

CAUÊ GIOVANI KAUYA
KAMILA KARSTEN
NICHOLAS DA GAMA TANAKA GUERREIRO
SABRINA HEMKEMEIER ILHA
SARAH SERAFIM KLEIMMANN
YAN PHELPE FREIRE
YASMIN ANACLETO GOMES

**EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA VEGETAL DA ORA-PRO-NOBIS (*PERESKIA
ACULEATA MILLER*) E AVALIAÇÃO DE SUA CAPACIDADE PREBIÓTICA**

JARAGUÁ DO SUL
2018

CAUÊ GIOVANI KAUYA
KAMILA KARSTEN
NICHOLAS DA GAMA TANAKA GUERREIRO
SABRINA HEMKEMEIER ILHA
SARAH SERAFIM KLEIMMANN
YAN PHELPE FREIRE
YASMIN ANACLETO GOMES

**EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA VEGETAL DA ORA-PRO-NOBIS (*PERESKIA
ACULEATA MILLER*) E AVALIAÇÃO DE SUA CAPACIDADE PREBIÓTICA**

Projeto de pesquisa desenvolvido no eixo formativo diversificado “Conectando Saberes” do Curso Técnico em Química (Modalidade Integrado) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina - Câmpus Jaraguá do Sul.

Orientadora: Débora Martins Martinez

Coordenadora de Fase: Ana Paula Centurião

JARAGUÁ DO SUL

2018

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem aproximada das bactérias <i>Bacillus clausii</i> (1.500x)	10
Figura 2: <i>Pereskia aculeata</i> Miller	10
Figura 3: Teor de aminoácidos por 100 g de proteínas da folha de ora-pro-nobis	11
Figura 4: Estrutura genérica das proteínas	12
Figura 5: Estrutura geral dos aminoácidos	13
Figura 6: Fluxograma das etapas do processo de extração da proteínas vegetais	18
Figura 7: Etapas para a avaliação da capacidade prebiótica do extrato proteico	21
Figura 8: Semeadura de <i>Bacillus clausii</i>	22

SUMÁRIO

1 TEMA	4
2 DELIMITAÇÃO DO TEMA	4
3 PROBLEMA	4
4 HIPÓTESES	5
5 OBJETIVO GERAL	5
5.1 Objetivos específicos	5
6 JUSTIFICATIVA	5
7 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
7.1 Prebiótico e probióticos	7
7.1.1 Efeitos de prebióticos na saúde humana	8
7.1.2 Bacillus clausii	9
7.2 Ora-pro-nobis	10
7.3 Proteínas	11
7.3.1 Aminoácidos e peptídeos bioativos	12
7.4 Métodos de extração de proteínas vegetais	14
8 METODOLOGIA	15
8.1. Extração de proteínas	15
8.2. Análise quantitativa de proteínas	18
8.2.1 Método de Lowry	18
8.2.1.1 Reagentes e procedimento	19
8.2.2 Tratamento de resíduos gerados no processo de extração proteica	21
8.3. Avaliação da propriedade prebiótica do extrato proteico	21
8.3.1 Cultivo de Bacillus clausii	22
8.3.2 Análise quantitativa do crescimento microbiano	23
8.3.3 Tratamento de resíduos gerados	24
9 CRONOGRAMA	24
REFERÊNCIAS	25

1 TEMA

Extração de proteína vegetal e avaliação de sua capacidade prebiótica.

2 DELIMITAÇÃO DO TEMA

Extração de proteínas da ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) e avaliação da sua capacidade prebiótica no crescimento de *Bacillus clausii*.

3 PROBLEMA

Segundo Tortora (2012), apenas um número minoritário das bactérias conhecidas são patogênicas. A maior parte das bactérias endógenas possuem efeitos favoráveis ao hospedeiro e seus processos bioquímicos. Desta maneira, as pesquisas sobre proliferação e restrição da reprodução de bactérias ganham destaque. Todavia, o uso de medicamentos antibacterianos¹ afeta não somente bactérias patogênicas, mas também torna-se nocivo para bactérias que beneficiam o corpo humano. Este contexto ocasiona o aumento da resistência bacteriana, problemática elevada a nível mundial nos últimos anos. Assim, a grande maioria dos microrganismos que é benéfica, é desvalorizada em relação à minoria patogênica.

A importância das bactérias benéficas é notada no sistema digestivo humano através da microbiota, composta por 400 à 1000 espécies de microrganismos (BEDANI, ROSSI, 2009) que atuam principalmente nos processos imunomodulatórios e na obtenção de vitaminas para o organismo. O uso de antibióticos afeta a microbiota, desequilibrando a relação entre hospedeiro-microrganismos, cuja recuperação demanda tempo de acordo com cada organismo (THUSRBY; JUGE, 2017). Uma das possíveis soluções para esta situação é a ingestão de prebióticos que, conforme Bruzzese *et al* (2006), são alimentos resistentes à digestão, capazes de estimular seletivamente o crescimento/atividade de determinadas bactérias². Desta maneira, prebióticos associados a outras medidas são estudados como uma possível solução para problemas intestinais - como a super inflamação do intestino e complicações de infecções (MANZANARES; HARDY, 2008).

¹ Dentre o espectro dos medicamentos antimicrobianos estão listados remédios como antifúngicos, antibióticos, antivirais, antimaláricos e anti-helmínticos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), 2018).

² “Prebiotics are non-digestible foods able to selectively stimulate the growth/activity of a limited number of colonic bacteria” (BRUZZESE *et al*, 2006, p. S283).

No mesmo período de formação deste contexto, a ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata Miller*), surge como uma planta desconhecida, a qual se destaca como contentora de altos teores de proteína, sendo incluída na alimentação de pessoas que buscam usufruir de seu valor nutritivo. Visto a importância vital das proteínas no metabolismo bacteriano e a ocasional desvalorização de bactérias benéficas, a questão proposta é: as proteínas extraídas da ora-pro-nobis possuem atividade prebiótica?

4 HIPÓTESES

- O processo de extração proteica através do método de precipitação por ajuste do pH é eficiente;
- A extração empregando um ácido inorgânico resultará em uma proteína que terá menor efeito prebiótico, quando comparada ao mesmo processo utilizando o ácido orgânico.
- O extrato proteico da ora-pro-nobis favorece o crescimento de bactérias *Bacillus clausii*, caracterizando um efeito prebiótico.

5 OBJETIVO GERAL

Extrair as proteínas das folhas da ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata Miller*) e analisar sua capacidade prebiótica.

5.1 Objetivos específicos

- Extrair as proteínas da ora-pro-nobis a partir do método de extração induzida pela precipitação com variação de pH;
- Estimar a concentração de proteínas do extrato da ora-pro-nobis;
- Avaliar as propriedades prebióticas *in vitro* do extrato proteico da ora-pro-nobis.

6 JUSTIFICATIVA

O conceito de prebióticos surge em 1995, definido pela primeira vez por Gibson & Roberfroid, sendo posteriormente alterado de acordo com os avanços na área. A recente aparição de pesquisas que abordam o assunto traz à tona a necessidade de estudos voltados para o tema, pois muitos dos dados existentes relacionados à utilização de prebióticos são provenientes de pequenos estudos clínicos e não possuem dados claros, devido a sinergia que

envolve o assunto (MANZANARES; HARDY, 2008). Todavia, com as pesquisas desenvolvidas é de conhecimento que parte dos principais prebióticos existentes podem ser produzidos sinteticamente, enquanto outros são encontrados em fontes naturais (PARRACHO; MCCARTNEY; GIBSON, 2007).

O atual contexto favorece o estudo de prebióticos de origem natural, visto que há uma crescente discussão e interesse pelas dietas vegetarianas, sendo que estas têm ganhado espaço há pelo menos dois séculos. No Brasil, a primeira entidade relacionada ao assunto surge em 2003, sob o nome de Sociedade Vegetariana Brasileira (SVB) (FERRIGNO, 2012), denotando o aumento do interesse do brasileiro em alternativas ao consumo da carne. Isto por sua vez, gera curiosidade a respeito de plantas utilizadas como fonte de proteínas na dieta, antes desconhecidas pela maioria da população. Dentre estas espécies vegetais encontra-se a *Pereskia aculeata* Miller.

Popularmente denominada ora-pro-nobis, esta planta possui em sua composição um teor proteico significativo que, segundo Queiroz (2012), corresponde a aproximadamente 25% da matéria seca. Neste aspecto, os teores de aminoácidos essenciais presentes nas folhas da planta são majoritariamente superiores aos valores recomendados para crianças de oito a dez anos, adolescentes e adultos pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO). Em três estudos analisados, apenas os aminoácidos sulfurados (metionina e cistina) não atingem a recomendação estabelecida pela FAO igualmente em todas as pesquisas³ (TAKEITI, 2009). O fácil acesso, manejo e distribuição no Brasil, fez com que a ora-pro-nobis fosse adotada como fonte de nutrientes - principalmente proteínas - para a alimentação animal e humana, sendo nesta última popularizada na dieta de pessoas de baixa renda (ARAÚJO; JOAQUIM, 2008). Esta alcunha provém também da facilidade do cultivo e propagação, favorecidos pela demanda hídrica moderada além de baixos índices de doenças relacionados à planta. Deste modo, a ora-pro-nobis apresenta cultivo doméstico simples e de baixo custo (MADEIRA; SILVEIRA, 2010; *apud* RIBEIRO et al, 2014), tornando-a um objeto de estudo propício.

³ Isto é observado através da fórmula: aminoácido em 1 g de proteína/escore padrão FAO. Os estudos apresentam diferenças nos cálculos: a fórmula pode ser multiplicada pelo fator 100 para alterar a unidade de medida do resultado obtido e além disso, é possível considerar a variável da digestibilidade proteica das amostras utilizadas (ZEM *et al*, 2017; SILVEIRA, 2016; TAKEITI *et al*, 2009). Evidencia-se que ocorreram mudanças nas convenções estabelecidas para os aminoácidos (recomendações e fórmulas) (FAO, 2013). Entretanto, nas pesquisas encontradas que analisam o teor de aminoácidos da ora-pro-nobis, observou-se apenas o uso da fórmula supracitada.

Em vista das informações apresentadas acima, o contexto é favorável ao estudo da capacidade prebiótica do extrato proteico da *ora-pro-nobis*. Além disso, a ascensão da química verde⁴ incrementa a relevância do tema - visto o uso de matéria-prima vegetal como alternativa prebiótica -, possibilitando assim, a realização de uma pesquisa que preze o cuidado com o meio ambiente ao longo de sua execução. De modo semelhante, distancia-se do pré-conceito de bactéria como um ser vivo prejudicial aos demais seres, ao mesmo tempo em que se evidencia o importante papel das bactérias, seja para o ser humano ou para outros seres vivos.

7 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

7.1 Prebiótico e probióticos

Os probióticos, com derivação grega “pró-vida”, são apresentados como o contraponto dos antibióticos. Definidos em 2011 pelo painel conjunto da Organização Mundial da Saúde (OMS) e a FAO: “microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (SAAD, Susana Marta Isay, 2006). Inicialmente o uso de probióticos era diretamente aplicado a alimentos que possuem alto valor nutricional ao consumidor, pois atribuem uma fácil absorção de nutrientes ao organismo. Contudo, ao passar dos anos, foi observado que há um maior impacto de utilização dos probióticos em exercer o benefício de microrganismos presentes no trato digestivo de animais.

Juntamente aos probióticos, os prebióticos, são compostos orgânicos que constituem os alimentos funcionais⁵, com fins de atuar de forma específica na saúde do hospedeiro. Ao final da século passado houve uma introdução a caracterização dos prebióticos, contudo, no presente momento não existe uma definição própria que indique completamente o que é um prebiótico, o conceito vigente aplicado em 2010 pela Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) (GIBSON et al., 2011):

“Prebióticos alimentares são ingredientes seletivamente fermentados, que resultam em alterações específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, assim proporcionando benefícios para a saúde do hospedeiro”.

⁴ “A invenção, design e aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas” (ANASTAS; WARNER; 1998, s/p *apud* TUNDO *et al*; 2000; p. 1210).

⁵ Alimento funcional é todo aquele que além de possuir características nutritivas, expõem ações de benfazejo e fisiológicas a saúde do consumidor.

7.1.1 Efeitos de prebióticos na saúde humana

A microbiota intestinal consiste em um sistema de elevada complexidade, compreendendo um grupo com mais de 1000 bactérias distintas, principalmente anaeróbicas, que colonizam o intestino. (PAIXÃO e CASTRO, 2016 *apud* GUARNER, 2007; BARBOSA et al., 2010). Na microbiota humana sumamente encontram-se três tipos de microrganismos, classificados como mutualistas⁶, comensais⁷ e oportunistas⁸. A proporção destes no intestino interfere diretamente na saúde do hospedeiro. Neste sentido, uma composição intestinal saudável apresenta, majoritariamente, microrganismos mutualistas e comensais (SANTOS et al., 2017 *apud* CÂNDIDO; TUNON; CARNEIRO, 2009).

Por sua vez, a composição da microbiota humana pode ser alterada drasticamente por fatores externos, tais como: o tipo de parto/aleitamento, genética, sistema imune, idade, estilo de vida/alimentação e uso de antimicrobianos. (PAIXÃO e CASTRO, 2016 *apud* PENNA; NICOLI, 2001; BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006). E, inclusive, por fatores internos; considerando-se a não interação mutualista entre os microrganismos, o epitélio⁹ e os tecidos intestinais, que resulta em um desequilíbrio imunológico que potencializa o desenvolvimento de patologias no hospedeiro (PAIXÃO e CASTRO *apud* GUARNER, 2007).

Os benefícios a saúde humana advindos do consumo de prebióticos associam-se diretamente a microbiota intestinal, a qual atua na homeostase¹⁰ do hospedeiro. Por sua vez, bactérias do TGI¹¹ participam ativamente das funções antimicrobiana/proteção, imunomoduladora¹², nutricional e metabólica. (PAIXÃO e CASTRO, 2016 *apud* WALL et al., 2009). Segundo Cândido, Tunon e Carneiro (2009) a microbiota também atua na digestão, síntese e excreção de vitaminas, produção de anticorpos naturais, combate a bactérias patogênicas, resposta imune e alérgica, etc. (SANTOS et al., 2017). Os prebióticos estimulam o crescimento de bactérias do gênero *Lactobacillus e Bifidobacterium*, as quais atuam na melhora da mobilidade intestinal e no esvaziamento gástrico.(PAIXÃO e CASTRO, 2016 *apud* GRITZAND; BHANDARI, 2014). Ademais, pesquisas indicam o

⁶ Mutualistas são os microrganismos que protegem o hospedeiro, pois produzem nutrientes importantes e colaboram para o crescimento e desenvolvimento do sistema imunológico.

⁷ Comensais são os microrganismos que mantêm associações sem benefícios ou malefícios detectáveis, sendo estas associações neutras.

⁸ Oportunistas são os microrganismos que causam doenças em indivíduos com o sistema imune comprometido.

⁹ É um dos principais tecidos do corpo, sendo responsável pelo revestimento da superfície externa, bem como cavidades internas do corpo humano.

¹⁰ Estado de equilíbrio das diversas funções e composições químicas do corpo humano.

¹¹ Trato gastrointestinal.

¹² Melhora da resposta imune do organismo.

expressivo papel dos mesmos na absorção de minerais, em especial de cálcio, ferro e magnésio (ILSI, 2013).

Estudos sobre ação simbiótica de pre/probióticos sumamente destacam a melhora das funções intestinais; o possível emprego no tratamento de quadros clínicos mais graves, tais como: DII¹³, SII¹⁴ e câncer de cólon; a melhora do sistema imunológico, que confere maior resistência a infecções intestinais e respiratórias (ILSI, 2013).

7.1.2 *Bacillus clausii*

A *Bacillus clausii* é uma bactéria anaeróbica, gram positiva e em forma de bastonete como apresentado na Figura 1. Foi bastante utilizada na Itália na década de 1960 para conter as diarreias virais em crianças e para efeitos colaterais relacionados a antibióticos (NISTA et al., 2004). Atualmente, a bactéria pode ser encontrado em alimentos, suplementos alimentares, nutracêuticos e medicamentos de venda livre, em função de seu efeito probiótico. Os probióticos, são microorganismos que auxiliam na flora intestinal que está naturalmente presente no corpo humano. A *Bacillus* é usada no seu estado de “dormência” ou vegetativa, chamado esporo, possuindo a vantagem de sobreviver intacta na sua passagem pelo estômago (COELHO, 2013; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA, 2011). Por isso, a bactéria necessita de uma condição de temperatura ótima para o seu crescimento, a qual deverá ser entre de 30 e 45°C (SOUZA, 2008).



¹³ Doença inflamatória do intestino - (DII).

¹⁴ Síndrome do intestino irritável.

Figura 1: Imagem aproximada das bactérias *Bacillus clausii* (1.500x)

Fonte: RABINOVITCH; DE OLIVEIRA, 2015.

7.2 Ora-pro-nobis

A *Pereskia aculeata* Miller é uma cactácea que possui folhas verdadeiras e potencial para uso alimentar como hortaliça, sendo uma fonte de nutrientes orgânicos e elementos minerais. Vegetais deste gênero tem ganhado espaço por suas propriedades nutricionais, e do mesmo modo esta tem despertado o interesse científico em relação à busca por novos compostos bioativos (CASTRO; SCIO, 2014). É considerada uma hortaliça não convencional, pela produção praticamente limitada ao cultivo doméstico, embora haja incentivo do Governo Federal para que seja inserida na dieta dos brasileiros devido a sua composição.

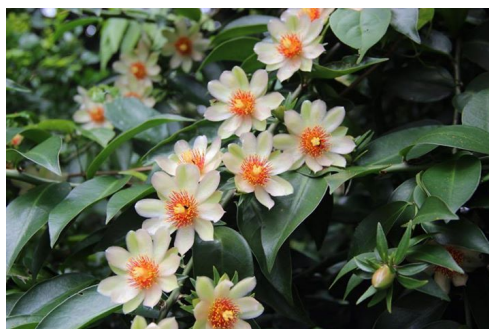


Figura 2: *Pereskia aculeata* Miller

Fonte: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, s/d.

As folhas dessa espécie apresentam em sua composição um elevado conteúdo hídrico, entre 85% e 90%, como a maioria dos vegetais folhosos (SILVEIRA, 2016 *apud* BANGASH et al., 2011; JAN et al., 2011; ODHAV et al., 2007; TAKEITI et al., 2009). Com a retirada do conteúdo hídrico temos uma rica composição de nutrientes fundamentais, sendo que de acordo com dados baseados em Megguer (2016), em 100 g de folhas da ora-pro-nobis são observados elevados teores de carboidratos (38,2%), proteínas (21,4%), cinzas (21,3%), fibra alimentar (9,5%), lipídios (9,4%), minerais (0,019%) e vitaminas (A, C e do complexo B) - com teores não identificados devido a apresentar apenas vestígios -. Estes valores tornam a ora-pro-nobis uma fonte alimentícia e funcional promissora, podendo variar conforme a espécie vegetal cultivada, o tipo de solo e as demais condições de plantio (SILVEIRA, 2016 *apud* MERCÊ et al., 2001b; ODHAV et al., 2007; SOUSA et al., 2014).

Tendo em foco a extração de proteínas da folha de ora pro-nobis, apresentamos a seguir no Figura 3 os teores de aminoácidos, levando em conta que uma proteína é em maior quantidade composta deles.

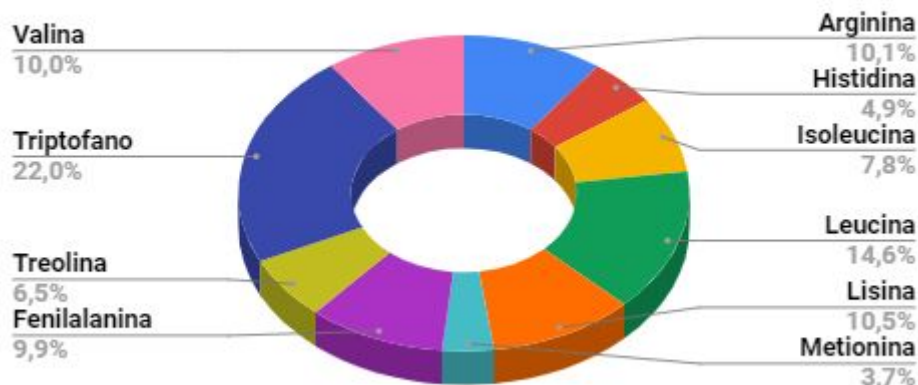


Figura 3: Teor de aminoácidos por 100 g de proteínas da folha de ora-pro-nobis

Fonte: QUEIROZ, 2012 (adaptado).

7.3 Proteínas

A palavra proteína vem do grego *protos, prōteios*, - primeiro, de primeira classe -, e do latim *ina*, substância fundamental (SIMÕES *et al.*, 2014). Tais palavras coincidem com o caráter indispensável das proteínas para o ser humano, já que essas são uma substância de extrema importância para o funcionamento e desenvolvimento do organismo de um ser vivo. As proteínas são macromoléculas, constituídas por uma sequência de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas que ocorrem entre um grupo amino ($-NH_2$) de um aminoácido com um grupo carboxílico ($-COOH$) de outro aminoácido. Estes são constituídos por quatro principais elementos, sendo eles carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, incluindo em alguns casos também enxofre e fósforo.

O que diferencia as proteínas é a sequência dos aminoácidos na cadeia. Essa cadeia é classificada de quatro formas: primária, secundária, terciária e quaternária, como apresentado sua estrutura na Figura 4, podendo ainda serem diferenciadas de com a forma pela qual estes aminoácidos estão ligados entre si e a quantidade destes presente na cadeia.

O que diferencia os aminoácidos é a cadeia lateral - representada na Figura 5 por R -, sendo a formação desta responsável por características peculiares a cada aminoácido, como a existência de propriedades relacionadas a ácidos e bases (BETTELHEIM *et al*, 2012). Além disso, em quase todos os aminoácidos comuns se observa que o grupo R possui uma composição diferente se comparada aos outros ligantes - que por sua vez se diferem entre si -. Isto possibilita a existência de isômeros ópticos: moléculas orgânicas de mesma fórmula molecular que, porém, refletem luz em direções diferentes, visto diferenças no arranjo espacial. Em aminoácidos, existe apenas um centro quiral, o que possibilita a existência de dois isômeros ópticos: R e S (D e L). A única exceção desta característica é a glicina que, por apresentar um hidrogênio na cadeia lateral, possui então dois hidrogênios ligados a cadeia principal, descartando a possibilidade da existência de isômeros ópticos. Mesmo assim, os aminoácidos existentes na natureza são majoritariamente classificados como estereoisômeros L, sendo rara a presença de estereoisômeros D (NELSON; COX, 2014).

Uma possível classificação dos aminoácidos é o agrupamento de acordo com aspectos da cadeia lateral. A lisina ($C_6H_{15}O_2N_2$) por exemplo, é um aminoácido básico visto a carga positiva existente na cadeia lateral, ao contrário do ácido glutâmico ($C_5H_9O_4N$), que possui características ácidas. Em relação às funções biológicas dos aminoácidos nos corpos, esses são classificados em: essenciais; não-essenciais; e funcionais. Os aminoácidos essenciais são o subgrupo em que se encontram aminoácidos que não podem ser sintetizados no corpo humano, são sintetizados de modo inadequado ou ainda que não são produzidos em quantidade suficiente pelo organismo. Os aminoácidos não-essenciais são caracterizados pela possibilidade de serem sintetizados pelo corpo humano em quantidades adequadas. Uma nova categoria surgiu nos últimos anos, os aminoácidos funcionais: importantes participantes da regulação de processos químicos relacionados ao âmbito da reprodução, crescimento, imunidade, etc. que ocorrem no organismo (WU, 2009).

De modo geral, o papel dos aminoácidos no microorganismo é intrínseco a função das proteínas e peptídeos, visto ser o aminoácido a subunidade formadora destes. Além disso, aminoácidos também constituem “coenzimas, hormônios, ácidos nucleicos e outras moléculas essenciais para o funcionamento do organismo” (MARCHINI *et al*, 2016, p. 14). Com relação a atividade prebiótica relacionada a aminoácidos, são poucas as pesquisas que exploram tal relação. Entretanto, estudos apontam que o processo catabólico de aminoácidos essenciais em porcos pode estar relacionado a atividade de bactérias presentes no intestino

delgado (FULLER; REDES, 1998, *apud* WU, 2009). Desta forma, prebióticos - ou antibióticos - agregados a alimentação seriam a causa do melhor uso de aminoácidos em funções biológicas dos porcos, como crescimento e deposição proteica (DENG *et al*, 2007; KONG *et al*, 2008, *apud* WU, 2009).

A importância crítica correlacionada a considerável versatilidade levou estudiosos a buscarem por métodos de extração que viabilizassem o aproveitamento das características de proteínas e respectivas subunidades. Entretanto, suas respectivas complexidades são notáveis. Sendo assim, faz-se necessário a descrição de algumas metodologias voltadas para o processo de extração proteica vegetal, de modo a criar familiaridade com as variáveis que podem afetar a extração e conseqüentemente, a presente pesquisa.

7.4 Métodos de extração de proteínas vegetais

Há diversos processos na bibliografia que descrevem a extração de proteínas. Estes visam a extração proteica para outros fins como quantificar sua concentração, determinar os aminoácidos presentes nesta, medir sua atividade enzimática, ou mesmo para determinar a estrutura tridimensional de uma proteína (MAGALHÃES, 2008). Estes objetivos, podem ser alcançados após a extração com métodos como Lowry, Bradford, por cromatografia, entre outros. Contudo, para que haja precisão em análises que se seguem a extração, esta deve seguir alguns procedimentos fundamentais: o rompimento celular, inativação ou remoção de interferentes e a solubilização das proteínas.

O rompimento celular se constitui na separação dos produtos intracelulares presentes na molécula, ou seja, recuperando estes. Estes produtos intracelulares dificultam o processo de purificação de biomoléculas, por isso sendo necessário o rompimento celular. Este rompimento pode ser alcançado por métodos físicos ou químicos, dependerá da natureza das células em questão; as células de microrganismos ou de tecidos de plantas requerem meios mais drásticos para a lise celular¹⁵, contudo células de mamíferos ou organelas celulares como a mitocôndria, exigem procedimentos mais amenos (MAGALHÃES, 2008). Por fim, segundo Leitão (2017) alguns métodos que propõem o rompimento celular são: ultrassom, choque osmótico, congelamento, solventes, moagem, autoclavagem, entre outros.

¹⁵ Lise celular é o processo de ruptura ou dissolução da membrana plasmática, ou da parede bacteriana, que leva à morte da célula e à liberação de seu conteúdo.

A remoção de interferentes se baseia na idéia de remover compostos - depois ou durante o rompimento celular - como proteases¹⁶, sais, ácidos nucléicos, polissacarídeos¹⁷, fenóis, ligninas¹⁸, pigmentos, entre outros. Exemplos de meios para fazer isso é, portanto, adicionar inibidores de proteases, ou até mesmo inativar as proteases com valores de pH baixo (MAGALHÃES, 2008).

No que concerne à solubilização das proteínas, após o rompimento celular e a remoção de interferentes, estes polipeptídeos precisam ser solubilizados, ou dependendo da finalidade da análise, desnaturados e reduzidos para romper as interações intra e inter-moleculares (MAGALHÃES, 2008). Para a solubilização das amostras são comumente utilizados compostos caotrópicos¹⁹ - como uréia ou tiouréia - detergentes não iônicos, anfólitos, agentes redutores, ou inibidores de protease (dependendo do tipo da amostra).

Estes procedimentos ocorrem todos durante os métodos de extração de proteínas vegetais, ou em demais tipos de análise que visem objetivos similares. Por fim, segundo a bibliografia, alguns exemplos de metodologias de extração podem ser a eletroforese, cromatografia, extração líquido-líquido, por diferença de pH, entre outros exemplos. Logo, é importante citar que a metodologia utilizada para este projeto será mais abordada no tópico 8.1.2.

8 METODOLOGIA

8.1. Extração de proteínas

Esta pesquisa fará uso das folhas da planta ora-pro-nobis, estas que segundo Girão et al. (1997) apresentam maior quantidade de proteína bruta - aproximadamente 10 vezes mais -, quando comparadas ao caule. A ora-pro-nobis que será utilizada não passará pelo processo de tratamento prévio, visto que esta não possui muitos lipídios em sua composição. Os pontos de coleta disponíveis para obtenção da planta serão as residências de componentes do grupo, conjuntamente à obtenção da ora-pro-nobis - adquirida comercialmente -, folhas

¹⁶ Segundo Iberoquímica magistral, a protease é uma enzima capaz de quebrar (hidrolisar) ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas.

¹⁷ Segundo Fragal et al. (2016), os polissacarídeos são carboidratos muito encontrados na natureza, eles podem ser descrito como polímeros de alta massa molecular, pois são formados pela união de mais de dez monossacarídeos através de ligações glicosídicas.

¹⁸ Segundo Saliba et al. (2001), a lignina é um polímero de natureza aromática, com alto peso molecular e que está ligada aos polissacarídeos da madeira. É responsável pela resistência mecânica de vegetais, entre outras funções.

¹⁹ Segundo o Dicionário Oxford, caotrópico é uma palavra que designa uma molécula ou substância que quebra as ligações de hidrogênio, especialmente com o efeito de desordem da estrutura de proteína e membranas.

trituras com aspecto de farinha em pó. Sendo que a segunda mencionada será utilizada como alternativa durante a execução do projeto.

Existem diversas metodologias empregadas na indústria que visam a extração proteica de espécies vegetais como o processo de extração por concentração salina, cromatografia, eletroforese, processo de extração pelo potencial hidrogeniônico, etc. A metodologia escolhida pelo grupo para um estudo mais aprofundado foi o processo de extração de proteínas por precipitação induzida por variações do pH das amostras, devido à maior acessibilidade e relação custo benefício favorável para processos industriais.

8.1.2 Extração por precipitação induzida por variações de pH

Para os testes de extração proteica, esta ocorrerá por meio de precipitação induzida por variação de pH. Desta extração, resultará, por fim um precipitado de proteínas que será posteriormente quantificado pela seguinte etapa da metodologia: o método de quantificação baseado na metodologia proposta por Lowry (1951). Esta primeira parte da metodologia pode ser melhor visualizada na Figura 6.

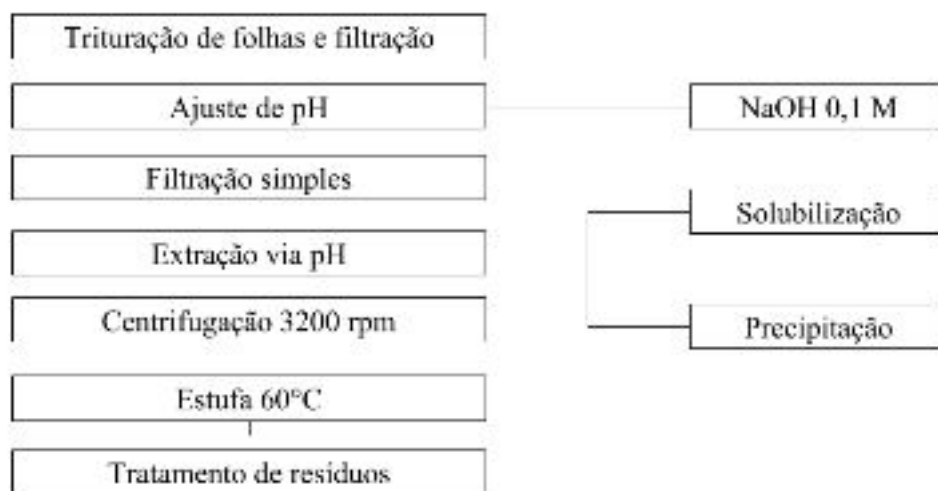


Figura 6: Fluxograma das etapas do processo de extração da proteínas vegetais

Fonte: Acervo pessoal.

A metodologia por potencial hidrogeniônico se baseia no conhecimento do ponto isoelétrico das proteínas da amostra. Segundo Derenzo e Aldeia (2000), o ponto isoelétrico (pI) é o pH onde as cargas negativas e positivas se encontram iguais - carga zero - e solubilidade mínima. A maioria das proteínas apresentam um ponto isoelétrico dentro de 4,5

e 6,5 (FERRI, 2006 *apud* SGARBIERI, 1996), contudo para esta metodologia serão produzidos testes para que haja um pI específico a ser utilizado.

Normalmente nesta extração, para que haja a precipitação das proteínas usam-se duas soluções: básica e ácida. A solução básica é primordialmente empregada com o objetivo de solubilizar as proteínas presentes no pó das folhas, seguidamente utilizando-se uma solução ácida para que o pH sofra uma diminuição para 4 a 5, fazendo este se precipitar e formar um coágulo proteico. As soluções utilizadas pelo grupo serão de hidróxido de sódio (NaOH), e ácido clorídrico (HCl), respectivamente.

O pH no qual ocorre maior precipitação das proteínas será determinado baseando-se no método proposto por Ferri (2006) *apud* Glória *et al.* (2000). As folhas de ora-pro-nobis serão trituradas com equipamentos de uso doméstico, ou com moinho de facas - disponível no laboratório -, sendo que a proporção de folhas para água deionizada será de 1:20 (m/v), ou seja, as quantidades utilizadas serão respectivamente 50 g de folhas desidratadas e 1000 mL de água deionizada. O pressuposto extrato aquoso será e quando finalizado o processo, a parte fibrosa da planta será removida pelo processo de filtração por papel filtro.

A faixa de pH abrangida para a primeira etapa do processo - obtenção do pI - será de 2 à 12, sendo que para cada uma destas será utilizado 50 mL de suco. O pH será ajustado, primeiramente após 15 minutos e, depois a cada hora - durante três horas -, por fim as soluções serão deixadas na centrífuga por cinco minutos a 3200 rpm²⁰ para que ocorra a separação da proteína precipitada e da solução sobrenadante. Durante o processo se analisará quais das seguintes soluções teve maior índice de precipitação - análise visual - e o pH que satisfazer este quesito será utilizado para seguir com o processo de extração.

Novamente o processo de extração procederá com a supracitada trituração das folhas. Antes da filtração o extrato das folhas terá seu pH ajustado para 8,0 com NaOH 0,1 mol L⁻¹, para a solubilização das folhas. Depois de filtrado, o liquidificador será lavado com 100 mL de água deionizada e o extrato líquido obtido deste será filtrado e adicionado ao primeiro, para que aumente a quantidade de amostra útil a ser analisada. Após isso o pH será ajustado para um pH entre 4,5 à 6,5 (valor da literatura) com HCl 0,1 mol L⁻¹, seguidamente sendo deixado em repouso por 5 horas a 4 °C, para que ocorra a precipitação. Posteriormente a isso a amostra será centrifugada por 3200 rpm durante 10 minutos para que ocorra a formação de duas alíquotas - proteínas e sobrenadante. Ao final, o precipitado será mantido na estufa, na

²⁰ Rotação por minuto.

temperatura de 60 °C por aproximadamente 10 h, destacando-se que o tempo que a amostra permanecerá na estufa dependerá de quanto tempo esta levará até atingir uma massa constante. Ao final a proteína será retirada da estufa e a massa será quantificada. A metodologia de extração pode ser representada pelo fluxograma, na Figura 6.

8.2. Análise quantitativa de proteínas

Dos diversos métodos propostos ao longo dos anos para a determinação da quantidade de proteínas totais, para este projeto optou-se pelo método de Lowry. Apesar de não existir uma metodologia padronizada e única para o método para este tipo de análise, o método de Lowry foi escolhido pelo grupo pois este se apresentou mais acessível e, ademais segundo Lowry (1951), este é o método mais utilizado para determinação do objeto em questão - as proteínas.

8.2.1 Método de Lowry

O método em questão se baseia na adição de molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin Ciocalteu), este que sofre uma redução quando reage com as proteínas na presença do cobre (Cu^{2+}), que atua como catalisador, sendo que ao final forma-se um composto em absorção de 750 nm. Ao longo de quatro horas após a adição de ácido fosfórico a cor da amostra tem a tendência de sofrer alterações (SANTOS, 2012 *apud* POMORY, 2008).

Pesquisas já desenvolvidas trazem pequenas modificações a este método devido a interferentes presentes nas amostras que são fotossensíveis - (SANTOS, 2012), o RNA, a melatonina, entre outros (ZAIA et al., 1998).

8.2.1.1 Reagentes e procedimento

Para a efetivação do método serão utilizados quatro reagentes:

- Albumina bovina 1 mg/mL
- Solução de Folin ciocalteu 1 mol L⁻¹;
- Reativo A: solução hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L⁻¹ com carbonato de sódio (Na_2CO_3) 2%;
- Reativo B: solução com partes iguais de B₁ - sulfato de cobre (CuSO_4) - 2%; e B₂ - tartarato de sódio e potássio (tartarato de Na e K) - 2% . É aconselhável que o reativo

B₁ seja armazenado em frasco âmbar e o reativo B₂ seja armazenado em frasco de plástico.

- Reativo C: 50 partes do reativo A para 1 parte do reativo B.

No que remete ao procedimento, observa-se uma representação do processo na Figura 7.

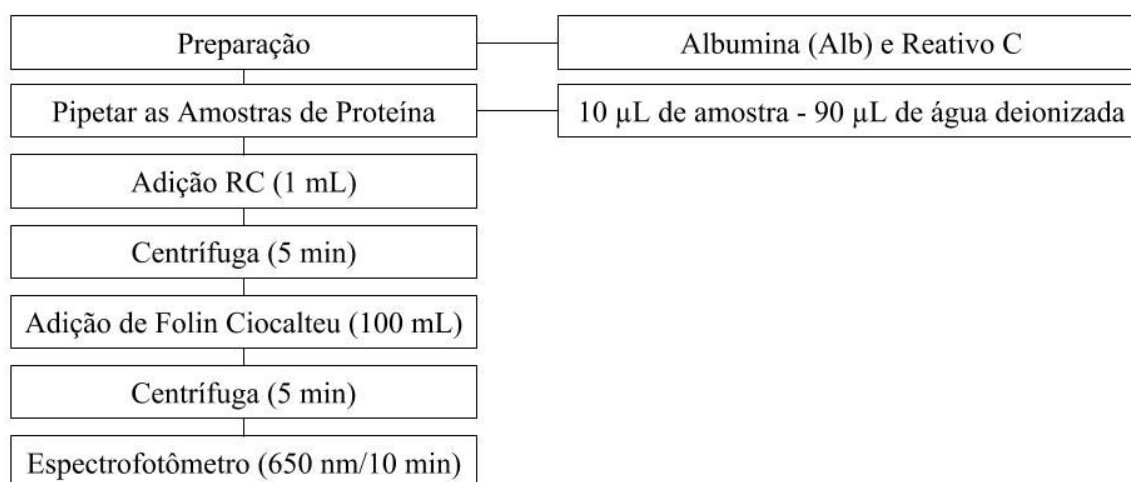


Figura 7: Metodologia de quantificação proteica

Fonte: Baseado em SPEROTTO, 2014.

Os volumes a serem utilizadas no reativo C devem ser adicionadas, respectivamente na ordem de A, B₁ e B₂, sendo que a solução deve ser preparada na hora que será usada e deve ser armazenada em frasco âmbar. Na Tabela um podem ser observados valores que podem vir a ser utilizados.

Tabela 1: Volumes a serem utilizados para a preparação do reativo C

Volume A	Volume B
20 mL	0,4 mL = 200 µL B ₁ + 200 µL B ₂
30 mL	0,6 mL = 300 µL B ₁ + 300 µL B ₂
40 mL	0,8 mL = 400 µL B ₁ + 400 µL B ₂
50 mL	1,0 mL = 500 µL B ₁ + 500 µL B ₂
100 mL	2,0 mL = 1.000 µL B ₁ + 1.000 µL B ₂

Fonte: SPEROTTO, 2014.

No que concerne ao processo, primeiramente serão identificados os vinte e quatro tubos que virão a ser utilizados, os quais seis irão conter a albumina bovina - padrão - e os outros dezoito tubos conterão as amostras de proteína. Seguidamente a albumina será descongelada, e se procederá a preparação do reativo C - a quantidade necessária para o número de amostras, mais a albumina.

A albumina bovina será utilizada para que haja um valor padrão, para que o valor obtido da proteína então possa ser comparado com um resultado já enumerado na bibliografia. Com isso o passo seguinte é pipetar albumina bovina, com embasamento de valores nos testes realizados por Sperotto (2014). Decorrente a isso, irão ser pipetadas as amostras de proteína, este processo acontecerá em triplicata, sendo que em cada tubo serão adicionados 10 µL de amostra para 90 µL de água deionizada.

Ao final da preparação das amostras e da albumina, serão adicionados 1 mL do reativo C, em ambos, e após isso homogeneizar as soluções na centrífuga por cinco minutos e, ao final, deixá-las em repouso por 10 minutos. Por fim deverão ser adicionados 100 µL de Folin Ciocalteu nos tubos preparados, e novamente homogeneizar a solução do mesmo modo do procedimento anterior, contudo após a finalização estas - as amostras e a albumina - devem ser deixadas em repouso por vinte minutos em um ambiente escuro, visto que as amostras de proteína são fotossensíveis. A cor demandada após este procedimento se encontrará variante por até duas horas (SPEROTTO, 2014). Em conclusão, ambas as proteínas preparadas, com as devidas adições serão levadas ao espectrofotômetro e deixadas por 10 minutos, à 650 nm.

Os cálculos realizados irão se embasar nos cálculos produzidos por Sperotto, 2014, onde a priori a seguinte fórmula é inserida:

$$FCP = Q1 / A1$$

- FCP: Fator de calibração parcial;
- Q: Quantidade proteínas adicionadas;
- A: Absorbância.

Ao fim será calculado o Fator de Calibração Médio (FCM) - média entre o FCP. Para que o valor final de proteínas esteja em mg/mL procederá-se a seguinte fórmula:

$$Absorbância \times FCM \times 100 = mg/mL \text{ de proteína}$$

A metodologia descrita pode sofrer alterações durante o processo.

8.2.2 Tratamento de resíduos gerados no processo de extração proteica

A princípio, o resíduo remanescente do processo de extração de proteínas será uma solução ácida de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. No que remete a supracitada solução, será adicionada uma quantidade de hidróxido de sódio ou bicarbonato de sódio, alternativamente, sendo que esta escolha irá se basear no pH que será encontrado na solução. Com isso, pode se dizer que o tratamento de resíduos se baseará no princípio de neutralização. Por fim os resíduos remanescentes do processo de quantificação da proteína - método de Lowry - poderão ser tratados e descartados da mesma maneira.

8.3. Avaliação da propriedade prebiótica do extrato proteico

Para avaliar a propriedade prebiótica do extrato, serão realizados testes com culturas de bactérias do gênero *Bacillus*, onde se verificará a influência do extrato proteico no crescimento da população de bactérias. O procedimento pode ser sintetizado em um fluxograma, observado na Figura 7.

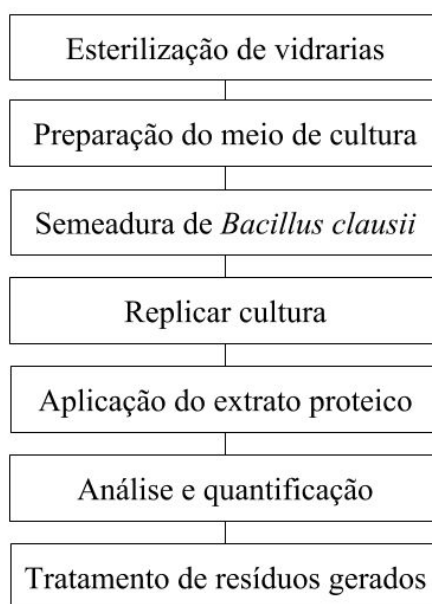


Figura 7: Etapas para a avaliação da capacidade prebiótica do extrato proteico

Fonte: Acervo pessoal.

Deste modo, optou-se por apresentar esta metodologia dividida em três partes: o processo de cultivo das bactérias a serem testadas, seguido pela inserção do extrato proteico nas culturas e o tratamento de resíduos.

8.3.1 Cultivo de *Bacillus clausii*

Para o cultivo serão utilizadas bactérias *Bacillus clausii* em suspensão adquiridas no comércio de Jaraguá do Sul - SC. Conforme as informações descritas pelo fabricante, os esporos de *Bacillus clausii* estão disponibilizados na concentração de $4,0 \times 10^8$ esporos/mL. As bactérias serão previamente ativadas visto que se encontram no estado de esporos. Sendo assim, realiza-se a ativação do *Bacillus clausii* com o meio Hektoen Enterei Agar²¹ em incubadora a 37 °C por 24 horas com agitação de 200 rpm (CRUZ *et al*, 2016), para posterior cultivo em placas de Petri e teste com o extrato proteico.

Primeiramente, é necessário definir o meio de cultura a ser adotado. Optou-se por seguir a recomendação fornecida pela *American Type Culture Collection* (ATCC), que relata o cultivo da espécie *Bacillus clausii* em ágar nutriente (AN) com pH 8,0 (2018). A preparação do AN é realizada através da mistura de 3 g de extrato de carne com 5 g de peptona e 15 g de ágar, que devem ser adicionados a 1000 mL de água, resultando no AN com pH 6,8 aproximadamente (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2013). Para obter o pH recomendado pela ATCC, será realizada a adição de NaOH. Para finalizar, garantindo a esterilidade do meio, realiza-se a autoclavagem em 121 °C na pressão de 1,5 atm por 20 minutos, conforme recomendado por Rabinovitch e Oliveira (2015).

Com o meio de cultura pronto, transfere-se de 20 mL de AN para placas de Petri estéreis, aguardando para solidificação do meio. Posteriormente se inicia o processo de semeadura de *Bacillus clausii*. Com o auxílio de um bico de Bunsen realiza-se a flambagem da alça de platina, que é então posta em contato com *Bacillus*, distribuídos em forma de estrias em uma placa de Petri (Figura 8).

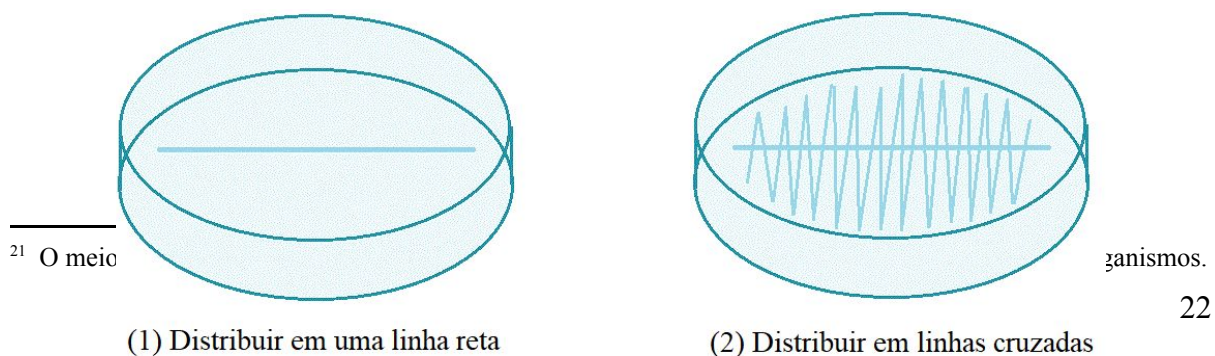


Figura 8: Semeadura de *Bacillus clausii*

Fonte: Acervo pessoal.

Posteriormente, ocorre a flambagem da alça de platina e o processo se reinicia, resultando na produção de três amostras. Após a realização da semeadura, as amostras são levadas para a estufa bacteriológica por 48 horas, na temperatura de 30° C. Posteriormente a esse período são feitas as réplicas das amostras, que são novamente inseridas em estufa bacteriológica.

8.3.2 Análise quantitativa do crescimento microbiano

Para realizar a análise quantitativa será utilizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs). O método se baseia na metodologia descrita na apostila do curso “*Quantificação e Identificação de Bacillus subtilis e Bacillus licheniformis*”, realizado pela Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE) em parceria com a Empresa Brasileira de Agropecuária (EMBRAPA) e com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

De modo a observar o efeito da adição do extrato proteico de *ora-pro-nobis*, serão realizadas diluições das amostras, para que a contagem de UFCs seja possibilitada. Assim, de acordo com os dados de EMBRAPA *et al*, produtos cujo número de UFC/g seja de 10^8 dever ser diluídos para a concentração 10^{-6} UFC/g. Portanto, tendo a massa de 10 g em um béquer de 100 mL, adiciona-se uma parte dos 90 g de água peptonada (AP). Posteriormente, realiza-se a transferência para um balão volumétrico de 200 mL, onde é adicionada a porção restante da massa supracitada. Com isto, têm-se a diluição 10^{-1} . Com o auxílio da micropipeta, são transferidos 1,0 mL desta solução para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de AP., formando a diluição 10^{-2} . Este processo é repetido por mais quatro vezes, de modo a obter a diluição 10^{-6} . Com a suspensão diluída pronta, são preparadas três placas de Petri com AN, que após solidificação são inoculadas com a suspensão, conforme descrito anteriormente. Após este procedimento, as amostras são mantidas em estufa bacteriológica por um período de 17 a 20 horas, na temperatura de 37 °C. Posteriormente, realiza-se a contagem visual de UFCs e o cálculo de UFC/mL de acordo com a seguinte fórmula, onde ocorre a multiplicação pelo fator dez visando a conversão de unidades:

$$UFC/mL = \text{número médio de colônias nas placas} \times \text{diluição utilizada nas amostras} \times 10$$

Com os valores de UFC/mL das amostras, realiza-se então a análise quantitativa, onde serão discutidos os supracitados valores. Caso se observe que as amostras contendo extrato proteico tenham obtido um maior número de UFC/mL é plausível supor que o dito extrato favorece a reprodução de bactérias, levando ao maior número de colônias observado. Em outro possível cenário observa-se menor valor de UFC/mL obtido para as amostras contendo o extrato. Logo, a inserção de extrato proteico no meio resulta no desfavorecimento do crescimento bacteriano. Finalmente, caso as amostras não apresentem diferenças consideráveis nos valores de UFC/mL, é razoável propor que o extrato proteico não afeta a reprodução bacteriana.

8.3.3 Tratamento de resíduos gerados

O descarte de resíduos baseia-se principalmente no *Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Hospitalar*, do Ministério da Saúde. Desta forma, será realizada a autoclavagem na temperatura de 121°C com pressão de 1,5 atm por 20 minutos dos materiais utilizados nos experimentos, sendo esses: “meios de cultura inoculados, meios de transporte, espécimes clínicos, swabs empregados na coleta, etc.” (BRASIL, 2000, s/p). Posteriormente, realiza-se o descarte dos materiais não-reutilizáveis - como os meios de cultura, por exemplo -, que são classificados como resíduos hospitalares (BRASIL, 2000, s/p). Já as placas de Petri e outros utensílios que podem ser utilizados novamente após a autoclavagem são armazenados normalmente.

9 CRONOGRAMA

Atividade e meses	Fevereiro	Março	Abril	Maior	Junho
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X
Extração de proteínas e análises quantitativas	X	X	X		
Avaliação prebiótica		X	X	X	
Discussão de resultados		X	X	X	X

REFERÊNCIAS

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Bacillus clausii** (ATCC® 700160™). Disponível em: <https://www.atcc.org/~/ps/700160.ashx>. Acessado em 09 de Outubro de 2018.

ANJO, Douglas Faria Corrêa. **Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular**. *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004. Disponível em: <http://jvascbras.com.br/pdf/04-03-02/04-03-02-145/04-03-02-145.pdf>. Acessado em 19 de Novembro de 2018.

ARAÚJO, T. Vasques; JOAQUIM, W. M. **Análise de Germinação de Sementes de Ora-pro-Nóbis (Pereskia aculeata) in vitro**. 2008. Disponível em: http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2008/anais/arquivosINIC/INIC0512_01_O.pdf. Acessado em 27 de Setembro de 2018.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A. **Microbiota intestinal e probióticos: implicações sobre o câncer de cólon**. *Jornal Português de Gastreenterologia*, v. 16, n. 1, p. 19-28, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/pdf/ge/v16n1/v16n1a03.pdf>. Acessado em 25 de Setembro de 2018.

BETTELHEIM, Frederick A. **Introdução à bioquímica**. Coordenação de Frederick A. Bettelheim; Tradução de Mauro de Campos Silva, Gianluca Camilo Azzellini. São Paulo: Cengage Learning, 2012. 300 p., il. ISBN 9788522111503.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle de infecção hospitalar: módulo 1**. Ministério da Saúde, 2000. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_procedimentos_microbiologiaclinica_controlo_infechospitalar.pdf. Acessado em 20 de Outubro de 2018.

BRUZZESE, E. et al. Impact of prebiotics on human health. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, p. S283-S287, 2006. Disponível em: [https://www.dldjournalonline.com/article/S1590-8658\(07\)60011-5/abstract](https://www.dldjournalonline.com/article/S1590-8658(07)60011-5/abstract). Acessado em 24 de Setembro de 2018.

CAVALCANTE, Ubiramar Ribeiro. **Qualidades de muda de Pereskia aculeata Miller em resposta ao tipo de substrato e maturação fisiológica do ramo**. Morrinhos. 2016. Disponível em: https://sistemas.ifgoiano.edu.br/sgcursos/uploads/anexos_9/2018-03-06-10-30-27Disserta%C3%A7%C3%A3o%20P%C3%B3s-Defesa%20pronta%20-Ubiramar.pdf. Acessado em 14 de Novembro de 2018.

COELHO, Julise Gonzalez. **Potencial probiótico de bactérias do gênero Bacillus**. 2013. 58 p. Curso de graduação (Engenharia de alimentos)- Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/87564/000910303.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acessado em 14 de Novembro de 2018.

CRUZ J. A. *et al.* **VIABILIDADE DE *Bacillus subtilis* E DE *Bacillus clausii* EM SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.)**. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Gramado. 2016. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/files/621.pdf>. Acessado em 19 de Novembro de 2018.

ENGLISH OXFORD DICTIONARIES. **Definition of chaotropic**. Disponível em: <https://en.oxforddictionaries.com/definition/chaotropic>. Acessado em 11 de Novembro de 2018.

ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA. **Proteínas**. Disponível em: http://www.esb.ucp.pt/nutribrinca/docs/Unidade_2.2_guia_proteinas.pdf. Acessado em 17 de Novembro de 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Dietary protein quality evaluation in human nutrition**. FAO Food and Nutritional Paper. Nº 92. 2013. Roma. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i3124e.pdf>. Acessado em 18 de Novembro de 2018.

FERRI, Priscila. **Extração de proteínas de folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) para obtenção de concentrado protéico**. 2006. Disponível em: <http://tede.unioeste.br/handle/tede/2836>. Acessado em 14 de Outubro de 2018.

FERRIGNO, Mayra Vergotti et al. **Veganismo e libertação animal: um estudo etnográfico**. 2012. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/279340/1/Ferrigno_MayraVergotti_M.pdf. Acessado em 25 de Setembro de 2018.

FRAGAL, Beatriz et al. **Tema 7: Polissacarídeos**. QFL-0343 – Reatividade de Compostos Orgânicos II. Universidade de São Paulo - USP. 2016. Disponível: <https://edisciplinas.usp.br/mod/resource/view.php?id=1172056>. Acessado em 11 de Novembro de 2018.

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES et al. **Curso teórico e prático - Identificação e Quantificação de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis***. 2012. Disponível em: http://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/bacillus/ApostilaCursoBacillus2012.pdf. Acessado em 20 de Outubro de 2018.

GIRÃO, Lúcio Vilela Carneiro *et al.* **Avaliação da Composição Bromatológica de Ora-pro-nóbis**. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Campus Universitário, 1997. Disponível em:

<http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/pmfi5000c.pdf>. Acessado em 10 de Outubro de 2018.

IBEROQUÍMICA MAGISTRAL. **Protease.** Disponível em: <https://www.iberquimica.com.br/Arquivos/Insumo/arquivo-143114.pdf>. Acessado em 11 de Novembro de 2018.

LEITÃO, Ana Laura Oliveira de Sá. **Avaliação de métodos de rompimento celular e de diferentes metais imobilizados em resina *Streamline Chelating* para purificação do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi*.** Dissertação. Natal. 2017. Disponível em: https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/23391/1/AnaLauraOliveiraDeSaLeitao_DISSERT.pdf. Acessado em 02 de Novembro de 2018.

MAGALHÃES, Cristiana Schmidt de. **Avaliação comparativa de procedimentos de extração de proteínas em plantas medicinais e fitoterápicos e quantificação de metais associados a essas proteínas. Campinas.** 2008. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/248579/1/Magalhaes_CristianaSchmidtde_D.pdf. Acessado em 20 de Outubro de 2018.

MANZANARES, William; HARDY, Gil. **The role of prebiotics and synbiotics in critically ill patients.** Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, v. 11, n. 6, p. 782-789, 2008. Disponível em: https://journals.lww.com/co-clinicalnutrition/Fulltext/2008/11000/The_role_of_prebiotics_and_synbiotics_in.17.aspx. Acessado em 14 de Outubro de 2018.

MARCHINI, Júlio César et al. **Aminoácidos.** São Paulo. ILSI Brasil - International Life Sciences Institute do Brasil, 2016. Disponível em: http://ilsibrasil.org/wp-content/uploads/sites/9/2016/08/Aminoacidos_vers%C3%A3o-online.pdf. Acessado em 11 de Novembro de 2018.

NELSON, David L., COX, Michael M.. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. XXX; 1298, il., color., 28 cm. ISBN 9788582710722.

NISTA, E.C *et al.* **Bacillus clausii therapy to reduce side-effects of anti-Helicobacter pylori treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial.** 10. ed. Roma, Itália: Aliment Pharmacol Ther, 2004. 1188 p. v. 20. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2036.2004.02274.x>>. Acessado em 14 de Novembro de 2018.

OMS. **Antimicrobial resistance.** Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acessado em 21 de Agosto de 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA. **Probióticos e Prebióticos.** Milwaukee. Organização Mundial de Gastroenterologia. 2011. Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-portuguese-2011.pdf>. Acessado em 15 de Novembro de 2018.

PAIXÃO, Ludmilla Araújo; CASTRO, Fabíola F. Dos Santos. **A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro.** Disponível em: <https://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/cienciasaude/article/viewFile/3629/3073>. Acessado em 20 de Outubro de 2018.

PARRACHO, Helena; MCCARTNEY, Anne L.; GIBSON, Glenn R. **Probiotics and prebiotics in infant nutrition.** Proceedings of the Nutrition Society, v. 66, n. 3, p. 405-411, 2007. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/B9B9DCC1B945B69E6CA27F607904FC46/S0029665107005678a.pdf/probiotics_and_prebiotics_in_infant_nutrition.pdf. Acessado em 25 de Setembro de 2018.

QUEIROZ, Carla Regina Amorim dos Anjos. **Cultivo e composição química de Ora-pro-nóbis (Pereskia aculeata Mill.) sob déficit hídrico intermitente no solo.** 2012. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/100813/queiroz_craa_dr_jabo.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acessado em 25 de Setembro de 2018.

RABINOVITCH, Leon; DE OLIVEIRA, Edmar Justo. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de bacillus e gêneros esporulados aeróbios correlatos.** 2015. 160 p. Dissertação (S.d)- Laboratório de Fisiologia Bacteriana, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, 2015. s.d. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/media/Coletanea%20de%20Procedimentos%20Tecnicos%20para%20Bacillus.PDF>. Acessado em 19 de Novembro de 2018.

RIBEIRO, Patrícia dos Anjos et al. **Ora-pro-nóbis: cultivo e uso como alimento humano.** Em Extensão, v. 13, n. 1, 2014. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/revextensao/article/view/24505/14682>. Acessado em: 24 de Setembro de 2018.

SAAD, Susana Marta Isay. **Probióticos e prebióticos: o estado da arte.** 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000100002. Acessado em 15 de novembro de 2018.

SALIBA, Eloísa de Oliveira Simões. **Ligninas - métodos de obtenção e caracterização química.** Santa Maria. 2001. Disponível em: https://scholar.google.com/scholar_url?url=http://agris.fao.org/agris-search/search.do%3FrecordID%3DDJ2012031349&hl=pt-BR&sa=T&oi=gsb&ct=res&cd=0&d=7807844461030909355&ei=yZjoW-qnGY6wmwGfsJ_oBA&scisig=AAGBfm10i_HvV-EYTR5j60KpF0ma3c5umQ. Acessado em 11 de Novembro de 2018.

SANTOS, Ana de Souza et al. **Microbiologia e a microbiota humana.** Publicado em 2017. Disponível em: <https://www.unifal-mg.edu.br/pet/sites/default/files/Apostila%20Minicurso%20Microbiol%20Microb%20Hum-PET-Biologia-Unifal.pdf>. Acessado em 5 de Novembro 2018.

SANTOS, Flávia Regina dos. **Método de Lowry: validação e estimativa do cálculo da incerteza.** 2012. Disponível

em:http://www2.fcfar.unesp.br/Home/Pos-graduacao/AlimentoseNutricao/Flavia_Regina_dos_Santos%20-%20ME.pdf. Acessado em 20 de Outubro de 2018.

SILVEIRA, Melissa Guimarães. **Ensaio nutricional de Pereskia spp.: hortaliça não convencional**. 2016. Disponível em: http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/10815/2/TESE_Ensaio%20nutricional%20de%20Pereskia%20spp.%3A%20hortali%C3%A7a%20n%C3%A3o%20convencional.pdf. Acessado em: 5 de Novembro de 2018.

SIMÕES, Ricardo Santos .; GIRÃO, João Henrique Rodrigues Castello.; SASSO, Gisela Rodrigues da Silva.; SILVA, Rinaldo Florencio da.; ALONSO, Luís Garcia.; MARQUES, Sérgio Ricardo. **Etimologia de termos Morfológicos**. 2014. Disponível em <http://dmorfo.sites.unifesp.br/images/doc/Grad/2017/Histologia/Dicionario%20etimol%C3%B3gico.pdf>. Acessado em 3 de Novembro de 2018.

SOUZA, Luis Carlos de. **Avaliação do desempenho de Bacillus licheniformis E-14 em diferentes condições de cultivos visando a obtenção de hidrolisada enzimático de levedura (Saccharomycs cerevisae)**. 2008. 122 p. Dissertação (Mestre em biotecnologia industrial) - Engenharia, Universidade de São Paulo, Lorena-São Paulo, 2008. S.D. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde-04102012-112323/publico/BID08008.pdf>. Acessado em 15 de Novembro de 2018.

SPEROTTO, Raul Antonio. **Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana**. Lajeado. 2014. Disponível em: https://scholar.google.com/scholar_url?url=http://web2db2.univates.br/editora-univates/media/publicacoes/74/pdf_74.pdf&hl=pt-BR&sa=T&oi=gsb-ggp&ct=res&cd=0&d=1213482693331288758&ei=usjcW7WHEo6wmwGfsJ_oBA&scisig=AAGBfm0QgqUAT_pTKBu1POJYx8Ko4xuvFA. Acessado em 22 de Outubro de 2018.

TAKEITI, Cristina Y. et al. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International journal of food sciences and nutrition**, v. 60, n. sup1, p. 148-160, 2009. Acessado em 18 de Novembro de 2018.

THUSRBY, Elizabeth; JUGE, Natalie. **Introduction to the human gut microbiota**. *Biochemical Journal*. 2017. London. N° 474, p. 1823 - 1836. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5433529/pdf/BCJ-2016-0510C.pdf>. Acessado em 24 de Setembro de 2018.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TUNDO, Pietro et al. **Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview**. *Pure and Applied Chemistry*. Vol. 72. N° 7. Durham. 2000. Disponível em: <https://www.iupac.org/publications/pac/pdf/2000/pdf/7207x1207.pdf>. Acessado em 12 de Novembro de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Ora-pro-nobis**. Disponível em: <https://hortomedicinaldohu.ufsc.br/planta.php?id=263>. Acessado em: 07 de Novembro de 2018.

WATERBORG, Jakob H. **The Lowry method for protein quantification**. 2002. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/b315/c99e81e4d62830d1cfe4544536cd9846d838.pdf>. Acessado em 22 de Outubro de 2018.

WU, Guoyao. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino acids**, v. 37, n. 1, p. 1-17, 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-009-0269-0>. Acessado em 11 de Novembro de 2018.

ZAIA, Dimas AM; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, Jaim. **Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes**. Química nova, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998. Disponível em: https://scholar.google.com/scholar_url?url=http://www.scielo.br/pdf/qn/v21n6/2914&hl=pt-BR&sa=T&oi=gsb-gga&ct=res&cd=0&d=2835839443260662736&ei=hCzPW87TIs-omAH9za3IAw&scisig=AAGBfm1oYFIJtwETyEDotEz8-KIdXrY-EQ. Acessado em 13 de Outubro de 2018.

ZEM, Luciele Milani et al. *Pereskia aculeata*: biological analysis on wistar rats. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 42-47, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v37s1/0101-2061-cta-1678-457X29816.pdf>. Acessado em 18 de Novembro de 2018.