

MARIA DO ROSÁRIO GIL CONDÉ

**TRANSLOCAÇÃO E DESAPARECIMENTO DE CÉLULAS VIÁVEIS  
DE *Lactobacillus acidophilus* EM BAÇO, FÍGADO, RINS E  
CORAÇÃO DE RATOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2002

MARIA DO ROSÁRIO GIL CONDÉ

**TRANSLOCAÇÃO E DESAPARECIMENTO DE CÉLULAS VIÁVEIS  
DE *Lactobacillus acidophilus* EM BAÇO, FÍGADO, RINS E  
CORÇÃO DE RATOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 9 de fevereiro de 2000.

---

Prof. José Mário da Silveira Mezêncio  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup> Josefina Bressan R. Monteiro  
(Conselheira)

---

Prof<sup>a</sup> Neuza Maria Brunoro Costa

---

Prof. José Benício Paes Chaves

---

Prof<sup>a</sup> Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas de estudo.

À professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, pela orientação e pelos ensinamentos.

Ao professor José Mário da Silveira Mezêncio e à professora Josefina Bressan Rezende Monteiro, pelas críticas e sugestões.

Ao professor José Benício Paes Chaves e à professora Neuza Maria Brunoro Costa, pelas significativas contribuições.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV e do Departamento de Nutrição e Saúde, pela constante ajuda no decorrer do trabalho.

Aos amigos Isabelle Dias Paes Marlieri, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, e à Elisa Teshima e Luciana Borba, pelas sugestões.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

MARIA DO ROSÁRIO GIL CONDÉ, filha de Sylvia Gil Condé e Sebastião Neiva Condé, nasceu em Raul Soares, estado de Minas Gerais.

Em setembro de 1996, graduou-se em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 1998, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, realizando seus estudos na área de microbiologia de alimentos e culturas lácticas.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. A microbiota gastrointestinal .....	4
2.1.1. Desenvolvimento da microbiota gastrointestinal .....	4
2.1.2. Funções da microbiota gastrointestinal .....	5
2.2. Os probióticos e sua ação .....	6
2.3. Requisitos para um microrganismo ser considerado probiótico ...	7
2.4. <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	8
2.4.1. Características gerais .....	8
2.4.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> como adjunto dietético .....	9
2.4.3. Benefícios do uso de <i>Lactobacillus acidophilus</i> como probiótico .....	10
2.4.3.1. Balanço da microbiota gastrointestinal .....	10
2.4.3.2. Fonte de $\beta$ -galactosidase para indivíduos lactase não- persistentes .....	10
2.4.3.3. Modulação da hipercolesterolemia .....	11
2.4.3.4. Modulação da tumorigênese .....	12

2.4.3.5. Modulação de enzimas pró-carcinogênicas .....	12
2.4.3.6. Modulação da resposta imunológica não-específica .....	13
2.5. Translocação .....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1. Origem e manutenção da cultura .....	16
3.2. Concentrado de células viáveis de <i>Lactobacillus acidophilus</i> UFVCC 1001 .....	17
3.3. Origem e manutenção dos animais .....	17
3.4. Delineamento experimental .....	17
3.5. Determinação de <i>Lactobacillus acidophilus</i> nos diferentes órgãos	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
4.1. Contagem de <i>Lactobacillus acidophilus</i> nos órgãos dos animais .	20
4.2. Desaparecimento de células viáveis de <i>Lactobacillus acidophilus</i> dos órgãos de animais que consumiram o probiótico por 14 dias ..	22
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
APÊNDICE .....	32

## RESUMO

CONDÉ, Maria do Rosário Gil, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2000. **Translocação e desaparecimento de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* em baço, fígado, rins e coração de ratos.** Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Conselheiros: José Mário da Silveira Mezêncio e Josefina Bressan Rezende Monteiro.

Os probióticos são alimentos funcionais que carregam números elevados de bactérias benéficas, originadas do trato gastrointestinal humano ou do animal para o qual está sendo destinado. Os microrganismos mais empregados como probióticos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. O *Lactobacillus acidophilus* NCFM é uma estirpe de origem humana presente em vários produtos probióticos. No entanto, há pouca informação sobre sua translocação para os órgãos do hospedeiro. Para avaliar esta translocação, empregaram-se 110 ratos de  $\pm$  61 g da raça Wistar, divididos em dois grupos (controle e teste) de 50 animais, e um grupo basal de dez animais. O grupo-controle recebeu uma dieta-padrão “ad libitum” e 0,1 mL de leite desnatado, via oral, diariamente. O grupo-teste recebeu a mesma dieta e 0,1 mL de leite desnatado, carregando  $1,0 \times 10^{10}$  UFC/mL da estirpe humana de *Lactobacillus acidophilus*, por dia. Após 14 dias de administração, dez animais de cada grupo foram sacrificados e o baço, o coração, o fígado e os rins avaliados quanto à presença de *Lactobacillus acidophilus*. O mesmo procedimento foi repetido sete, 14, 21 e 28 dias após o período de administração do probiótico. Verificou-se maior translocação (em UFC) de *Lactobacillus acidophilus* para o fígado ( $2,9 \times 10^3$ ). Para os demais órgãos os números de células translocadas (em UFC) no tempo zero foram: ( $1,4 \times 10^3$ ); ( $5,2 \times 10^2$ ); e ( $9,0 \times 10^1$ ) para rins, baço e coração respectivamente. As contagens 28 dias após a administração, de acordo com o modelo

de regressão ajustado, indicaram maior eliminação (% desaparecimento) dos microrganismos translocados no baço (100), fígado (98,41), rins (97,7) e coração (98). A avaliação dos órgãos estudados dos grupos controle e basal, nos diversos tempos, não indicou a presença de *Lactobacillus acidophilus*. Observou-se que os números de células translocadas nos órgãos além de baixos exibiram uma eliminação constante no período estudado. O tempo de eliminação completa de *Lactobacillus acidophilus* foi calculado, para os diferentes órgãos, de acordo com o modelo de regressão ajustado, sendo 25,6 dias para o baço. No caso do coração, rins e fígado, permanecendo a tendência verificada no intervalo de tempo estudado (28 dias), esta eliminação aconteceria em 28,9, 40,5 e 46,9 dias respectivamente. Os dados desta experimentação sugerem que 46,9 seja o tempo necessário para eliminar *Lactobacillus acidophilus* ingeridos como probióticos a  $1,0 \times 10^{10}$  UFC/mL. Sugere-se que a capacidade de translocação seja um parâmetro a ser considerado para adição de probióticos em alimentos, uma vez que se desconhecem as implicações desta translocação para o hospedeiro.

## ABSTRACT

CONDÉ, Maria do Rosário Gil, M. S., Universidade Federal de Viçosa, February 2000.  
**Translocation and clearing of *Lactobacillus acidophilus* viable cells in spleen, liver, kidneys and heart of rats.** Adviser: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira.  
Committee Members: José Mário da Silveira Mezêncio and Josefina Bressan Rezende Monteiro.

The probiotics are functional foods which carry large numbers of beneficial bacteria originated from the host's intestinal tract. The most commonly applied microorganisms as probiotics are those of the *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera. *Lactobacillus acidophilus* NCFM is a strain isolated from humans, present in several probiotic products. Despite its wide use, there is little information on its translocation to the host's organs. To investigate this process, 110 animals comprising two groups of 50 weaned Wistar rats (control and test), and one basal group (10 animals) were used. The control group received a standard diet (AIN-93, "ad libitum") and 0.1 ml skimmed milk/day. Besides the standard diet, the test group received 0.1 ml skimmed milk containing  $1.0 \times 10^{10}$  CFU/ml of a strain of *Lactobacillus acidophilus* of human origin for 14 days. After this time, 10 animals were killed and had their spleens, hearts, livers and kidneys screened for *Lactobacillus* (time 0). The same procedure was repeated at 7, 14, 21, and 28 days. The highest translocation, expressed as CFU/organ, was observed for the liver. The average translocation for the other organs did not differ significantly from each other. However, the counting at 28 days after the end of the experiment, according to the adjusted regression model, indicated an elimination (% clearing) of the microorganisms translocated from the spleen (100), liver (98,41), kidney (97,7), heart (98.0). The evaluation of the organs from the control and basal groups did not indicate the presence of *Lactobacillus*, according to growth in MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) agar. The translocated cell numbers, besides being low, were constantly eliminated during the evaluation period. The time required for the complete elimination of *Lactobacillus* was calculated for the different organs according to the adjusted regression model and corresponded to 25.6; 28.9; 40.5; and 46.9 days for the spleen, heart, kidneys and liver, in that order. The current data suggested that 46,9 days

after the end of a 14 day period of probiotic consumption containing  $1.0 \times 10^{10}$  CFU/ml of *Lactobacillus acidophilus*, the organs here in studied were cleared from the translocated cells. Since the implications of microbial translocation in the host with different degrees of debility is not known, the translocation capacity is suggested to be an important parameter for the selection of strains to be used as probiotics.

## 1. INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais são alimentos que, além de nutrir, têm um benefício fisiológico adicional como promover a saúde ou prevenir doenças (PASCAL, 1996). Dentre os grupos de alimentos funcionais estão os probióticos, produtos que carregam bactérias benéficas vivas, originadas do trato gastrointestinal humano, ou do animal para o qual está sendo destinado (FERREIRA, 1999a).

O *Lactobacillus acidophilus* é um componente comum de probióticos. Os lactobacilos são conhecidos por produzirem diversos compostos antimicrobianos durante a fermentação do leite como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, os quais são eficazes contra diversos patógenos intestinais e, por esta razão, o consumo destas bactérias tem sido eficaz no controle de uma variedade de desordens intestinais. Este grupo de microrganismos é eficaz na recolonização do intestino após intenso tratamento com antibiótico. Além disso, constitui fonte de  $\beta$ -galactosidase para indivíduos lactase não-persistentes e afetam a modulação da hipercolesterolemia, da resposta imunológica não-específica, encefalopatia hepática e na tumorigênese; (SANDINE, 1979; GILLILAND, 1989; ALM, 1991; MOULIN, 1996; PRAJAPATI, 1997).

Vários critérios têm sido usados para seleção de culturas para uso como adjunto dietético. A cultura candidata a probiótico deve possuir características básicas como: ser habitante normal do trato gastrointestinal da espécie para a qual o probiótico se destina; ser capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal e colonizar o intestino onde produziriam substâncias antimicrobianas (ácidos orgânicos e outros) ativas contra microrganismos enteropatogênicos, putrefativos e proteolíticos e com isso controlar o ambiente microbiano; produzir efeitos benéficos ao hospedeiro quando no intestino e manter-se viável no alimento carreador até o consumo (GOLDIN, 1998). Além desses, a capacidade de translocação dessas bactérias exógenas tem sido

ênfâtizada, por se desconhecer suas possíveis implicações (BERG, 1979, 1992).

Dados sobre a translocação de microrganismos são escassos. Trabalhos desenvolvidos por BERG et al. (1979, 1980, 1992, 1995) descrevem aspectos de translocação de bactérias do trato gastrointestinal de animais convencionais e gnotobióticos. Estes estudos indicam que o fenômeno é observado com mais frequência com bactérias gram-negativas e anaeróbias facultativas do que com anaeróbias obrigatórias e organismos gram-positivos.

*A priori*, a capacidade de bactérias probióticas para translocar do trato gastrointestinal para outros sítios não é desejável, uma vez que se desconhece qual o mecanismo envolvido nesta translocação e suas implicações para o hospedeiro. Tratamento mediado por microrganismos (“microbial interference treatment - MIT”) tem sido considerado uma alternativa para prevenir infecções hospitalares em indivíduos transplantados, pacientes com pancreatite aguda, inflamações intestinais, portadores do vírus HIV que se apresentam debilitados e com o sistema ecológico intestinal desbalanceado pelo elevado consumo de antibióticos (BENGMARK, 1998).

Embora a translocação de bactérias probióticas seja uma preocupação recente, demonstrada por cientistas em eventos internacionais (SOMED, 1997; LACTIC, 1997; WIA, 1997), trabalhos completos sobre a translocação destas bactérias não foram publicados até a presente data.

Tendo em vista o exposto, objetivou-se no presente trabalho administrar diariamente *Lactobacillus acidophilus* em concentração normalmente presente nos produtos probióticos em ratos e avaliar sua translocação para fígado, rins, baço e coração após 14 dias de administração e o desaparecimento de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* dos órgãos após o final da administração.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A microbiota gastrointestinal

A microbiota gastrointestinal de homens e animais representa um ecossistema extremamente complexo abrangendo mais de 400 espécies diferentes de bactérias. Esses organismos convivem em relações simbióticas ou antagônicas, utilizando para o seu desenvolvimento, componentes de alimentos ingeridos ou secreções do trato digestivo do hospedeiro (MITSUOKA, 1992).

#### 2.1.1. Desenvolvimento da microbiota gastrointestinal

No interior do útero materno, o indivíduo permanece em um ambiente estéril. No momento do nascimento, o corpo é exposto às bactérias do canal vaginal e à pele da mãe, às mãos de enfermeiras, às roupas e ao ar do ambiente. Os microrganismos contaminam o recém-nascido principalmente por via oral ou anal. Cerca de 24 horas após o nascimento, as fezes da maioria dos recém-nascidos já contêm uma grande variedade de bactérias, principalmente as do grupo coliformes, *Enterococcus*, *Clostridium* e *Staphylococcus* em várias proporções (MITSUOKA, 1989).

As bactérias do grupo *Bifidobacterium* começam a proliferar três a quatro dias após o nascimento, passando a predominar. Coincidindo com o aumento dessas bactérias, ocorre uma diminuição gradativa dos grupos coliformes e *Enterococcus* (MITSUOKA, 1978). A microbiota se estabiliza a

partir da primeira semana no trato gastrointestinal de recém-nascidos, com predominância de bactérias bífidas, acreditando-se que essa predominância tenha efeito na prevenção de infecções intestinais (MITSUOKA, 1989).

Após o período de amamentação, bactérias bífidas, *Bacteroides*, *Eubacterium* e *Peptococcus* passam a predominar, enquanto coliformes e *Enterococcus* são reduzidos em níveis inferiores a  $10^8$  UFC/g de fezes. Estes grupos bacterianos predominam a microbiota gastrointestinal de jovens e adultos. Em idosos, o número de bactérias bífidas diminui e alguns grupos de bactérias indesejáveis como *Clostridium perfringens* aumentam (MITSUOKA, 1982).

### **2.1.2. Funções da microbiota gastrointestinal**

A microbiota gastrointestinal atua: i) na produção de diversas enzimas resultando em compostos que podem ser benéficos ou nocivos ao hospedeiro. Esses compostos podem afetar a nutrição, a fisiologia do hospedeiro, a eficácia de drogas, a carcinogênese e o processo de envelhecimento, assim como a resistência do hospedeiro a infecções (SELLARS, 1991; MITSUOKA, 1992); e ii) na inibição do crescimento de patógenos pela produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas e, ou, pela desconjugação de ácidos biliares (ALM, 1991; GILLILAND, 1977, 1989).

Segundo BENGMARK (1998), são cada vez maiores as evidências de que doenças humanas estejam relacionadas ao estilo de vida. Como fatores envolvidos na diminuição de resistência a doenças estão relacionados o estresse da vida moderna, a diminuição de atividade física, consumo elevado de alimentos processados e produtos farmacêuticos. Infecções hospitalares têm aumentado consistentemente no mundo todo e pacientes acometidos de pancreatite aguda e portadores do vírus HIV são mais suscetíveis a infecções oportunistas. O consumo de antibióticos de amplo espectro de ação, além de eliminar os patógenos responsáveis pela doença, elimina também a microbiota protetora. Microrganismos oportunistas, geralmente das famílias *Enterobacteriaceae* e *Micrococcaceae*, aumentam em número, provocando, quase sempre, diarreias.

A administração de bactérias probióticas restabelece a condição normal de equilíbrio microbiano intestinal que sofreu um desbalanceamento em virtude de fatores externos ou internos, normalizando a microbiota com conseqüente melhoria da saúde do hospedeiro, e no caso dos animais, melhorando sua produtividade (SISSONS, 1989; KMET et al., 1993; BENGMARK, 1998).

## **2.2. Os probióticos e sua ação**

Os probióticos são produtos que carregam bactérias vivas originadas do trato gastrointestinal humano ou do animal para o qual está sendo destinado (FERREIRA, 1999a).

Evidências documentadas certificam a expectativa de que bactérias probióticas constituem uma arma eficaz na prevenção e tratamento de várias infecções microbianas. Além disso, a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1994) com base em estudos que indicam a crescente resistência a antibióticos, recomenda o tratamento mediado por microrganismos tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (BENGMARK, 1998).

O princípio de ação dos probióticos no trato gastrointestinal ainda não está totalmente esclarecido embora a maioria atue como uma combinação de vários fatores. Pode-se considerar quatro mecanismos de ação básica: exclusão competitiva, produção de substâncias antibióticas, produção de ácidos orgânicos e imunostimulação (FULLER, 1989).

O Quadro 1 resume os possíveis princípios de ação dos probióticos.

### Quadro 1 - Princípios de ação de probióticos

- 
1. Supressão de contagem viável por:
    - (a) produção de compostos antibacterianos
    - (b) competição por nutrientes
    - (c) competição por sítios de adesão
-

- 
2. Alteração do metabolismo microbiano:
    - (a) aumento da atividade enzimática
    - (b) diminuição da atividade enzimática
  3. Estimulação da imunidade:
    - (a) aumento da atividade de macrófagos
- 

Fonte: FULLER (1989).

### **2.3. Requisitos para um microrganismo ser considerado probiótico**

Uma cultura considerada candidata para uso como adjunto dietético deve possuir certas características básicas, como: ser habitante normal do trato gastrointestinal, sobreviver à passagem pelo trato intestinal, ser capaz de sobreviver e colonizar o intestino, produzir efeitos benéficos ao hospedeiro quando no intestino e manter-se viável no alimento carreador, antes do consumo (GILLILAND, 1989).

Um critério para a seleção de bactérias lácticas presentes no intestino é baseado na sua capacidade de afetar prejudicialmente os microrganismos patogênicos no intestino. Com a finalidade de exibir efeito probiótico, é essencial que a bactéria sobreviva à passagem através do estômago e intestino. A aderência às células do epitélio do trato gastrointestinal pode ser um fator importante para sua atividade (KLEEMANN e KLAENHAMMER, 1982).

O suco gástrico tem um efeito germicida e protege o organismo da invasão por bactérias indesejáveis que são mortas pelo baixo pH. Entretanto, com a finalidade de encontrar um efeito inibitório, bifidobactéria e *Lactobacillus acidophilus* devem ser capazes de sobreviver à passagem através do estômago. O tempo de transição do leite fermentado pelo estômago é relativamente pequeno, de 1 a 2 horas, e as condições do pH do suco gástrico flutuam de acordo com a composição da refeição. Durante o jejum, o pH pode diminuir para 1,5 e após a dieta pode atingir valores de pH de 4 a 5 (HUNGER e PEITERSEN, 1992).

Outra característica importante a ser avaliada na seleção de bactérias probióticas seria a translocação, ou seja, a capacidade dessas bactérias de

translocarem do intestino para outros sítios, uma vez que se desconhece a ação dessas bactérias em outros sítios que não o trato gastrointestinal.

Os microrganismos que são descritos mais comumente como possuidores de características probióticas estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2 - Microrganismos usados como probióticos

Microrganismos	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Lactobacillus casei</i> var. <i>shirota</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Lactobacillus GG</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus reuterii</i>	

Fonte: GOLDIN (1998).

## 2.4. *Lactobacillus acidophilus*

### 2.4.1. Características gerais

O *Lactobacillus acidophilus* pertence ao gênero *Lactobacillus* apresentando células em forma de bastonete regular, com extremidades arredondadas. Seu arranjo, quando observado ao microscópio, pode apresentar células simples, em pares ou até pequenas correntes. É um microrganismo gram-positivo, anaeróbio facultativo, não esporula e é homofermentativo (produz apenas ácido lático a partir da fermentação de açúcares). A faixa de temperatura ótima de crescimento ocorre entre 35 e 38° C. Este microrganismo faz parte da microbiota normal da boca, do trato gastrointestinal e da vagina de muitos animais homeotérmicos incluindo o homem. Sua patogenicidade é rara (KANDLER e WEISS, 1986).

O *Lactobacillus acidophilus* é um microrganismo extremamente fastidioso, requerendo para seu crescimento as vitaminas niacina, riboflavina e ácido fólico. Este microrganismo não requer apenas carboidratos como fonte de energia e carbono, mas também nucleotídeos e aminoácidos. O procedimento para o seu isolamento deve levar em conta sua natureza acidúrica e acidofílica e seus requerimentos nutricionais complexos. Quando os lactobacilos são a microbiota predominante no material de origem, o meio não-seletivo MRS (de MAN et al., 1960) pode ser usado para o isolamento. Pode-se isolar *Lactobacillus acidophilus* do trato gastrointestinal de homens e animais, boca humana e vagina (KANDLER e WEISS, 1986).

#### **2.4.2. *Lactobacillus acidophilus* como adjunto dietético**

Desde que Metchnikoff sugeriu pela primeira vez, no início do século, a idéia de que o consumo regular de leite fermentado com lactobacilos poderia oferecer benefícios à saúde do consumidor, as possíveis propriedades profiláticas e terapêuticas de produtos contendo *Lactobacillus acidophilus* têm sido assunto de grande interesse.

Em 1935, RETTGER et al. demonstraram que desordens intestinais como diarreias, constipação, irritação de cólon e colite eram remediadas com a administração de leite fermentado contendo números elevados de uma estirpe de origem humana de *Lactobacillus acidophilus*.

A partir de então, tem havido um crescente interesse em definir a maneira pela qual o *Lactobacillus acidophilus* contribui tanto para a saúde humana quanto para a saúde animal (FERREIRA, 1999b).

#### **2.4.3. Benefícios do uso de lactobacilos como probiótico**

##### **2.4.3.1. Balanço da microbiota intestinal**

Não sendo toxigênico, e por ser habitante natural do trato gastrointestinal humano, o *Lactobacillus acidophilus* é um dos microrganismos de escolha para ajudar na recomposição e manutenção do ecossistema intestinal, principalmente em casos em que o indivíduo necessite se submeter à antibioticoterapia ou quimioterapia (FERREIRA, 1999b).

Ainda, segundo FERREIRA (1999b), o consumo de antibióticos de amplo espectro de atuação, cada vez mais difundido, além de eliminar o(s) microrganismo(s) indesejável(eis) para o qual o tratamento está sendo feito, elimina microrganismos benéficos, protetores e mantenedores do balanceamento desta microbiota. No entanto, o equilíbrio da microbiota intestinal pode ser restabelecido pelo consumo de probióticos. Após sua ingestão as bactérias probióticas encontram um meio mais adequado para multiplicarem e deste modo se aderem às células epiteliais do intestino para assim estabelecer predominância sobre os microrganismos patogênicos (BALDAN, 1997).

#### **2.4.3.2. Fonte de $\beta$ -galactosidase para indivíduos lactase não-persistentes**

O consumo de leite por indivíduos lactase não-persistentes, incapazes de digerir a lactose por apresentarem quantidade insuficiente da enzima  $\beta$ -galactosidase no intestino delgado, resulta em uma síndrome caracterizada por dor abdominal, flatulência e diarreia. Esses indivíduos geralmente evitam o consumo de leite, perdendo assim uma importante fonte de cálcio, fósforo e proteína de alta qualidade (KIM e GILLILAND, 1983). Entretanto, o leite fermentado é mais bem tolerado por esses indivíduos, pois a lactose em produtos fermentados é parcialmente hidrolisada e estes produtos também podem conter lactase de origem bacteriana. A enzima  $\beta$ -galactosidase microbiana é uma enzima intracelular que pode passar intacta do estômago para o intestino (MARTINI et al., 1991).

Um estudo conduzido por WELCH (1987) verificou que a digestão da lactose é aumentada, em humanos, pelo consumo de leite acidófilo ou de iogurte, particularmente em produtos contendo *Lactobacillus acidophilus*.

#### **2.4.3.3. Modulação da hipercolesterolemia**

O metabolismo do colesterol é influenciado, dentre outros, pela dieta e hormônios do indivíduo (HAWKINS, 1993). A microbiota intestinal também influencia os níveis de colesterol sérico: animais “germ-free” excretam mais colesterol do que animais convencionais (GILLILAND, 1989). A capacidade da microbiota intestinal em desconjugar ácido biliar pode também influenciar o nível de colesterol. Normalmente, após ocorrer a emulsão das gorduras pelos sais biliares, eles são reabsorvidos pelas paredes do intestino e levados até o fígado para serem reaproveitados. Se os sais biliares forem desconjugados ou dehidroxilados por bactérias do intestino, essa reciclagem não irá ocorrer. Então o organismo terá que utilizar mais colesterol para sintetizar mais sais biliares. (SABOYA, 1997).

Estudos “in vitro”, desenvolvidos por GILLILAND et al. (1985), evidenciaram uma diminuição do nível de colesterol no sobrenadante da cultura de *Lactobacillus acidophilus*, incubada na presença de sais biliares. Ao mesmo tempo observou-se um aumento do nível de colesterol no concentrado celular. Atribuiu-se este efeito à adsorção de colesterol pelas células. Os autores encontraram estirpes de *Lactobacillus acidophilus* que são capazes de assimilar o colesterol em condições de meio similares às do trato gastrointestinal.

KLAVER e van DER MEER (1993) desenvolveram um trabalho, “in vitro”, em que células de várias estirpes de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* foram postas para fermentar, na presença e ausência de sais biliares. Os resultados demonstraram uma relação entre o colesterol precipitado e a desconjugação de sais biliares, pois as variedades de microrganismos que conseguiam desconjugar os sais biliares causavam uma

precipitação não apenas desses sais, mas também do colesterol. A precipitação do colesterol reduz sua absorção.

#### **2.4.3.4. Modulação da tumorigênese**

A propriedade de supressão de tumor está associada a células integrais intactas e viáveis, células mortas e também a fragmentos de paredes de células de lactobacilos. A supressão do câncer já iniciado pode ser feita pela ativação de mecanismos de defesa do hospedeiro, como ativação de macrófagos que destroem células tumorais (FERNANDES et al., 1987).

PERDIGON et al. (1986) observaram que a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de ratos foi mais alta injetando-se *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* de forma intraperitoneal do que quando administrados oralmente. A diferença entre a alimentação e a injeção intraperitoneal é que, através da alimentação, as células de *Lactobacillus acidophilus* estão presentes no trato gastrointestinal e não no local do tumor. Através da injeção intraperitoneal, as células de *Lactobacillus acidophilus* ficam posicionadas diretamente no local do tumor e suprime o crescimento deste. O efeito antitumoral de *Lactobacillus acidophilus* provavelmente está envolvido com a estimulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

#### **2.4.3.5. Modulação de enzimas pró-carcinogênicas**

A prevenção da formação do câncer pode ser feita pela redução indireta de pró-carcinógenos, ou seja, pela supressão de bactérias produtoras de enzimas fecais (azoredutase,  $\beta$ -glucoronidase e nitroredutase) que têm sido usadas como monitoras de carcinogênese da mucosa por converter pró-carcinógenos a carcinógenos (FERNANDES e SHARANI, 1990). Quanto mais elevado o nível dessas enzimas, mais alto será o potencial de carcinogênese.

Foi observado por Gadelle et al., citados por FERNANDES et al. (1987), que  $\beta$ -glucoronidase é produzida pelos gêneros: *Clostridium*, *Peptostreptococcus*

e *Staphylococcus*. Se uma dieta contiver células de *Lactobacillus acidophilus*, haverá alteração da microbiota intestinal favoravelmente e resultará em diminuição de enzimas pró-carcinogênicas; assim, o nível dessas enzimas deve ser mais alto em floras fecais indesejáveis e baixo ou ausente quando houver células de *Lactobacillus acidophilus*. Entretanto, mais pesquisas são necessárias para se conhecer o efeito dessas enzimas no intestino.

#### **2.4.3.6. Modulação da resposta imunológica não-específica**

A estimulação direta da resposta imune não-específica poderia resultar na produção de substâncias imunoativas pelas bactérias lácticas (MOINEAU e GOULET, 1991). Entretanto, até o presente, nenhuma substância imunoestimuladora foi isolada diretamente de bactérias lácticas, além de componentes de parede celular (SEKINE et al., 1985).

A imunoestimulação por bactérias gram-positivas provavelmente deve-se ao peptidoglicano, porém HATCHER e LAMBRECHT (1993) verificaram a ocorrência deste efeito utilizando extratos de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* sem células viáveis ou fragmentos de parede celular. PERDIGÓN et al. (1988) observaram que o sobrenadante de culturas fermentadas com bactérias lácticas aumentou a resposta imune. Este efeito ocorreu independente da presença das bactérias.

### **2.5. Translocação**

WOLOCHOW et al. (1966) foram os primeiros autores que empregaram o termo translocação para descrever a passagem de bactérias viáveis provenientes do trato gastrointestinal para sítios extraintestinais ou tecidos. Posteriormente, BERG et al. (1979, 1980, 1992, 1995) descreveram vários trabalhos indicando condições que favorecem ou não o processo de translocação para os diversos órgãos em animais convencionais e gnotobióticos.

O trato gastrointestinal humano contém uma grande variedade de bactérias aeróbias e anaeróbias. O estômago e o intestino delgado contêm número pequeno de

bactérias (GORBACH et al., 1967). Estas são geralmente aeróbias e gram-positivas e os gêneros mais freqüentemente isolados são *Streptococcus*, *Lactobacillus* e vários fungos (DRASAR et al., 1969). A microbiota presente no intestino grosso é semelhante à das fezes compreendendo predominantemente bactérias anaeróbias como *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Clostridium* e um grupo menor como coliformes, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Veillonella* (MITSUOKA, 1978).

Segundo BERG (1980), translocação bacteriana pode ser detectada quando o balanço ecológico do trato gastrointestinal é alterado. Antibióticos de amplo espectro de ação permitem que microrganismos geralmente presentes em pequenos números aumentem sua população resultando em vários tipos de infecções. A translocação pode também ocorrer quando o sistema imunológico não está operando com a máxima eficiência. A integridade da mucosa intestinal constitui uma barreira física na prevenção da translocação e vários fatores ambientais como dieta, estresse, e outros, podem alterar o delicado balanço no trato gastrointestinal promovendo também a translocação.

Numa ampla revisão, BERG (1992) menciona que translocação de *Lactobacillus acidophilus*, do trato gastrointestinal para outros órgãos não causa doença severa, e afirma que, conhecer os mecanismos de defesa do hospedeiro dará subsídios para controlar infecções oportunistas em pacientes debilitados. O conhecimento dos mecanismos envolvidos na translocação de bactérias saprófitas como as bactérias probióticas, é importante para a definição de seu consumo por pessoas que apresentam desordens imunossupressoras e indivíduos debilitados ou predispostos a enfermidades infecciosas. Tratamento mediado por microrganismos tem sido considerado um método alternativo para o restabelecimento e manutenção da microbiota intestinal nestes indivíduos acometidos por algum tipo de infecção (BENGMARK, 1998).

Três mecanismos primários que promovem a translocação bacteriana têm sido propostos: i) supercrescimento bacteriano intestinal; ii) aumento da permeabilidade da mucosa intestinal; e iii) deficiências na imunidade do hospedeiro. Estes mecanismos podem não ser mutuamente exclusivos e um ou mais podem ser relevantes para cada indivíduo (O'BOYLE et al., 1998).

A migração de organismos através da parede intestinal pode ocorrer por pinocitose (processo de ingestão de quantidades diminutas de líquido extracelular e de substâncias nele dissolvidas, sob a forma de pequenas vesículas) em células epiteliais e tem sido proposto como o princípio do mecanismo da translocação na presença de uma barreira mucosa intacta (BERG, 1995).

A translocação bacteriana envolve, portanto, interações complexas entre os mecanismos de defesa e a capacidade para transpor a barreira intestinal e sobreviver em outro ambiente, sendo necessários mais estudos para elucidar os mecanismos envolvidos na presença de translocação no hospedeiro saudável ou debilitado (BERG, 1992). Ainda, segundo o autor, a translocação bacteriana da microbiota nativa, que normalmente colonizam o trato gastrointestinal em níveis populacionais elevados, pode ocorrer em taxas reduzidas, e de forma “espontânea”, através da mucosa de animais saudáveis.

Foi objetivo desta experimentação administrar diariamente *Lactobacillus acidophilus* em concentração normalmente presente nos produtos probióticos em ratos e avaliar sua translocação para fígado, rins, baço e coração após 14 dias de administração e o desaparecimento de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* dos órgãos após o final da administração.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Culturas Lácticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos e de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

#### 3.1. Origem e manutenção da cultura

A cultura de *Lactobacillus acidophilus* UFVCC 1001, de origem intestinal humana, foi obtida do Banco de Culturas do Laboratório de Culturas Lácticas, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. Esta cultura corresponde ao *Lactobacillus acidophilus* NCFM – “North Caroline Food Microbiology”, obtida no Departamento de Ciência Animal da Universidade Estadual de Oklahoma, Stillwater, USA. A cultura foi congelada a  $-18^{\circ}\text{C}$ , em LDR (leite desnatado reconstituído) 12% e glicerol, descongelada em temperatura ambiente e ativada em LDR 10% estéril. Após incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, foram feitas três repicagens em tubos com tampa rosqueável (15 x 150 mm) contendo 5 mL de caldo MRS (De Mann, Rogosa e Sharpe, Merck), utilizando 1% de inóculo. Na terceira repicagem, foi usado um volume de 200 mL deste caldo em frasco erlenmeyer. Esse procedimento foi observado em todas as repetições do experimento. No período entre as repicagens a cultura foi mantida sob refrigeração em caldo MRS.

#### 3.2. Concentrado de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* (UFVCC 1001)

Após a incubação de 200 mL de caldo MRS, inoculado sob anaerobiose e a 37° C, por 24 horas, a cultura foi submetida à centrifugação por 15 minutos a 5.000 x g (centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, Fanem). O sedimento obtido foi ressuspenso em LDR a 10% de sólidos não-gordurosos, esterilizado, constituindo-se assim o concentrado de células utilizado, contendo cerca de 10<sup>10</sup> UFC/mL. O concentrado foi preparado a cada três dias e mantido sob refrigeração.

### **3.3. Origem e manutenção dos animais**

Foram utilizados 110 ratos machos (61g ± 4,616) da raça Wistar originados do biotério do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV. Os ratos foram mantidos individualmente em gaiolas à temperatura ambiente (cerca de 25° C) e tiveram livre acesso à dieta AIN-93G (REEVES et al., 1993) e água.

### **3.4. Delineamento experimental**

Os animais foram divididos em três grupos, a saber:

*Grupo Basal:* consistiu de dez ratos, que receberam a dieta AIN-93G durante 14 dias. Após este período, foram sacrificados para exame de seus órgãos (fígado, coração, baço e rins).

*Grupo Controle:* consistiu de 50 ratos, que receberam a dieta AIN-93G “ad libitum” e 0,1 mL de leite desnatado diariamente, administrado via oral por 14 dias.

*Grupo-Teste:* consistiu de 50 ratos, que receberam dieta AIN-93G e 0,1 mL de leite desnatado contendo 10<sup>10</sup> UFC/mL de *Lactobacillus acidophilus* NCFM diariamente, administrado via oral por 14 dias.

Ao final do período de 14 dias de administração (tempo 0), dez ratos de cada tratamento foram sacrificados (por asfixia com éter etílico) e o baço, coração, fígado e rins avaliados quanto à presença de *Lactobacillus acidophilus*. O mesmo procedimento foi repetido para os grupos controle e teste sete, 14, 21 e

28 dias após o período de administração do leite. Durante os 28 dias que sucederam a administração do probiótico, os animais foram mantidos na dieta AIN-93G.

Na análise dos resultados considerou-se o modelo de experimento em parcelas subdivididas com os quatro órgãos, mais o grupo controle na parcela, com dez repetições (ratos) e o tempo de eliminação dos lactobacilos nas subparcelas. No caso de interação órgão x tempo significativa, procedeu-se a análise de regressão para avaliar o efeito do tempo de eliminação sobre a contagem de lactobacilos para cada órgão.

O modelo de regressão testado foi o descrito pela equação abaixo:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 T$$

em que

$Y = \text{Log}(2 + \text{UFC/g})$ ;

$T = \text{tempo (dias)}$ ; e

$\beta_0$  e  $\beta_1$  = parâmetros do modelo.

Para avaliar este modelo de regressão foram feitos os seguintes testes: teste F da regressão, teste t para os parâmetros e teste F da falta de ajustamento do modelo. O  $R^2$  do modelo de regressão foi calculado com base nas médias.

O teste Duncan foi utilizado para comparar as médias de contagem de lactobacilos entre os órgãos no tempo zero, isto é, logo após a administração do probiótico.

Todas as análises estatísticas realizadas foram feitas no Sistema SAS.

### **3.5. Determinação de *Lactobacillus acidophilus* nos diferentes órgãos**

Ao término da experimentação, os animais foram sacrificados (por asfixia com éter) nos tempos zero, 7, 14, 21 e 28 dias e seus órgãos (baço, coração, fígado e rins) foram coletados, lavados em solução salina 0,9% estéril, pesados e armazenados em sacos plásticos estéreis de polietileno (sacos amostradores Whirl-Pak, Millipore) à -

80°C (Bio-Freezer, Forma Scientific). Posteriormente, para a determinação de lactobacilos nesses órgãos, preparou-se diluições apropriadas, após maceração de cada órgão (NADER de MACIAS et al., 1992, 1993). Seguiu-se plaqueamento em profundidade ( $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ), em ágar MRS, e incubação, sob anaerobiose, a 37°C, por 48 horas.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Contagem de *Lactobacillus acidophilus* nos órgãos dos animais

Nos órgãos avaliados (fígado, baço, coração e rins) dos ratos dos grupos basal e controle não se observou a presença de células de *Lactobacillus acidophilus*. No entanto, nos animais que consumiram o probiótico (leite desnatado contendo  $10^{10}$  UFC/mL) por 14 dias, a presença do *Lactobacillus acidophilus* foi constatada nos diferentes órgãos em diferentes concentrações.

Imediatamente após a experimentação (tempo zero), a presença de *Lactobacillus acidophilus* variou de  $2,9 \times 10^3$  UFC no fígado a 32,2 vezes menos no coração  $9,0 \times 10^1$  UFC. O número de células translocadas para o fígado foi maior do que aqueles encontrados nos outros órgãos: rins ( $1,4 \times 10^3$  UFC); baço ( $5,2 \times 10^2$  UFC) e coração ( $9,0 \times 10^1$  UFC) (Quadro 3). A translocação de bactérias é um fenômeno que ocorre normalmente no trato gastrointestinal, principalmente em relação a microrganismos exógenos, para serem eliminados pelos mecanismos de proteção do organismo (GUYTON, 1988). Embora *Lactobacillus acidophilus* seja de origem intestinal, os números ministrados ao animal foram elevados ( $10^9$  UFC/dia). O princípio de probiótico exige que para exercer uma função específica no hospedeiro números elevados de microrganismos benéficos sejam administrados a este hospedeiro. O trato gastrointestinal, visto como um órgão onde um ecossistema deva ser mantido balanceado, de alguma maneira permitiu nesta experimentação que células em excesso fossem translocadas. Os mecanismos mais conhecidos para esta translocação são: i) por meio de junções epiteliais, pela via paracelular; e ii) por meio de absorção pelas células epiteliais, transcelularmente, de modo que pela pinocitose estes corpos, considerados estranhos, possam ser eliminados (GUYTON, 1988; BERG, 1995).

Quadro 3 – Translocação de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* para os diferentes órgãos

Órgão	Translocação de células viáveis de <i>L. acidophilus</i> (em UFC) para os órgãos (tempo zero)
Fígado	$2,9 \times 10^3$
Rins	$1,4 \times 10^3$
Baço	$5,2 \times 10^2$
Coração	$9,0 \times 10^1$

Grande número de bactérias passa constantemente pela mucosa gastrointestinal para o sangue porta, e antes que este chegue à circulação sistêmica geral, passa pelos seios hepáticos (GUYTON, 1988) podendo ser este um dos mecanismos que justificam a presença destes microrganismos no fígado ( $2,9 \times 10^3$  UFC). Ainda de acordo com GUYTON (1988) o microrganismo atingindo a circulação geral, passará por outra linha de defesa desempenhada pelo baço. Nesta experimentação, observa-se esta função do baço, pelo número de células ali encontrado logo após o término da ingestão do probiótico ( $5,2 \times 10^2$  UFC). Ainda assim, quando estes mecanismos de defesa falham, o microrganismo presente na circulação geral, atingirá outros órgãos como rins e coração.

Os baixos números de células de *Lactobacillus acidophilus* translocados nesta experimentação corroboram informação de BERG (1992) onde o autor se refere ao *Lactobacillus acidophilus* como um microrganismo que tem baixo poder de translocação, mesmo quando administrado em concentrações elevadas. No entanto, não informa os níveis de translocação e os órgãos para os quais ocorre maior translocação, nem o período de permanência dos microrganismos nestes órgãos.

Na presente experimentação, verificou-se que a translocação de *Lactobacillus acidophilus* foi 32,2 vezes menor no coração ( $9,0 \times 10^1$  UFC) do que no fígado ( $2,9 \times 10^3$  UFC/g) e que nos rins e baço, estes números foram respectivamente  $1,4 \times 10^3$  e  $5,22 \times 10^2$ , após administração de números na faixa de  $10^{10}$  UFC/mL, por 14 dias.

#### 4.2. Desaparecimento de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* dos órgãos de animais que consumiram o probiótico por 14 dias

Verificou-se nesta experimentação que a presença de células de *Lactobacillus acidophilus* somente foi constatada nos órgãos (fígado, baço, coração e rins) dos animais que consumiram o probiótico (leite desnatado contendo  $10^{10}$  UFC/mL) por 14 dias. Após o período de administração observou-se que as bactérias foram eliminadas em diferentes taxas nos órgãos avaliados (Figura 1).

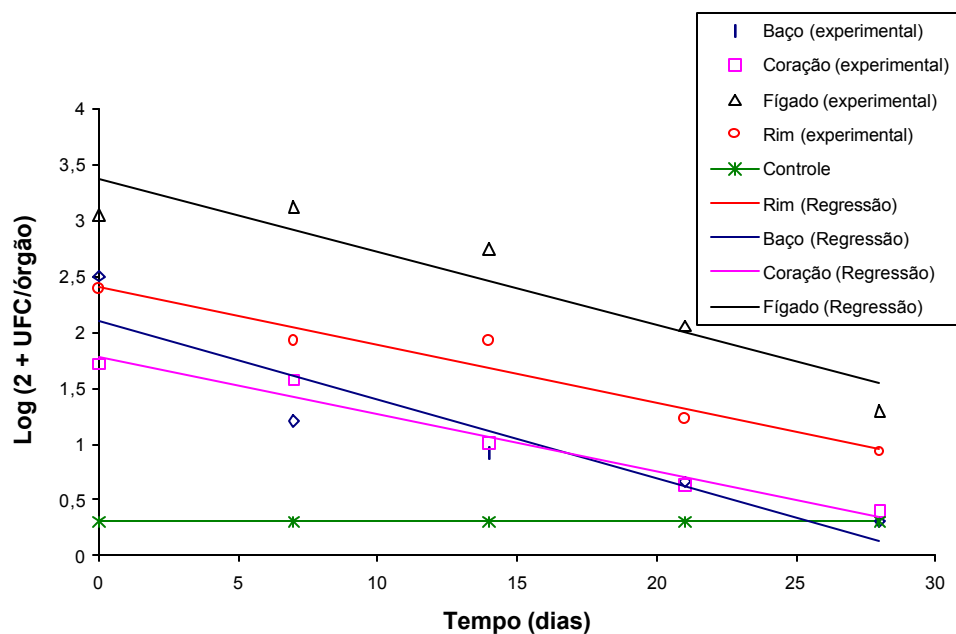


Figura 1 - Contagem de *Lactobacillus acidophilus* nos diferentes órgãos, durante os 28 dias após o término da ingestão do probiótico.

A eliminação das bactérias nos diferentes órgãos seguiu o modelo de regressão testado descrito pela equação abaixo:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 T$$

em que

$$Y = \log (2+UFC/g);$$

T= tempo (dias após administração do probiótico); e

$\beta_0$  e  $\beta_1$  = parâmetros do modelo.

O tempo de eliminação completa de *Lactobacillus acidophilus*, para cada órgão, pode ser calculado a partir dos modelos de regressão ajustados (Quadro 4). No baço, a eliminação completa ocorreu em 25,6 dias. Nos outros órgãos a eliminação completa não foi alcançada dentro do período de tempo estudado (28 dias), mas, permanecendo a tendência verificada neste período, esta eliminação aconteceria aos 28,9, 40,5 e 46,9 dias no coração, rins e fígado respectivamente (Figura 1).

Quadro 4 - Modelos de regressão ajustados para os diferentes órgãos

Órgão	Modelo ajustado	R <sup>2</sup>
Baço	$\hat{Y} = 2,1075 - 0,0707T$	0,86
Coração	$\hat{Y} = 1,7811 - 0,0512T$	0,97
Rins	$\hat{Y} = 2,4014 - 0,0519T$	0,94
Fígado	$\hat{Y} = 3,3686 - 0,0654T$	0,87

Observou-se, portanto, que dos órgãos avaliados o fígado apresentou maior número de células translocadas e acompanhando-se o desaparecimento destas células o baço foi o órgão que as eliminou mais rapidamente, no período estudado. Para um microrganismo translocado atingir o fígado, este deve atravessar a mucosa gastrointestinal e passar pelo sangue porta ficando retido nas células de defesa (células fagocíticas pertencentes à classe dos leucócitos que desempenham papel essencial na proteção do organismo contra a invasão de bactérias) denominadas células de Kupffer. Neste órgão, estas células têm função de remover bactérias do sangue porta que vem do intestino. Portanto, células translocadas de *Lactobacillus acidophilus* presentes no sangue porta foram, ao atingir o fígado, eliminadas por fagocitose.

Para um microrganismo translocado atingir o baço, este deve atingir primeiramente o fígado e por meio da circulação sanguínea geral atingir o baço ficando retido nas células de defesa denominadas histiócitos. Neste órgão, estas células têm função de destruir agentes estranhos que atingiram a circulação geral. Pelo fato do baço ser um órgão possuidor de um número elevado de histiócitos a eliminação dos microrganismos ali presentes foi mais rápida, o que foi corroborado na presente experimentação (1,8 vez mais rápido em relação ao fígado, 1,6 em relação aos rins e 1,1 em relação ao coração).

As células translocadas que não foram retidas nas duas primeiras linhas de defesa (fígado e baço) atingem a circulação sanguínea geral, podendo assim chegar aos rins e coração. Nos rins, estas células de defesa são denominadas mesangiais. Neste órgão, as células translocadas foram eliminadas via fagocitose também. Já o coração, por ser um órgão bombeador e não possuir células de defesa, provavelmente eliminou as células de *Lactobacillus acidophilus* nele presente por movimentos mecânicos.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Os probióticos são alimentos funcionais que carregam números elevados de bactérias benéficas, originadas do trato gastrointestinal humano ou do animal para o qual está sendo destinado. Os microrganismos mais empregados como probióticos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. O *Lactobacillus acidophilus* NCFM é uma estirpe de origem humana presente em vários produtos probióticos. No entanto, há pouca informação sobre sua translocação para os órgãos do hospedeiro. Para avaliar esta translocação, empregaram-se 110 ratos de  $\pm 61$  g da raça Wistar, divididos em dois grupos (controle e teste) de 50 animais, e um grupo basal de dez animais. O grupo-controle recebeu uma dieta padrão “ad libitum” e 0,1 mL de leite desnatado, via oral, diariamente. O grupo-teste recebeu a mesma dieta e 0,1 mL de leite desnatado, carreando  $1,0 \times 10^{10}$  UFC/mL da estirpe humana de *Lactobacillus acidophilus*, por dia. Após 14 dias de administração, dez animais de cada grupo foram sacrificados e o baço, o coração, o fígado e os rins avaliados quanto à presença de *Lactobacillus acidophilus*. O mesmo procedimento foi repetido sete, 14, 21 e 28 dias após o período de administração do probiótico.

Constatou-se a translocação de *Lactobacillus acidophilus* viáveis do trato gastrointestinal para outros órgãos, em ratos machos saudáveis, que foram alimentados por 14 dias, com 0,1 mL de leite acidófilo, contendo  $10^{10}$  UFC/mL de *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Nesta experimentação a taxa de desaparecimento de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* translocadas para baço, coração, fígado e rins foi estudada por um período de 28 dias após a administração do probiótico.

Os números de microrganismos probióticos translocados (em UFC) para os órgãos foram:  $2,9 \times 10^3$ ,  $1,4 \times 10^3$ ,  $5,2 \times 10^2$  e  $9,0 \times 10^1$ , para fígado, rins, baço e coração, respectivamente.

Vinte e oito dias após o consumo do probiótico, os números de células presentes nos órgãos (em UFC), foram: 32 para rins, 46 para fígado, 1,5 para coração e zero para baço. Portanto, após 46,9 dias estima-se que os microrganismos translocados para os diferentes órgãos sejam completamente eliminados. O baço, embora tenha apresentado imediatamente após a experimentação (tempo zero) somente  $5,22 \times 10^2$  UFC foi também o órgão do qual estas células foram mais rapidamente eliminadas. Isso pode ser devido à presença neste órgão de um número elevado de histiócitos cuja função é destruir, via fagocitose, agentes estranhos que tenham atingido a circulação sistêmica geral.

Os alimentos probióticos têm sido indicados para indivíduos convalescentes imunocomprometidos. É importante, pois, que a translocação seja mais um parâmetro no processo de seleção de microrganismos probióticos, uma vez que se desconhece qual o mecanismo envolvido nesta translocação e suas implicações para o hospedeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALM, L. The therapeutic effects of various cultures – an overview. In: ROBINSON, R.K. (Ed.). **Therapeutic properties of fermented milks**. London: Elsevier, cap. 3, p. 45-64, 1991.
- BALDAN, L.C. Em defesa da vida. **Globo Rural**, n.4, p.7-9, 1997.
- BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. **Gut**, v.42, p.2-7, 1998.
- BERG, R.D., CARLINGTON, A.W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. **Infection and Immunity**, v.23, p.403-411, 1979.
- BERG, R.D. Mechanisms confining indigenous bacteria to gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.33, p.2472-2484, 1980.
- BERG, R.D. Translocation and the indigenous gut flora. In: FULLER, R. (Ed.) **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman e Hall, p.55-85, 1992.
- BERG, R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends Microbiol.**, v.3, p.149-54, 1995.
- DRASAR, B.S., SHINER, M., McCLEOD, G.M. Studies on the intestinal flora. The bacterial flora of the gastrointestinal tract in healthy and achlorhydric persons. **Gastroenterology**, v.56, p.71-9, 1969.
- FERNANDES, C.F., SHAHANI, K.M., AMER, M.A. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. **Microbiology Reviews**, v.46, n.3, p.343-56, 1987.
- FERNANDES, C.F., SHAHANI, K.M. Anticarcinogenic and immunological properties of dietary lactobacilli. **J. Food Protection**, v.53, p.704-10, 1990.
- FERREIRA, C.L.L.F. Leite acidófilo: oito décadas de evolução. **Revista Leite & Derivados**, p.22-26, julho/agosto de 1999a.

- FERREIRA, C.L.L.F. O Leite "sweet" acidophilus. **Revista Indústria de Laticínios**, p.74-75, julho/agosto de 1999b.
- FULLER, R. A review – probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v.66, p.365-78, 1989.
- GILLILAND, S.E., SPECK, M.L. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.33, p.15-18, 1977.
- GILLILAND, S.E. et al. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Microbiology**, v.49, p.377-381, 1985.
- GILLILAND, S.E. Acidophilus milk products: a review of potential benefits for humans. **J. Dairy Sci.**, v.72, p.2483-94, 1989.
- GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v.80, p.203-207, 1998.
- GORBACH, S.L., PLAUT, A.G., NAHAS, L. et al. Studies of intestinal microflora. II. Microorganisms of the small intestine and their relations to oral and faecal flora. **Gastroenterology**, v.53, p.856-857, 1967.
- GUYTON, A.C. *Fisiologia Humana*, 6. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, 348p.
- HATCHER, G.E., LAMBRECHT, R.S. Augmentation of macrophage activity by cell-free extracts of selected lact acid-producing bacteria. **J. Dairy Sci.**, v.76, p.2485-92, 1993.
- HAWKINS, S.M. Bifidobacteria in dairy products. **Cult. Dairy Prod. J.**, v.28, p.16-20, 1993.
- HUNGER, W., PEITERSEN, N. New technical aspects of preparation of starter cultures. **Bulletin International Dairy Federation**, n.277, p.4-16, 1992.
- KANDLER, O., WEISS, N. **Regular, nonsporing gram-positive rods**. In: Bergey, D. H. **Bergeys manual of sistematic bacteriology**. Baltimore: Willians & Wilkins, v.2, p.1208-23, 1986.
- KIM, H.S., GILLILAND, S.E. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. **J. Dairy Sci.**, v.66, p.959-66, 1983.
- KLAVER, F.A.M., van DER MEER, R. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and Bifidobacterium bifidum is due to their bile salt-

deconjugating activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.1120-1124, 1993.

KLEEMANN, E.G., KLAENHAMMER, T.R. Adherence of *Lactobacillus* species to human fetal intestinal cells. **Journal Dairy Science**, v.11, p.2063-69, 1982.

KMET, V., FLINT, H.J., WALLACE, R.J. Probiotics and manipulation of rumen development and function. **Arch. Anim. Nutr.**, v. 44, p.1-10, 1993.

LACTIC. **Lactic acid bacteria**, Caen: França, 1997. [não paginado].

MARTINI, M.C., LEREBOURS, E.C., LIN, W.J., HARLANDER, S.K., BERRADA, N.M., ANTOINE, J.M., SAVAIANO, D.A. Strain and species of lactic acid bacteria in fermented milks (yogurts): effect on in vivo lactose digestion. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.54, p.1041-1046, 1991.

MITSUOKA, T. **Intestinal bacteria and health**, Tokyo: Harcourt Brace Jovarnovich Japan, 1978, 208p.

MITSUOKA, T. Recent trends in research on intestinal flora. **Bifidobacteria and Microflora**, v.1, p.3-24, 1982.

MITSUOKA, T. **Microbes in the Intestine – our lifelong partners**. Tokyo: Yakult Honsha Co., Std. 1989, 104p.

MITSUOKA, T. Intestinal flora and aging. **Nutrition Reviews**, v.50, p.438-46, 1992.

MOINEAU, S., GOULET, J. Effect of feeding fermented milks on the pulmonary macrophage activity in mice. **Milchwissenschaft**, v.46, p.551-4, 1991.

MOULIN, M.R.I. **Resposta imunológica de camundongos alimentados com células de *Bifidobacterium longum* em leite fermentado e não fermentado**. Viçosa-MG: UFV, 1996, 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)– Universidade Federal de Viçosa, 1996.

NADER de MACÍAS, M.E., APELLA, M.C., ROMERO, N.C., GONZALEZ, S.N., OLIVER, G. Inhibition of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. **J. Applied Bacteriology**, v.73, p.407-411, 1992.

NADER de MACÍAS, M.E., APELLA, M.C., ROMERO, N.C., GONZALEZ, S.N., OLIVER, G. Prevention of infections produced by *Escherichia coli* and

- Listeria monocytogenes* by feeding milk fermented with lactobacilli. **J. Food Prot.**, v.56, p.401-405, 1993.
- O'BOYLE, C.J., MACFIE, J., MITCHELL, C.J., JOHNSTONE, D., SAGAR, P.M., SEDMAN, P.C. Microbiology of bacterial translocation in humans. **Gut**, v.42, p.29-35, 1998.
- PASCAL, G. Functional foods in the European Union. **In Nutrition Reviews**, v.54, n.11, p.S29-S32, 1996.
- PERDIGÓN, G., MACIAS, M. E. N., ALVAREZ, S. et al. Effect of a mixture of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* administered orally on the immune system in mice. **J. Food Protection**, v.49, p.986-989, 1986.
- PERDIGÓN, G., MACIAS, M.E.N., ALVAREZ, S. et al. Systemic argumentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. **Immunology**, v.63, p.17-23, 1988.
- PRAJAPATI, J.B., PATIDAR, S.K. Methods for assessing the immunostimulating properties of dietary lactobacilli - a critical appraisal. **J. Food Sci. Technol.**, v.34, n.3, p.181-194, 1997.
- REEVES, P.G. et al. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, v.123, p.1939-1951, 1993.
- RETTGER, L.F., LEVY, M.N., WEINSTEIN, L. AND WEISS, J.E. ***Lactobacillus acidophilus* and its therapeutic application**. New Haven: Yale University Press, 1935.
- SABOYA, I., OETTERER, M., OLIVEIRA, A.J. Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados. **Bol. SBCTA**, v.31, n.2, p.176-185, jul-dez., 1997.
- SANDINE, W.E. Role of lactobacilli in the intestinal tract. **J. Food Prot.**, v.42, p.259-262, 1979.
- SEKINE, K., TOIDA, T., SAITO, M. et al. A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. **Cancer Research**, v.45, p.300-7, 1985.

- SELLARS, R. Acidophilus products. In: Robinson, R.K. (Ed.). **Therapeutic properties of fermented milks**. London: Elsevier Applied Science, p.81-116, 1991.
- SISSONS, J.W. Potencial of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals – a review. **J. Sci. Food Agric.**, p.1-13, 1989.
- SOMED. **XX1st International congress on microbial ecology and disease**, 28-30 de outubro, Institute Pasteur, Paris, França, 1996.
- WAGENINGEN INSTITUTE OF ANIMAL SCIENCES-WIA. **Non digestible oligossacharides, healthy food for the colon?** 4-5 de dezembro, Wageningen, Holanda, 1997.
- WELCH, C. Nutritional and therapeutic aspects of *Lactobacillus acidophilus* in dairy products. **Cultured Dairy Products Journal**, v.22, n.2, p.23-24, 26, 1987.
- WHO, Scientific Working Group on Monitoring and Management of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agentes. Geneva, 1994.
- WOLOCHOW, G., HILDEBRANT, G.J., LAMANNA, C. Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effects of microbial size and concentration. **The Journal of Infections Diseases**, v.116, p.523-8, 1966.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A

Quadro 1A - Contagem de lactobacilos no baço do grupo-teste após a administração do probiótico (tempo zero)

Repetição	Diluição	UFC/g	UFC/órgão
-----------	----------	-------	-----------

	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
1	98 (102/95)	10 (11/10)	980	784
2	92 (89/96)	9 (11/8)	920	598
3	80 (82/78)	7 (8/6)	800	528
4	0	0	0,0	0,0
5	90 (91/90)	4 (3/5)	900	630
6	80 (82/79)	7 (8/6)	800	760
7	73 (69/77)	6 (7/5)	730	613
8	92 (97/88)	9 (10/8)	920	644
9	53 (54/49)	5 (4/5)	530	355
10	41 (37/45)	2 (2/2)	410	315
Média			7,0 x 10 <sup>2</sup>	5,2 x 10 <sup>2</sup>
Desvio-Padrão			305,3	240,0

Quadro 2A - Contagem de lactobacilos no baço do grupo-teste sete dias após a administração do probiótico

Repetição (N <sup>o</sup> do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
11	1 (2/1)	0	10	6
12	0 (1/0)	0	0	0,0
13	4 (5/4)	0	40	28
14	0	0	0	0,0
15	5 (7/4)	0	50	61
16	7 (8/6)	0	70	55
17	3 (4/4)	0	30	35
18	9 (11/7)	0	90	57
19	0	0	0	0,0
20	8 (9/7)	0	80	74
Média			3,7x10 <sup>1</sup>	3,2x10 <sup>1</sup>
Desvio-Padrão			34,6	29,0

Quadro 3A - Contagem de lactobacilos no baço do grupo-teste 14 dias após a administração do probiótico

Repetição (N <sup>o</sup> do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
21	1 (1/1)	0	10	7
22	0 (1/0)	0	0	0,0

23	0	0	0	0,0
24	0	0	0	0,0
25	7 (9/5)	0	70	60
26	0	0	0	0,0
27	0	0	0	0,0
28	7 (8/7)	0	70	51
29	2 (3/1)	0	20	21
30	5 (6/4)	0	50	38
Média			2,2x10 <sup>1</sup>	1,8x10 <sup>1</sup>
Desvio-Padrão			29,7	23,0

Quadro 4A - Contagem de lactobacilos no baço do grupo-teste 21 dias após a administração do probiótico

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
31	1 (1/2)	0	10	6
32	0	0	0	0,0
33	1 (0/2)	0	10	7
34	0	0	0	0,0
35	0 (1/0)	0	0	0,0
36	0	0	0	0,0
37	0	0	0	0,0
38	5 (6/5)	1 (2/0)	50	44
39	0	0 (0/1)	0	0,0
40	2 (2/3)	0	20	18
Média			0,9x10 <sup>1</sup>	7,5x10 <sup>1</sup>
Desvio-Padrão			15,9	14,0

Quadro 5A - Contagem de lactobacilos no baço do grupo-teste 28 dias após a administração do probiótico

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
41	0 (0/1)	0	0	0,0
42	0 (1/0)	0	0	0,0

43	0	0	0	0,0
44	0	0	0	0,0
45	0	0	0	0,0
46	0	0	0	0,0
47	0	0	0	0,0
48	0	0(0/1)	0	0,0
49	0	0	0	0,0
50	0(1/0)	0	0	0,0
Média			0	0,0
Desvio-Padrão			0,0	0,0

Quadro 6A - Contagem de lactobacilos no coração do grupo-teste após a administração do probiótico (tempo zero)

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
1	9 (11/7)	0	90	94
2	9 (8/10)	0	90	72
3	1 (2/0)	0	10	9
4	1 (3/0)	0	10	10
5	12 (13/11)	0	120	121
6	2 (4/1)	0	20	18
7	17 (16/19)	0 (1/0)	170	183
8	1 (2/1)	0	10	9
9	19 (21/18)	1	190	273
10	12 (13/11)	1	120	110
Média			8,3x10 <sup>1</sup>	9,0x10 <sup>1</sup>
Desvio-Padrão			68,2	87,0

Quadro 7A - Contagem de lactobacilos no coração do grupo-teste sete dias após a administração do probiótico

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
11	7 (8/6)	0	70	68
12	10 (9/12)	0	100	110
13	0	0	0	0,0

14	4	0	40	48
15	10 (11/9)	0	100	108
16	1 (1/1)	0	10	9
17	11 (10/13)	1 (2/1)	110	101
18	5 (7/3)	0	50	53
19	6 (7/5)	0	60	75
20	1 (2/1)	0	10	11
Média			$5,5 \times 10^1$	$5,8 \times 10^1$
Desvio-Padrão			40,3	41,0

Quadro 8A - Contagem de lactobacilos no coração do grupo-teste 14 dias após a administração do probiótico

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	$10^{-1}$	$10^{-2}$		
21	0	0	0	0,0
22	2 (2/3)	0	20	24
23	0	0	0	0,0
24	3 (4/2)	0	30	35
25	4 (5/3)	0	40	59
26	0	0	0	0,0
27	0	0	0	0,0
28	4 (5/4)	0	40	40
29	2 (2/2)	0	20	20
30	1 (2/1)	0	10	11
Média			$1,6 \times 10^1$	$1,9 \times 10^1$
Desvio-Padrão			16,5	21,0

Quadro 9A - Contagem de lactobacilos no coração do grupo-teste 21 dias após a administração do probiótico

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	$10^{-1}$	$10^{-2}$		
31	0	0	0	0,0
32	0 (1/0)	0	0	0,0
33	0	0	0	0,0

34	3 (3/4)	0	30	34
35	0	0	0	0,0
36	1 (2/0)	0	10	13
37	0	0	0	0,0
38	2 (2/3)	0	20	30
39	0	0	0	0,0
40	0	0	0	0,0
Média			$6,0 \times 10^0$	$7,7 \times 10^0$
Desvio-Padrão			10,7	13,0

Quadro 10A - Contagem de lactobacilos no coração do grupo-teste 28 dias após a administração do probiótico

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	$10^1$	$10^2$		
41	0	0	0	0,0
42	1 (1/1)	0	10	15
43	0	0	0	0,0
44	0	0	0	0,0
45	0	0	0	0,0
46	0 (1/0)	0	0	0,0
47	0	0	0	0,0
48	0 (0/1)	0	0	0,0
49	0	0	0	0,0
50	0	0	0	0,0
Média			$1,0 \times 10^0$	$1,5 \times 10^0$
Desvio-Padrão			3,16	4,7

Quadro 11A - Contagem de lactobacilos no fígado do grupo-teste após a administração do probiótico

Repetição (Nº do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	$10^0$	$10^1$	$10^2$		
1	48 (47/49)	4 (4/5)	0	48	464
2	TNTC (28/31)	296 (295/298)	29	2960	19506
3	124 (146/102)	10 (12/9)	0	124	949

4	111 (103/119)	10 (11/10)	1 (2/1)	111	889
5	165 (163/167)	16 (17/15)	1 (2/0)	165	1409
6	178 (180/176)	4 (5/4)	0	178	1667
7	245 (252/238)	26 (29/23)	3 (4/2)	245	2231
8	4 (5/3)	0	0	4	47
9	179 (180/178)	16 (18/14)	1 (1/1)	179	1381
10	154 (157/152)	15 (15/16)	1 (2/0)	154	1061
Média				4,17x10 <sup>2</sup>	2,9x10 <sup>3</sup>
Desvio-Padrão				896,2	5800

Quadro 12A - Contagem de lactobacilos no fígado do grupo-teste sete dias após a administração do probiótico

Repetição (N <sup>o</sup> do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
11	208 (214/202)	21 (23/19)	1 (3/0)	208	1872
12	232 (241/224)	20 (22/19)	1 (2/0)	232	2781
13	178 (176/180)	18 (19/17)	0	178	2039
14	75 (77/74)	7 (8/6)	0	75	1044
15	>400	57 (58/57)	5 (6/5)	570	7341
16	59 (64/55)	5 (6/5)	0	59	608
17	35 (25/45)	2 (3/1)	0	35	308
18	83 (76/91)	9 (10/8)	0	83	743
19	91 (102/80)	0	0	91	992
20	140 (152/129)	15 (16/14)	1 (0/2)	140	1538
Média				1,67x10 <sup>2</sup>	1,9x10 <sup>3</sup>
Desvio-Padrão				156,2	2000

Quadro 13A - Contagem de lactobacilos no fígado do grupo-teste 14 dias após a administração do probiótico

Repetição (N <sup>o</sup> do Animal)	Diluição			UFC/órgão	UFC/g
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
21	34 (29/39)	3 (3/3)	0	34	415
22	63 (62/64)	7 (8/6)	0	63	753
23	57 (59/56)	6 (7/5)	0	57	621

24	90 (97/84)	10 (11/9)	0	90	1125
25	93 (97/90)	9 (10/8)	0	93	1471
26	73 (62/85)	6 (5/7)	0	73	845
27	13 (15/11)	0	0	13	206
28	35 (43/27)	1 (1/1)	0	35	398
29	42 (48/36)	4 (5/3)	0	42	392
30	26 (34/18)	2 (3/2)	0	26	320
Média				5,3x10 <sup>1</sup>	6,5x10 <sup>2</sup>
Desvio-Padrão				27,1	400

Quadro 14A - Contagem de lactobacilos no fígado do grupo-teste 21 dias após a administração do probiótico

Repetição (Nº do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
31	2 (2/3)	0 (1/0)	0	2	25
32	18 (14/22)	2 (1/3)	0	18	231
33	92 (102/83)	14 (17/12)	1 (3/0)	92	1409
34	30 (31/30)	3 (4/2)	0	30	354
35	11 (8/15)	0	0	11	153
36	0	0	0	0,0	0,0
37	16 (8/24)	0	0	16	230
38	22 (27/18)	1 (2/1)	0	22	417
39	5 (7/4)	0	0	5	73
40	3 (4/2)	0	0	3	47
Média				2,0x10 <sup>1</sup>	2,9x10 <sup>2</sup>
Desvio-Padrão				27,1	420

Quadro 15A - Contagem de lactobacilos no fígado do grupo-teste 28 dias após a administração do probiótico

Repetição (Nº do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
41	1 (2/0)	0	0	1	13
42	1 (1/2)	0	0	1	18
43	0	0	0	0,0	0,0

44	4 (1/7)	0	0	4	51
45	5 (4/6)	0 (1/0)	0	5	73
46	9 (8/10)	0	2 (2/3)	9	139
47	4 (4/4)	0 (1/0)	0	4	50
48	0	0	0	0	0,0
49	0	0	0	0	0,0
50	8 (10/6)	1 (1/1)	0	8	117
Média				2,8	4,6x10 <sup>1</sup>
Desvio-Padrão				3,4	50,0

Quadro 16A - Contagem de lactobacilos nos rins do grupo-teste após a administração do probiótico

Repetição (N <sup>o</sup> do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
1	78	8 (8/9)	0	78	135
2	157	17 (16/18)	1	157	213
3	67	7 (4/11)	0	67	100
4	TNTC	>600	71 (8)	7100	12212
5	144	14 (16/13)	0	144	218
6	60	5 (6/5)	0	60	105
7	113	12 (13/12)	0	113	214
8	82	8 (9/7)	0	82	168
9	76	6 (7/5)	0	76	153
10	81	9 (10/8)	0	81	148
Média				8,0x10 <sup>2</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>
Desvio-Padrão				2215,3	3800

Quadro 17A - Contagem de lactobacilos nos rins do grupo-teste sete dias após a administração do probiótico

Repetição (N <sup>o</sup> do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
11	30	3 (3/4)	0	30	57
12	132	13 (13/14)	1 (2/0)	132	278
13	54	6 (8/5)	0	54	108

14	0	0	0	0,0	0,0
15	38	3 (4/3)	0	38	77
16	124	12 (13/11)	0	124	248
17	68	6 (7/5)	0	68	127
18	49	5 (5/5)	0	49	93
19	26	0 (1/0)	0	26	60
20	158	12 (14/11)	0	158	336
Média				$6,8 \times 10^1$	$1,4 \times 10^2$
Desvio-Padrão				52,3	110

Quadro 18A - Contagem de lactobacilos nos rins do grupo-teste 14 dias após a administração do probiótico

Repetição (N <sup>o</sup> do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
21	60	7 (7/8)	0	60	115
22	81	8 (9/7)	1 (1/1)	81	185
23	50	5 (6/4)	0	50	106
24	0	0	0	0,0	0,0
25	87	7 (8/7)	0	87	228
26	31	2 (2/3)	0	31	73
27	37	3 (3/4)	0	37	91
28	80	8 (9/7)	1 (2/0)	80	193
29	65	8 (8/9)	0	65	143
30	27	2 (3/2)	0	27	70
Média				$5,2 \times 10^1$	$1,2 \times 10^2$
Desvio-Padrão				28,1	68

Quadro 19A - Contagem de lactobacilos nos rins do grupo-teste 21 dias após a administração do probiótico

Repetição (N <sup>o</sup> do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
31	0	0	0	0,0	0,0
32	0	0	0	0,0	0,0
33	35 (41/29)	3 (4/3)	0	35	115
34	12 (14/10)	1 (1/1)	0	12	35

35	0	0	0	0,0	0,0
36	23	1 (1/1)	0	23	60
37	42	6 (7/5)	0	42	110
38	11 (10/11)	0	0	11	30
39	0	0	0	0,0	0,0
40	39	0	0	39	99
Média				$1,6 \times 10^1$	$4,5 \times 10^1$
Desvio-Padrão				17,3	48

Quadro 20A - Contagem de lactobacilos nos rins do grupo-teste 28 dias após a administração do probiótico

Repetição (Nº do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$		
41	9 (11/7)	0	0	9	26
42	0	0	0	0,0	0,0
43	1	0	0	1	2
44	6 (8/4)	0	0	6	17
45	1 (2/0)	0	0	1	3
46	15 (18/12)	0	0	15	44
47	0	0	0	0,0	0,0
48	0	8 (14/2)	0	80	226
49	0	0	0	0,0	0,0
50	0	0	0	0,0	0,0
Média				$1,1 \times 10^1$	$3,2 \times 10^1$
Desvio-Padrão				24,7	70

Quadro 21A - Contagem de lactobacilos no baço do grupo-controle após a administração do LDR 10%

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	$10^{-1}$	$10^{-2}$		
1	0	0	0	0,0
2	0	0	0	0,0
3	0	0	0	0,0
4	0	0	0	0,0

5	0	0	0	0,0
6	0	0	0	0,0
7	0	0	0	0,0
8	0	0	0	0,0
9	0	0	0	0,0
10	0	0	0	0,0
Média			0,0	0,0
Desvio-Padrão			0,0	0,0

Quadro 22A - Contagem de lactobacilos no baço do grupo-controle sete dias após a administração do LDR 10%

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
11	0	0	0	0,0
12	0	0	0	0,0
13	0	0	0	0,0
14	0	0	0	0,0
15	0	0	0	0,0
16	0	0	0	0,0
17	0	0	0	0,0
18	0	0	0	0,0
19	0	0	0	0,0
20	0	0	0	0,0
Média			0,0	0,0
Desvio-Padrão			0,0	0,0

Quadro 23A - Contagem de lactobacilos no baço do grupo-controle 14 dias após a administração do LDR 10%

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
21	0	0	0	0,0
22	0	0	0	0,0
23	0	0	0	0,0
24	0	0	0	0,0

25	0	0	0	0,0
26	0	0	0	0,0
27	0	0	0	0,0
28	0	0	0	0,0
29	0	0	0	0,0
30	0	0	0	0,0
Média			0,0	0,0
Desvio-Padrão			0,0	0,0

Quadro 24A - Contagem de lactobacilos no baço do grupo-controle 21 dias após a administração do LDR 10%

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
31	0	0	0	0,0
32	0	0	0	0,0
33	0	0	0	0,0
34	0	0	0	0,0
35	0	0	0	0,0
36	0	0	0	0,0
37	0	0	0	0,0
38	0	0	0	0,0
39	0	0	0	0,0
40	0	0	0	0,0
Média			0,0	0,0
Desvio-Padrão			0,0	0,0

Quadro 25A - Contagem de lactobacilos no baço do grupo-controle 28 dias após a administração do LDR 10%

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
41	0	0	0	0
42	0	0	0	0
43	0	0	0	0
44	0	0	0	0

45	0	0	0	0
46	0	0	0	0
47	0	0	0	0
48	0	0	0	0
49	0	0	0	0
50	0	0	0	0
Média			0,0	0,0
Desvio-Padrão			0,0	0,0

Quadro 26A - Contagem de lactobacilos no coração do grupo-controle após a administração do LDR 10%

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
1	0	0	0	0,0
2	0	0	0	0,0
3	0	0	0	0,0
4	0	0	0	0,0
5	0	0	0	0,0
6	0	0	0	0,0
7	0	0	0	0,0
8	0	0	0	0,0
9	0	0	0	0,0
10	0	0	0	0,0
Média			0,0	0,0
Desvio-Padrão			0,0	0,0

Quadro 27A - Contagem de lactobacilos no coração do grupo-controle sete dias após a administração do LDR 10%

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
11	0	0	0	0,0
12	0	0	0	0,0
13	0	0	0	0,0
14	0	0	0	0,0

15	0	0	0	0,0
16	0	0	0	0,0
17	0	0	0	0,0
18	0	0	0	0,0
19	0	0	0	0,0
20	0	0	0	0,0
Média			0,0	0,0
Desvio-Padrão			0,0	0,0

Quadro 28A - Contagem de lactobacilos no coração do grupo-controle 14 dias após a administração do LDR 10%

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
21	0	0	0	0,0
22	0	0	0	0,0
23	0	0	0	0,0
24	0	0	0	0,0
25	0	0	0	0,0
26	0	0	0	0,0
27	0	0	0	0,0
28	0	0	0	0,0
29	0	0	0	0,0
30	0	0	0	0,0
Média			0,0	0,0
Desvio-Padrão			0,0	0,0

Quadro 29A - Contagem de lactobacilos no coração do grupo-controle 21 dias após a administração do LDR 10%

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
31	0	0	0	0,0
32	0	0	0	0,0
33	0	0	0	0,0
34	0	0	0	0,0

35	0	0	0	0,0
36	0	0	0	0,0
37	0	0	0	0,0
38	0	0	0	0,0
39	0	0	0	0,0
40	0	0	0	0,0
Média			0,0	0,0
Desvio-Padrão			0,0	0,0

Quadro 30A - Contagem de lactobacilos no coração do grupo-controle 28 dias após a administração do LDR 10%

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
41	0	0	0	0,0
42	0	0	0	0,0
43	0	0	0	0,0
44	0	0	0	0,0
45	0	0	0	0,0
46	0	0	0	0,0
47	0	0	0	0,0
48	0	0	0	0,0
49	0	0	0	0,0
50	0	0	0	0,0
Média			0,0	0,0
Desvio-Padrão			0,0	0,0

Quadro 31A - Contagem de lactobacilos no fígado do grupo-controle após a administração do LDR 10% (tempo zero)

Repetição (Nº do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
1	0	0	0	0	0,0
2	0	0	0	0	0,0
3	0	0	0	0	0,0
4	0	0	0	0	0,0

5	0	0	0	0	0,0
6	0	0	0	0	0,0
7	0	0	0	0	0,0
8	0	0	0	0	0,0
9	0	0	0	0	0,0
10	0	0	0	0	0,0
Média				0,0	0,0
Desvio-Padrão				0,0	0,0

Quadro 32A - Contagem de lactobacilos no fígado do grupo-controle sete dias após a administração do LDR 10%

Repetição (N <sup>o</sup> do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
11	0	0	0	0	0,0
12	0	0	0	0	0,0
13	0	0	0	0	0,0
14	0	0	0	0	0,0
15	0	0	0	0	0,0
16	0	0	0	0	0,0
17	0	0	0	0	0,0
18	0	0	0	0	0,0
19	0	0	0	0	0,0
20	0	0	0	0	0,0
Média				0,0	0,0
Desvio-Padrão				0,0	0,0

Quadro 33A - Contagem de lactobacilos no fígado do grupo-controle 14 dias após a administração do LDR 10%

Repetição (N <sup>o</sup> do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
21	0	0	0	0	0,0
22	0	0	0	0	0,0
23	0	0	0	0	0,0
24	0	0	0	0	0,0

25	0	0	0	0	0,0
26	0	0	0	0	0,0
27	0	0	0	0	0,0
28	0	0	0	0	0,0
29	0	0	0	0	0,0
30	0	0	0	0	0,0
Média				0,0	0,0
Desvio-Padrão				0,0	0,0

Quadro 34A - Contagem de lactobacilos no fígado do grupo-controle 21 dias após a administração do LDR 10%

Repetição (Nº do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
31	0	0	0	0	0,0
32	0	0	0	0	0,0
33	0	0	0	0	0,0
34	0	0	0	0	0,0
35	0	0	0	0	0,0
36	0	0	0	0	0,0
37	0	0	0	0	0,0
38	0	0	0	0	0,0
39	0	0	0	0	0,0
40	0	0	0	0	0,0
Média				0,0	0,0
Desvio-Padrão				0,0	0,0

Quadro 35A - Contagem de lactobacilos no fígado do grupo-controle 28 dias após a administração do LDR 10%

Repetição (Nº do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
41	0	0	0	0	0,0
42	0	0	0	0	0,0
43	0	0	0	0	0,0
44	0	0	0	0	0,0

45	0	0	0	0	0,0
46	0	0	0	0	0,0
47	0	0	0	0	0,0
48	0	0	0	0	0,0
49	0	0	0	0	0,0
50	0	0	0	0	0,0
Média				0,0	0,0
Desvio-Padrão				0,0	0,0

Quadro 36A - Contagem de lactobacilos nos rins do grupo-controle após a administração do LDR 10%

Repetição (N <sup>o</sup> do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
1	0	0(0/1)	0	0	0,0
2	0	0	0	0	0,0
3	0	0	0	0	0,0
4	0	0	0	0	0,0
5	0	0	0	0	0,0
6	0	0	0	0	0,0
7	0	0	0	0	0,0
8	0	0	0	0	0,0
9	0	0	0	0	0,0
10	0	0	0	0	0,0
Média				0,0	0,0
Desvio-Padrão				0,0	0,0

Quadro 37A - Contagem de lactobacilos nos rins do grupo-controle sete dias após a administração do LDR 10%

Repetição (N <sup>o</sup> do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
11	0	0	0	0	0,0
12	0	0	0	0	0,0
13	0	0	0	0	0,0
14	0	0	0	0	0,0

15	0	0	0	0	0,0
16	0	0	0	0	0,0
17	0	0	0	0	0,0
18	0	0	0	0	0,0
19	0	0	0	0	0,0
20	0	0	0	0	0,0
Média				0,0	0,0
Desvio-Padrão				0,0	0,0

Quadro 38A - Contagem de lactobacilos nos rins do grupo-controle 14 dias após a administração do LDR 10%

Repetição (Nº do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
21	0	0	0	0	0,0
22	0	0	0	0	0,0
23	0	0	0	0	0,0
24	0	0	0	0	0,0
25	0	0	0	0	0,0
26	0	0	0	0	0,0
27	0	0	0	0	0,0
28	0	0	0	0	0,0
29	0	0	0	0	0,0
30	0	0	0	0	0,0
Média				0,0	0,0
Desvio-Padrão				0,0	0,0

Quadro 39A - Contagem de lactobacilos nos rins do grupo-controle 21 dias após a administração do LDR 10%

Repetição (Nº do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
31	0	0	0	0	0,0
32	0	0	0	0	0,0
33	0	0	0	0	0,0

34	0	0	0	0	0,0
35	40 (37/44)	0	0	0	0,0
36	0	0	0	0	0,0
37	0	0	0	0	0,0
38	197 (159/235)	0	0	0	0,0
39	0	0	0	0	0,0
40	0	0	0	0	0,0
Média				0,0	0,0
Desvio-Padrão				0,0	0,0

Quadro 40A - Contagem de lactobacilos nos rins do grupo-controle 28 dias após a administração do LDR 10%

Repetição (Nº do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
41	0	0	0	0	0,0
42	0	0	0	0	0,0
43	0	0	0	0	0,0
44	0	0	0	0	0,0
45	0	0	0	0	0,0
46	0	0	0	0	0,0
47	0	0	0	0	0,0
48	0	0	0	0	0,0
49	0	0	0	0	0,0
50	0	0	0	0	0,0
Média				0,0	0,0
Desvio-Padrão				0,0	0,0

Quadro 41A - Contagem de lactobacilos no baço do grupo basal no tempo zero

Repetição (Nº do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
1	0	0	0	0,0
2	0	0	0	0,0
3	0	0	0	0,0
4	0	0	0	0,0
5	0	0	0	0,0
6	0	0	0	0,0

7	0	0	0	0,0
8	0	0	0	0,0
9	0	0	0	0,0
10	0	0	0	0,0
Média			0,0	0,0
Desvio-Padrão			0,0	0,0

Quadro 42A - Contagem de lactobacilos no coração do grupo basal no tempo zero

Repetição (N <sup>o</sup> do Animal)	Diluição		UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
1	0	0	0	0,0
2	0	0	0	0,0
3	0	0	0	0,0
4	0	0	0	0,0
5	0	0	0	0,0
6	0	0	0	0,0
7	0	0	0	0,0
8	0	0	0	0,0
9	0	0	0	0,0
10	0	0	0	0,0
Média			0,0	0,0
Desvio-Padrão			0,0	0,0

Quadro 43A - Contagem de lactobacilos no fígado do grupo basal no tempo zero

Repetição (N <sup>o</sup> do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
1	0	0	0	0	0,0
2	0	0	0	0	0,0
3	0	0	0	0	0,0
4	0	0	0	0	0,0
5	0	0	0	0	0,0
6	0	0	0	0	0,0

7	0	0	0	0	0,0
8	0	0	0	0	0,0
9	0	0	0	0	0,0
10	0	0	0	0	0,0
Média				0,0	0,0
Desvio-Padrão				0,0	0,0

Quadro 44A - Contagem de lactobacilos nos rins do grupo basal no tempo zero

Repetição (N <sup>o</sup> do Animal)	Diluição			UFC/g	UFC/órgão
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		
1	0	0	0	0	0,0
2	0	0	0	0	0,0
3	0	0	0	0	0,0
4	0	0	0	0	0,0
5	0	0	0	0	0,0
6	0	0	0	0	0,0
7	0	0	0	0	0,0
8	0	0	0	0	0,0
9	0	0	0	0	0,0
10	0	0	0	0	0,0
Média				0,0	0,0
Desvio-Padrão				0,0	0,0

Quadro 45A - Análise de variância da regressão e da falta de ajustamento para o baço

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Modelo	1	29,5442*
Falta de Ajuste	3	1,6140 <sup>ns</sup>
Erro puro	45	0,4399
Resíduo	48	0,5133

\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não-significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 46A - Análise de variância da regressão e da falta de ajustamento para o coração

Fonte de Variação	Gráus de Liberdade	Quadrado Médio
Modelo	1	13,3709*
Falta de Ajuste	3	0,1344 <sup>ns</sup>
Erro puro	45	0,2238
Resíduo	48	0,2182

\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não-significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 47A - Análise de variância da regressão e da falta de ajustamento para o fígado

Fonte de Variação	Gráus de Liberdade	Quadrado Médio
Modelo	1	6,8359*
Falta de Ajuste	3	0,0502 <sup>ns</sup>
Erro puro	45	0,0928
Resíduo	48	0,0901

\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não-significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 48A - Análise de variância da regressão e da falta de ajustamento para os rins

Fonte de Variação	Gráus de Liberdade	Quadrado Médio
Modelo	1	11,5133*
Falta de Ajuste	3	0,1453 <sup>ns</sup>
Erro puro	45	0,2111
Resíduo	48	0,2070

\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não-significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.