

EVELINE MONTEIRO CORDEIRO DE AZEREDO

**EFEITOS DE *Lactobacillus acidophilus* SOBRE A BIODISPONIBILIDADE DE
ZINCO, DE CÁLCIO E SOBRE A QUALIDADE PROTÉICA DE BEBIDAS
PROBIÓTICAS**

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 “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

EVELINE MONTEIRO CORDEIRO DE AZEREDO

EFEITOS DE *Lactobacillus acidophilus* SOBRE A BIODISPONIBILIDADE DE ZINCO, DE CÁLCIO E SOBRE A QUALIDADE PROTÉICA DE BEBIDAS PROBIÓTICAS

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 “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 02 de maio de 2002.

Prof^a Célia Lúcia de L. Fortes Ferreira
(Conselheira)

Prof. Gilberto Paixão Rosado
(Conselheiro)

Prof. Juraci Alves de Oliveira

Prof^a Lêda Quércia Vieira

Prof^a Neuza Maria Brunoro Costa
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, instituição que me proporcionou o desenvolvimento do programa de doutorado, preparando-me para o pleno exercício de minha vocação profissional. Meu agradecimento se estende a todos os professores cujos conhecimentos e exemplo marcaram o convívio experimentado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior – CAPES – pelos onze meses de bolsa concedidos durante o decorrer do programa.

À Professora Aristéa Alves Azevedo, Assessora Especial da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, pela acolhida, suporte e solidariedade, demonstrados de forma incondicional em momentos decisivos.

A tantos funcionários, do Departamento de Tecnologia de Alimentos e do Departamento de Nutrição e Saúde, cujo auxílio e boa-vontade foram essenciais para que esse período de treinamento chegasse a bom termo.

À minha orientadora, Professora Neuza Maria Brunoro Costa, pelos ensinamentos, pelo incentivo, pela segurança no controle dos rumos e pela amizade demonstrada.

Ao Professor Gilberto Paixão Rosado e à Professora Célia Lúcia de L. Fortes Pereira, meus conselheiros, pelas sugestões e pelo incentivo durante todo o desenvolvimento dos trabalhos de pesquisa.

Ao Professor Juraci Alves de Oliveira, cujos ensinamentos e auxílio foram vitais para desenvolvimento e prática da metodologia utilizada.

À Professora Leda Quércia Vieira, pelas sugestões e pela simpática e entusiasta participação durante a defesa da tese.

E, sobretudo, graças a Deus, porque n'Ele eu pude ter o sustento e a força que me fizeram alcançar mais esta grande bênção.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	1
BIBLIOGRAFIA.....	17
CAPÍTULO 1: QUALIDADE PROTÉICA DE PRODUTOS LÁCTEOS À BASE DE SORO DE LEITE ADICIONADOS DE PROBIÓTICOS.....	23
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS E .DISCUSSÃO.....	29
BIBLIOGRAFIA.....	35
CAPÍTULO 2: EFEITOS DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> NA BIODISPONIBILIDADE DE CÁLCIO (⁴⁵ Ca).....	37
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	55
CAPÍTULO 3: EFEITOS DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> NA BIODISPONIBILIDADE DE ZINCO.....	59
INTRODUÇÃO.....	59
MATERIAL E MÉTODOS.....	61
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
BIBLIOGRAFIA.....	72
CONCLUSÕES GERAIS.....	74

RESUMO

AZEREDO, Eveline Monteiro Cordeiro de, D.S. Universidade Federal de Viçosa, maio de 2002. **Efeitos de *Lactobacillus acidophilus* sobre a biodisponibilidade de zinco, de cálcio e sobre a qualidade protéica de bebidas probióticas.** Professor Orientador: Neuza Maria Brunoro Costa. Conselheiros: Prof^a Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira e Prof. Gilberto Paixão Rosado.

Estudos sobre a qualidade protéica e a biodisponibilidade de minerais têm a sua importância na manipulação dietética, visando a redução da prevalência de desnutrição energético-protéica e de carências nutricionais específicas, uma vez que componentes da dieta podem promover melhor utilização dos nutrientes. Nesse sentido, o presente trabalho visou avaliar os efeitos da adição de *Lactobacillus acidophilus*, uma bactéria probiótica, na qualidade protéica de uma bebida láctea à base de soro de queijo. Avaliou-se, ainda, o efeito dessa bactéria sobre a biodisponibilidade de cálcio e de zinco. No ensaio para avaliar a qualidade protéica foram utilizados 24 ratos machos recém-desmamados, separados em quatro grupos (n=6): um grupo controle com dieta à base de caseína, um segundo grupo com dieta aprotéica e dois grupos experimentais, sendo um à base da fórmula infantil e o outro à base da bebida láctea probiótica. Foram utilizados os métodos PER (coeficiente de eficiência protéica), NPR (razão protéica líquida), NPU (utilização protéica líquida) e digestibilidade. No estudo com cálcio foram utilizadas 60 ratas fêmeas adultas, sendo 30 intactas e 30 ovariectomizadas, divididas em 6 grupos (n=10), e cada grupo subdividido em três. Dentre as ratas intactas, um grupo recebeu probiótico, outro grupo recebeu leite sem probiótico e um terceiro grupo dose intraperitoneal de ⁴⁵Ca. Da mesma forma ocorreu com as ratas ovariectomizadas. O cálcio foi avaliado utilizando-se a técnica do traçador bioquímico (⁴⁵Ca), medindo-se sua absorção fracional no fêmur dos animais. Foi ainda avaliado o efeito do probiótico no íleo das ratas, medindo-se a superfície de absorção intestinal. A biodisponibilidade do zinco foi avaliada em 32 ratos machos recém-desmamados, divididos em quatro grupos: dieta padrão com 15 e 30 µg de zinco/g de dieta e dieta padrão com probiótico,

também com 15 e 30 μg de zinco/g de dieta. Foi feita a determinação do teor do mineral no fêmur, nos rins, no fígado, no sangue e no cérebro, por espectrofotometria de absorção atômica. O ganho de peso foi monitorado e determinada a atividade da enzima fosfatase alcalina, indicativa de crescimento ósseo. A bebida láctea elaborada apresentou uma alta qualidade protéica, semelhante a da proteína padrão (caseína), o que pode ser atribuído ao elevado valor biológico das proteínas do soro de queijo, associado à presença de bactérias probióticas e outras culturas lácteas, que ajudam a promover uma melhor utilização da proteína. No experimento com zinco não foi observada diferença nos fêmures dos animais, porém, a presença de *Lactobacillus acidophilus* proporcionou maior ganho de peso, podendo estar relacionado com a melhor biodisponibilidade desse e de outros nutrientes promotores do crescimento, o que indica efeito benéfico da presença da bactéria. Quanto à retenção de cálcio nos fêmures, os resultados mostraram ser maior nos animais que receberam probiótico e naqueles não submetidos à ovariectomia. Através da análise estatística dos valores observados para os parâmetros 'espessura' e 'superfície de absorção' dos cortes de íleo, obtidos histologicamente, observou-se que os animais intactos (com ovário) que receberam probiótico apresentaram os valores mais elevados, resultado semelhante ocorrido na retenção no fêmur, sugerindo a interferência do hormônio estrogênio nessas funções. Dessa forma, pode-se concluir que microrganismos probióticos são fatores de promoção da saúde, interferindo positivamente na biodisponibilidade de minerais como o cálcio e o zinco. A elevada qualidade protéica da bebida com probiótico e soro de leite demonstra não só benefícios dos probióticos, como também da utilização do soro de leite na elaboração de produtos lácteos.

ABSTRACT

AZEREDO, Eveline Monteiro Cordeiro de, D.S. Universidade Federal de Viçosa, May 2002. **Effects of *Lactobacillus acidophilus* on zinc and calcium bioavailability and protein quality of probiotic beverages.** Advisor: Neuza Maria Brunoro Costa. Committee Members: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira and Gilberto Paixão Rosado.

Studies on protein quality and mineral bioavailability are important on diet manipulation to reduce occurrence of protein-energy malnutrition and specific nutritional deficiencies, since diet components may improve nutrient utilization. The present work aimed at to evaluate the effects of *Lactobacillus acidophilus*, a probiotic bacteria, on protein quality of a whey-based milky beverage. The effect of this bacteria on calcium and zinc bioavailability was also evaluated. For protein quality assay, twenty-four weaning male rats were divided into four groups (n=6): control group fed a casein-based diet, protein-free group and two experimental groups, one of them fed a commercial probiotic infant formula, and the other fed the probiotic milky beverage. The following methods were utilized: protein efficiency ratio (PER), net protein ratio (NPR), net protein utilization (NPU) and digestibility. Sixty adult females rats, thirty intact and thirty ovariectomized, were utilized in the study on calcium bioavailability. They were divided into six groups (n=10). Among the intact female rats, one group was fed the probiotic, a second one received milk without probiotic, and a third one was fed an intraperitoneal dosis of ^{45}Ca . The ovariectomized rats were treated in the same manner. The calcium was evaluated by means of the method of biochemical tracer (^{45}Ca), by measuring its fractional absorption in the animal femurs. The effect of the probiotic bacteria on the ileum of the animals was also evaluated, by measuring the intestinal absorption surface. The zinc bioavailability was evaluated in thirty-two weaning male rats divided into four groups, fed a standard diet with 15 or 30 μg zinc/g diet, or a standard diet plus probiotic with 15 or 30 μg zinc/g diet. The zinc content was determined by atomic absorption spectrophotometry in femur, kidneys, liver, blood and brain. The weight gain was monitored and the activity of alkaline fosfatase, used as a bone growth marker, was determined. The

formulated milky beverage presented a high protein quality, similar to the standard protein (casein). This may be attributed to the high biological value of the whey proteins combined with the presence of probiotic bacteria and other dairy cultures that help to improve protein utilization. In the experiment with zinc, there was no difference among animal femurs, but the presence of *Lactobacillus acidophilus* provided an enhanced weight gain, which may be related to the better bioavailability of zinc and other growth-promoting nutrients, indicating a beneficial effect of this bacteria. Calcium retention in the femurs was higher in the intact animals fed the probiotic. The statistical analysis of the values reported for the parameters 'thickness' and 'absorption surface' of the ileum cuts indicated that the intact animals fed the probiotic presented the highest values, similarly to what occurred with calcium retention in the femur, suggesting the influence of estrogen hormone on these functions. It may be concluded that probiotic microorganisms are health-promoting factors, improving calcium and zinc bioavailability. The high protein quality of the beverage indicates the benefits of both probiotics and whey addition to dairy products.

INTRODUÇÃO

A frase "faça do alimento o seu medicamento", dita por Hipócrates há cerca de 2.500 anos, está recebendo interesse renovado. Hoje, para a maioria dos pesquisadores, a única saída para alterar o alarmante quadro em que se observam números crescentes de doenças advindas do consumo inadequado de alimentos, é conscientizar a população para que mude seus hábitos alimentares e siga o que Hipócrates pregava há milênios. Nos últimos anos a ciência da nutrição tem tomado outro rumo enquanto se abrem novas fronteiras ligando nutrição e medicina, com o surgimento do conceito de 'alimentos funcionais'. A descoberta de que certos alimentos contêm componentes ativos capazes de reduzir o risco de doenças, faz com que essa ciência se associe à medicina preventiva e ganhe uma nova dimensão no século XXI. Entre esses alimentos que contêm tais elementos considerados funcionais destacam-se os prebióticos e os probióticos que, além de nutrir, contribuem com componentes ativos que atuam sobre o organismo, produzindo efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos sobre a saúde (NUTRIÇÃO EM PAUTA, 2001).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Mundial para a Agricultura e Alimentos (FAO) reafirmaram, na Conferência Internacional de Nutrição, realizada em Roma em dezembro de 1993, que mais de dois bilhões de pessoas - cerca de 1/3 da população mundial - sofrem de deficiência de nutrientes, o que pode afetar principalmente crianças e a população de renda mais baixa. Dentre as mais importantes deficiências podemos destacar as de ferro, cálcio, iodo, vitamina A, vitaminas do complexo B, vitamina C, selênio e zinco. A carência desses elementos prejudica a saúde, podendo diminuir a resistência às infecções, o desenvolvimento físico, o aprendizado e a capacidade de trabalho de seus portadores, situação que pode ser prevenida por uma alimentação balanceada e variada (CONSÓRCIO DAS INSTITUIÇÕES BRASILEIRAS DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO -CIBRAN, 1994).

A utilização dos nutrientes energéticos pelo organismo, é comprometida pela deficiência de vitaminas e de minerais. Os minerais desempenham importantes funções no organismo, seja na forma iônica, seja em solução, nos fluidos corporais e, também, como constituintes de compostos vitais. De modo geral, eles regulam o metabolismo de diversas enzimas, mantêm o equilíbrio

ácido-básico e a pressão osmótica, facilitam a transferência de compostos essenciais através das membranas, mantêm a irritabilidade muscular e nervosa e, em alguns casos, fazem parte dos elementos constituintes dos tecidos do organismo (KRAUSE e MAHAN, 1998).

Ao se avaliar o estado nutricional de uma população, é impossível considerar todos os nutrientes essenciais, por volta de quarenta. A carência de alguns desses, dentre os quais cálcio e zinco, é reconhecida como problema de saúde pública em muitos países do terceiro mundo (WILLIAMS e WORTHINGTON-ROBERTS, 1992).

Os elementos minerais apresentam-se, no organismo e nos alimentos, em combinações orgânicas e inorgânicas. O corpo humano contém quantidades relativamente pequenas de minerais. Aproximadamente 4 a 5% do peso do corpo humano consiste de minerais, comparados com aproximadamente 14 a 16% de proteínas e 12 a 20% de gorduras. Todos os minerais participantes da estrutura orgânica devem ser fornecidos na dieta, particularmente para populações biologicamente vulneráveis. Para se ter uma boa alimentação é indispensável que a dieta seja balanceada, adequada ao seu usuário e suficiente em nutrientes e energia. A desnutrição pode ser primária, resultante de deficiência na dieta, ou secundária, em virtude de uma deficiência orgânica que interfira na absorção ou utilização de um ou mais nutrientes ou, ainda, de energia. As desordens, que podem ser por deficiência ou excesso alimentar, envolvem um ou mais nutrientes e podem variar de acordo com o grau de duração e conseqüências (GURR, 1999).

A importância dos minerais na dieta resulta de sua função biológica, o que justifica o direcionamento de estudos que levem à determinação de sua concentração nos alimentos e na quantificação de sua ingestão e biodisponibilidade (BARBERÁ e FARRÉ, 1992). Os estudos sobre biodisponibilidade de nutrientes, no Brasil, iniciaram-se na década de 60 do século passado, com trabalhos de avaliação do valor biológico de proteínas, fundamentados nos aspectos relacionados à DEP (desnutrição energético-protéica), cuja incidência sempre foi alta em nosso país. Por volta de 1980, com o desenvolvimento de técnicas analíticas mais sensíveis, passou-se também ao estudo dos micronutrientes, com particular interesse pelos minerais (COZZOLINO e PEDROSA, 1995).

1. IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL DO ZINCO

O zinco é um elemento essencial para nutrição de plantas, animais e humanos, ativando várias enzimas, além de ser um componente de muitas metaloenzimas importantes. Está envolvido na replicação celular e no desenvolvimento da cartilagem e dos ossos. Muitas rações para animais requerem suplementação com zinco devido aos baixos níveis dietéticos ou pela presença de fatores que diminuem sua biodisponibilidade (AMMERMAN et al., 1995). Está presente em sistemas biológicos na forma de cátion divalente, quase sempre complexado com substâncias orgânicas, como proteínas e aminoácidos, principalmente cisteína, histidina, e também algumas enzimas que têm o glutamato e o aspartato como ligantes (CHESTERS, 1997).

O zinco é um microelemento encontrado no organismo humano em maior quantidade que os elementos-traço, estando seu conteúdo calculado entre 1,5 e 2,5 g (80% no citosol e o restante no núcleo) e é encontrado no cabelo, pele, olhos, próstata, unhas, fígado, pâncreas, músculos, ossos e secreção das glândulas endócrinas (MARREIRO et al., 1998). Maiores concentrações corporais estão presentes na musculatura esquelética (57%), ossos (29%), pele (6%) e fígado (5%), mas secreções e fluidos corporais também contêm zinco. Seu teor no sangue é de cerca de 70-130 µg/dL. As principais enzimas nas quais o zinco está ligado são a anidrase carbônica, a carboxipeptidase, a desidrogenase láctica e as fosfatases alcalinas. O zinco funciona como determinante da forma e disposição espacial de enzimas e proteínas e na estabilização de proteínas ligadas ao DNA. Suas funções enzimáticas estão ligadas à necessidade deste mineral na atividade de muitas enzimas, entre elas a timulina, um hormônio envolvido na maturação de linfócitos T (CUNNINGHAM-RUNDLES, 1996). Também apresenta funções regulatórias, pois é captado ativamente pelas vesículas sinápticas, atuando na atividade neural e na memória. É um fator de crescimento, necessário para a síntese protéica, replicação de ácidos nucleicos, divisão celular, metabolismo da somatostatina, modulação da prolactina, ação da insulina e hormônios do timo, tireóide, supra-renal e testículos (WOOD, 2000). É necessário para o funcionamento adequado de linfócitos e fibroblastos, o que o torna essencial na defesa imunológica e na cicatrização. O zinco é absorvido passivamente ao longo de todo o intestino delgado, no duodeno e jejuno, através

da mediação de carreadores localizados na borda "em escova" do enterócito. Combina-se no plasma e, após liberar-se dos alimentos, forma complexos ligantes endógenos e exógenos com a histidina, ácido cítrico e ácido picolínico. A absorção acha-se relacionada com a concentração intestinal intraluminal e passa para a corrente sanguínea portal por processo ativo. No plasma e no sangue, combina-se com albuminas, ácidos e macroglobulinas, não se destinando a uso metabólico. Armazena-se no fígado, tecido muscular, unhas, pâncreas e ossos. A excreção é feita pela via urinária, cabelo, descamações da pele e sêmen e é perdido nas fezes junto com os enterócitos descamados na renovação celular da mucosa. A quantidade de zinco corporal é mantida constante no indivíduo adulto pela eficiência da absorção intestinal e pelas perdas fecais do mineral excretado nas secreções digestivas e na descamação do epitélio da mucosa intestinal. A absorção de zinco aumenta quando seus níveis corporais começam a diminuir e vice-versa. Animais deficientes em zinco podem absorver quase 100% do zinco alimentar, e no homem a absorção varia entre 6 e 40% (GUTHRIE e PICCIANO, 1995, FLEET, 2000, WOOD, 2000).

O acúmulo mais rápido e a maior taxa de renovação do zinco ocorrem nos tecidos moles, especialmente no pâncreas, fígado, rins e baço. O citosol hepático contém proteínas ligadoras de zinco similares ou idênticas à metalotioneína. Além de sua função na detoxicação celular de metais pesados, essa proteína pode ainda servir para o armazenamento de zinco. Quantidades relativamente grandes de zinco estão depositadas nos ossos, porém esses reservatórios não entram em equilíbrio rápido com o resto do organismo. O reservatório biologicamente disponível de zinco do organismo parece ser pequeno e apresentar renovação rápida (KING e KEEN, 1994).

Apesar de existirem inúmeros estudos qualitativos em animais domésticos, são poucos os dados quantitativos de biodisponibilidade, em mamíferos. Em muitos casos é impossível obter um valor específico a partir de trabalhos desenvolvidos, seja porque não existe uma curva-padrão ou porque não foram obtidas respostas aos suplementos de zinco, sob as condições usadas. Os sais de zinco, como o sulfato e o carbonato, têm sido usados rotineiramente nos estudos de biodisponibilidade. Experimentos com aves em crescimento mostraram que esses sais apresentam biodisponibilidade alta (AMMERMAN et al., 1995).

Fontes usadas como padrão nos ensaios de biodisponibilidade de zinco incluem o sulfato, o carbonato, o cloreto, o óxido e o acetato. O zinco de origem animal é mais biodisponível do que o de origem vegetal. O acúmulo de zinco no osso e a taxa de crescimento, em animais, parece ser um indicativo seguro da biodisponibilidade relativa de zinco. O zinco absorvido pelo fígado e a síntese de metalotioneína têm sido usados para estimar a biodisponibilidade, especialmente quando altas concentrações de zinco na dieta são fornecidas.

A recomendação de zinco varia de 2 a 5 mg/dia, para crianças, e de 12 a 14 mg/dia, para lactantes, sendo que, para adultos, a recomendação é de 8 a 11 mg/dia (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2001).

2. IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL DO CÁLCIO

No corpo humano, o cálcio está presente primariamente nos ossos e dentes, bem como nos fluidos intra e extracelulares, onde desempenha um papel em muitas reações enzimáticas. As perdas diárias podem ser repostas por meio da ingestão dietética. Adequada ingestão de cálcio pode ser benéfica não apenas na prevenção e tratamento da osteoporose, mas também na redução do risco de várias doenças, incluindo a hipertensão, câncer colo-retal e cálculo renal (SALOFF-COSTE, 1994).

O corpo humano contém por volta de 1.200 g de cálcio, sendo que, aproximadamente, 99% estão presentes no esqueleto. O osso é constantemente transformado ou renovado, num processo contínuo de reabsorção e formação. O cálcio sanguíneo é mantido dentro dos limites pela interação de vários hormônios (1,25-dihidroxicolecalciferol, hormônio da paratireóide, calcitonina, estrogênio, testosterona entre outros), que controlam a absorção e a excreção do cálcio, bem como o metabolismo ósseo. A principal função do cálcio é construir e manter ossos e dentes. Cerca de 1% do cálcio é encontrado nos fluidos corporais e tecidos moles. O cálcio participa do processo de coagulação sanguínea, iniciando as alterações necessárias para a formação do coágulo de fibrina. Além dessas funções o cálcio está ainda envolvido na liberação de energia para a contração muscular, na transformação de protrombina em trombina, na liberação inicial de neurotransmissores e na secreção de insulina (MÉNDEZ E WYATT, 2000).

A ligação existente entre o cálcio e a mineralização óssea é evidenciada, durante toda vida, na tentativa de se prevenir a osteoporose. Além desse importante papel, o cálcio desempenha inúmeras outras funções reguladoras no processo bioquímico corpóreo. A concentração plasmática de cálcio é relativamente constante, variando entre 9 e 11 mg/dL (EKLOU-KALONJI et al., 1999).

A eficiência da absorção do cálcio é de 10 a 60%, dependendo de sua disponibilidade, sendo um processo complexo ligado a inúmeros fatores que incluem também a idade, a raça, a presença de vitamina D, e até o uso de fármacos. Existem dois mecanismos distintos de absorção: difusão passiva (cerca de 80%) e transporte ativo (20%), que ocorrem principalmente no intestino delgado. A difusão passiva é paracelular e acontece principalmente no íleo e numa pequena extensão do cólon. Quando o cálcio ingerido é suficiente ou em excesso, o mecanismo passivo prevalece. Este processo passivo depende da ingestão de cálcio na dieta. O tempo de trânsito intestinal tem um grande impacto nesse processo, ou seja, quando o trânsito está acelerado leva a uma menor absorção. O transporte ativo necessita de ATP, é mediado por uma proteína transportadora e ocorre na presença de vitamina D. É um mecanismo muito importante quando a ingestão é baixa. Entre os fatores que influenciam positivamente sua absorção podem-se citar, além da vitamina D: a acidez da matéria digestiva, a presença de lactose, a proteína, o fósforo na alimentação e a necessidade orgânica de cálcio. Quando os níveis plasmáticos de cálcio estão baixos, a paratireóide é estimulada e libera o paratormônio, que age na vilosidade intestinal, nos rins e nos ossos. Sua ação no intestino visa aumentar a absorção do mineral; nos rins provoca maior reabsorção com maior excreção de fósforo e, nos ossos, maior mobilização de fósforo e cálcio, para aumentar o nível plasmático (HARRINSON e McNEILL, 1988).

Entre os fatores que influenciam de forma negativa a absorção do cálcio, pode-se destacar a presença de ácido oxálico, ácido fítico e fibra na alimentação. A presença de esteatorréia, instabilidade emocional, aumento da motilidade intestinal, inatividade física, cafeína e medicamentos anti-ácidos à base de alumínio, também estão relacionados à baixa absorção (KRAUSE e MAHAN, 1998).

A ingestão diária de 1.000 a 1.300 mg de cálcio é recomendada (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2001) para manter uma densidade óssea normal, e o consumo diário de leite e de produtos lácteos em geral, principalmente leites fermentados, contribui com uma fonte de cálcio em forma facilmente assimilável (FERREIRA, 1997). O cálcio é melhor absorvido como componente dos leites fermentados (em forma de lactato) do que em leite (como caseinato), visto que a presença de ácido e a melhor digestibilidade das proteínas aumentam a absorção de cálcio (HITCHINS e MCDONOUGH, 1989).

Verificou-se que a lactose pode aumentar, de modo não seletivo, a permeabilidade da membrana do intestino delgado, em experimentos feitos com camundongos, facilitando a difusão passiva de cátions divalentes como o cálcio (ROBERFROID, 2000). No entanto, em humanos, o fenômeno de absorção de cálcio é mais complexo, sendo diminuída em indivíduos intolerantes à lactose e aumentada em indivíduos sem esse problema. Como a lactase favorece a absorção de cálcio, portadores de deficiência de lactase estão mais propensos à osteoporose em razão da impossibilidade do consumo de leite (NAIDU et al., 1999). A lactose apresenta efeito favorável à absorção de cálcio, em nível proporcional à quantidade administrada, pois ocorre a quelação e formação de um complexo lactose-cálcio, de baixo peso molecular, forma pela qual o cálcio pode ser transportado através da mucosa intestinal (ALLEN & WOOD, 1994). É também possível que este complexo previna a precipitação do cálcio em forma de complexo insolúvel, quando o pH do trato intestinal muda de ácido para alcalino (MAHAN et al., 1998).

A osteoporose, considerada um dos maiores problemas de saúde pública nos países ocidentais, com prevalência em mulheres, é determinada pela combinação entre a quantidade de massa óssea formada até os 25 anos de vida e a razão de perda óssea a partir do climatério (MATKOVIC & ILICH, 1993). Esta enfermidade consiste na redução da massa óssea, tornando seus portadores suscetíveis a fraturas, quando submetidos a traumatismos. A nutrição é de interesse relevante nessa doença, já que a dieta é um recurso controlável, podendo ser modificada e adaptada a situações individuais (KRALL & DAWSON-HUGHES, 1994). Recomenda-se um consumo adequado de cálcio ao longo da vida como fator preventivo, porém grande parte das mulheres tem evitado o consumo de leite por causa da gordura nele contida. A prevalência da

osteoporose é aumentada em pessoas idosas, em razão da diminuição hormonal que ocorre com a idade, principalmente no sexo feminino. Estima-se que a fratura óssea decorrente da osteoporose seja encontrada em cerca de 7% das mulheres com idade próxima de 60 anos e em 25% das mulheres por volta de 80 anos. A massa óssea durante a vida é determinada por um número de fatores ambientais e genéticos, incluindo idade da menopausa, peso e altura corporal, atividade física, tabagismo, consumo de álcool e, também, ingestão de cálcio, vitamina D e outros nutrientes. Os mecanismos pelos quais esses fatores influenciam a massa óssea são diversos e não completamente entendidos. Alguns fatores de risco são interativos, como o tabagismo associado à diminuição da absorção de cálcio. A osteoporose pode se desenvolver secundariamente em condições como hiperparatireoidismo e hipertireoidismo. Os hormônios da tireóide e os fármacos dos grupos dos glicocorticóides e anticonvulsivos podem acelerar a perda óssea (WOSJE e SPECKER, 2000).

Acredita-se que uma ingestão adequada de cálcio por crianças e adolescentes aumente a massa óssea, e que essa influência seja maior no desenvolvimento do que na perda óssea, ou seja, o cálcio estaria agindo mais como um fator preventivo do que curativo, visto que a ingestão de cálcio na idade adulta não parece interferir na densidade óssea. Na menopausa, ocorre uma diminuição do estrógeno causando uma acelerada perda óssea. Esta deficiência pode ser prevenida pelo aumento na ingestão de cálcio. Recomenda-se, para mulheres e homens acima de 50 anos de idade, uma ingestão de 1.200 mg de cálcio/dia. A prevenção da osteoporose deve ser feita ainda na idade jovem, com ingestão adequada de cálcio, atividade física constante e hábitos de vida saudáveis (evitar uso de cigarro, consumo de bebida alcoólica e uso constante de alguns tipos de medicamentos). A deficiência na ingestão de cálcio tem contribuído para a perda de massa óssea enquanto a suplementação de cálcio, em mulheres osteoporóticas na menopausa, tem mostrado diminuir a taxa de fratura óssea. Um fator que parece levar à diminuição da ingestão de cálcio é a deficiência intestinal da enzima lactase, o que leva as pessoas a consumirem quantidades reduzidas de leite e derivados e, conseqüentemente, de cálcio (GURR, 1999).

Segundo informe da Tetrapak, a população brasileira consumiu, em 1998, 340 mL/dia de leite e derivados, cerca de 420 mg de cálcio (TETRAPAK, 2001).

De acordo com um inquérito alimentar realizado na cidade de São Paulo (VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ et al., 1997), a média diária de consumo de cálcio para homens e mulheres é de 380 mg, sendo 338 mg só para o sexo feminino, com idade entre 20 e 50 anos, considerado grupo de risco.

Os produtos lácteos, por constituírem a principal fonte de cálcio (RECKER et al., 1988), contribuem com cerca de 72% do conteúdo total de cálcio da dieta americana e os produtos lácteos probióticos, incluídos nesse grupo, são recomendados por proporcionarem efeitos benéficos ao organismo, tanto pelo aspecto nutricional como também pelo terapêutico. Desta forma, uma solução para o aumento da biodisponibilidade de cálcio seria através do uso de alguns produtos lácteos que veiculam microrganismos probióticos (GOLDIN, 1998). Estes produtos apresentam não apenas altas concentrações de cálcio, fósforo, magnésio e zinco, mas a biodisponibilidade é alta (isto é, a proporção disponível para absorção e utilização dentro do corpo). A biodisponibilidade dos minerais desses produtos pode até aumentar, comparada com a biodisponibilidade no leite, devido ao abaixamento do pH gástrico induzido pelo processo de fermentação (BUTTRISS, 1997).

3. IMPORTÂNCIA DOS PROBIÓTICOS PARA A SAÚDE

A palavra probiótico vem do grego "pela vida", foi originariamente proposta para descrever compostos produzidos por um protozoário que estimula o crescimento de outros. Conseqüentemente, a palavra 'probiótico' foi aplicada a organismos e substâncias que contribuem para o balanço da microflora intestinal. Esta definição não foi satisfatória, pois a palavra 'substância' pode incluir uma variedade de suplementos. O termo probiótico foi introduzido por Lilly e Stilwell (1965) para descrever substâncias produzidas por um microrganismo que estimula o crescimento de outros, com o propósito de se opor aos antibióticos. Parker (1974) definiu probióticos como organismos e substâncias que contribuem para o balanço intestinal. Mas esta definição não excluiu os antibióticos. FULLER (1989) enfatizou a importância de se ter células vivas, um componente essencial de um probiótico efetivo, definindo então probiótico como "um suplemento alimentar contendo microrganismos vivos os quais afetam benéficamente o hospedeiro melhorando o balanço da microbiota intestinal".

A definição de probiótico foi estendida de forma que, atualmente, probióticos são definidos como microrganismos viáveis que exibem um efeito benéfico na saúde do hospedeiro após sua ingestão pela melhora das propriedades da microflora nativa (SALMINEN et al., 1999).

As culturas probióticas são culturas de microrganismos que originalmente foram isolados do trato intestinal da espécie humana e animal e são empregadas para a elaboração de produtos lácteos probióticos ou de terceira geração, reconhecidos como funcionais. Existe uma tendência de se denominar alguns desses produtos de 'nutracêuticos' ou 'biocêuticos', devido ao caráter terapêutico e nutricional a eles atribuídos. As culturas probióticas são encontradas na forma simples, contendo uma espécie microbiana, ou na forma múltipla, combinando mais de uma espécie, probiótica ou não (FERREIRA, 1998).

Os benefícios nutricionais dos probióticos têm sido estudados em produtos lácteos fermentados com lactobacilos e bifidobactérias. Esses produtos contêm compostos químicos importantes, dependendo do tipo de leite usado e do tipo de microrganismo adicionado (bem como de suas atividades bioquímicas específicas) e também do processamento empregado para sua manufatura. Eles são caracterizados por um menor nível residual de lactose e maiores níveis de aminoácidos livres e de certas vitaminas do que os leites não-fermentados. Esses produtos contêm preferencialmente ácido láctico na forma L (+), que é mais facilmente metabolizado pelo homem do que o na forma D (-). As bifidobactérias produzem o ácido láctico L(+) em adição ao ácido acético, prevenindo a manifestação de acidose metabólica em crianças menores de um ano de idade. Além disso, o ácido láctico na forma L (+) absorvido no intestino é usado como fonte de energia. *Lactobacillus acidophilus* e as bifidobactérias sintetizam ácido fólico, niacina, tiamina, riboflavina, piridoxina e vitamina K, as quais são lentamente absorvidas pelo organismo. As vitaminas do complexo B são freqüentemente obtidas como ingredientes naturais nos alimentos. Assim, a adição dessas bactérias à dieta poderia mais efetivamente ajudar a alcançar os requerimentos (GOMES e MALCATA, 1999).

A categoria dos alimentos probióticos foi regulamentada em julho de 1991, no Japão, e recebeu o nome de "Foods for Special Health Use" (FOSHU), os quais devem apresentar propriedades medicinais e salutares, na forma de alimentos comuns, consumidos em dietas convencionais, mas que demonstrem

capacidade de regular funções corporais, de forma a auxiliar na proteção contra doenças (SILVA e STAMFORD, 2000).

A atuação dos probióticos baseia-se no princípio da "exclusão competitiva", que constitui uma propriedade inerente às bactérias que habitam o trato digestivo de animais, protegendo-os contra organismos que podem causar enfermidades e outros efeitos adversos. O efeito benéfico dos probióticos consiste na diminuição do pH intestinal, na competição pelos nutrientes, na produção de antitoxina, na redução de aminas tóxicas e amônia, além de facilitar a digestão dos nutrientes através de enzimas, produção de vitaminas, desconjugamento de sais biliares e diminuição do colesterol sanguíneo (PAULO, 1991).

Um probiótico efetivo deve ser dotado de uma série de propriedades, exercendo efeito benéfico ao hospedeiro, não sendo patogênico nem tóxico, excluindo ou reduzindo a aderência de enteropatógenos e, além disso, produzindo ácidos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas antagônicas ao crescimento desses patógenos. É essencial que o probiótico seja isolado da mesma espécie em que se deseja instalar. Um produto probiótico deve conter um grande número de células viáveis, que sobrevivam e se desenvolvam no intestino, deve permanecer viável durante a estocagem e uso, apresentando boas propriedades sensoriais. Em relação aos efeitos funcionais das bactérias probióticas, SALMINEN et al. (1996) sumarizaram os efeitos mais importantes que incluem: a modulação da resposta imune, a constituição de barreira da mucosa intestinal (devido à modificação da microflora intestinal), a aderência à mucosa intestinal de modo a evitar que o patógeno o faça ou seja ativado, a modificação das proteínas ingeridas, por ação da microbiota intestinal, a modificação da capacidade enzimática bacteriana - especialmente daquelas relacionadas à indução de tumores - e influência na permeabilidade da mucosa intestinal.

As bactérias probióticas têm sempre tido uma associação natural com alimentos lácteos. Os produtos contendo probióticos fornecem não apenas bactérias viáveis, mas também uma alta qualidade de macronutrientes e micronutrientes como o cálcio, peptídeos bioativos, esfingolípídeos, produtos finais da fermentação e ácidos linoléicos conjugados, todos encontrados nos produtos lácteos fermentados. Ao mesmo tempo, o tamponamento natural da acidez estomacal pelo alimento poderia aumentar a estabilidade do probiótico após seu consumo.

Muitos estudos têm mostrado os benefícios dos probióticos na prevenção e no tratamento de certas infecções do trato intestinal, o que se explica pela capacidade de exercer exclusão por competição, mesmo porque, de forma geral, os microrganismos patogênicos são pouco competitivos (VAUGHAN e MOLLET, 1999).

4. SORO DE QUEIJO E SUA IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL

A indústria de laticínios constitui parcela importante da indústria alimentícia e sua contribuição em termos de poluição de águas é significativa, sendo, portanto, necessário e obrigatório o tratamento prévio de seus rejeitos líquidos antes do lançamento. Muitas vezes esses rejeitos são lançados diretamente no meio ambiente e, por terem uma alta carga de sólidos totais degradáveis, sua carga de contaminação é muito elevada. No Brasil observa-se um crescente aumento na produção de queijos, com conseqüente maior produção de soro, visto que 80 a 90% do volume de leite empregado no processo é liberado nessa forma. É muito comum, em nosso país, os laticínios lançarem o soro de queijos e leite em cursos d'água ou empregá-los na alimentação de suínos, solução insuficiente para fazer frente ao volume a ser eliminado. Do ponto de vista biológico, o soro é um dos resíduos mais poluentes, apresentando uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) entre 30.000 e 60.000 ppm (MOSQUIM e FERREIRA, 1996). Estima-se que uma fábrica de queijo que produza 250.000 litros de soro por dia possa contaminar tanto a água quanto uma cidade de 50.000 habitantes (FAO, 1974). Apesar de o soro apresentar um teor protéico de apenas 0,7%, este dispõe de proteínas de alto valor biológico. As proteínas do soro de queijo são valiosas do ponto de vista nutricional. As lactoalbuminas e lactoglobulinas (principais proteínas do soro) são comparáveis às proteínas do ovo, apresentando uma taxa de eficiência protéica (PER) de 3,0; comparada ao valor 2,5 da caseína (FERREIRA, 1996). O teor de aminoácidos essenciais das proteínas do soro é maior do que os de quaisquer outras fontes, respondendo por aproximadamente 60% do teor protéico total do soro.

O soro é um dos maiores problemas das indústrias de laticínios em todo o mundo, por ser um resíduo com alta concentração de matéria orgânica. Cerca de 50% da matéria orgânica do leite está presente no soro, incluindo o melhor que o

leite pode oferecer: proteínas, peptídeos solúveis, lactose, minerais (principalmente cálcio e fósforo) e vitaminas. Algumas das alternativas para sua utilização seriam como complemento alimentar de ração animal - que só é praticável a curtas distâncias e pela produção de proteínas de soro e lactose em pó. Um outro método seria a sua fermentação por lactobacilos para produção de ácido láctico (PASSOS, 1997).

Pesquisas têm objetivado encontrar novos métodos de utilização do soro de queijo. O uso mais lógico seria retornar o soro de queijo à cadeia alimentar humana em forma palatável. Vários autores sugeriram que o soro de queijo poderia ser usado na formulação de refrigerantes nutritivos ou bebidas com alto teor protéico. O uso do soro como bebida na nutrição humana, especialmente para propósitos terapêuticos, foi mencionado por Hipócrates, em 460 a.C., o qual prescrevia o soro como um complemento dos alimentos. Na Idade Média, o soro foi recomendado por muitos médicos para várias doenças e, na metade do século XIX, a cura com o soro de queijo alcançou o ponto culminante com o estabelecimento de mais de 400 pontos que vendiam soro no Oeste Europeu. E mais tarde, entre 1940 e 1950, na Europa Central, a dispepsia, a uremia, a artrite, a gota, doenças do fígado, a anemia e até a tuberculose foram tratadas com a ingestão de mais de 1.500 g de soro de queijo por dia. A literatura indica que as bebidas de soro de queijo foram estudadas com maior intensidade na Alemanha e no Leste Europeu. As revisões publicadas sobre a utilização do soro de queijo em bebidas datam a partir de 1948 (TORRES, 1988).

Atualmente várias multinacionais já trabalham no sentido de dar um destino mais nobre para esse derivado. Indústrias como COBERCO (Holanda) e New Zealand Milk Products (Nova Zelândia) já atuam há vários anos no mercado mundial como fornecedores dessa matéria prima, que apresenta alta aceitação nos mercados Europeu, Americano e está aumentando no Brasil, sendo base para diversos tipos de produtos. No caso da indústria de transformação uma das principais vantagens da utilização de proteínas derivadas do soro é a substituição parcial de uma matéria-prima cara, como o leite em pó desnatado, por uma matéria-prima de valor biológico semelhante, mas com custo mais acessível. Já para a indústria que processa o soro de queijo, as vantagens são várias, além do benefício legal, relativo ao cumprimento das normas vigentes, esta se apresenta como uma nova fonte de renda. A utilização do soro de leite possibilita o

desenvolvimento de produtos de baixo custo, valor nutritivo elevado e de excelente padrão de qualidade.

O Japão e os Estados Unidos foram os pioneiros no uso de soro como fonte de compostos com propriedades medicinais. Atualmente, diversos outros países têm intensificado suas pesquisas sobre os benefícios à saúde. Várias funções ou atividades fisiológicas têm sido descobertas ou atribuídas às proteínas e aos peptídeos secundários do soro. Esses componentes podem aumentar a proteção passiva contra infecções, modular processos digestivos e metabólicos e atuar como fatores de crescimento para diferentes tipos de células, tecidos e órgãos. Os componentes do soro com potencial para serem usados em produtos comerciais incluem a α -lactalbumina, a β -lactoglobulina, a albumina sérica bovina, as imunoglobulinas, a lactoferrina e a lactoperoxidase. Muitos desses componentes possuem atividades biológicas que podem ser aproveitadas com grandes vantagens em produtos nutracêuticos ou antimicrobianos, sobretudo substâncias resultantes da degradação das proteínas do leite, definidos como peptídeos bioativos, as exorfinas (casomorfina), os fosfopeptídeos e os imunopeptídeos (USDEC News, 2001).

5. QUALIDADE NUTRICIONAL DAS PROTEÍNAS

Definir a qualidade protéica de um alimento não é fácil, pois essa qualidade não é dependente somente do padrão de aminoácidos e da digestibilidade da proteína, mas também do estado fisiológico do indivíduo que o recebe. A qualidade protéica é definida como a capacidade da proteína de fornecer ao indivíduo aminoácidos essenciais e nitrogênio não essencial. A qualidade protéica sofre a interferência também da composição e da adequação da dieta como um todo.

Os produtos lácteos fermentados são altamente nutritivos, principalmente porque seus principais constituintes estão parcialmente pré-digeridos devido ao processo fermentativo (FERREIRA, 1997). A hidrólise parcial da caseína e a desnaturação parcial das proteínas do soro durante o tratamento térmico do leite que dará origem ao produto fermentado facilita a ação das enzimas digestivas. O valor biológico das proteínas dos leites fermentados é superior ao do leite fresco (Rasic et al., 1971 citados por FERREIRA, 1997).

Existem numerosos estudos indicando que a fermentação dos alimentos com culturas de BAL (bactérias ácido lácticas) aumentam a quantidade, a disponibilidade e a digestibilidade dos nutrientes. O embasamento dessas conclusões vêm das medidas diretas da síntese de vitaminas e do aumento da eficiência alimentar quando os produtos fermentados são fornecidos a animais (NAIDU et al., 1999).

6. BIODISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES

A quantidade de nutrientes na dieta não é necessariamente o melhor indicador de sua adequação, pois os nutrientes são absorvidos com diferentes eficiências e, uma vez absorvidos, a utilização pode ser influenciada por outros componentes da dieta ou do alimento, pelo estado nutricional ou pela forma química do nutriente. Sendo assim, a biodisponibilidade deve ser vista como a eficiência de utilização do nutriente no alimento ou na dieta em relação ao padrão apropriado, ou seja, é a quantidade do nutriente que é absorvida na forma em que é metabolicamente ativo (MILLER, 1989).

Para entendermos a necessidade de técnicas para medir a biodisponibilidade de minerais, devemos considerar seu metabolismo no organismo. A rota metabólica dos minerais constantes de uma dieta, de um dia específico, ou de um alimento em particular, pode ser distinguida dos minerais de outras fontes, utilizando traçadores isotópicos (radioativos ou estáveis) como marcadores. Existem vários métodos para medir a biodisponibilidade do mineral, sendo que muitos envolvem a marcação do elemento extrinsecamente ou intrinsecamente com isótopo radioativo ou estável. Duas técnicas de marcação têm sido utilizadas. A marcação intrínseca consiste em fazer um alimento (no caso, vegetal) se desenvolver, incorporando o marcador. O uso posterior dos dados obtidos depende do fornecimento de informações precisas acerca da biodisponibilidade de alimentos isolados. Já na marcação extrínseca, uma quantidade-traço de um mineral é adicionada à dieta-teste, baseando-se no fato de que uma troca isotópica completa ocorra entre o marcador extrínseco e o mineral endógeno da dieta, de modo que a absorção e a utilização do isótopo adicionado extrinsecamente ocorram de forma idêntica à dos isótopos naturalmente presentes. Pode ser utilizada tanto para alimentos quanto para

dietas (SANDSTROM et al., 1993). As técnicas mais utilizadas para medir esta biodisponibilidade são o monitoramento fecal (isótopos estáveis), contagem de corpo inteiro (radioisótopos), incorporação pela hemoglobina para biodisponibilidade de ferro (radioisótopos e isótopos estáveis para crianças) e a técnica de isótopo duplo (administração oral e intravenosa de diferentes isótopos, como o cálcio e o zinco).

Dentre os métodos utilizados para avaliar a biodisponibilidade de cálcio, as técnicas utilizando isótopos são mais precisas em estudos de metabolismo e absorção em modelos animais e humanos. Possibilitam avaliar de forma mais precisa suas rotas metabólicas e sua retenção no organismo, tanto em elementos isolados quanto no contexto de uma dieta, uma vez que os isótopos seguem a mesma rota metabólica do mineral em estudo. Os resultados com radioisótopos são mais acurados devido à facilidade de detecção do mineral. Entretanto, esse método não pode ser utilizado em estudos com crianças e gestantes, devido aos efeitos das radiações ionizantes.

NICKEL et al. (1996) mostraram que a absorção fracional de cálcio do leite e derivados foi similar, aproximadamente 30% em mulheres na pré-menopausa, e a absorção não foi afetada pela técnica de marcação, extrínseca ou intrínseca, pelo conteúdo de lactose, pela fermentação ou pela forma química do cálcio. Este estudo confirmou os resultados obtidos por BUCHOWSKI et al. (1989), ao compararem métodos que utilizam marcadores extrínsecos e intrínsecos para estimar a biodisponibilidade de cálcio no leite de cabra e derivados, em ratos, o que evidencia que a técnica que utiliza marcador extrínseco é válida para esses produtos.

Diante desse quadro, considerando os valores de uma alimentação equilibrada, a importância das proteínas e dos minerais na nutrição e no controle de doenças, objetivou-se nesse estudo avaliar a biodisponibilidade de cálcio e de zinco de uma suspensão bacteriana probiótica de *Lactobacillus acidophilus* e a qualidade protéica de uma bebida láctea elaborada com soro de leite, adicionada de *Lactobacillus acidophilus*.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, L. H., WOOD, R. J. Calcium and phosphorus. In: SHILS, M. E., OLSON, J. A., SHIKE, M. **Modern nutrition in health and disease**. 8. ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1994. Cap. 7, p. 144 – 163.
- AMMERMAN, C. B., BAKER, D. H., LEWIS, A. J. **Bioavailability of nutrients for animals: amino acids, minerals and vitamins**. San Diego: Academic, 1995. 441p.
- BARBERÁ, R., FARRÉ, R. Revisión: biodisponibilidad de los elementos traza. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, València, v. 32, n.4, p.381-389, 1992.
- BUCHOWSKI, M. S., MILLER, D. D. Lactose, calcium source and age affect calcium bioavailability in rats. **American Institute of Nutrition**, New York, v.121, n. 11, p. 1746-1754, 1991.
- BUSHNELL, P. J., DeLUCA, H. F. Lactose facilitates the intestinal absorption of lead in wealing rats. **Science**, v. 211, p. 61-63, 1981.
- BUTTRISS, J. Nutritional properties of fermented milk products. **International Journal of Dairy Technology**, n.1,v. 50, p. 21-27, 1997.
- CHESTERS, J. K. Zinc. In: O'DELL, B.L., SUNDE, R.A. **Handbook of nutritionally essential minerals elements**. Marcel Dekker, Inc: New York, 1997. P.185-230.

- CONSÓRCIO DAS INSTITUIÇÕES BRASILEIRAS DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO (CIBRAN), 13, 1994. Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 1994.341p.
- COZZOLINO, S. M. F., PEDROSA, L. F. C. Biodisponibilidade de nutrientes. **Boletim SBCTA**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p.53-56, 1995.
- CUNNINGHAM-RUNDLES, S. Zinc modulation of immune function: specificity and mechanism of interaction. **J. Lab. Clin. Med.**, n.128, p.9-11, 1996.
- FERREIRA, C. L. L. F. Valor nutricional e bioterapêutico de leites fermentados. **Leite e Derivados**, n. 36, p. 46-52. 1997.
- FLEET, J.C. Zinc, copper and manganese. In: STIPANUK, M.H. **Biochemical and physiological aspects of human nutrition**. Philadelphia: Saundres Company, p.732-760, 2000.
- FOOD AND NUTRITION BOARD. **Dietary reference intakes (DRIs): recommended intakes for individuals, elements**. Institute of Medicine, National Academies, 2001.
- FULLER, R. A review – probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.
- GOLDIN, B. R. Health benefits of probiotics. **British Journal Nutrition**, v. 80, sup. 2, p. 203-207, 1998.
- GOMES, A.M.P., MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, n. 10, p. 139-157, 1999.

- GURR, M. **Calcium in Nutrition**. Ilsi Europe Concise Monograph Series. International Life Sciences Institute, 1999, 40 p.
- GUTHRIE, H.A., PICCIANO, M.F. **Human Nutrition**. Mosby, St. Louis, 1995, 659 p.
- HITCHINS, A. D., McDONOUGH, F. E. Prophylatic and therapeutic aspects of fermented milk. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, p. 675-684, 1989.
- KING, J.C., KEEN, C.L. **Zinc**. In: SHILS, M.E., OLSON, J.A., SHIKE, M. Modern Nutrition in Health and Disease. 8 ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1994. pp.214-230.
- KRALL, E. A., DAWSON-HUGHES, B. Osteoporosis. In: **Nutrition in health and disease**. 8. ed. London: Lea e Febiger, 1994. v.2, cap. 89, p. 1559-1567.
- MAHAN, L.K., ESCOTT-STUMP, S., KRAUSE, M.V., **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, 1998. 1179 p.
- MARREIRO, D.N., FISBERG, M., COZZOLINO, S.M.F. Considerações sobre o estado nutricional relativo ao zinco na obesidade. **Cadernos de Nutrição**, n.16, p. 31-40, 1998.
- MATKOVIC, V., ILICH, J.Z. Calcium requeriments for growth; are current recommendations adequate? **Nutrition Reviews**, Cambridge, v. 51, p.171-180, 1993.
- MÉNDEZ, R.O., WYATT, J. Contenido y absorción del calcio proveniente de la dieta del noroeste de Mexico. Una retrospectiva bibliográfica. **Archivos Latinoamericanos de Nutrição**, v.50, n.4, p.300-333, 2000.

- MILLER, D.D. Calcium in the diet: food sources, recommended intakes, and nutritional bioavailability. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.33, p.103-56, 1989.
- MOSQUIM, M.C. A.V.; FERREIRA, C. L. L. F. **III Encontro Divital de Tecnologia de Alimentos**. Aproveitamento tecnológico / racional de efluentes de laticínios. Novembro de 1996. Viçosa. MG.
- NAIDU, A. S., BIDLACK, W. R., CLEMENS, R. A. Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. 38, v. 1, p. 13-126, 1999.
- NICKEL, K.P., MARTIN, B.R., SMITH, D.L., SMITH. J.B., MILLER, G.D.WEAVER, C.M. Calcium bioavailability from bovine milk and dairy products in premenopausal women using intrinsic and extrinsic labeling techniques. **The Journal of Nutrition**, v.126, p.1406-1411, 1996.
- NUTRIÇÃO EM PAUTA**. Impacto dos alimentos funcionais para a saúde. p.1-6, 2001.
- ORTEN, J. M., NEUHAUS, O. W. **Bioquímica humana**. 10. ed. Bogotá: Médica Panamericana, 1984. 1016 p.
- PASSOS, L.M.L. **Produção de Células Viáveis de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 em Soro de Queijo Ultrafiltrado e Suplementado**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 48 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- PAULO, E. M. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de suínos para uso como probiótico**. Viçosa: UFV. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1991, 73 p.

RECKER, R. R., BAMMI, A., BARGER-LUX, M. J., HEANEY, R. P. Calcium absorbability from milk products, an imitation milk, and calcium carbonate. **American Journal of Clinical Nutrition**, USA, v. 47, p. 93-95, 1988.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.6, p.1682-1687, 2000.

SALMINEN, S. Probiotics: Scientific Support Use. **Food Technology**, n.11, v.53, p. 66, 1999.

SILVA, L. L., STAMFORD, T. L. M. Alimentos Probióticos: Uma revisão. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 68/69, p. 41-50, 2000.

http://tetrapak.com.br/html/produtos/index_produtos.htm (consultado em 06/09/2001)

TORRES, C.C. **Bebidas à base de soro de queijo: caracterização físico-química, microbiológica e sensorial**. Viçosa, MG: UFV, 1988. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1988.

USDEC NEWS. **Relação entre ingrediente de soro e saúde**. v. 4, n.1, 2001.

VAUGHAN, E. E., MOLLET, B. Probiotics in the new millennium. **Nahrung**, v. 43, n. 3, p. 148-153, 1999.

VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G., MARTINS, I.S., CERVATO, A.M., FORNÉS, N.S., MARUCCI, M.F.N. Consumo alimentar de vitaminas e minerais em adultos residentes em área metropolitana de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.31, n.2, 1997.

WILLIAMS, S.R., WORTHINGTON-ROBERTS, B.S. **Nutrition throughout the life cycle**. Ed. Mosby Year Book, St. Louis, 1992, 498 p.

WOOD, R.J. Assessment of marginal zinc status in humans. Supplement. Zinc and Health: Current Status and Future Directions. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 1350- 1354, 2000.

WOSJE, K.S., SPECKER, B.L. Role of calcium in bone health during childhood. **Nutrition Reviews**, v.58, n.9, p.253-268, 2000.

CAPÍTULO 1

QUALIDADE PROTÉICA DE PRODUTOS LÁCTEOS À BASE DE SORO DE LEITE ADICIONADOS DE PROBIÓTICOS

INTRODUÇÃO

O leite não é somente o alimento mais completo do homem, mas também o primeiro e aquele que o acompanha por toda a vida. Ao longo dos tempos, muitas modificações têm sido introduzidas para melhorar a palatabilidade do leite, sua digestibilidade e, ainda, para transformá-lo em alimento com propriedades funcionais, por meio da adição de microrganismos, como *Lactobacillus* e outros gêneros de reconhecida importância para a manutenção da saúde humana (FERREIRA, 1999). Como derivado do leite temos o soro, definido como a 'fração solúvel do leite que é separada da caseína durante a produção do queijo' (AGUILERA, 1995), ou como o 'subproduto do leite obtido durante a produção de queijo ou de caseína'. O soro é rico em componentes valiosos e, sob o ponto de vista nutricional, reúne proteínas de alto valor biológico, vitaminas e sais minerais, cujo aproveitamento merece ser incrementado (USDEC, 1997).

Ainda hoje os derivados da indústria de laticínios - entre os quais o soro de queijo - são desprezados e tratados como rejeitos sem grande importância alimentar, embora as proteínas encontradas neste soro sejam altamente biodisponíveis do ponto de vista nutricional, sendo excelentes fontes de aminoácidos. Porém, este soro vem sendo usado em algumas indústrias na fabricação de bebidas lácteas, normalmente na proporção de 30 a 40% da quantidade líquida total, diminuindo o desperdício e a poluição e, principalmente, aumentando o valor nutritivo desses produtos (SEIBEL e CANSIAN, 2001). A adição de bactérias probióticas aos produtos lácteos à base de soro tem sido objeto de estudo em inúmeras pesquisas, de forma a se conhecer os efeitos fisiológicos da administração oral dessas bactérias.

Especialistas são unânimes em afirmar que a integridade do intestino é fundamental para manter a saúde de todo o organismo. Muitas doenças provocadas por bactérias podem causar sérios problemas intestinais e, até mesmo, levar à morte. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS)

a diarreia é uma das principais causas de morte no mundo, e mata uma pessoa a cada 10 segundos. As vítimas mais freqüentes são as populações carentes, e a doença atinge principalmente crianças, idosos e pacientes debilitados. Voltados à preservação da saúde e à qualidade de vida, vários pesquisadores utilizam as bactérias lácticas, promotoras do reequilíbrio da microflora intestinal, para reverter quadros de diarreia.

O primeiro relato sobre o efeito terapêutico de *Lactobacillus acidophilus* foi publicado em 1921, por Rettger e Cheplin. Em 1935, Rettger e colaboradores demonstraram que desordens do trato intestinal podiam ser tratadas com a administração de leite fermentado contendo números elevados de uma estirpe de *L. acidophilus*, de origem humana. Nas primeiras décadas do século XX, já se relacionavam distúrbios intestinais com o desbalanceamento da microflora e *L. acidophilus* foi o primeiro microrganismo indicado para a sua recuperação (FERREIRA, 1999).

Este estudo consistiu do desenvolvimento de ensaio biológico com animais de laboratório, com o propósito de avaliar a qualidade protéica de uma bebida láctea à base de soro de leite, enriquecida com probióticos, e de um formulado comercial para uso infantil que contém probióticos. Visou ainda avaliar a utilização do soro de leite na produção de uma bebida láctea, como forma de aproveitamento desse resíduo, evitando sua descarga e conseqüente contaminação do ambiente.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*) da linhagem Wistar, recém-desmamados (24 ± 2 dias), peso inicial de 65 ± 5 g. Os animais foram separados em quatro grupos (n=6): um grupo controle com dieta padrão à base de caseína, um segundo grupo com dieta aprotéica e dois grupos experimentais, sendo um à base da fórmula infantil e o outro à base da bebida láctea probiótica.

Produtos avaliados: Os produtos avaliados foram uma bebida láctea e um formulado infantil, ambos contendo probióticos. A bebida láctea foi elaborada no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, segundo método descrito por SILVA et al. (2001), e posteriormente liofilizada no Laboratório de Genética Molecular de Plantas do BIOAGRO (Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária), da Universidade Federal de Viçosa. O formulado infantil, em forma de pó, foi obtido por doação da indústria produtora. A composição dos produtos utilizados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos produtos utilizados

Bebida Láctea (*)	Formulado Infantil (**)
Leite cru (58%)	Proteínas, composto por:
Soro de leite (24,8%)	60% de caseína (leite de vaca desnatado) e 40% de proteínas do soro de leite (soro de leite desmineralizado)
Sacarose (8,2%)	Carboidratos, composto por: 77% de lactose e 23% de maltodextrina
Polpa de manga (7%)	Lipídios, composto por: 50% de óleo de palma, 18% de óleo de canola, 18% de óleo de coco, 11% de óleo de milho e 3% de gordura Láctea, sais minerais e vitaminas
Cultura <i>S. thermophilus</i> + <i>L. bulgaricus</i> (1%)	Culturas de <i>S. thermophilus</i> + <i>B. bifidum</i>
Cultura <i>L. acidophilus</i> (1%)	
Ferrochel (200 mg Fe/g) (0,0002%)	

(*) Segundo SILVA et al. (2001)

(**) Informações obtidas no rótulo do produto

Dietas: As dietas apresentaram composição conforme AIN 93G (REEVES et. al., 1993), com modificação da quantidade de proteína para 10% (dietas padrão - DP, bebida láctea probiótica - DB e formulado infantil - DF), alterando-se a fonte protéica conforme o produto. A bebida láctea probiótica sofreu um processo de liofilização a fim de se obter um concentrado que alcançasse a quantidade protéica estipulada em 10%, uma vez que sua composição protéica original era em torno de 2,12%.

A Tabela 2 apresenta a composição das dietas experimentais e seus teores de proteínas.

Tabela 2. Composição das dietas experimentais e teores de proteína (g/100g)

Ingredientes	Dieta Padrão Caseína	Dieta aprotéica	Dieta Bebida Láctea	Dieta Formulado Infantil
Fonte de Proteína	10	--	10	10
Amido dextrinizado (*)	13,2	13,2	--	--
Sacarose	10	10	--	10
Óleo de soja	7	7	7	7
Fibra (celulose microfina) (*)	5	5	5	5
Mistura salínica (*)	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura vitamínica (*)	1	1	1	1
L- cistina (*)	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de colina (*)	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido (q.s.p.)	100	100	100	100
Teor de proteína (**)	10	---	9,73	9,47

(*) Rhooster Ind. Com. Ltda.

(**) Determinada pelo método Kjeldahl (AOAC, 1990)

Os animais ficaram alojados em gaiolas individuais, em condições de temperatura (25⁰C) e luminosidade artificial controladas, com fotoperíodo de 12 horas, recebendo água e alimentação *ad libitum*.

A bebida láctea probiótica constitui uma bebida fermentada à base de leite e soro de leite, tratada termicamente, mantida a 42⁰C e inoculada com 1% de cultura láctea para iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) e 1,0% da cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus*. Após incubação a 42⁰C por 3 a 3,5 horas, o produto foi resfriado, adicionado de soro e de polpa de manga (SILVA et al., 2001). O procedimento posterior foi a liofilização, pois este processo é o mais adequado por manter as células

bacterianas viáveis. A liofilização foi feita congelando o produto a -80°C , por 3 horas e, em seguida, sendo levado ao liofilizador (Edwards, Super Modulyio) por um período de 48 horas, o qual apresentava capacidade de liofilizar 2 L a cada 48 horas. Foram liofilizados 15 L da bebida, com rendimento de aproximadamente 1,5 Kg do produto em pó.

A concentração da cultura probiótica na bebida foi da ordem de 10^8 UFC/mL.

Foi feita determinação dos teores de proteínas (método semi-micro Kjeldahl), em todas as dietas, segundo AOAC (1990).

Os métodos biológicos empregados para avaliar a qualidade protéica foram o PER (coeficiente de eficiência protéica), NPR (razão protéica líquida), NPU (utilização protéica líquida) e digestibilidade (HOPKINS e STEINKE, 1978).

O PER foi determinado através da razão ganho de peso dos animais/consumo de proteína (g) durante os 14 dias de experimento.

O NPR é determinado através da seguinte fórmula:

$$\text{NPR} = (\text{ganho de peso do grupo teste (g)} + \text{perda de peso do grupo aprotéico (g)}) / \text{proteína ingerida do grupo teste (g)}.$$

O NPU, utilizado para a dosagem de nitrogênio retido na carcaça do animal, é obtido pela fórmula:

$$\text{NPU} = (\text{nitrogênio da carcaça do grupo teste (g)} - \text{nitrogênio da carcaça do grupo aprotéico (g)}) / \text{nitrogênio ingerido pelo grupo teste (g)}.$$
 Para se determinar o NPU, os animais, após sacrificados, foram secos em estufa de ar circulante a $105^{\circ}\text{C}/24$ horas, desengordurados em aparelho Soxhlet com éter de petróleo por 4 horas e triturados em multiprocessador doméstico, para se obter o nitrogênio da carcaça. Foi utilizado o método semi-micro Kjeldahl (AOAC, 1990).

Para a determinação da digestibilidade as dietas foram marcadas com indigocarmin (200 mg/100 g de dieta), e administradas aos animais no 3^o e 9^o dias. Procedeu-se à coleta das fezes por um período de sete dias, do 4^o ao 10^o dia, sendo colocadas em recipientes individuais e mantidas sob refrigeração até o momento da secagem em estufa com circulação de ar ($105^{\circ}\text{C}/24$ horas). As fezes foram então trituradas em multiprocessador e determinado o teor de nitrogênio pelo método semi-micro Kjeldahl (AOAC, 1990). A digestibilidade é obtida pela fórmula:

$D = [\text{nitrogênio ingerido (g)} - (\text{nitrogênio fecal (g)} - \text{nitrogênio fecal do grupo aprotéico (g)})] / \text{nitrogênio ingerido (g)}$ durante os sete dias de coleta das fezes.

Durante o ensaio biológico (14 dias), o ganho de peso e o consumo alimentar dos animais foram registrados semanalmente. Após esse período os animais foram sacrificados por inalação de gás carbônico.

Os dados foram interpretados por meio de análise de variância e as médias dos fatores qualitativos foram comparados utilizando o teste de Tukey ($P < 0,05$) (VIEIRA e HOFFMANN, 1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros ganho de peso e consumo alimentar, durante os 14 dias do ensaio, estão apresentados nas Figuras 1 e 2.

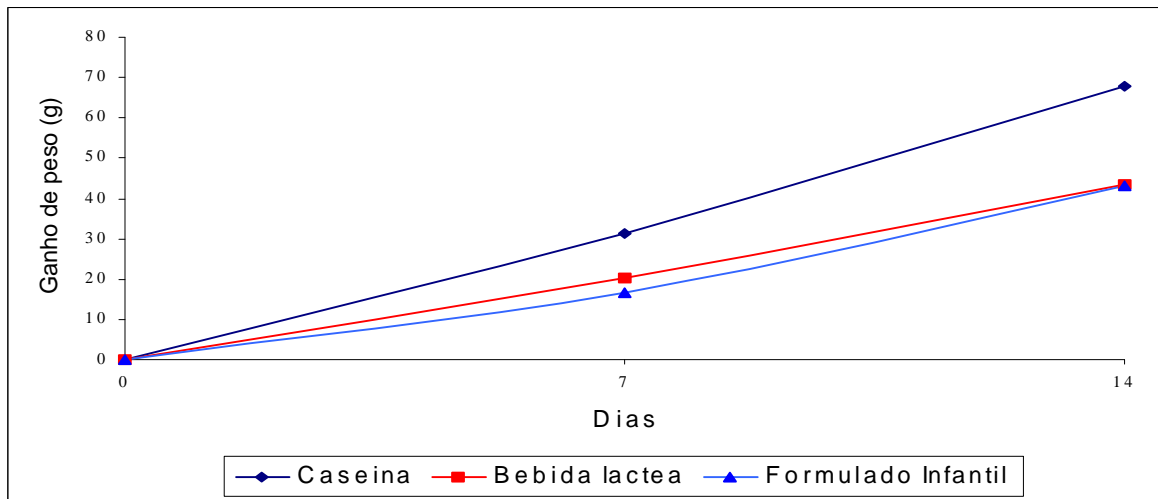


Figura 1. Ganho de peso dos ratos para os três tratamentos

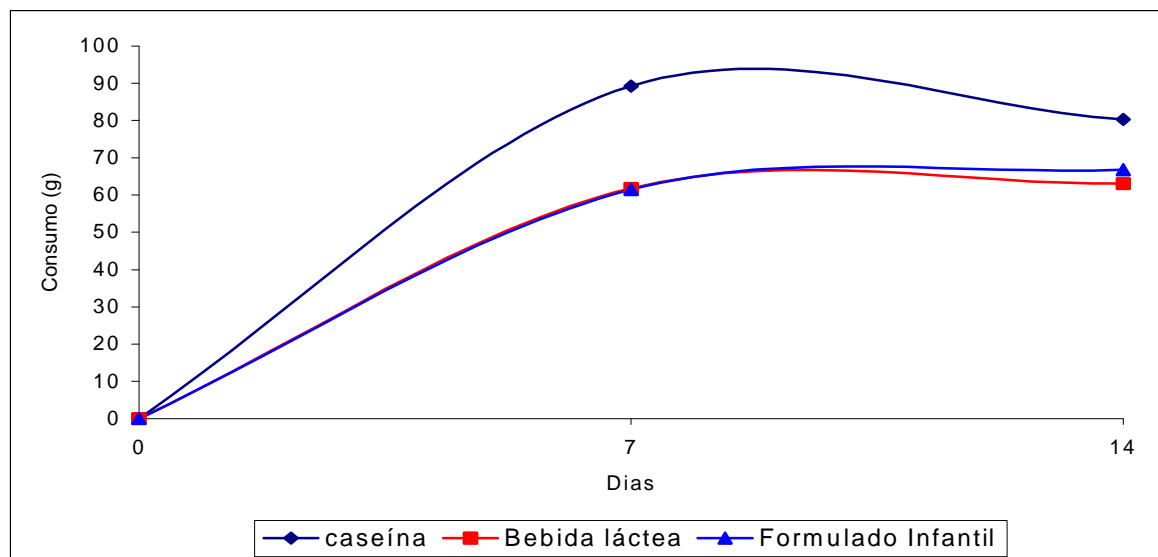


Figura 2. Consumo dos ratos para os três tratamentos

A observação da Figura 1 permite inferir que ambos os produtos testados levaram a incrementos no ganho de peso. Já na Figura 2 os grupos que consumiram as dietas experimentais (bebida láctea e formulado) apresentaram consumo menor do que o grupo que recebeu a dieta padrão.

O Quadro 1 apresenta a análise de variância dos parâmetros ganho de peso, consumo alimentar e o coeficiente de eficiência alimentar, representado pela razão entre o ganho de peso e o consumo alimentar. Observou-se diferença significativa entre tratamentos para todos os parâmetros. O Quadro 2, em seguida, mostra os valores médios desses parâmetros comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 1 – Resumo da análise de variância dos parâmetros estudados

FV	QM			
	GL	GP	CA	CEA
Tratamento	2	192,4*	3712,5*	0,3706*
Repetição	5	16,3 ^{ns}	79,10 ^{ns}	0,0302 ^{ns}
Resíduo	10	37,6	132,11	0,0326 ^{ns}
CV		11,9	8,15	6,46

* significativo a 5% de probabilidade

ns: não significativo a 5% de probabilidade

QM: quadrado médio

GP: ganho de peso

CA: consumo alimentar

CEA: coeficiente de eficiência alimentar

Quadro 2 – Comparação das médias dos parâmetros avaliados

Tratamento	Ganho de peso	Consumo Alimentar	CEA*
Caseína	67,6 ^a	169,6 ^a	2,51 ^b
Bebida Láctea	43,3 ^b	128,4 ^b	2,96 ^a
Formulado Infantil	43,2 ^b	124,9 ^b	2,90 ^a

Médias seguidas de uma mesma letra na coluna são estatisticamente iguais (Tukey, P<0,05)

* CEA: razão entre ganho de peso/consumo alimentar

Observa-se, pelos resultados mostrados nos Quadros 1 e 2, que o grupo que recebeu a dieta padrão (caseína) apresentou maior ganho de peso e maior consumo alimentar, mas o coeficiente de eficiência alimentar foi estatisticamente diferente dos outros grupos que receberam a bebida láctea e o formulado infantil. Nestes grupos o CEA foi maior, ou seja, as dietas experimentais promoveram maior eficiência alimentar segundo a razão ganho de peso/consumo alimentar.

De acordo com os dados expostos no Quadro 3, pode-se observar que os valores de PER não diferiram estatisticamente entre a bebida e o formulado, e a bebida láctea não diferiu da caseína (proteína padrão). Pode-se dizer que ambos os produtos testados podem ser considerados eficientes em relação à sua qualidade protéica no que diz respeito ao incremento de peso alcançado pela ingestão protéica. Para o NPR não houve diferença significativa entre os três tratamentos, podendo dizer que os produtos testados apresentaram valores adequados no que diz respeito ao crescimento e à manutenção. Os valores de digestibilidade foram estatisticamente iguais para os dois produtos, diferindo ambos do padrão.

Quadro 3. Valores de PER, PERr, NPR, NPRr, NPU e Digestibilidade encontrados

Tratamento	PER	PERr	NPR	NPRr	NPU	DIGESTIBILIDADE
Caseína	3,97 ^a	100%	4,75 ^a	100%	95,4 ^a	95,11 ^a
Bebida Láctea	3,57 ^{ab}	89,9%	4,67 ^a	98,3%	63,4 ^b	86,10 ^b
Formulado Infantil	3,56 ^b	89,67%	4,66 ^a	98,1%	63,4 ^b	89,15 ^b

Médias seguidas de uma mesma letra na coluna são estatisticamente iguais (Tukey, P<0,05)

Apesar da qualidade da proteína dos produtos ser elevada, observou-se menor digestibilidade nesses tratamentos, possivelmente pelo fato de as culturas probióticas contribuírem para um aumento da excreção fecal de nitrogênio proveniente dessa massa bacteriana. A quantidade de nitrogênio fecal encontrado foi 0,08 g para a dieta padrão de caseína diferenciando-se dos valores encontrados nos produtos testados (0,14 g para a bebida láctea e 0,13 g para o

formulado infantil), o que pode explicar os resultados do NPU e da Digestibilidade. É importante ressaltar que os animais dos dois grupos que receberam as dietas experimentais apresentaram diarreia durante o experimento, presumivelmente devido ao alto teor de lactose nesses produtos, o que pode ter contribuído para os mais baixos valores de NPU.

Muitas doenças provocadas por bactérias patogênicas podem causar sérios problemas intestinais, em forma de diarreias e disenterias que podem, mesmo, levar à morte. Entre as causas desses distúrbios estão a ingestão de água e alimentos contaminados, além de excessos de alimentação, abuso de álcool e ansiedade (GRACEY, 1996).

O leite e seus derivados são alimentos muito valorizados e a cada dia aparecem novas evidências de componentes lácteos que desempenham uma longa lista de funções fisiológicas benéficas à saúde. A partir dessas descobertas, as indústrias de laticínios foram estimuladas a desenvolver ingredientes especiais derivados lácteos. O leite apresenta em sua constituição nove tipos básicos de proteína, desempenhando funções específicas no organismo, tanto individualmente quanto em combinação com outros componentes. As proteínas presentes no soro do leite possuem um dos mais altos índices de valor biológico em comparação a outras fontes protéicas, tais como ovos, leite, carne bovina, soja e caseína, quando avaliadas pelo PER (USDEC News, 2000).

O soro de leite possui a proteína β -lactoglobulina que é uma rica fonte de cisteína, um aminoácido essencial que estimula a síntese de glutathione, um tripeptídeo anticarcinogênico produzido pelo fígado para a proteção contra tumores intestinais. A função biológica de uma outra fração, a α -lactoalbumina, é a de dar suporte na biossíntese da lactose, importante fonte de energia (WIT, 1998).

Os quadros de diarreia e disenteria são enfermidades persistentes principalmente nos países em desenvolvimento. Os avanços no tratamento dessas enfermidades, que incluem tanto o emprego de terapias de reidratação oral (especialmente aquelas feitas com alimentos de uso comum) quanto práticas corretas de alimentação, produziram aumentos significativos nas taxas de sobrevivência (GRACEY, 1996).

O PER é um método baseado no crescimento de ratos jovens, tido como o método oficial nos Estados Unidos nos ensaios biológicos de qualidade protéica.

Quando a qualidade protéica é interpretada em termos de nutrição humana, o rato é normalmente escolhido nos ensaios *in vivo*. Porém, o uso do rato pode levar a uma subestimação da qualidade de uma proteína para o homem. O homem requer menores quantidades de proteína para o crescimento e maiores para a manutenção do que o rato. Os requerimentos do rato para aminoácidos sulfurados e lisina são maiores que os dos homens. Estas diferenças entre as duas espécies podem ser devidas à maior taxa de crescimento dos ratos e também à maior quantidade de pêlos e conseqüentemente um alto requerimento de aminoácidos sulfurados. Mas, apesar dessas insuficiências no modelo – rato, os ensaios biológicos com esse animal continuam sendo a principal técnica de laboratório em ensaios de qualidade protéica (WALKER, 1983).

Por causa de sua capacidade de colonizar o intestino, tem sido atribuído a *Lactobacillus acidophilus* um importante papel na melhora da digestibilidade, aumentando a biodisponibilidade de nutrientes e estimulando o mecanismo imune do hospedeiro (GUPTA et. al., 1996). A hidrólise parcial da caseína e a desnaturação parcial das proteínas do soro durante o tratamento térmico do leite que dá origem ao produto fermentado parece facilitar a ação das enzimas digestivas. Algumas pesquisas têm indicado que os produtos lácteos fermentados resultam em maior eficiência alimentar, aumentando a média diária de ganho de peso e a conversão alimentar. Os resultados obtidos parecem ser conseqüência da melhor utilização dos nutrientes e maior biodisponibilidade das proteínas já parcialmente pré-digeridas nestes produtos.

PEREIRA e COSTA (2002), determinando a digestibilidade das proteínas do feijão sem casca em animais *germ free* e convencionais, encontraram valores superiores nos animais convencionais, sugerindo uma contribuição da flora intestinal para elevar o teor de Nitrogênio nas fezes desses animais, subestimando a digestibilidade verdadeira do feijão. A presença de microrganismos probióticos no intestino dos ratos que receberam a bebida láctea pode ter sido semelhante ao descoberto por esses autores.

O desenvolvimento de novos alimentos e a aplicação de bactérias probióticas, bem como o entendimento dos mecanismos de defesa e barreira intestinal são essenciais. A mucosa intestinal é um importante órgão de defesa, sendo uma barreira muito forte e eficaz contra antígenos e substâncias nocivas ao organismo (SALMINEN et al., 1996).

Apesar das intercorrências observadas, tal fato não impediu que os produtos analisados obtivessem um resultado favorável em relação à sua qualidade protéica.

BIBLIOGRAFIA

- AGUILERA, J.M. Gelation of whey proteins. **Food technology**, p.83-89, 1995.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15 ed., Washington, D.C.: 1990. 1184p.
- FERREIRA, C.L.L.F. Leite acidófilo: oito décadas de evolução. **Revista Leite & Derivados**. julho/agosto, p. 22-26, 1999.
- HOPKINS, D.T., STEINKE, F.H. Updating protein quality measurement techniques. **Cereal Foods World**, 23, p.539-543, 1978.
- GRACEY, M. A doença diarréica vista em perspectiva. Nestlé Nutrition Services, 35 p. **Resumo do 38º Seminário de Nestlé Nutrition**, 1996.
- GUPTA, P.K., MITAL, B.K., GARG, S.K. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* strains for use as dietary adjunct. **International Journal of Food Microbiology**, 29, p. 105-109, 1996
- PEREIRA, C.A.S., COSTA, N.M.B. Proteínas do feijão preto sem casca, digestibilidade em animais convencionais e *germ-free*. **Revista de Nutrição da PUCCAMP**, Campinas, S.P., v.15, 2002.
- REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., FAHEY, G.C. 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-76-A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, n. 123, p. 1939-1951, 1993.
- SALMINEN, S., ISOLAURI, E., SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antonie van Leeuwenhoek**, 70: 347-358, 1996.
- SEIBEL, N.F., CANSIAN, R.L. Análise de diferentes concentrações de soro na produção de bebida láctea. **Leite & Derivados**, p. 44-49, 2001.

SILVA, M.R., FERREIRA, C.L.L.F., COSTA, N.M.B., MAGALHÃES, J. Elaboração e avaliação de uma bebida láctea fermentada à base de soro de leite fortificada com ferro. **Revista do Laticínios Cândido Tostes**, n. 321, v. 56, julho/agosto, 2001.

USDEC - U.S. DAIRY EXPORT COUNCIL. **Manual de referência para produtos de soro dos EUA**. Arlington, 1997.

USDEC NEWS. Ingredientes lácteos para uma alimentação saudável. v.2, n.4, 2000.

VIEIRA, S., HOFFMANN, R. **Estatística experimental**. São Paulo: Atlas.1989. 179 p.

WALKER, A.F. The estimation of protein quality. In: Development in Food Protein. Edited by Hudson, B.I.F., v. 2, London, 1983. 339 p.

WIT, J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products, **Journal of Dairy Science**, 81: 597-608, 1998.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DE *Lactobacillus acidophilus* NA BIODISPONIBILIDADE DE CÁLCIO (^{45}Ca)

INTRODUÇÃO

O consumo adequado de minerais é importante para a manutenção de diversas funções metabólicas do organismo. Desta forma, uma ingestão inadequada pode levar a estados de carência nutricional, sendo conhecidas diversas manifestações patológicas decorrentes.

A importância do cálcio é conhecida há muitos anos e sua utilidade tem sido demonstrada na prevenção de enfermidades como a osteoporose, considerada um dos grandes problemas de saúde pública nos países ocidentais, com prevalência maior em mulheres, pois é determinada pela combinação entre a quantidade de massa óssea formada até os 25 anos de vida e a razão de perda óssea a partir do climatério (MATKOVIC e ILICH, 1993; NRC, 1989).

O cálcio tem sua melhor absorção através do consumo de leites fermentados do que através do consumo de leite que não sofreu fermentação, uma vez que a fermentação bacteriana dá origem ao ácido láctico, favorecendo a absorção do mineral. Além disso, a melhoria da digestibilidade das proteínas também aumenta sua absorção (HITCHINS e McDONOUGH, 1989).

Produtos lácteos fermentados podem ser acrescidos de bactérias probióticas, que apresentam inúmeros efeitos profiláticos e terapêuticos, dentre eles o balanceamento da microflora intestinal, o aumento da tolerância e da digestão da lactose, a atividade anticarcinogênica, a redução dos níveis de colesterol sangüíneo, a modulação da absorção da amônia, a síntese de vitaminas do complexo B, o aumento da absorção de cálcio e a modulação do sistema imunológico (SILVA e STAMFORD, 2000). Os probióticos são microrganismos vivos que, quando ingeridos, aprimoram beneficemente a microflora intestinal e as funções fisiológicas do trato intestinal humano. Os produtos contendo bactérias probióticas, como *Lactobacillus acidophilus*, são recomendados por proporcionarem efeitos benéficos ao organismo. A

administração oral da estirpe probiótica *Lactobacillus acidophilus*, pode melhorar a absorção intestinal de cálcio durante ou após a menopausa (ZAVALLA et al., 1997).

Dentre os métodos utilizados para avaliar a biodisponibilidade de cálcio, as técnicas utilizando isótopos, radioativos e estáveis, são mais precisas em estudos de metabolismo e absorção em modelos animais e humanos. Essas possibilitam avaliar de forma mais precisa suas rotas metabólicas e sua retenção no organismo. As técnicas mais utilizadas para estudos de biodisponibilidade de minerais são o monitoramento fecal (isótopos estáveis), contagem de corpo inteiro (radioisótopos) e a técnica de isótopo duplo (administração oral e intravenosa de diferentes isótopos, como cálcio e zinco). Os resultados com radioisótopos são mais acurados devido à facilidade de detecção do mineral (SANDSTROM et. al., 1993; SMITH et. al., 1985).

Com o propósito de verificar os efeitos de *Lactobacillus acidophilus* na biodisponibilidade de cálcio, propôs-se este estudo, avaliando-se a absorção fracional de ^{45}Ca , pela retenção do radioisótopo no fêmur de ratas com e sem ovário. Foram determinados os teores de cálcio, de zinco e de magnésio nos ossos a fim de avaliar a retenção desses minerais e o efeito da interação entre eles. Foram ainda analisados cortes histológicos do íleo dos animais para verificar os efeitos das bactérias probióticas sobre a mucosa intestinal.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: foram utilizadas 60 ratas fêmeas adultas (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe Rodentia) da linhagem Wistar, divididas em seis grupos de animais (n=10).

Probiótico: consistiu de uma suspensão de células da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* NCFM, elaborada no Laboratório de Culturas Lácticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

Dietas: segundo AIN 93-M (REEVES et. al., 1993), com modificação no teor de cálcio, sendo fornecido 50% da recomendação de cálcio para ratos (2,5 mg/g) (Quadro 1), tomando por base a ingestão média de cálcio da população brasileira, mulheres, entre 20 e 40 anos de idade (VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ et al., 1997)

Quadro 1. Dieta AIN 93-M fornecida aos animais.

Ingredientes	g/100g
Caseína	14
Amido dextrinizado	15,5
Sacarose	10
Óleo de soja	4
Celulose microfina	5
Mistura salínica*	3,5
Mistura vitamínica	1,0
L-cistina	0,18
Bitartarato de colina	0,25
Amido de milho (q.s.p.)	100 (q.s.p.)

* a mistura salínica foi elaborada com 2,5 mg de cálcio/g, na forma de carbonato de cálcio.

Solução radioativa de ^{45}Ca : a solução radioativa de cloreto de cálcio ($^{45}\text{CaCl}_2$) apresentava contagem inicial de 2 mCi (74 MBq), com atividade específica de 250 $\mu\text{Ci/mL}$. A quantidade da solução radioativa adquirida foi de 8 mL da solução de $^{45}\text{CaCl}_2$ com contagem de 2 mCi. Foram feitos os devidos cálculos para determinar a atividade da solução no dia em que se fez a aplicação, diluindo a solução para se atingir a atividade desejada. Tal procedimento foi feito com um

aparato de segurança, no Laboratório de Aplicação de Radioisótopos do Departamento de Biologia Geral, seguindo as normas da CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN, 2002).

Animais: apresentaram pesos iniciais entre 230 e 255 g, sendo separados aleatoriamente em grupos de dez e distribuídos em gaiolas individuais de aço inoxidável. A temperatura foi controlada para 25°C, e os animais foram mantidos em fotoperíodo de 12 horas. Os ratos receberam dieta baseada na semipurificada AIN93-M e água deionizada *ad libitum* durante o experimento. O consumo alimentar e o ganho de peso foram monitorados semanalmente. Os grupos experimentais consistiram de 30 ratas com ovário e 30 ovariectomizadas, sendo que cada um desses grupos foi subdividido em três grupos (n=10); o grupo 1 recebeu probiótico, o grupo 2 leite sem probiótico e o grupo 3 uma dose intraperitoneal de ⁴⁵Ca. A biodisponibilidade do cálcio foi determinada pela absorção fracional de cálcio radioativo (⁴⁵Ca).

Elaboração do probiótico: A suspensão de células bacterianas foi elaborada a cada três dias e a cultura constantemente ativada em caldo MRS (DE MAN et. al., 1960). A comprovação de pureza das culturas era feita por método de coloração de Gram. Após ativada, a cultura foi colocada para crescer em 200 mL de caldo MRS (1% da suspensão), e incubada por 24 horas à temperatura de 37°C. Em seguida foi centrifugada em 4 tubos de 50 mL (centrífuga Escelsa Baby), a 5.000 g, por vinte minutos. O sobrenadante foi descartado, adicionado o LDR a 10% (leite desnatado reconstituído) seguido de agitação em vórtex. Foram feitos plaqueamentos a cada elaboração da suspensão, em ágar MRS, com incubação por 48 horas em diluições de 10⁻⁷, 10⁻⁸ e 10⁻⁹. As contagens situaram-se na ordem de 10¹⁰ UFC/mL. A suspensão foi administrada durante 28 dias aos animais dos grupos selecionados para receber o probiótico, sendo que a cada animal foi fornecida uma dose de 0,1 mL/dia com 10¹⁰ UFC de probiótico *Lactobacillus acidophilus* NCFM/mL. Os animais dos demais grupos receberam a mesma quantidade diária (0,1 mL) apenas do leite desnatado reconstituído esterilizado. A dose de 0,1 mL foi administrada utilizando-se pipeta automática de 100 µL e ponteiros descartáveis. A suspensão de células de *L. acidophilus* foi acondicionada em frascos individuais, devidamente esterilizados, para cada dia.

Esterilização das ratas: Foi realizada cirurgia de ovariectomia em 36 ratas, sendo utilizadas 30 no experimento. A cirurgia foi conduzida no Centro Cirúrgico do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, onde as ratas receberam uma dose de 0,5 mL do anestésico geral intramuscular Zoletil® (Laboratório Virbac Ltda) e feita incisão abdominal para retirada dos ovários. Após a cirurgia as ratas foram alocadas em gaiolas individuais até sua pronta recuperação, por sete dias, recebendo, nesse período, dieta comercial peletizada e água destilada *ad libitum*.

Adaptação e utilização do ^{45}Ca : Os animais foram adaptados para consumir 3 g de dieta durante 2 dias alternados, após jejum de 12 horas. Após o consumo dessa dose, os animais receberam suas dietas "*ad libitum*". Esse treino foi importante para que os animais pudessem consumir toda a dose de ^{45}Ca em uma porção de 3 g de dieta. Aos 26 dias de experimento e após 12 horas de jejum, quatro grupos (com ovário - com e sem probiótico, sem ovário - com e sem probiótico) receberam 3 g de dieta contendo 25 mg de cálcio, adicionada de 9 μCi de ^{45}Ca /0,5 mL (dose oral). Os outros dois grupos (com e sem ovário) receberam dieta semelhante, sem marcador radioativo, e receberam uma dose intraperitoneal (IP) com dosagem de 9 μCi de ^{45}Ca /0,3 mL de solução salina 0,9%. Após receberem a dosagem, os animais retornaram à dieta AIN93-M, por 48 horas.

Sacrifício dos animais e retirada de fêmur e intestino: Após 48 horas do recebimento das doses de cálcio radioativo (oral e intraperitoneal), os animais foram sacrificados por inalação de CO_2 e seus fêmures direitos retirados para análise. Os fêmures foram digeridos em 3 mL de HNO_3 , por 15 horas, e o volume completado para 25 mL com água deionizada. Alíquotas de 0,5 mL dessas soluções foram diluídas com 5 mL de coquetel de líquido de cintilação da Sigma (S4273) para determinação do ^{45}Ca em Espectrômetro de Cintilação Líquida BECKMAN LS 6500. Procedeu-se à leitura da radioatividade presente nas amostras, quantificadas em cpm (contagens por minuto). As leituras foram realizadas por cinco minutos em duas replicatas. A absorção fracional de cálcio (^{45}Ca) nos animais foi calculada em relação à quantidade de ^{45}Ca no fêmur de cada rato que recebeu IP (injeção intraperitoneal), assumindo 100% de absorção.

$$\% \text{ Absorção fracional} = \frac{\% \text{ de dose oral de } ^{45}\text{Ca/fêmur}}{\% \text{ de dose intraperitoneal de } ^{45}\text{Ca/fêmur}} \times 100$$

Após a realização do experimento, os utensílios utilizados foram descontaminados com solução de cloreto de cálcio (1,25 mM CaCl₂). No restante do material utilizado - nos quais não era possível realizar a descontaminação - procedeu-se ao acondicionamento em freezer, onde foi devidamente identificado, para ser eliminado quando atingir o limite de isenção, segundo normas da CNEN (2002).

Além dos fêmures, foi retirada parte do intestino delgado, da região do íleo, para análise histológica. Esta retirada foi padronizada em relação à região e o tamanho da amostra - retirou-se de todos os animais cerca de 1 cm da região final do íleo, sendo em seguida fixada em solução contendo 5% de formol e 95% de solução salina 0,9%. Este material foi levado para análise histológica (realizada no Laboratório de Anatomia Patológica – PREVENT), onde foi submetido a cortes em micrótomo e feita coloração HE (hematoxilina-eosina), para posterior análise das lâminas em microscópio (Microscópio Óptico Olympus AX 70, acoplado a um microcomputador com analisador de imagens - Image ProPlus, versão 4.1.0.0).

Foram feitas leituras em espectrofotômetro de absorção atômica para os minerais cálcio, zinco e magnésio, a fim de verificar suas concentrações nos fêmures.

Análise estatística: O ensaio biológico foi conduzido segundo um esquema fatorial 2x2 {2 grupos de animais (com e sem ovário) e 2 dietas (com e sem probiótico)}, num delineamento em blocos casualizados com 8 blocos, pois foram descartados 2 blocos de cada tratamento devido a erros experimentais ocorridos na aplicação da dosagem da solução radioativa e no baixo consumo de alguns animais, da dieta contendo a solução radioativa. Os dados foram interpretados por meio de análise de variância utilizando-se o programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas), Universidade Federal de Viçosa, 1993. As médias foram comparadas utilizando-se o teste F, adotando-se o nível de 5% de probabilidade (VIEIRA e HOFFMANN, 1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Quadro 2 apresenta o resumo do Quadrado Médio (QM) dos parâmetros estudados. Observa-se maior absorção de cálcio pelo fêmur dos animais com ovário, sendo alcançados maiores valores de ganho de peso nos animais que receberam probiótico. Para o parâmetro retenção de cálcio no fêmur, pode-se observar maior retenção nos animais com ovário.

Quadro 2. Resumo do Quadrado Médio (QM), obtido pela análise de variância dos parâmetros estudados

FV	GL	QM					
		GP	Consumo	⁴⁵ Ca/fêmur	Ca fêmur	Zn fêmur	Mg fêmur
Tratamento	1	30,0 ^{ns}	0,38 ^{ns}	106,4*	896,9*	240,6 ^{ns}	17,4 ^{ns}
Dieta	1	185,3**	681,4 ^{ns}	14,4 ^{ns}	439,1 ^{ns}	87,6 ^{ns}	1,16**
Tratamento*Dieta	1	1,5 ^{ns}	577,6 ^{ns}	58,2**	24,5 ^{ns}	291,2 ^{ns}	0,004 ^{ns}
Bloco	7	246,4**	4475,5 ^{ns}	17,1 ^{ns}	207,2 ^{ns}	1120,8 ^{ns}	0,24 ^{ns}
Resíduo	21	102,9	915,1	8,3	164,3	215,9	0,21
CV%		47,5	7,5	15,7	7,4	17,3	9

* significativo a 5%

** significativo a 1%

ns: não-significativo pelo teste F (P>0,05)

QM: quadrado médio

GP: ganho de peso

FV: fonte de variação

GL: grau de liberdade

Tratamento: ovariectomizados ou não

Dieta: com ou sem probiótico

Observa-se pela análise da Figura 1 que houve maior retenção de ⁴⁵Ca (p<0,05) nas ratas com ovário que receberam probiótico (22,08%), comparado com as que não receberam probiótico (18,04%). O efeito do probiótico, entretanto, não foi observado nos animais ovariectomizados com (15,73%) e sem (17,09%) probiótico. Portanto, o possível incremento na absorção intestinal de cálcio decorrente da ação dos probióticos não contribuiu para a maior deposição de

cálcio nos ossos de animais ovariectomizados, ao contrário dos animais normais, sugerindo o efeito de hormônios estrogênicos para essa finalidade.

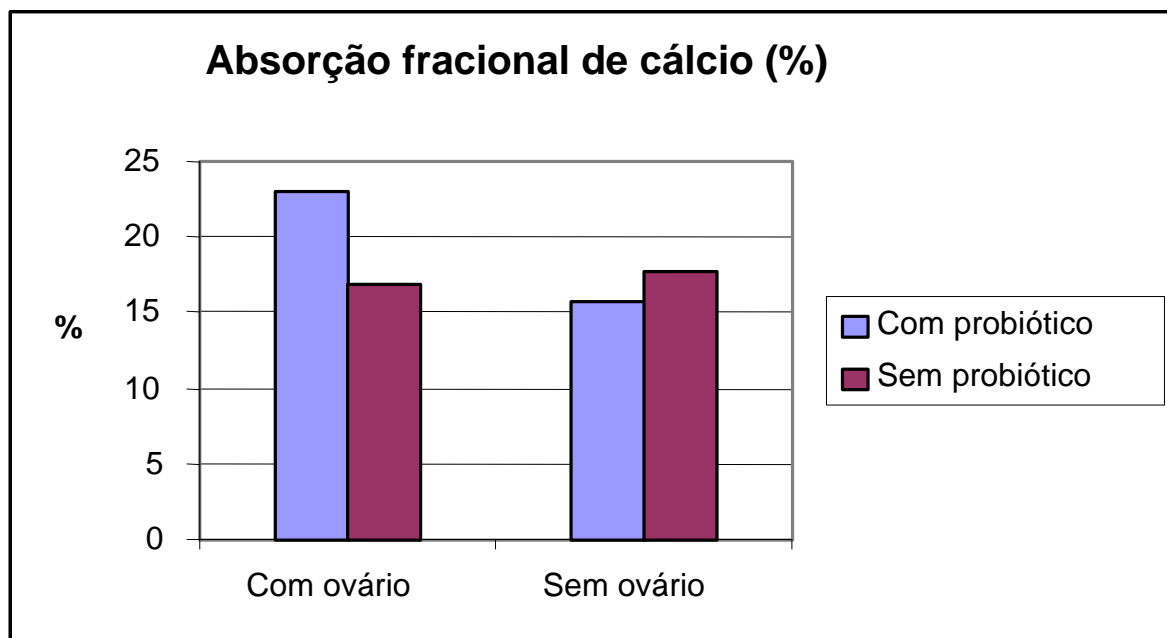


Figura 1. Absorção fracional de ^{45}Ca no fêmur. CP: com probiótico; SP: sem probiótico

O Quadro 3 apresenta o teor médio de cálcio encontrado no fêmur, apresentando os valores obtidos e a análise estatística da comparação entre eles. Observa-se maior retenção de cálcio no fêmur nos animais com ovário e que receberam probiótico.

Quadro 3. Absorção fracional de cálcio no fêmur (%)

^{45}Ca	Com probiótico	Sem probiótico
Com ovário	22,08 ^{a A}	18,04 ^{b A}
Sem ovário	15,73 ^{a B}	17,09 ^{a A}

Médias seguidas pela mesma letra na linha (minúscula) e na coluna (maiúscula), não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

O Quadro 4 apresenta os valores médios de cálcio determinados por absorção atômica, o que reflete seu teor médio de absorção no fêmur dos

animais. Houve diferença significativa entre tratamentos, ou seja, os animais com ovário apresentaram maior absorção de cálcio pelo fêmur, independente da presença do probiótico.

Quadro 4. Teor médio de cálcio absorvido pelo fêmur (mg/g)

⁴⁵ Ca	Com probiótico	Sem probiótico
Com ovário	181,2	175,6
Sem ovário	172,1	163,2

Receptores de estrogênios têm sido identificados no osso e esses hormônios são conhecidos por terem um papel importante na manutenção da massa óssea. A deficiência de estrógeno, que ocorre nas mulheres após a menopausa, resulta numa acelerada perda mineral óssea, sendo um fator importante no desenvolvimento da osteoporose. A terapia de reposição hormonal reduz a taxa de perda de massa óssea e conseqüentemente diminui a incidência de fratura óssea (ALOIA et al., 1994).

Quando analisada a fonte de variação 'tratamento' (com e sem ovário) e 'interação' não houve diferença significativa para os parâmetros consumo e ganho de peso. Porém, houve diferença significativa no efeito dieta (com e sem probiótico) para ganho de peso, sendo que os grupos que utilizaram o probiótico apresentaram uma média de ganho de peso maior, independente do tratamento.

O Quadro 5 apresenta os valores médios dos parâmetros avaliados, para os diferentes tratamentos e dietas. O teor de zinco no fêmur não apresentou diferença significativa. Já o teor de magnésio encontrado no fêmur mostrou haver diferença significativa entre tratamentos, semelhante ao encontrado para o teor de cálcio no fêmur. O que também permite dizer que quando os animais apresentavam ovário, observou-se maior absorção de magnésio pelo fêmur, sugerindo mais uma vez a importância dos hormônios estrogênios no desenvolvimento ósseo.

Quadro 5. Valores médios dos parâmetros analisados em função dos tratamentos e das dietas fornecidas

Tratamento	Parâmetros			
	Ganho de peso (g)	Consumo Alimentar (g)	Zinco ($\mu\text{g/g}$)	Magnésio (mg/g)
Com ovário/com probiótico	17,8	380,7	83,6	6,0
Com ovário/sem probiótico	14,9	401,7	81,1	5,7
Sem ovário/com probiótico	25,9	409,4	83,1	4,7
Sem ovário/sem probiótico	21,8	411,1	91,4	4,4

Os cortes histológicos de íleo foram analisados em microscópio, fazendo-se medida da superfície de absorção, nas vilosidades intestinais, e medindo-se a espessura da membrana celular, desde a extremidade da vilosidade até a parede mais externa do intestino (muscular da mucosa). Foram feitas duas leituras em cada lâmina, tirando-se, em seguida, a média. Os resultados apresentados no Quadro 6, mostram um resumo da análise de variância da espessura da membrana e superfície de absorção.

Quadro 6. Resumo do Quadrado Médio, obtido pela ANOVA dos parâmetros analisados

FV	GL	Espessura	Superfície
		QM	QM
Tratamento	1	107928 ^{ns}	281,49 ^{ns}
Dieta	1	415267*	572,48*
Tratamento*Dieta	1	34150 ^{ns}	6,65 ^{ns}
Bloco	7	86,07 ^{ns}	24490,21 ^{ns}
Resíduo	21	32394	74,60
C.V. %		15,76	22,48

* significativo a 5% de probabilidade

^{ns}: não-significativo a 5% de probabilidade

Tratamento: com ovário e sem ovário

Dieta: com probiótico e sem probiótico

Pelos resultados expostos no Quadro 6, verifica-se que houve diferença significativa apenas no efeito 'dieta', não havendo diferença significativa na interação 'tratamento-dieta', o que significa dizer que os dados são independentes

e que o contraste entre as médias das dietas é estatisticamente diferente de zero. Como houve diferença significativa nas dietas, podemos dizer que a dieta que apresentou maior média é a melhor, ou seja, quando as ratas receberam probiótico apresentaram maior superfície de absorção e maior espessura de membrana, independente do tratamento (com ou sem ovário), podendo afirmar que o efeito do probiótico foi significativo e positivo.

O Quadro 7 apresenta os valores médios encontrados nas medidas da superfície de absorção e na espessura da parede intestinal.

Quadro 7. Médias dos valores encontrados de espessura e superfície de absorção (n=10)

Tratamento	Superfície de absorção (μm)	Espessura (μm)
Com ovário-sem probiótico	712	53,1
Com ovário-com probiótico	1005	62,5
Sem ovário- sem probiótico	679	48,1
Sem ovário-com probiótico	823	55,6

A Figura 2 apresenta fotomicrografia do íleo intestinal dos animais estudados. As fotos A e B correspondem aos animais que foram submetidos à ovariectomia e as fotos C e D, aos animais intactos. Verificam-se as vilosidades intestinais, apresentando maior superfície de absorção o intestino dos animais que receberam probiótico – lâminas B e D.

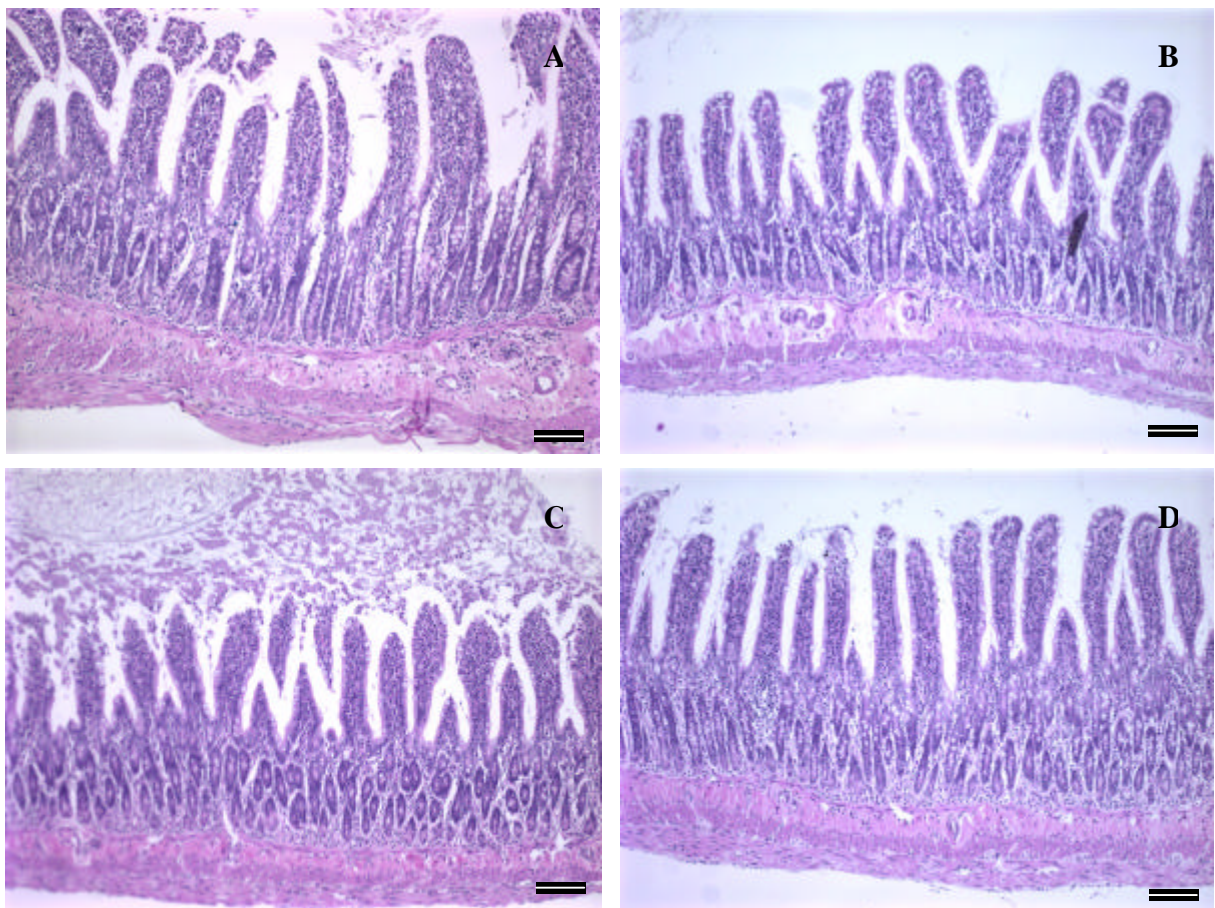


Figura 2. Fotomicrografia de íleo intestinal dos animais estudados. A - sem ovário e sem probiótico; B - sem ovário e com probiótico; C - com ovário e sem probiótico; D - com ovário e com probiótico. Barra equivale a 10 μ M.

Dentre os benefícios causados pelo consumo de probióticos, inclui-se a manutenção da integridade da mucosa (KLAENHAMMER e KULLEN, 1999). A adesão das bactérias lácticas às células intestinais é o primeiro passo da colonização. Esta adesão pode ser não-específica, baseada em fatores físico-químicos, ou específica, envolvendo adesão aos receptores nas células epiteliais. A variabilidade das propriedades de adesão testadas usando células intestinais humanas tem-se tornado um procedimento padrão na seleção de novas estirpes de probióticos. A aderência e a colonização são importantes para fins de efeitos na saúde humana, observadas em estudos clínicos. As bactérias lácticas são ótimas candidatas para o tratamento da diarreia aguda, gastroenterite e inflamação intestinal devido à sua capacidade de aderência, sendo essa aderência também responsável por alterações na microflora intestinal, nas atividades das enzimas bacterianas e na estabilização da permeabilidade intestinal (HOLZAPFEL et. al., 1998).

L. acidophilus são os microrganismos probióticos mais recomendados dentre os lactobacilos, como suplemento dietético, por possuírem uma alta capacidade de aderir ao epitélio intestinal (SALMINEN et. al., 1996). Entre os inúmeros benefícios dos lactobacilos podemos destacar seu papel como coadjuvante na integridade da parede intestinal. Lactobacilos estão presentes em grande número na porção final do intestino delgado denominada íleo, tendo sido, portanto, esse o local escolhido para análise histológica. Embora as bactérias lácticas tenham sido isoladas na microflora de todas as porções do trato intestinal humano, o íleo terminal e o cólon parecem ser os locais ou nichos preferenciais de colonização. Administrados oralmente, os microrganismos probióticos não podem afetar o ambiente no intestino, a menos que sua população atinja um certo nível mínimo, situado provavelmente entre 10^6 e 10^8 UFC/g de conteúdo intestinal (GOMES e MALCATA, 1999).

A ingestão de produtos lácteos contendo bactérias probióticas, como *Lactobacillus acidophilus*, auxilia na melhor absorção do cálcio, pois essas bactérias têm seu melhor sítio de atuação no intestino delgado, local onde a absorção do cálcio também é melhor. Acredita-se que *L. acidophilus*, por apresentarem características de adesão às células intestinais, e promoverem melhora da integridade de suas células, aumentam a área de absorção intestinal e apresentem maior renovação celular (GILLILAND, 1979).

Marcus e Lengemann, citados por GUPTA et. al. (1996), estudaram a absorção de ^{45}Ca nos segmentos intestinais do rato. Para uma dose na forma líquida, os valores foram: estômago (0%), duodeno (15%), jejuno (23%), íleo (62%). Quando o isótopo foi dado com um alimento sólido, os valores correspondentes foram: 0, 8, 4 e 88%, respectivamente.

O epitélio intestinal intacto, associado à microflora normal, representa uma barreira para a entrada de bactérias patogênicas, antígenos e outras substâncias não desejáveis. Em indivíduos saudáveis esta barreira é estável protegendo o hospedeiro e promovendo função intestinal normal. Quando a microflora normal ou as células epiteliais são destruídas, ocorrem defeitos nos mecanismos de barreira, alterando a permeabilidade e facilitando a invasão de patógenos e outras substâncias prejudiciais. Estes distúrbios podem levar à diarreia, inflamação da mucosa e outros efeitos. O desenvolvimento de novos alimentos e a aplicação de bactérias probióticas, bem como o entendimento dos mecanismos de defesa e barreira intestinal são essenciais. A mucosa intestinal é um importante órgão de defesa, sendo uma barreira muito forte e eficaz contra antígenos e outras substâncias nocivas ao organismo (FULLER, 1989, GORBACH, 1996, GOLDIN, 1998).

O cálcio é um elemento importante para a implantação dos lactobacilos na superfície intestinal. KLEEMAN e KLAENHAMMER (1982) testaram 28 estirpes de lactobacilos para aderência a células intestinais humanas, o que foi conseguido na presença de cálcio.

Segundo GILLILAND (1979), dentre os microrganismos intestinais, os lactobacilos são considerados os mais resistentes à acidez do estômago. PETTERSON et al. (1984) verificaram que *L. acidophilus* mostraram a maior taxa de sobrevivência num período de três horas de exposição ao suco gástrico.

Um dos objetivos da manutenção da integridade da membrana intestinal é evitar a translocação bacteriana que ocorre através do rompimento da permeabilidade intestinal (GILLILAND, 1979, BRASSART e SCHIFFRIN, 1997). Dessa forma, o uso dos probióticos não oferece riscos, pelo contrário, inúmeros benefícios podem ser listados (SALMINEN, 1999).

Lactobacillus acidophilus colonizam o intestino e desempenham importante papel na melhora da digestibilidade, aumentando a biodisponibilidade de nutrientes e na estimulação do mecanismo imune do hospedeiro (FULLER, 1989).

A administração de probióticos pode alterar a microflora intestinal, o seu balanço natural pode ser restaurado e o indivíduo retornar ao estado de nutrição, crescimento e saúde normais.

De acordo com KOO et al. (1993), o método de retenção de cálcio no fêmur, através da injeção de ^{45}Ca tanto pela via intraperitoneal como intravenosa foram depositados de maneira idêntica nos fêmures. A absorção de cálcio pode ser convenientemente medida por qualquer um dos métodos de retenção corporal ou métodos de captação nos fêmures, e as comparações da captação oral podem ser feitas para qualquer administração do cálcio, intraperitoneal ou intravenoso. O uso de traçadores para avaliar absorção pode não demonstrar o que está ocorrendo na condição crônica. A injeção intraperitoneal do traçador radioativo no método de retenção no fêmur é mais conveniente e igualmente válido como administração intravenosa. A escolha da utilização da retenção no fêmur versus contagem de corpo inteiro depende da instrumentação disponível, da seleção dos isótopos e da limitação de tempo. O emissor beta, ^{45}Ca , o qual pode ser usado apenas no método de retenção no fêmur, é menos custoso e apresenta uma meia-vida maior (165 dias) do que o ^{47}Ca .

O melhor modelo para observar a interação da microflora intestinal no epitélio consiste no modelo gnotoxênico (gnotobióticos). Nos animais axênicos (ou livres de germes), a mucosa intestinal e a camada de muco são consideravelmente finas. Assim que é acrescentada alguma flora a esses animais, o tamanho da mucosa intestinal aumenta, verificando-se igualmente um acréscimo da quantidade de muco. O ácido butírico produzido durante a fermentação colônica constitui um combustível para os colonócitos, sendo capaz de modular o metabolismo dos mesmos. O ácido butírico é responsável pelo chamado efeito "trófico" nas células epiteliais. Demonstrou-se recentemente que as bactérias exógenas podem modular a secreção de muco no hospedeiro. Estudos experimentais realizados em ratos demonstraram que alguns probióticos possuem a capacidade de melhorar a troficidade dos enterócitos (DANONE, 2002).

O cálcio é absorvido por transporte ativo e difusão passiva através da mucosa intestinal. O transporte ativo, chamado também de transcelular, ocorre mais no duodeno e é dependente de 1,25 dihidroxicolecalciferol [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] - a forma ativa da vitamina D, e dos receptores intestinais. Já a difusão passiva ou paracelular, ocorre no íleo, sendo estimulada pela presença de lactose e acidez.

A diminuição da produção de estrógeno na menopausa está associada com a acelerada perda óssea, sendo os baixos níveis de estrógeno acompanhados pela diminuição na eficiência da absorção de cálcio e aumento das taxas de 'turnover' ósseo. Estas observações podem ser interpretadas por vários caminhos: a diminuição nos níveis de estrógeno afeta o esqueleto, levando a um aumento na reabsorção óssea e aumento do cálcio ionizado circulante, diminuição do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e redução do estímulo no transporte intestinal ativo de cálcio. A deficiência de estrógeno reduz a eficiência de utilização do cálcio, ocasionando perda óssea. Um aumento na ingestão de cálcio poderia aumentar a absorção do cálcio nos ossos, mas não a sua deposição. Dessa forma, um aumento na ingestão de cálcio poderia corrigir este problema se a deficiência de estrógeno reduzisse apenas a eficiência na absorção (GURR, 1999).

Os estrógenos causam um aumento na atividade osteoblástica e no crescimento ósseo. Quando a mulher entra em seu ciclo reprodutivo, sua taxa de crescimento é rápida tornando as mulheres mais altas que os homens, na mesma idade. Os estrógenos afetam o crescimento ósseo através da produção de um aumento no depósito da matriz óssea com subsequente retenção de cálcio. (WILLIAMS e SCHLENKER, 1992). A osteoporose é caracterizada pela diminuição da matriz orgânica, quando a atividade osteoblástica está abaixo do normal e, conseqüentemente, o índice de deposição óssea está deprimido. Uma das causas é a ausência da secreção de estrógenos, hormônio que apresenta uma atividade estimulante dos osteoblastos (GUYTON, 1997).

Durante as primeiras décadas de vida, predomina a formação óssea e por último a reabsorção óssea, de tal forma que a massa óssea começa a declinar vagarosamente a partir dos cinquenta anos de idade para a maioria das pessoas. Com o passar dos anos, todos os ossos do nosso corpo são totalmente renovados. Diariamente nosso organismo recebe cálcio dos alimentos ingeridos e perde através da urina. Se sai mais cálcio do que entra, o organismo retira cálcio dos ossos, para poder manter um nível circulante no sangue. A perda gradual da

massa óssea, torna o osso mais frágil podendo até diminuir de tamanho. Existem casos em que se pode corrigir o problema estando diretamente ligado ao estilo de vida, à alimentação que pode ser modificada e a terapia de reposição hormonal. Quando a mulher se aproxima dos cinqüenta anos a produção de estrógeno diminui, e uma das soluções para esses casos é a reposição hormonal, que protege contra as doenças coronarianas, reduz o risco de câncer uterino e é a melhor forma de interromper a perda de massa óssea e prevenir a osteoporose da pós-menopausa. Associada a esta terapia temos a modificação da alimentação, aumentando-se as doses de cálcio, que nessa faixa etária as recomendações aumentam para 1200 mg/dia (RDI). Na menopausa, a perda óssea se inicia durante os anos imediatamente precedentes à menopausa (SCHAAFSMA, et al., 2001).

O osso trabecular é um frequente sítio de fratura óssea e é sensível à deficiência de cálcio devido a taxa relativamente alta de 'turnover'. Para manter a homeostase e suprir as necessidades do organismo, a absorção do cálcio pelo intestino, a reabsorção pelos rins e o turnover mineral ósseo são regulados pelo calcitriol, pelo PTH e calcitonina. Vários outros hormônios, entre eles o estrógeno, podem afetar o turnover ósseo e o metabolismo mineral.

A densidade mineral óssea continua a aumentar até os 30 anos de idade e o tecido ósseo é continuamente remodelado durante a vida. Dois importantes tipos celulares no osso são os osteoblastos, envolvidos na formação óssea, e os osteoclastos, envolvidos na reabsorção óssea. A atividade dos osteoblastos determina a taxa de deposição da matriz óssea. Os osteoblastos, os quais apresentam receptores celulares para o PTH, para o calcitriol e para o estrógeno, regulam o fluxo de cálcio no osso e mediam a deposição de hidroxapatita no tecido ósseo. A atividade dos osteoclastos no osso determina a taxa de colapso ósseo (GURR, 1999).

Apesar da diminuição do estrógeno na menopausa causar acelerada perda óssea, a deficiência do hormônio pode não ser substituída pelo aumento na ingestão de cálcio. O estrógeno tem uma influência extensa na absorção de cálcio, mas existem evidências de que não é suficiente para suportar os requerimentos em mulheres, dependendo do estado da menopausa ou do uso de terapia de reposição hormonal (SCHAAFSMA et al., 2001)

Até o presente momento não existe cura para a osteoporose, mas pode-se reduzir o risco da doença na vida adulta. O risco de osteoporose é maior em mulheres nos primeiros anos após a menopausa pela deficiência de estrógeno, sendo mais eficaz a terapia de reposição hormonal, mas só com acompanhamento médico regular, e o uso contínuo poderia aumentar os riscos de certos tipos de câncer. Uma maior ingestão de cálcio poderia retardar a perda excessiva de massa óssea. A suplementação de cálcio pode reduzir a taxa de perda óssea, apesar de alguns pesquisadores acreditarem que a suplementação de cálcio tem pouco efeito (GURR, 1999).

A terapia de reposição hormonal aliada à suplementação de cálcio poderá prevenir maiores perdas ósseas em mulheres já no estado de pós-menopausa. Na verdade, o melhor seria prevenir através de uma alimentação equilibrada, principalmente em relação ao cálcio. A ingestão de produtos lácteos adicionados de probióticos apresentam benefícios tanto na prevenção quanto no tratamento da osteoporose. Tais produtos contêm lactose já hidrolisada pelos microrganismos, o que favorece a absorção do cálcio, e a presença desses microrganismos probióticos aumentando a superfície de absorção intestinal, irão favorecer a saúde do organismo, ajudando a prevenir e tratar inúmeras doenças geralmente relacionadas com a osteoporose.

A técnica utilizando marcadores radioisotópicos permitiu avaliar a retenção de cálcio no organismo dos animais. Os resultados obtidos permitiram indicar que a administração dos *Lactobacillus acidophilus* proporcionou uma melhor retenção de cálcio nos ossos, associada à presença do hormônio estrogênio, o que sugere uma adequada ingestão de cálcio ao longo da vida como fator preventivo da osteoporose, veiculado em produtos lácteos probióticos.

BIBLIOGRAFIA

- ALOIA, J.F., VASWANI, A., YEH, J.K., ROSS, P.L., FLASTER, E., DILMANIAN, F.A. Calcium supplementation with and without hormone replacement therapy to prevent postmenopausal bone loss. **Ann. Intern. Med.**, 120: p. 97-103, 1994.
- BRASSARD, D., SCHIFFRIN, E.J. The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. **Trends in Food Science & Technology** n.8, p.321-326, 1997.
- CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear. <http://cnen.gov.br>, consultado em 25/11/2002.
- De MAN, J.C., ROGOSA, M., SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, 23:130, 1960.
- FULLER, F. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, 66, p. 365-378, 1989.
- GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition**, n. 80, Supplement 2, p. 203-207, 1998.
- GILLILAND, S.E. Beneficial interrelationships between certain microorganisms for use as dietary adjuncts. **Journal Food Protection**, 42: 164-168, 1979.
- GOMES, A.M.P., MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v.10,n.4-5, p. 139-157, 1999.
- GORBACH, S.L. Efficacy of Lactobacillus in treatment of acute diarrhea. **Nutrition Today**, n.31, p.19-23, 1996.
- GUPTA, P.K., MITAL, B.K., GARG, S.K. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* strains for use as dietary adjunct. **International Journal of Food Microbiology**, 29, p. 105-109, 1996.

GURR, M. **Calcium in Nutrition**. Ilsi Europe Concise Monograph Series. International Life Sciences Institute, 1999, 40 p.

GUYTON, A.C. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1997. 1014 p.

HITCHINS, A. D., McDONOUGH, F. E. Prophylatic and therapeutic aspects of fermented milk. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, p. 675-684, 1989.

HOLZAPFEL, W.H., HABERER, P., SNEL, J., SCHILLINGER, U., VELD, J.H.I. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, 41, p. 85-101, 1998.

http://www.danonevitapole.com/nutri_views/searchArchives/index.html Consultado em 22/09/2002.

KLAENHAMMER, T. R., KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, 50: 45-57, 1999.

KLEEMAN, E.G., KLAENHAMMER, T.R. Adherence of Lactobacillus species to human fetal intestinal cells. **Journal of Dairy Science**, n.65, p.2063-2069, 1982.

KOO, J., WEAVER, C.M., MICHAEL, J.N., MILLER, G.D. Isotopic tracer techniques for assessing calcium absorption in rats. **Journal Nutrition and Biochemistry**, v.4, n.2, p. 72-76, 1993.

MATKOVIC, V., ILICH, J. Z. Calcium requeriments for growth; are current recommendations adequate? **Nutrition Reviews**, Cambridge, v. 51, p.171-180, 1993.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recommended Dietary Allowances**. 10 ed. Washington, D.C.: National Academy, 1989, 284 p.

- PAULO, E.M. **Isolamento e caracterização de *L. acidophilus* de fezes de suínos para uso como probiótico.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1991. 73 p.
- PETTERSON, L., GRAF, W., ALM, L., LINDWALL, S. STROMBERG, A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* NCDO 1748 in the human gastrointestinal tract. I. Incubation with gastric juice in vitro. In: Symposium of Swedish Nutrition Foundation, 1981. *Symposio*, 1983. In: **Dairy Science Abstracts**, 46, 1-3: 135, 1984. Abstr. N. 1185.
- REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., FAHEY, G.C. 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-76-A Rodent Diet. **American Institute of Nutrition**, p. 1939-1951, 1993.
- SALMINEN, S. Probiotics: Scientific Support for Use. **Food Technology**, v. 53, n.11, p. 66-77, 1999.
- SALMINEN, S., ISOLAURI, E., SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antonie van Leeuwenhoek**, 70: 347-358, 1996.
- SANDSTROM, B., FAIRWEATHER-TAIT, S.F. HURREL, R.F., VAN DOKKUM, W. Methods for studying mineral and trace elements absorption in humans using stable isotopes. **Nutrition Research Review**, v.6, p.71-95, 1993.
- SCHAAFSMA, A., VRIES, P.J.F., SARIS, H.M. Delay of natural bone loss by higher intakes of specific minerals and vitamins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.41, n.3, p. 225-249, 2001.
- SILVA, L. L., STAMFORD, T. L. M. Alimentos Probióticos: Uma revisão. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 68/69, p. 41-50, 2000.
- SMITH, D.L., ATKIN, C., WESTENFELDER, C. Stable isotopes of calcium as tracers; methodology. **Clinica Chimica Acta**, v. 146, p.97-101, 1985.

- VELÁQUEZ-MELÉNDEZ, G., MARTINS, I.S., CERVATO, A.M., FORNÉS, N.S., MARUCCI, F.N. Consumo Alimentar de vitaminas e minerais em adultos residentes em área metropolitana de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.31, n.2, São Paulo, 1997.
- VIEIRA, S., HOFFMANN, R. **Estatística experimental**. São Paulo: Atlas.1989. 179 p.
- WILLIAMS, S.R.; SCHLENKER, E.D. Nutrition and the adult. In: WILLIAMS, S.R. WORTHINGTON-ROBERTS, B.S. **Nutrition throughout the life cycle**. 2 ed. Boston, Mosby Year Book Inc., 1992, 498 p.
- ZAVALLA, J. O.; ALARCON, O.; MORENO, R.; GONZALEZ, S. & OLIVER, G. Oral administration of fermented milk on the calcium serum levels from adults. **Lactic/CAEN**, Normandy, France, 1997.

CAPÍTULO 3

EFEITOS DE *Lactobacillus acidophilus* NA BIODISPONIBILIDADE DE ZINCO, EM RATOS

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Mundial para a Agricultura e Alimentos (FAO) relatam que dois bilhões de pessoas - cerca de um terço da população mundial - sofre de deficiência de micronutrientes, principalmente as crianças e a população de baixa renda. A carência desses nutrientes afeta a nutrição e a saúde, o desenvolvimento físico e o aprendizado. O zinco é um desses micronutrientes essenciais na nutrição, por desempenhar inúmeras funções no organismo, dentre as quais funções estruturais, enzimáticas e regulatórias. Assim, participa na definição estrutural de proteínas e atua como co-fator em cerca de 300 enzimas, muitas das quais envolvidas na expressão gênica. O zinco atua na atividade neural e na memória, é necessário na síntese protéica, na regulação hormonal e na defesa imunológica. A quantidade de zinco corporal é mantida constante no indivíduo adulto pela eficiência da absorção intestinal e pelas perdas fecais, e sua absorção aumenta quando os níveis corporais começam a diminuir. Em animais de laboratório a deficiência de zinco pode determinar níveis de absorção próximos de 100% do zinco alimentar, enquanto a absorção relatada para humanos varia entre 6 e 40% (FLEET, 2000, BRANDÃO-NETO et al., 1995).

Os estudos versando sobre biodisponibilidade de minerais são particularmente importantes, na medida em que podem contribuir para a prevenção de carências nutricionais, de forma especial quando se consideram grupos populacionais com necessidades nutricionais aumentadas, como gestantes, lactantes, crianças, adolescentes e consumidores de fármacos, inclusive álcool (MILLER, 1989).

Há pelo menos uma década, os alimentos passaram a ser estudados com objetivos de descobrir componentes, além dos nutrientes já conhecidos, que pudessem auxiliar a reduzir os riscos de doenças. Neste contexto surgiram as pesquisas com as bactérias probióticas, dentre as quais *Lactobacillus acidophilus*,

uma bactéria láctica que pode ser incorporada aos alimentos. Os probióticos são microrganismos vivos que, quando ingeridos, aprimoram a microflora intestinal e as funções fisiológicas do trato intestinal humano. Dentre os efeitos observados em diversos estudos, destaca-se o aumento da absorção de minerais, como cálcio, magnésio e ferro. Entretanto, a literatura especializada não traz referências a possíveis efeitos sobre a absorção de zinco, o que vem justificar a proposta de avaliar a biodisponibilidade desse mineral em resposta à utilização da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* como adjunto dietético.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: foram utilizados 32 ratos recém-desmamados (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*), da linhagem Wistar. Os animais foram separados em quatro grupos (n=8), identificados como 1, 2, 3 e 4.

1. Dieta DP-15: dieta padrão com 15 µg de zinco/g de dieta.
2. Dieta DP-30: dieta padrão com 30 µg de zinco/g de dieta.
3. Dieta PP-15: dieta padrão com 15 µg de zinco/g de dieta + probiótico
4. Dieta PP-30: dieta padrão com 30 µg de zinco/g de dieta + probiótico

Probiótico: consistiu de uma suspensão de células de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, veiculada em LDR 10% (leite desnatado reconstituído), esterilizado. A suspensão foi administrada durante 42 dias, sendo que cada animal dos grupos 3 e 4 recebeu uma dose de 0,1mL/dia, contendo, aproximadamente, 10¹⁰ UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de *Lactobacillus acidophilus*/mL. A suspensão foi obtida no Laboratório de Culturas Lácticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

Dietas: elaboradas de acordo com American Institute of Nutrition - AIN 93-G (REEVES et al., 1993), contendo dois teores de zinco, correspondendo a 50 e 100% da recomendação de zinco para ratos (15 µg/g e 30 µg/g), respectivamente. O Quadro 1 apresenta a composição das dieta fornecidas.

Quadro1. Composição da dieta AIN-93G fornecida aos ratos

Ingredientes	g/100g
Caseína	20
Amido dextrinizado (**)	13,2
Sacarose	10
Óleo de soja	7
Fibra - Celulose microfina (**)	5
Mistura salínica* (**)	3,5
Mistura vitamínica (**)	1,0
L-cistina (**)	0,3
Bitartarato de colina (**)	0,25
Amido de milho (q.s.p.)	100 (q.s.p.)

** Rhoster Ind. Com. Ltda

* a mistura salínica foi elaborada sem adição de zinco. Na confecção das dietas, o zinco, na forma de carbonato de zinco, foi adicionado para atingir 15 µg/g e 30 µg/g.

Condições experimentais: os animais foram alojados em gaiolas individuais de aço inoxidável, a 25^oC, com luminosidade artificial controlada e fotoperíodo de 12 horas, recebendo água *ad libitum* e alimentação "pair-fed" (quantidades iguais de dieta para todos os ratos padronizada de acordo com o grupo que apresentava a menor ingestão diária). O ganho de peso dos animais foi monitorado semanalmente.

Os grupos de animais DP-15 e DP-30 receberam as variações da dieta padrão AIN 93-G, atendendo a 50 e 100% da recomendação de zinco para ratos, respectivamente (REEVES et al., 1993). Os grupos PP-15 e PP-30, além das variações da dieta padrão, também com 50 e 100% da recomendação, receberam suplementação de probiótico.

Determinação do teor de zinco nas dietas: durante o experimento foram feitas duas coletas de amostras de cada dieta e da caseína, a fim de se determinar o teor de zinco por espectrofotometria de absorção atômica em aparelho GBC 908 AA, segundo metodologia descrita por SILVA (1990).

Retirada de sangue, fêmur e órgãos para análises: Após 42 dias de experimento, os animais foram sacrificados por inalação de gás carbônico e o sangue retirado por punção cardíaca em seringas descartáveis com capacidade para 10 mL, com posterior separação do soro por centrifugação, em centrífuga FANEM Excelsa 3, modelo 204 NR, por 20 minutos, à temperatura de 37^oC. Foram retirados ainda o fígado, os rins, o cérebro e o fêmur direito de cada animal, para análise de zinco.

Determinação do teor de zinco: por espectrofotometria de absorção atômica, em aparelho GBC 908 AA, nos diversos espécimens retirados dos animais. As amostras foram preparadas segundo metodologia preconizada por Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1990) e posteriormente analisadas.

- (a) - Para determinação no fígado, nos rins, e no cérebro, os órgãos foram macerados e parte de seu homogenato foi pesado, digerido com ácido nítrico concentrado sob aquecimento por um período de 12 horas. Após a digestão as amostras foram diluídas com água deionizada.
- (b) - A determinação de zinco no soro sanguíneo se deu após a centrifugação do sangue, sendo retirada uma alíquota do soro e diluída com água deionizada.
- (c) - O fêmur direito foi digerido em ácido nítrico concentrado por 24 horas e, a seguir, diluído em água deionizada para posterior determinação de zinco.

A vidraria utilizada na determinação de zinco foi desmineralizada em ácido clorídrico a 20% por um período de 24 horas.

Determinação de cálcio e magnésio: realizada nos fêmures, usando espectrofotometria de absorção atômica, segundo SILVA (1990), em aparelho GBC 908 AA.

Determinação da atividade da enzima fosfatase alcalina no soro: foi desenvolvida usando Kit para fosfatase da marca Doles[®], método colorimétrico com leitura em espectrofotômetro BECKMAN Du[®] 70 em comprimento de onda de 410 nm.

Modelo Experimental: o experimento foi conduzido segundo um esquema fatorial 2x2, sendo dois grupos de dietas, identificados como 'fontes' (dieta padrão, DP, e dieta padrão + probiótico, PP) e dois níveis de zinco, identificados como 'doses' (15 e 30). O delineamento foi em blocos casualizados, com oito repetições. As médias dos fatores qualitativos foram comparados utilizando-se o teste de Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação do teor de zinco nas dietas

Na Tabela 1 estão exibidos os resultados obtidos na determinação de zinco nas dietas experimentais e na caseína, matéria-prima utilizada na confecção das dietas. Pode-se observar que a caseína adquirida não atendeu as especificações para teor de cinzas, apresentando níveis de zinco muito acima do que seria esperado, observado nas dietas com 15 µg/g de zinco. Disso resultou que o teor desse mineral, em desacordo com o que havia sido programado para as dietas, interferiu em resultados do experimento.

TABELA 1. Teores de zinco nas dietas e na caseína utilizadas no ensaio de biodisponibilidade de zinco

Material	Teores de zinco µg/g	
	Esperado	Observado
Dieta 15 ¹	15	22,21
Dieta 30 ²	30	25,6
Caseína	0	95,03

1: Dieta com 15 µg de zinco/g de dieta

2: Dieta com 30 µg de zinco/g de dieta

Teores de zinco no soro, fêmur, rins, fígado e cérebro

O teor de zinco no soro, fêmur, rins, fígado e cérebro foram analisados por meio de análise de variância (Quadro 1).

QUADRO 1. Resumo da análise de variância dos parâmetros estudados

FV	GL	GP	Consumo	Fígado	Soro	QM					
						Cérebro	Rim	FA	Ca fêmur	Mg fêmur	Zn fêmur
Fonte	1	413,3*	162,32 ^{ns}	148,3*	0,673 ^{ns}	7,04 ^{ns}	19,88 ^{ns}	288,5 ^{ns}	80,16 ^{ns}	198,53 ^{ns}	0,077 ^{ns}
Dose	1	810,1 ^{ns}	718,87 ^{ns}	93*	0,353 ^{ns}	0,332 ^{ns}	58,71 ^{ns}	8065,5*	76,65 ^{ns}	187,92 ^{ns}	59,2 ^{ns}
Fonte*Dose	1	30 ^{ns}	331,85 ^{ns}	19,9 ^{ns}	1,312*	7,29 ^{ns}	137,05*	86,38 ^{ns}	8,73 ^{ns}	21,4 ^{ns}	478,3 ^{ns}
Resíduo	21	2594,9	185,59	12,4	0,0304	10,62	29,72	776,73	40,22	98,6	166,7
CV%		4,7	2,3	14,8	15,6	22,8	21,2	25,9	8,87	8,87	7,8

* significativo pelo teste F (P<0,05)

ns: não-significativo pelo teste F (P>0,05)

GP: ganho de peso

FA: fosfatase alcalina (UI/L)

QM: quadrado médio

FV: fonte de variação

GL: grau de liberdade

Ca: teor de cálcio no fêmur

Mg: teor de magnésio no fêmur

Zn: teor de zinco no fêmur

Fonte: com ou sem probiótico

Dose: 15 ou 30 µg/g de zinco

Como se observa no Quadro 1, apenas os parâmetros ganho de peso (GP) e teor de zinco no fígado, apresentaram diferença significativa quanto à fonte, ou seja, quando os animais receberam dietas do tipo PP (com probiótico), as médias foram estatisticamente maiores do que o tratamento padrão, sem probiótico. E pode-se afirmar, também, pela análise do Quadro 1, que o fator 'dose' foi significativo para os teores zinco no fígado e que, para cada fonte, as doses 15 e 30 $\mu\text{g/g}$ de zinco foram estatisticamente diferentes, sendo alcançada uma resposta melhor quando a dose foi de 30 $\mu\text{g/g}$. Semelhante resultado foi observado na atividade da enzima fosfatase alcalina, observando-se que houve diferença significativa apenas quanto ao fator 'dose', o que nos leva a dizer que, também, para cada fonte (DP e PP) houve diferença significativa entre as doses 15 e 30, sendo esta última superior. Apenas os parâmetros teores de zinco no rim e no soro apresentaram diferença estatística na interação entre fonte (DP e PP) e doses de zinco (15 e 30 $\mu\text{g/g}$). O consumo alimentar não apresentou diferença significativa, o que é justificado pelo fato de que todos os animais receberam a mesma quantidade de dieta ("pair-fed"), ao longo do experimento, tendo consumido uma média de 14 g/dia.

Foram analisados os minerais cálcio e magnésio presente nos fêmures dos animais. Não houve diferença significativa nos teores desses minerais nos tratamentos (fonte) e nas doses, e também na interação (Quadro 1). Isto significa que a absorção destes minerais foi estatisticamente igual, independente dos tratamentos (dietas DP e PP) e das doses de zinco (15 e 30 $\mu\text{g/g}$).

O Quadro 2 apresenta os valores das médias obtidas dos parâmetros avaliados.

Quadro 2 – Médias dos teores de zinco obtidos dos parâmetros avaliados

Tratamento	GP (g)	CA (g)	Fígado (µg/g)	Cérebro (µg/g)	FA (UI/L)	Zn (µg/g)	Ca (µg/g)	Mg (µg/g)
DP 15	195,3	586,9	20,6	15,1	124,5	161,84	36,6	65,3
DP30	207,3	602,9	22,4	14,3	96,0	166,85	48,2	77,2
PP15	204,4	597,9	23,3	13,2	132,9	169,7	48,4	93,4
PP30	212,5	600,9	28,3	14,3	102,5	159,2	45,2	72,8

DP 15 e DP 30: dieta-padrão com 15 e 30 µg de zinco/g dieta

PP 15 e 30: dieta-padrão + probiótico com 15 e 30 µg de zinco/g dieta

CEA: coeficiente de eficiência alimentar

CA: consumo alimentar

FA: fosfatase alcalina

Ca, Mg, Zn: teores dos respectivos minerais no fêmur

Segundo se observa no Quadro 3 houve diferença entre as fontes apenas quando a dose era de 15 µg/g. Para estes dois parâmetros analisados a dieta padrão foi superior à com probiótico, o que não foi verificado quando a dose era de 30 µg/g, tanto para zinco no rim quanto para zinco no soro.

QUADRO 3 - Comparação das médias dos teores de zinco significativos na interação

Teores de zinco em diferentes amostras	Dose (µg/g)	Médias DP (µg/g)	Médias PP (µg/g)
Rim	15	27,59 ^{aA}	21,88 ^{bB}
Rim	30	25,32 ^{aA}	27,91 ^{aA}
Soro	15	3,97 ^{aA}	3,27 ^{bA}
Soro	30	3,35 ^{aA}	3,47 ^{aA}

Médias seguidas pela mesma letra na linha (minúscula) e na coluna (maiúscula), não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05)

DP: dieta padrão

PP: dieta padrão com probiótico

Deficiências isoladas de micronutrientes são raras, com exceção do ferro e zinco. Devido ao seu elevado grau de renovação, o sistema imunológico é o primeiro a ser afetado por alterações nos níveis plasmáticos de zinco. O zinco é um micronutriente essencial para as respostas imunes (RINK e GABRIEL, 2000). Existem doenças ligadas à resposta imune, em que se caracterizam má absorção de zinco, com elevada incidência de infecções bacterianas, virais e fúngicas, podendo ser revertidas pela suplementação de zinco. Em crianças com diarreia persistente, a suplementação com zinco resulta em recuperação mais rápida e menor número de episódios diarréicos (TOMKINS et al., 1993).

A quantidade de zinco corporal é mantida constante no indivíduo adulto pela eficiência da absorção intestinal e pelas perdas fecais do mineral excretado nas secreções digestivas e na descamação do epitélio da mucosa intestinal. A absorção de zinco aumenta quando seus níveis corporais começam a diminuir e vice-versa. Animais deficientes em zinco podem absorver quase 100% do zinco alimentar, e no homem a absorção varia entre 6 e 40% (FOMON e REBOUCHE, 1993). O acúmulo mais rápido e a maior taxa de renovação do zinco ocorrem nos tecidos moles, especialmente no pâncreas, fígado, rins e baço.

O ganho de peso não apresentou diferenças significativas quanto ao efeito dose, apenas em relação à fonte, justificado, possivelmente, pela presença do microrganismo probiótico. Quando ocorre deficiência de zinco, alguns dos sintomas são a diminuição do paladar, anorexia e retardo no crescimento (FLEET, 2000, MARREIRO et al., 1998), fatos não ocorridos nos animais em estudo.

O zinco de origem animal é mais biodisponível do que o de origem vegetal. O acúmulo de zinco no osso e a taxa de crescimento em animais jovens parece ser um indicativo da biodisponibilidade relativa de zinco. O zinco absorvido pelo fígado tem sido usado para estimar a biodisponibilidade, especialmente quando altas concentrações de zinco na dieta são fornecidas. Tal fato pode ser relevante pelos resultados obtidos, e mostra que quando os ratos ingeriram uma dose maior de zinco com a administração do probiótico, obteve-se uma maior taxa de absorção. Devido aos altos teores de zinco fornecidos nas dietas, pode-se dizer que os valores elevados encontrados no fígado refletem o armazenamento do

mineral neste órgão. Parece que a utilização da suspensão bacteriana de *Lactobacillus acidophilus* aumentou ainda mais esta absorção, sugerindo que o leite, associado ao probiótico, promova maior biodisponibilidade do mineral. A lactose aumenta a absorção e a retenção do cálcio, além de favorecer a absorção de magnésio e de zinco (BUTRISS, 1997). Os resultados obtidos em relação à absorção tanto do zinco, como do cálcio e magnésio revelam não haver diferença significativa quando avaliada a retenção desses minerais no fêmur, provavelmente devido às proximidades dos teores de zinco das dietas, o que reflete absorção máxima dos minerais no fêmur quando fornecido nível de 15 µg/g.

Os teores de zinco nos rins e no soro apresentaram melhores valores quando foram fornecidos 15 µg/g (50% da recomendação) da dieta padrão, sem o probiótico. Entretanto, quando foi atingida a recomendação de 100% (30 µg/g), a biodisponibilidade de zinco foi igual tanto para a dieta padrão quanto para a dieta com probiótico.

A atividade da enzima fosfatase alcalina está sujeita a muitas influências fisiológicas e psicológicas, e os níveis são aumentados durante o crescimento rápido. Geralmente, o melhor caminho para monitorar a resposta na suplementação de zinco é através da atividade da fosfatase (FIDANZA, 1991). Os resultados obtidos para a fosfatase alcalina mostraram haver diferença significativa no efeito 'dose', ou seja, quando a dose foi de 30 µg/g houve maior atividade da enzima.

De acordo com HARA et al. (2000), num experimento realizado com ratos alimentados com níveis graduados de zinco, o ganho de peso e o consumo alimentar não apresentaram diferença entre os grupos, exceto para os ratos alimentados com o nível mais baixo de zinco (considerado um nível deficiente). Nesse grupo deficiente em zinco, tanto o ganho de peso quanto o consumo alimentar foram menores do que nos outros grupos. As concentrações de zinco no soro foram mais baixas nos ratos que receberam o nível mais baixo e aumentaram com níveis mais altos de zinco. A concentração de zinco nos rins diferiu de maneira similar daquela vista no soro. As concentrações de zinco no fêmur aumentaram linearmente apenas quando o nível de zinco era elevado. Já a

concentração do mineral no fígado foi maior nos ratos alimentados com o mais baixo teor de zinco, sendo que os outros níveis acima não apresentaram diferença significativa, o que entra em desacordo com o obtido no presente trabalho. Provavelmente isto ocorreu devido ao fato de que neste trabalho os níveis de zinco estavam acima do programado, e não houve, em nenhum momento nível deficiente de zinco. Os resultados obtidos mostram que não houve diferença significativa no ganho de peso. No soro obtivemos resultados semelhantes aos alcançados por HARA et al. (2000), pois o teor de zinco foi maior quando a dose foi de 30 µg/g. O que foi alcançado no trabalho realizado, tendo-se obtido uma maior absorção de zinco quando foi administrado o probiótico, pode ser explicado pela presença do microrganismo associado ao leite.

No trabalho de HARA et al. (2000), os níveis de zinco variaram da necessidade mínima à máxima. A absorção de zinco no fêmur aumentou gradualmente com o consumo de dietas contendo altos níveis de zinco até alcançar um platô. Conforme já visto, no trabalho realizado, não houve diferença significativa nos teores de zinco no fêmur, pois as doses não permitiram que houvesse tal diferença, tendo a absorção já atingido um nível ótimo. Alta eficiência de absorção foi mostrada nos ratos que consumiram dietas com baixos teores de zinco, sugerindo que a capacidade absorptiva se adapta com baixas doses de zinco. A concentração de zinco no soro pode ser diminuída temporariamente com resultado de uma infecção, stress, sugerindo que esta concentração não é um indicador tão apropriado do “status” de zinco (HARA et al., 2000, WOOD, 2000).

A evidência de que a deficiência de zinco pode significativamente prejudicar a resposta imune de crianças em muitos países e que os suplementos de zinco podem prevenir e reduzir doenças como a diarreia e infecções do trato respiratório, parece bastante forte (ALNWICK, 1998, CUNNINGHAM-RUNDLES, 1996). A administração da bactéria probiótica *L. acidophilus*, por apresentar benefícios relacionados ao estabelecimento da integridade da mucosa intestinal, prevenindo, dessa forma, a diarreia, poderá auxiliar no combate ou na prevenção à deficiência de zinco.

O zinco foi identificado como um elemento importante para o crescimento de microrganismos há mais de 100 anos (CUNNINGHAM-RUNDLES, 1996).

Deficiências específicas de oligoelementos devem ser prevenidas e/ou corrigidas precocemente. A manipulação nutricional do sistema imunológico se inicia com a utilização de alimentos funcionais como recurso promissor para reduzir a morbidade e mortalidade causadas por infecções, com profundas implicações clínicas e na saúde pública (SCALABRIN, 2001).

A suplementação de uma dieta com zinco associada à administração do probiótico apresenta efeito favorável. Os animais que receberam probiótico apresentaram maior ganho de peso, o que demonstra haver adequada absorção de zinco. O maior ganho de peso pelos animais que receberam probiótico pode estar relacionado com a melhor biodisponibilidade de zinco e outros nutrientes promotores do crescimento, o que implica num efeito benéfico dessas bactérias.

BIBLIOGRAFIA

- ALNWICK, D.J. Combating micronutrient deficiencies: problems and perspectives. In: International and Public Health Nutrition Group Symposium on "Can nutrition intervention make a difference?" **Proceedings of the Nutrition Society**, 57, p. 137-147, 1998.
- AMMERMAN, C.B., BAKER, D.H., LEWIS, A.J. **Bioavailability of nutrients for animals**. Academic Press, New York. 1995
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15 ed. Washington, D.C.:1990. 1184 p.
- BUTTRISS, J. Nutritional properties of fermented milk products. **International Journal of Dairy Technology**, n.1, v.50, p. 21-27, 1997.
- CHESTERS, J.K. In: O'DELL, B.L., SUNDE, R.A. **Handbook of nutritionally essential minerals elements**. Marcel Dekker, Inc.: New York, 1997, p. 185-230.
- CUNNINGHAM-RUNDLES, S. Zinc modulation of immune function: specificity and mechanism of interaction. **J. Lab. Clin. Med.**, n.128, p.9-11, 1996.
- FERREIRA, K.S. **A desnutrição mineral na dieta básica brasileira**. Viçosa, MG:UFV, 1995.185p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- FIDANZA, F. **Nutritional Status Assessment: a manual for population studies**. Chapman e Hall, London, 1991. 486 p.

- FLEET, J.C. Zinc, copper and manganese. In: STIPANUK, M.H. **Biochemical and physiological aspects of human nutrition**. Philadelphia: Saundres Company, p.732-760, 2000.
- FRANCO, G. 1992.**Tabela de composição química dos alimentos**. São Paulo.
- HARA, H., KONISHI, A., KASAI, T. Contribution of the cecum and colon to zinc absorption in rats. **American Society for Nutritional Sciences**, 2000. p. 83-89.
- MARREIRO, D.N., FISBERG, M., COZZOLINO, S.M.F. Considerações sobre o estado nutricional relativo ao zinco na obesidade. **Cadernos de Nutrição**, n.16, p. 31-40, 1998.
- REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., FAHEY, G.C. 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-76-A Rodent Diet. **American Institute of Nutrition**, p. 1939-1951, 1993.
- RINK, L., GABRIEL, P. Zinc and the immune system. **Proceedings of Nutrition Society**, n.59, p.541-552, 2000.
- SCALABRIN, D.M.F. O papel dos micronutrientes no fortalecimento da resposta imune. **Revista Racine**, n.62, p.48-54,ano XI, maio/junho, 2001.
- SILVA, J.D. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 2 ed., Viçosa, M.G.: UFV, Imprensa Universitária, 1990, 165 p.
- TOMKINS, A., BEHRENS, R., ROY, S. The role of zinc and vitamin A deficiency in diarrhoeal syndromes in developing countries. **Proceedings of Nutrition Society**, n. 52, p. 131-142, 1993.
- WOOD, R.J. Assessment of marginal zinc status in humans. Supplement. Zinc and Health: Current Status and Future Directions. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 1350- 1354, 2000.

CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a qualidade protéica de uma bebida láctea probiótica com *L. acidophilus* elaborada com soro de leite e a biodisponibilidade dos minerais cálcio e zinco através da administração de uma suspensão da bactéria probiótica *L. acidophilus*. Os experimentos foram realizados com ratos Wistar e permitiram as seguintes conclusões:

A utilização de uma bebida láctea elaborada com soro de leite apresentou resultados de qualidade protéica semelhantes aos da proteína padrão (caseína), permitindo sugerir a utilização de tal matéria-prima na elaboração de produtos lácteos em geral, pois as proteínas do soro apresentam elevado valor biológico e, estando associadas às bactérias probióticas, promovem uma melhor utilização protéica;

Os valores encontrados para digestibilidade abaixo dos obtidos para a dieta padrão podem ser atribuídos às intercorrências observadas (diarréias nos animais) e pelo fato de ter havido maior excreção de nitrogênio proveniente da microbiota intestinal composta pelo probiótico;

O aumento na absorção e retenção de cálcio nos ossos, promovidos pela administração de *L. acidophilus* pode beneficiar a calcificação quando hormônios sexuais estiverem presentes;

A administração do probiótico auxiliou maior ganho de peso nos animais, podendo estar relacionado com a melhor biodisponibilidade de zinco e de outros nutrientes promotores do crescimento, implicando num efeito benéfico das bactérias probióticas;

A utilização do zinco associado às bactérias probióticas promove maior armazenamento do mineral no fígado.

Futuros estudos poderão esclarecer melhor a ação das bactérias probióticas no organismo, através de ensaios de biodisponibilidade de outros nutrientes, bem como pesquisar a associação dessas bactérias a produtos lácteos fermentados elaborados com soro de leite, permitindo assim, uma utilização em maior escala dessa matéria-prima.