

FERLANDO LIMA SANTOS

**EFEITO DE *Lactobacilli* NO METABOLISMO LIPÍDICO E EM OUTRAS
PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO TUBO DIGESTÓRIO EM DOIS
MODELOS ANIMAIS**

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
2003

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S2237
2003

Santos, Ferlando Lima, 1966-

Efeito de *lactobacilli* no metabolismo lipídico e em outras propriedades funcionais do tubo digestório em dois modelos animais / Ferlando Lima Santos. – Viçosa : UFV, 2003.

156p. : il.

Orientador: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Viçosa

1. Colesterol – Efeito de probióticos. 2. *Lactobacillus casei*. 3. Animais de laboratório – Efeito de probióticos. 4. Probióticos – Translocação. 5. *Eschericia coli* – Efeito de probióticos. 6. Beta-glucoronidase – Efeito de probióticos. 7. Intestinos – Vilosidades – Efeito de probióticos. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

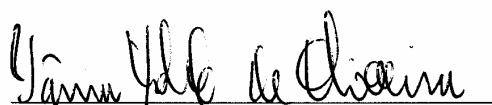
CDD 20. ed. 589.95

FERLANDO LIMA SANTOS


**EFEITO DE *Lactobacilli* NO METABOLISMO LIPÍDICO E EM OUTRAS
PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO TUBO DIGESTÓRIO EM DOIS
MODELOS ANIMAIS**


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: 14 de abril de 2003.


Prof^ª Tânia Toledo de Oliveira
(Conselheira)


Prof^ª Neuza Maria Brunoro Costa
(Conselheira)


Prof. Nerilson Terra Santos


Prof^ª Jacqueline Isaura Alvarez Leite


Prof^ª Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira
(Orientadora)

A Deus, pela iluminação e presença constantes em minha vida.

À Jean Cristina, pela companhia e pelo apoio.

Ao Francisco, pela inspiração.

Aos meus familiares, pela compreensão dos momentos ausentes.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Tecnologia de Alimentos e da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, pelo apoio e pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto.

À Professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, pela orientação, pelos ensinamentos, pelos incentivos e pelas oportunidades.

Às professoras Neuza Maria Brunoro Costa e Tânia Toledo, pela colaboração, pelo apoio e pelas sugestões durante a realização deste trabalho.

Aos professores Isabel Maldonado, Nerilson Terra Santos, Jacqueline Isaura Alvarez Leite, Marco Túlio e Gulab Jhan, pelo apoio e pela participação na construção deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelos serviços prestados.

Aos colegas do Laboratório de Culturas Láticas: Elisa Teshima, Luciana Borba, Lorena, Gustavo, Maximiliano, Carlos e Dayse, pela troca de idéias e experiências e pela amizade.

Aos estagiários Rodrigo, Ana Clarissa, Liliane e Eliana, pelo auxílio na condução dos experimentos.

Aos amigos Maria Lídia, Valter Aragão e Jorge Encarnação, pelo incentivo e pela força.

Às pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

BIOGRAFIA

FERLANDO LIMA SANTOS, filho de Francisco de Assis Santos e Maria de Lourdes Lima Santos, nasceu em 16 de dezembro de 1966, em Cachoeira, Bahia.

Em outubro de 1996, graduou-se em Nutrição pela Universidade Federal da Bahia.

Em março de 1997, iniciou o Curso de Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa-MG, realizando seus estudos na área de Bioquímica de Alimentos (Laticínios). Em março de 1999 defendeu a tese de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Em abril de 1999, iniciou o curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa-MG, realizando seus estudos na área de probióticos.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	xxii
ABSTRACT	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Considerações iniciais	3
2.2. Alimentos funcionais.....	5
2.2.1. Propriedades funcionais de probióticos e prebióticos.....	6
2.3. Metabolismo de colesterol.....	7
2.3.1. Transporte de colesterol.....	13
2.4. Modelos animais utilizados no estudo da colesterolemia.....	14
2.5. Ação das bactérias probióticas na redução do colesterol.....	16
2.5.1. Desconjugação de ácidos biliares	16
2.5.2. Produção de ácidos graxos de cadeia curta	20
2.6. Efeito de bactérias probióticas na colesterolemia de animais	22
2.7. Efeito de bactérias probióticas na colesterolemia de humanos.....	28

	Página
2.8. Considerações finais	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Origem e manutenção das culturas de <i>Lactobacillus</i> spp.	33
3.2. Preparo do concentrado celular	34
3.3. Ajuste da suspensão bacteriana de <i>L. casei</i> spp.	34
3.4. Avaliação na atividade da enzima BSH em células de <i>L. acidophilus</i> NCFM, <i>L. acidophilus</i> CH5, <i>L. casei</i> spp.	35
3.5. Ensaio biológico com ratos.....	36
3.5.1. Animais.....	36
3.5.2. Dietas	36
3.5.3. Efeito de <i>L. acidophilus</i> NCFM, <i>L. acidophilus</i> CH5 e <i>L. casei</i> spp. na modulação da hipercolesterolemia em ratos.....	37
3.5.4. Efeito hipocolesterolemia de diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. em ratos	38
3.6. Ensaio biológico com coelhos.....	40
3.6.1. Animais.....	40
3.6.2. Dietas	40
3.6.3. Efeito hipocolesterolemia de diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. em coelhos	41
3.7. Análise do sangue	42
3.7.1. Colesterol total.....	42
3.7.2. HDL-Colesterol	43
3.7.3. Triacilgliceróis.....	43
3.7.4. LDL-Colesterol + VLDL-Colesterol	43
3.7.5. Ácidos biliares séricos.....	43
3.8. Avaliação da translocação de microrganismos	44
3.8.1. Caracterização dos isolados translocados por perfil de fermentação de carboidratos.....	45
3.8.2. Preparo do inóculo das colônias selecionadas	45
3.8.3. Ajuste do inóculo das colônias selecionadas	45
3.8.4. Inoculação e incubação.....	46
3.9. Avaliação da microbiota intestinal	46
3.10. Determinação do pH intestinal	47
3.11. Avaliação da enzima β -glucuronidase (EC 3.2.1.31)	47

	Página
3.12. Análise histológica do intestino delgado de ratos e coelhos normocolesterolêmicos: comprimento de vilosidades intestinais	48
3.13. Análise de colesterol hepático.....	49
3.13.1. Extração de colesterol	49
3.13.2. Análises cromatográficas	51
3.14. Análise das fezes	51
3.14.1. Extração de colesterol e ácidos biliares	52
3.1.5. Análise estatística.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. Efeito de <i>L. acidophilus</i> NCFM, <i>L. acidophilus</i> CH5 e <i>L. casei</i> spp. na modulação da colesterolemia em ratos alimentados com dieta hiperlipídica	54
4.1.1. Ensaio <i>in vitro</i>	54
4.1.2. Ensaio biológico	55
4.1.3. Parâmetros sanguíneos.....	57
4.2. Caracterização da cultura utilizada como probiótico na avaliação do efeito de dose na modulação da colesterolemia em ratos e coelhos.....	61
4.3. Número de células viáveis no concentrado <i>L. casei</i> spp.....	61
4.4. Efeito hipocolesterolemiantes de diferentes concentrações de <i>Lactobacillus casei</i> spp. em ratos normo e hipercolesterolêmicos	63
4.4.1. Ganho de peso, consumo e coeficiente de eficiência alimentar	63
4.4.2. Sobrevivência das células testadas e recuperadas no conteúdo colônico dos animais	64
4.4.3. Metabolismo lipídico	66
4.5. Efeito hipocolesterolemiantes de diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. em coelhos normo e hipercolesterolêmicos	73
4.5.1. Ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar	73
4.5.2. Sobrevivência das células administradas e determinação do pH intestinal dos animais.....	74

	Página
4.5.3. Metabolismo lipídico	76
4.6. Efeito das diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. na supressão de grupos bacterianos do cólon de ratos e coelhos normocolesterolêmicos	81
4.6.1. Determinação de <i>E. coli</i> em ratos	81
4.6.2. Determinação de <i>E. coli</i> e <i>Clostridium</i> spp. em coelhos	82
4.7. Efeito sobre enzima β -glucuronidase no conteúdo colônico de ratos e coelhos	83
4.8. Determinação de peso do baço de ratos e coelhos normocolesterolêmicos	86
4.9. Determinação de translocação bacteriana no baço de ratos e coelhos normocolesterolêmicos	87
4.10. Análise histológica do intestino delgado de ratos e coelhos normocolesterolêmicos	89
5. RESUMO E CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
APÊNDICE	118
APÊNDICE A	119

LISTA DE QUADROS

	Página
1 Resumo dos estudos que avaliaram a propriedade hipocolesterolemiantes das bactérias do ácido lático nos últimos dez anos	8
2 Composição das dietas experimentais (g/100 g de mistura)	37
3 Composição da ração Coelhoil “R”	40
4 Densidade ótica das culturas de lactobacilos crescidas a 37° C nos tempos 0, 6 e 12 horas (média de duas repetições).....	55
5 Atividade da enzima BSH nas culturas de lactobacilos crescidas a 37° C nos tempos 0, 6 e 12 horas (média de duas repetições).....	55
6 Concentração (UFC/mL) dos probióticos administrados aos ratos.....	56
7 Ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos, após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 8)	56
8 Índice de peso dos órgãos de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos, após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 8).....	57

	Página
9 Colesterol total. HDL-C, VLDL+LDL-C e triacilgliceróis séricos (mg/dL) e índice aterogênico (IA) de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos, após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 8).....	58
10 Perfil de fermentação de carboidratos por <i>L. casei</i> spp., após 48 h de incubação, em Kit API CHL (Biomeriux - França).....	62
11 Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das suspensões celulares de <i>L. casei</i> spp. utilizadas para administração aos ratos durante 14 dias experimentais	62
12 Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das suspensões celulares de <i>L. casei</i> spp. utilizadas para administração aos coelhos durante 14 dia dias experimentais	63
13 Ganho de peso, consumo e CEA de ratos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp., após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 8)	64
14 Análise estatística das características apresentadas no Quadro 13 (valores de P)	64
15 Recuperação de células de lactobacilos (Log UFC/g) no conteúdo colônico de ratos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp., após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 6).....	65
16 Análise estatística das características analisadas no Quadro 15 (valores de P).....	65
17 Colesterol total. HDL-C, VLDL+LDL-C, triacilgliceróis séricos (mg/dL) e índice aterogênico de ratos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 8).....	66
18 Análise estatística das características analisadas no Quadro 17 (valores de P).....	66

	Página	
19	Peso do fígado, colesterol hepático, ácidos biliares e colesterol fecais de ratos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp., após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 8).....	68
20	Análise estatística das características apresentadas do Quadro 19 (valores de P)	68
21	Ganho de peso, consumo alimentar e CEA de coelhos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp., após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 6).....	74
22	Análise estatística das características analisadas do Quadro 21 (valores de P).....	74
23	Recuperação de células de lactobacilos no cólon e pH do conteúdo duodenal, ileal e colônico de coelhos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp., após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 6).....	75
24	Colesterol total. HDL-C, VLDL+LDL-C, triacilgliceróis séricos (mg/dL) e índice aterogênico de coelhos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp., após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 6).....	77
25	Análise estatística das características apresentadas do Quadro 25 (valores de P)	77
26	Peso do fígado, colesterol hepático, ácidos biliares e colesterol fecais de coelhos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp., após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 6).....	79
27	Análise estatística das características apresentadas do Quadro 27 (valores de P)	79
28	Recuperação de células de <i>E. coli</i> no conteúdo colônico de ratos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp., após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 6).....	81

	Página	
29	Recuperação de células de <i>E. coli</i> e <i>Clostridium</i> spp. no conteúdo colônico de coelhos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6).....	83
30	Atividade da enzima β -glucuronidase no conteúdo colônico de ratos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6).....	84
31	Atividade da enzima β -glucuronidase no conteúdo colônico de coelhos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6).....	84
32	Índice de peso do baço de ratos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6).....	87
33	Índice de peso do baço de coelhos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6).....	87
34	Contagem de células de <i>Lactobacillus</i> spp. no baço de ratos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6).....	88
35	Contagem de células de <i>Lactobacillus</i> spp. no baço de coelhos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6).....	88
36	Comprimento das vilosidades do íleo de ratos alimentados com dieta basal suplementada com doses crescentes de <i>L. casei</i> spp. (média \pm desvio-padrão, n = 5).....	90
37	Comprimento das vilosidades do íleo de coelhos alimentados com dieta basal suplementada com doses crescentes de <i>L. casei</i> spp. (média \pm desvio-padrão, n = 5).....	90
1A	Atividade da enzima BSH, pH, densidade óptica em células de <i>L acidophilus</i> CH5 nos tempos 0, 6 e 12 horas	119

	Página
2A Atividade da enzima BSH, pH e densidade óptica em células de <i>L. casei</i> spp. nos tempos 0, 6 e 12 horas	119
3A Atividade da enzima BSH, pH e densidade óptica em células de <i>L. acidophilus</i> NCFM nos tempos 0, 6 e 12 horas	119
4A Ganho de peso diário de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)	120
5A Consumo alimentar diário de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)	120
6A Conversão alimentar de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)	121
7A Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos concentrados de lactobacilos administrados aos ratos (pré-tratamento).....	121
8A Peso do fígado de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (gramas)	122
9A Peso do baço de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (gramas)	122
10A Colesterol total de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)	122
11A HDL-C de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)	123
12A VLDL + LDL-C de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)	123
13A Triglicerídios de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)	123
14A Índice aterogênico de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)	124
15A Ácidos biliares séricos de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)	124
16A Unidade formadora de colônias (UFC/mL) das doses de <i>L. casei</i> spp. administrados aos ratos (0,1 mL)	125

	Página
17A	Efeito de diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. no ganho de peso diário de ratos normocolesterolêmicos..... 125
18A	Efeito de diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. no ganho de peso diário de ratos hipercolesterolêmicos 126
19A	Efeito de diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. no consumo alimentar diário de ratos normocolesterolêmicos..... 126
20A	Efeito de diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. no consumo alimentar diário de ratos hipercolesterolêmicos..... 127
21A	Efeito de diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. na conversão alimentar diária de ratos normocolesterolêmicos 127
22A	Efeito de diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. na conversão alimentar diária de ratos hipercolesterolêmicos..... 128
23A	Viabilidade de células de lactobacilos em conteúdo colônico de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp..... 128
24A	Viabilidade de células de lactobacilos em conteúdo colônico de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. 129
25A	Peso do fígado de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. ... 129
26A	Peso do fígado de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. 130
27A	Peso do baço de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. 130
28A	Peso do baço de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. 131
29A	Colesterol total de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. ... 131
30A	Colesterol total de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp. 132

	Página
31A HDL-C de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp.....	132
32A HDL-C de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp.....	133
33A VLDL + LDL-C de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp.....	133
34A VLDL + LDL-C de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp.....	134
35A Triglicerídios de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp.	134
36A Triglicerídios de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp.	135
37A Índice aterogênico de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp.....	135
38A Índice aterogênico de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de <i>L. casei</i> spp.....	136
39A Colesterol hepático de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	136
40A Colesterol hepático de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	136
41A Colesterol fecal de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	137
42A Colesterol fecal de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	137
43A Ácidos biliares fecais de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.....	137
44A Ácidos biliares fecais de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	138

	Página
45A Contagem bacteriana de <i>E. coli</i> em conteúdo colônico de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	138
46A Atividade da enzima beta-d-glucuronide em ratos normocoles-terolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	139
47A Translocação de células de lactobacilos em baços de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	139
48A Unidade formadora de colônia (UFC/mL) dos concentrados celulares de <i>L. casei</i> spp. administrados em coelhos (0,3 mL)	140
49A Efeito de diferentes doses de <i>L. casei</i> spp. no ganho de peso diário de coelhos normocolesterolêmicos	140
50A Efeito de diferentes doses de <i>L. casei</i> spp. no ganho de peso diário de coelhos hipercolesterolêmicos.....	141
51A Efeito de diferentes doses de <i>L. casei</i> spp. no consumo alimen-tar diário de coelhos normocolesterolêmicos.....	141
52A Efeito de diferentes doses de <i>L. casei</i> spp. no consumo alimen-tar diário de coelhos hipercolesterolêmicos.....	141
53A Efeito de diferentes doses de <i>L. casei</i> spp. na conversão de coelhos normocolesterolêmicos.....	142
54A Efeito de diferentes doses de <i>L. casei</i> spp. na conversão de coelhos hipercolesterolêmicos	142
55A pH do conteúdo duodenal, íleal e colônico de ratos normocoles-terolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.....	142
56A pH do conteúdo duodenal, íleal e colônico de coelhos hiperco-lestonolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.....	143
57A Viabilidade de células de lactobacilos em conteúdo colônico de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	143

	Página
58A Viabilidade de células de lactobacilos em conteúdo colônico de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	143
59A Peso do fígado de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	144
60A Peso do fígado de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	144
61A Peso do baço de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	144
62A Peso do baço de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	145
63A Colesterol total de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	145
64A Colesterol total de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	145
65A HDL-C de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	146
66A HDL-C de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	146
67A VLDL + LDL-C de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	146
68A VLDL + LDL-C de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	147
69A Triglicerídios de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	147
70A Triglicerídios de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	147
71A Índice aterogênico de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	148

	Página
72A Índice aterogênico de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.....	148
73A Colesterol hepático de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp. (mg/g de fígado).....	148
74A Colesterol hepático de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.....	149
75A Colesterol fecal de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp. (mg/100 g de fezes).....	149
76A Colesterol fecal de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.....	149
77A Ácidos biliares fecais de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	150
78A Ácidos biliares fecais de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.....	150
79A Contagem bacteriana de <i>E. coli</i> em conteúdo colônico de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	150
80A Contagem bacteriana de <i>Clostridium</i> spp. em conteúdo colônico de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	151
81A Atividade da enzima beta-d-glucuronide em coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.....	151
82A Translocação de células de lactobacilos em baços de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.....	151
83A Comprimento das vilosidades intestinais do íleo de ratos e coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de <i>L. casei</i> spp.	152

LISTA DE FIGURAS

	Página
1	Resumo das principais vias metabólicas do colesterol em seres humanos 11
2	Metabolismo dos principais ácidos biliares verificados em humanos: A = 7 α -hidroxilase; B = BSH; e C = 7 α -dehidroxilase.. 12
3	Possíveis mecanismos de ação das bactérias probióticas sobre o metabolismo de colesterol..... 17
4	Representação esquemática das camadas que formam a parede do intestino delgado. A camada mucosa emite evaginações para a luz intestinal e entre elas desembocam as glândulas intestinais ou criptas de Lieberkühn. Cada evaginação da mucosa é denominada vilo ou vilosidade 50
5	Cromatograma do padrão de colesterol 52
6	Ácidos biliares séricos de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 8) 59
7	Representação das vilosidades do íleo de ratos e coelhos alimentados com dieta basal: A = íleo de ratos corado pela técnica de Malory (10X); B = íleo de coelho corado pela técnica de HE (4X); seta = células caliciformes; e linha pontilhada = comprimento do vilo..... 89

	Página
1A Cromatograma de coelhos normocolesterolêmicos	155
2A Cromatograma de coelhos hipercolesterolêmicos.....	155
3A Cromatograma de ratos normocolesterolêmicos.....	156
4A Cromatograma de ratos hipercolesterolêmicos.....	156

RESUMO

SANTOS, Ferlando Lima, D.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2003. **Efeito de *lactobacilli* no metabolismo lipídico e em outras propriedades funcionais do tubo digestório em dois modelos animais.** Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Conselheiras: Neuza Maria Brunoro Costa e Tânia Toledo de Oliveira.

Probióticos, na forma de produtos lácteos fermentados ou não, são conhecidos como alimentos funcionais e têm sido recomendados como adjunto dietético para indivíduos com hipercolesterolemia. Com o objetivo de avaliar seu efeito no metabolismo lipídico e em outras propriedades funcionais do tubo digestório foram conduzidos cinco ensaios biológicos, envolvendo 104 ratos e 48 coelhos. A modulação da colesterolemia foi avaliada em ratos que receberam dieta basal ou dieta hiperlipídica suplementada com diferentes células de *L. acidophilus* CH5, *L. acidophilus* NCFM e *L. casei* spp., por um período de 14 dias. Observou-se que as espécies *L. acidophilus* CH5 e *L. casei* spp. apresentaram praticamente o dobro da atividade da enzima BSH de *L. acidophilus* NCFM. A suplementação de probióticos aos animais não alterou ($P>0,05$) o consumo alimentar, o coeficiente de eficiência alimentar, o ganho de peso, o índice de peso de fígado, o índice de peso do baço, o índice aterogênico e a concentração de colesterol total, HDL-C, VLDL+LDL-C, ácidos biliares e

triacilgliceróis entre os grupos experimentais. Por outro lado, a dieta hiperlipídica administrada aos animais não aumentou a concentração de colesterol sanguíneo ($P>0,05$). Avaliando-se o efeito da administração de diferentes concentrações de *L. casei* spp. (10^4 , 10^6 , 10^8 UFC/mL) em ratos normo e hipercolesterolêmicos, por um período de 14 dias, verificou-se que o ganho de peso ($P<0,05$), o coeficiente de eficiência alimentar ($P<0,01$) e os parâmetros sanguíneos (índice aterogênico e níveis séricos de colesterol total, triacilgliceróis, HDL-C, LDL+VLDL-C) ($P<0,01$) dos animais que receberam a dieta hiperlipídica foram superiores aos dos animais que receberam a dieta basal. No entanto, independentemente do tipo de dieta, as diferentes concentrações de *L. casei* spp. administradas aos animais não exerceram efeito sobre esses parâmetros ($P>0,05$). Embora houvesse aumento ($P<0,01$) no peso do fígado, na concentração de colesterol hepático e na concentração de colesterol e ácidos biliares fecais nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, quando comparados com os que receberam a dieta basal. Observa-se que o efeito de dose foi significativo no colesterol hepático ($P<0,01$) e fecal ($P<0,05$), independentemente do tipo de dieta. No entanto, não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre as diferentes concentrações de *L. casei* spp. Repetindo a experimentação anterior em coelhos normo e hipercolesterolêmicos, porém utilizando as concentrações 10^5 , 10^7 , 10^9 UFC/mL, verificou-se que os parâmetros sanguíneos ($P<0,01$), o peso do fígado ($P<0,01$) e a concentração de colesterol hepático e colesterol fecal ($P<0,01$) dos animais que receberam a dieta hiperlipídica foram superiores aos dos animais que receberam a dieta basal. No entanto, diferentemente de ratos, o efeito de dose não foi significativo ($P>0,05$) para todas as características analisadas. Quanto ao efeito de dose em outras propriedades funcionais do tubo digestório em ratos e coelhos normocolesterolêmicos, constatou-se que as diferentes concentrações probióticas testadas aumentaram os níveis de *Lactobacillus* ($P<0,01$) e reduziram os níveis de *E. coli* ($P<0,05$) e a atividade da enzima β -glucuronidase ($P<0,01$) em ratos, mas não em coelhos ($P>0,05$). Por outro lado, não houve alteração no peso do baço, nem na contagem

bacteriana neste órgão ($P>0,05$), mas houve aumento do comprimento das vilosidades intestinais ($P<0,01$) nos dois modelos animais. Portanto, concluiu-se que, embora não houvesse alteração na colesterolemia dos animais, a suplementação de doses crescentes de *L. casei* spp. exerceu alguma influência no metabolismo de colesterol, na morfologia intestinal e na modulação da microbiota intestinal, aumentando os níveis de lactobacilos e reduzindo os níveis de *E. coli*, dos dois modelos estudados.

ABSTRACT

SANTOS, Ferlando Lima, D.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2003.
Effect of lipid metabolism and other functional properties of the alimentary canal in two animal models. Adviser: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira. Committee Members: Neuza Maria Brunoro Costa and Tânia Toledo de Oliveira.

Probiotics, whether in the form of fermented dairy products or not, are known as functional foods and have been recommended as dietary adjuncts to individuals with hypercholesterolemia. Five bioassays were carried out to evaluate the effect of probiotics on the lipid metabolism and other functional properties of the alimentary canal in 104 rats and 48 rabbits. Cholesterolemia modulation was evaluated in rats fed a basal diet or hyperlipidic diet supplemented with different cells of *L. acidophilus* CH5, *L. acidophilus* NCFM and *L. casei* spp. for 14 days. The species *L. acidophilus* CH5 and *L. casei* spp. were observed to present practically double the BSH enzyme activity of the *L. acidophilus* NCFM. Probiotic supplementation fed the animals did not alter ($P > 0.05$) food consumption, food efficiency coefficient, weight gain, liver weight index, spleen weight index, atherogenic index, and total cholesterol concentration, HDL-C, VLDL+LDL-C, bile acids and triacylglycerol among the experimental groups. However, the hyperlipidic diet fed the animals did not increase blood cholesterol concentration ($P > 0.05$). The evaluation of the effect of feeding different concentrations of *L. casei* spp. (10^4 , 10^6 , 10^8 UFC/mL) to

normal and hypercholesterolemic rats for 14 days, showed that weight gain ($P > 0.05$), food efficiency coefficient ($P < 0.01$) and blood parameters atherogenic index and serum levels of total cholesterol, triacylglycerol, HDL-C, LDL+VLDL-C ($P < 0.01$) of the animals fed the hyperlipidic diet were higher than those of the animals fed a basal diet. Regardless of the type of diet, different concentrations of *L. casei* spp. fed to the animals did not have an effect on these parameters ($P > 0.05$), despite the increase ($P < 0.01$) in liver weight, liver cholesterol concentration, and cholesterol and fecal bile acid concentrations in the animals fed the hyperlipidic diet, compared to those fed the basal diet. It was observed that the dose effect was significant for the liver cholesterol ($P < 0.01$) and fecal cholesterol ($P < 0.05$), regardless of type of diet. However, no significant difference was found ($P > 0.05$) among the different concentrations of *L. casei* spp. The repetition of the previous experiment using normal and hypercholesterolemic rabbits, but at concentrations 10^5 , 10^7 , 10^9 UFC/mL, showed that the blood parameters ($P < 0.01$), liver weight ($P < 0.01$) and liver cholesterol concentration and fecal cholesterol ($P < 0.01$) of the animals fed the hyperlipidic diet were higher than those of the animals fed the basal diet. However, contrary to the rats, the dose effect was not significant ($P > 0.05$) for all the characteristics analyzed. Regarding the dose effect on other functional properties of the alimentary canal in normocholesterolemic rats and rabbits, it was confirmed that the different probiotic concentrations tested increased the *Lactobacillus* levels ($P > 0.05$) and decreased *E. coli* levels ($P < 0.05$) and the enzyme β -glucuronidase activity ($P < 0.01$) in rats but not in rabbits ($P > 0.05$). On the other hand, no alteration was found either in spleen weight nor in spleen bacterial counting ($P > 0.05$) but there was an increase in the length of the intestinal villi ($P > 0.01$) in both animal models. Therefore, it was concluded that, although no alteration was verified in the animals' cholesterolemia, supplementing increasing *L. casei* spp. doses had some effect on cholesterol metabolism, intestinal morphology and intestinal microbiota modulation, increasing the *Lactobacillus* levels and reducing the *E. coli* levels for both models studied.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida, juntamente com a modificação no estilo de vida do homem moderno, promoveu o aumento nas taxas de incidência e prevalência das doenças crônico-degenerativas, principalmente das doenças cardiovasculares. Como consequência, essas doenças passaram a representar a maior causa de morte na população mundial. Adicionalmente, sabe-se que a concentração elevada de colesterol sanguíneo, particularmente da fração LDL-C (lipoproteína de baixa densidade), tem sido associada ao risco de doenças cardiovasculares e que a redução na colesterolemia está relacionada ao decréscimo significativo desse risco. Com isso, tem havido uma crescente preocupação na busca de novas alternativas, principalmente nas de origem dietética, que diminuam a concentração de colesterol sérico, visando reduzir a incidência dessas doenças. Deste modo, pesquisas têm sido conduzidas para avaliar o efeito hipocolesteremiante de diversos compostos presentes em alimentos.

Estudos empregando modelo animal e humano indicam que alguns alimentos possuem função metabólica e regulatória na fisiologia do organismo, promovendo a nutrição e a saúde e prevenindo doenças. Esses alimentos, denominados “alimentos funcionais”, têm sido avaliados na redução dos níveis séricos de colesterol e, conseqüentemente, do risco de doenças cardiovasculares.

Dentro dessa concepção, os efeitos fisiológicos da administração oral de células de bactérias probióticas têm sido estudados em diversos modelos experimentais, resultando no acúmulo de informações sobre a atuação desses microrganismos no metabolismo de colesterol. Estudos sobre o efeito hipocolesterolemizante dessas bactérias têm demonstrado resultados contraditórios. Em adição, não se tem estudado o efeito da dosagem probiótica sobre o metabolismo de colesterol, e os modelos animais utilizados são predominantemente hipercolesterolêmicos.

Assim, em resposta a este quadro, desenvolveu-se este estudo com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes concentrações de *Lactobacillus casei* spp. no metabolismo lipídico em ratos e coelhos normo e hipercolesterolêmicos e em outras propriedades funcionais do tubo digestório, como níveis de *E. coli*, na atividade da enzima β -glucuronidase, na taxa de translocação dos microrganismos administrados e na morfologia intestinal, nos dois modelos estudados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações iniciais

Nas últimas décadas, a melhoria das condições de vida, juntamente com os avanços da medicina, promoveu o aumento da expectativa de vida do homem. Concomitantemente, ocorreu um rápido processo de modernização e industrialização das cidades, o que concorreu para a modificação no estilo de vida de seus habitantes. Como consequência, houve o aumento nas taxas de incidência e prevalência das doenças crônico-degenerativas, como doenças cardiovasculares, câncer e diabetes mellitus (GURALNIK et al., 1996; SZRETER e MOONEY, 1998; DONALDSON, 2000; GRACEY, 2000; HAYFLICK, 2000; HORIUCT, 2000; NANCY e CLEEMAN, 2002).

Em países desenvolvidos e em centros urbanos de países em desenvolvimento, as doenças cardiovasculares representam a maior causa de morte na população adulta, sendo responsável por um terço das mortes ocorridas no mundo (WHO, 1997). Essas doenças têm elevado a taxa de morbidade populacional e representam os maiores custos na área da saúde pública (ASSMANN et al., 1998).

Os níveis de lipídios plasmáticos estão associados às doenças cardiovasculares. Desde a infância, observa-se a deposição de lipídios na camada

íntima das artérias. Inicialmente aparecem manchas lineares amareladas (*fatty streak*), que vão progredindo com espessamento e fibrose, caracterizando a placa de ateroma que, num estágio mais avançado, pode manifestar calcificação, hemorragia e trombose local das artérias (GOLDSTEIN et al., 1979; NORA et al., 1980; FLAVANHAN, 1992; STRONG, 1992; BERLINER et al., 1995). A aterosclerose exerce papel preponderante dentre as doenças cardiovasculares. O seu desenvolvimento promove a obstrução do fluxo de sangue nas artérias coronárias, o que contribui para o agravamento de patologias associadas a esta doença, tais como hipertensão arterial, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (WHO, 1997).

Estudos epidemiológicos têm estabelecido a relação entre nível elevado de colesterol e aterogênese, em especial as correlações positivas entre a doença arterial coronariana e as concentrações plasmáticas de colesterol total e de LDL-C (lipoproteína de baixa densidade) e correlação negativa com o HDL-C (lipoproteína de alta densidade) (LAW et al., 1994 a, b, c; LEVINE et al., 1995; LAW e WALD, 1999; WALKER, 1999). O primeiro estudo que associou níveis elevados de colesterol à aterosclerose foi desenvolvido por ANITSCHKOW e CHALATOW (1913), que induziram a formação de placas de ateroma em coelhos alimentados com dieta rica em gema de ovo. Posteriormente, essa relação foi observada em humanos (MULLER, 1938; THANNHAUSER e MAGENDANTZ, 1938).

Em 1949, um estudo prospectivo com moradores da cidade de Framingham, nos Estados Unidos, além da hipercolesterolemia, foram identificados o tabagismo, a obesidade, o sedentarismo e a hipertensão arterial como os principais fatores de risco das doenças cardiovasculares (DAWBER e KANNEL, 1966). Esses resultados incentivaram diversos estudos epidemiológicos, sobretudo nas décadas de 60 e 70, que corroboraram os fatores já citados em populações com alta incidência de doenças cardiovasculares (ROSE et al., 1965; LEREN et al., 1966; KEYS et al., 1967; DAYTON et al., 1969; GPNTR, 1971; GROSS e FIGUEREDO, 1973; DETRE et al., 1974; ROBERTSON et al., 1977; DORR et al., 1978; WOODHILL et al., 1978).

Os principais estudos epidemiológicos e experimentais desenvolvidos entre 1950 e 1990 foram analisados por LAW et al. (1994), para estimar a associação entre concentração sérica de colesterol e doenças cardiovasculares. Desta forma, foram avaliados 12 estudos prospectivos em comunidades de diversos países e 28 ensaios experimentais. Os resultados demonstraram que a redução de 10% nos níveis de colesterol sanguíneo promoveria a diminuição no risco da mortalidade por doenças ateroscleróticas de 50, 40, 30, e 20% em indivíduos com a idade de 40, 50, 60 e 70 anos, respectivamente.

Essa realidade tem proporcionado a crescente preocupação na busca de novas alternativas, principalmente nas de origem dietética, que promovam a diminuição do colesterol sérico, para que haja redução no risco de morte por doenças cardiovasculares. Deste modo, pesquisas têm sido conduzidas para avaliar o efeito hipocolesterolemizante de diversos compostos presentes em alimentos (HARRIS et al., 1990; CHOUDHURY et al., 1994; LEE et al., 1994; ANTHONY et al., 1996; HEBBACHI et al., 1997; PEDERSEN et al., 1997; NESTEL et al., 1997; NICOLISI et al., 1997; ROSA et al., 1998b; BOK et al., 1999; BORRADAILE, 1999; USMAN e HOSONO, 2000; KUROWSKA, 2000; MOUGIOS et al., 2001).

Assim, tem-se sugerido o aumento na dieta de ácidos graxos ômega 3, fibra solúvel, isoflavonas, flavonóides, ácido linoléico conjugado, prebióticos e probióticos e o consumo moderado de álcool. Ainda que essas pesquisas tenham comprovado em modelos animais e humanos a eficácia desses componentes alimentares na redução da colesterolemia, é necessária a condução de estudos que investiguem o efeito da concentração dessas substâncias na modulação do colesterol sérico em humanos.

2.2. Alimentos funcionais

Os alimentos funcionais são definidos como aqueles que apresentam compostos, nutrientes ou não, com propriedade de promover a saúde ou diminuir o risco de doenças quando consumidos em quantidades tradicionais

(ROBERFROID, 1999; 2000b). O termo surgiu no Japão no final da década de 80, como resposta da indústria de alimentos a um apelo do governo japonês, preocupado com o aumento na incidência das doenças crônico-degenerativas na população japonesa de terceira idade. Assim, foram lançados vários alimentos fortificados com vitaminas, minerais, e atualmente esses produtos denominados funcionais podem carrear substâncias prebióticas, microrganismos probióticos e outros componentes (MILNER, 2000; ROBERFROID, 2000c).

2.2.1. Propriedades funcionais de probióticos e prebióticos

Os probióticos são produtos definidos como suplemento dietético que contém bactérias viáveis de origem intestinal humana, quando o produto se destina ao consumo humano, e bactérias de origem intestinal animal específica, quando este se destina ao consumo de uma determinada espécie animal. Esses produtos afetam benéficamente o hospedeiro pela melhoria do balanço da microbiota intestinal que foi, de algum modo, desbalanceada por tratamentos com antibióticos, quimioterapia, radioterapia ou por situação de estresse (FERREIRA, 1998).

Outras funções têm sido inferidas aos alimentos carreadores de bactérias probióticas, como ativação do sistema imune, efeito na encefalopatia portal sistêmica, atividade anticarcinogênica, síntese de vitaminas do complexo B, melhoria na digestão da lactose por indivíduos lactase não-persistentes, aumento na absorção de minerais, inibição de patógenos e diminuição do colesterol sérico (SANDERS, 1993, 1999; SALMINEN et al., 1999; NAIUDU et al., 1999; WOLLOWSKI et al., 2001; YBARRA et al., 2001). As principais bactérias probióticas são do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (FULLER, 1999).

Os prebióticos são alimentos que não são digeríveis no intestino delgado e atingem o intestino grosso, onde estimulam um determinado grupo microbiano. Os prebióticos mais comuns são os frutooligosacarídeos (FOS) e as inulinas, que estimulam principalmente as bactérias bífidas (GIBSON e ROBERFROID, 1995; ROBERFROID, 2001). Os alimentos que carregam ao mesmo tempo

bactérias probióticas e substâncias prebióticas são denominados simbióticos (GIBSON, 1998; DE VRESE e SCHREZENMEIR, 2001).

Os efeitos profiláticos e terapêuticos das bactérias lácticas foram estudados no início do século passado, quando METCHNIKOFF (1908) lançou a teoria sobre o prolongamento da vida por meio do consumo regular de leites fermentados. No entanto, o primeiro trabalho que relacionou o efeito da microbiota intestinal sobre o metabolismo de colesterol foi desenvolvido por Eyssem (1966) (EYSSSEN, 1973). Posteriormente, MANN e SPOERRY (1974) estudaram essa associação em seres humanos, quando observaram a relação entre o consumo elevado de leites fermentados e a redução de colesterol sérico em indivíduos da tribo Maasai. Desde então, pesquisas vêm corroborando essas observações iniciais, relacionando o consumo de leite fermentado e a modulação na colesterolemia de diversos modelos experimentais. No entanto, os mecanismos pelos quais as bactérias lácticas favorecem a diminuição do colesterol sérico ainda não estão devidamente esclarecidos. No Quadro 1 estão os trabalhos publicados nos dez últimos anos.

2.3. Metabolismo de colesterol

Desde que foi isolado de cálculos biliares em 1784, o colesterol tem sido a molécula que mais recebe atenção na biologia. O colesterol desempenha diversas funções no organismo animal, dentre elas a composição estrutural de membrana celular, a síntese de hormônios sexuais, a formação de vitamina D e a síntese de sais biliares e hormônios esteróides (LEHNINGER, 2000). Por outro lado, é também o principal constituinte dos cálculos biliares, além de exercer importante papel na gênese da aterosclerose (MURRAY, 1994). O fígado é o principal órgão da biossíntese de colesterol, e a sua via metabólica é regulada pelas enzimas HMG-CoA redutase (3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase) e 7 α -hidroxilase. Adicionalmente, a maior parte do colesterol total do organismo é originada de síntese endógena; em humanos, por exemplo, ocorre baixa absorção de colesterol dietético (2 a 4 mg/kg de peso corporal/dia) em relação à síntese

Quadro 1 – Resumo dos estudos que avaliaram a propriedade hipocolesteremiante das bactérias do ácido lático nos últimos dez anos

Autor	Características do Estudo (população/colesterolemia/tempo, em dias)	Microorganismo Envolvido	Resultados sobre o Metabolismo de Colesterol
NAKAJIMA et al. (1992)	Ratos, HC, 7	<i>Lactobacillus cremoris</i>	↓ CT ↑ HDL
AGERBAECK et al. (1995)	Indivíduos, HC, 42	<i>Enterococcus faecium/ Streptococcus thermophilus</i>	↓ CT e LDL
FUKUSHIMA e NEKANO (1995)	Ratos, HC, 42	<i>Bacillus, Lactobacillus, Candida, Saccharomyces, Streptococcus</i>	↑ esteróides fecais, ↓ CT, LDL, VLDL e HMG CoA redutase
ABDULRAHIM et al. (1996)	Frangos, NC, 112	<i>L. acidophilus</i>	↓ CT na gema de ovo
FUKUSHIMA e NEKANO (1996)	Ratos, HC, 28	<i>Bacillus, Lactobacillus, Candida, Saccharomyces, Streptococcus e Clostridium</i>	↑ sais biliares fecais
HADDADIN et al. (1996)	Pintos, NC, 336	<i>L. acidophilus</i>	↓ CT, LDL e HMG CoA redutase
MOHAN et al. (1996)	Frangos, NC, 56	<i>L. acidophilus, L. casei, Bifidobacterium bifidum, Aspergillus oryzae, Torulopsis</i>	↓ CT na gema de ovo
RICHELSEN et al. (1996)	Indivíduos, NC, 42	<i>Enterococcus faecium, Streptococcus thermophilus</i>	↓ CT do soro e ↓ CT na gema de ovo
AKALIN et al. (1997)	Camundongos, HC, 56	<i>L. acidophilus, L. delbrückii ssp. bulgaricus, Streptococcus thermophilus</i>	NS
BEENA e PRASAD (1997)	Ratos, HC, 30	<i>L. delbrückii ssp bulgaricus, Streptococcus thermophilus B. bifidum</i>	↓ CT e LDL
SESSIONS et al. (1997)	Ratos, HC, 30	<i>L. delbrückii ssp bulgaricus, Streptococcus thermophilus B. bifidum</i>	↑ TG, ↓ CT, LDL
SESSIONS et al. (1997)	Indivíduos, HC, 84	<i>Enterococcus faecium, Streptococcus thermophilus</i>	NS
DE SMET et al. (1998)	Suínos, HC, 91	<i>L. reuteri</i>	↓ CT e LDL no soro
DU TOIT et al. (1998)	Suínos, HC, 35	<i>L. johnsonii, L. reuteri</i>	↓ CT
HAYAKAWA et al. (1998)	Hamster, HC e NC, 7	<i>B. breve</i>	NC ↓ LDL e VLDL-C
SCHAAFSMA et al. (1998)	Indivíduos, HC, 50	<i>L. acidophilus, L. delbrückii ssp bulgaricus, Streptococcus thermophilus</i>	HC ↓ CT, LDL e VLDL-C; ↑ AB fecal
SPANHAAK et al. (1998)	Indivíduos, NI, 49	<i>L. casei</i> biovariedade <i>Shirota</i>	↓ CT, LDL e LDL:HDL
TARANTO et al. (1998)	Camundongos, HC, 7	<i>L. reuteri</i>	NS
			↑ HDL:LDL ↓ CT e TG

Quadro 1, Cont.

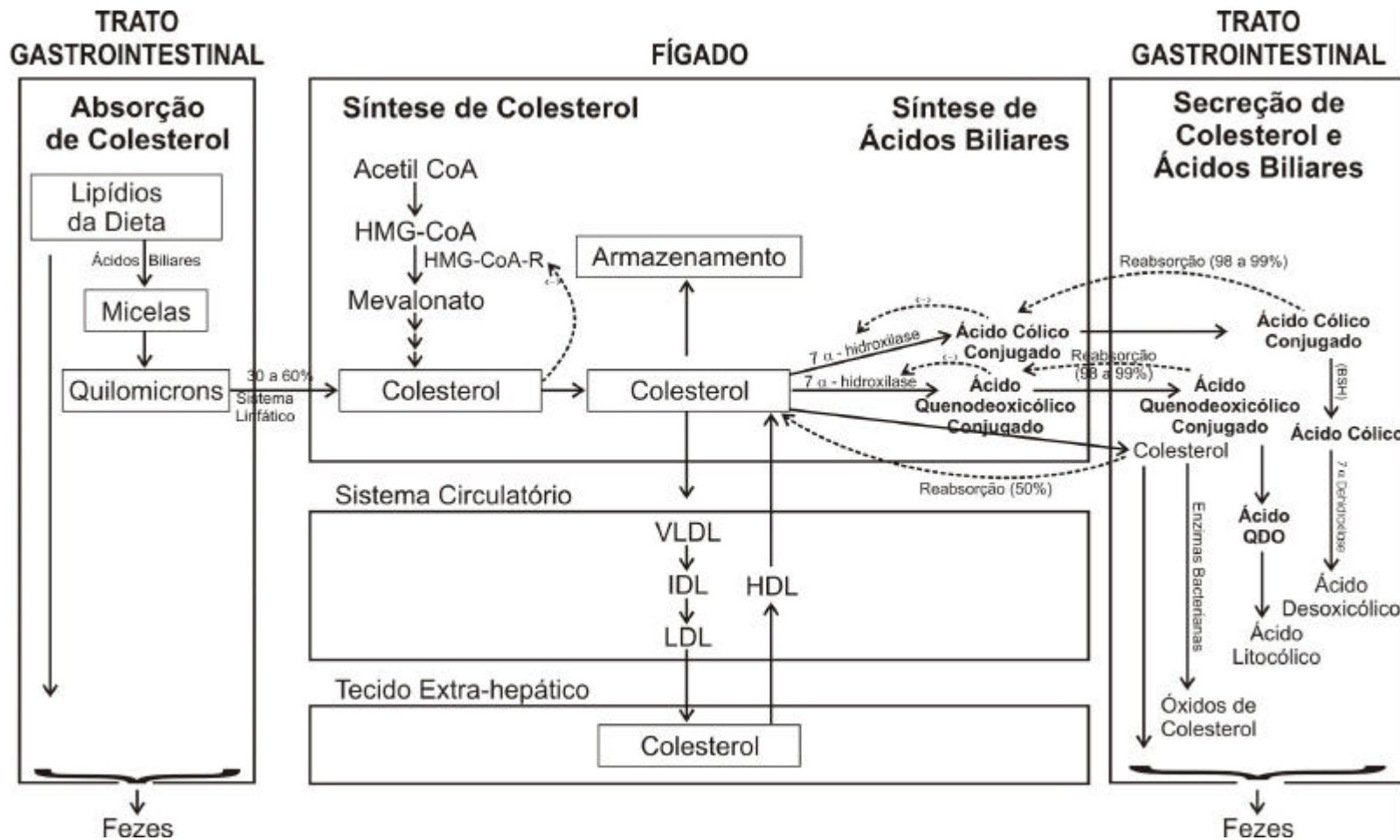
Autor	Características do Estudo (população/colesterolemia/tempo, em dias)	Microorganismo Envolvido	Resultados sobre o Metabolismo de Colesterol
DE ROOS et al. (1999)	Indivíduos, HC e NC, 42	<i>L. acidophilus, S. thermophilus</i>	NS (NC e HC)
ANDERSON e GILLILAND (1999)	Indivíduos, HC, 56	<i>L. acidophilus</i>	↓ CT
FUKUSHIMA et al. (1999)	Ratos, HC, 28	<i>Bacillus, Lactobacillus, Candida, Saccharomyces, Streptococcus e Clostridium</i>	↑ atividade da Δ6-desaturase e ácido araquidônico, ↓ CT do soro
HADDADIN et al. (1999)	Ovelhas, NC, 112	<i>L. acidophilus</i>	↓ CT no leite
LUBBADEH et al. (1999)	Ovelhas e cordeiro, NC, 120	<i>L. acidophilus</i>	↓ CT presente na carne dos animais
AGERHOLM-LARSEM et al. (2000)	Indivíduos obesos, 56	<i>Enterococcus faecium, L. acidophilus, L. rhamnosus, Streptococcus thermophilus</i>	↓ LDL
CANZI et al. (2000)	Coelhos, HC, 42	<i>L. acidophilus, L. delbrueckii ssp. bulgaricus, Streptococcus thermophilus</i>	↓ CT
ASHAR et al. (2000)	Humanos, NC e HC, 20	<i>L. acidophilus</i>	NC: ↑ TG e VLDL HC: ↓ CT e LDL
ZHOU et al. (2000 ^a)	Camundongos, NC, 28	<i>L. acidophilus, L. rhamnosus, B. lactis</i>	NS
TARANTO et al. (2000)	Camundongos, HC, 7	<i>L. reuteri</i>	↓ CT, LDL e AB do soro ↑ AB das fezes
KAWASE et al. (2000)	Ratos, HC, 14 Indivíduos, HC, 56	<i>L. casei e S. thermophilus</i>	Ratos: ↓ CT Indivíduos: ↑ HDL, ↓ TG
USMAN e HOSONO (2000)	Ratos, HC, 14	<i>L. gasseri</i>	↑ HDL:LDL ↓ CT e TG
PIETRAS et al. (2001)	Frangos, NC, 49	<i>L. acidophilus, E. faecium</i>	↓ CT, HDL do soro
SCHAARMANN et al. (2001)	Indivíduos, NC e HC, 51	<i>L. acidophilus, B. longum, Lactobacillus lactis e S. thermophilus</i>	Indivíduos NC: ↓ CT e LDL-C, TG; ↑ HDL Indivíduos HC: ↓ CT e LDL-C, TG; ↑ HDL
JAHREIS et al. (2002)	Indivíduos, NI 35	<i>L. paracasei</i>	NS

HC = hipercolesterolêmico; NC = normocolesterolêmico; CT = colesterol total; TG = triglicerídios; AB = ácidos biliares; HMG CoA redutase, hidroxi metil glutaril coenzima A redutase; NI, não-identificado; NS, não-significativo; ↑ = elevação; e ↓ = redução.

endógena (9 a 13 mg/kg de peso corporal /dia) (SHILS, 1994). Porém, a elevação na concentração de colesterol sérico, além dos fatores genéticos, deve levar em consideração outros fatores, como tabagismo, estresse, ingestão de gordura saturada, sedentarismo, entre outros. Na Figura 1 estão as principais vias metabólicas do colesterol.

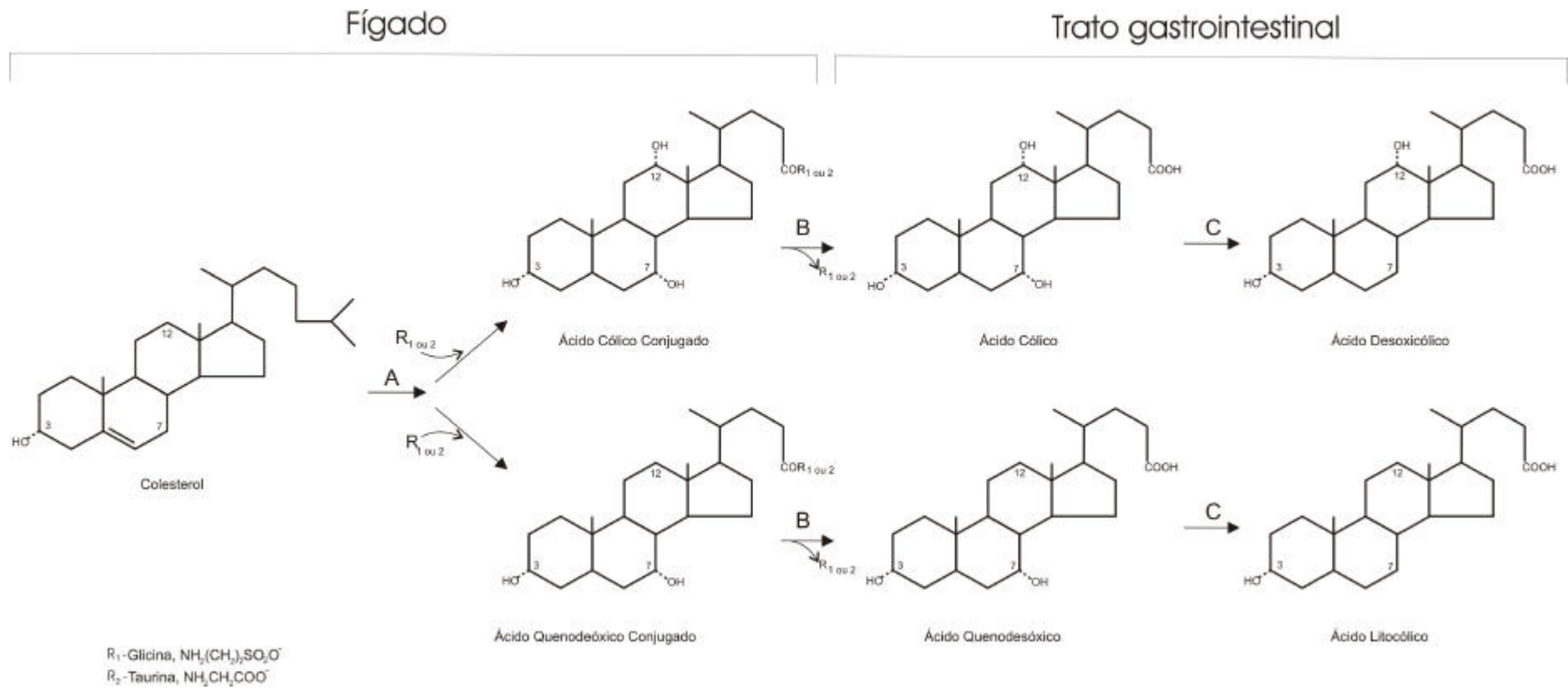
A enzima HMG-CoA redutase catalisa uma das etapas de formação da molécula de colesterol, no entanto a concentração de colesterol celular poderá inibir ou estimular essa via metabólica (GRUNDY, 1983). Por outro lado, os principais produtos do catabolismo de colesterol são os ácidos biliares, reação catalisada pela enzima hepática 7α -hidroxilase, que favorecem a absorção de lipídios no trato gastrointestinal. Os ácidos cólico e quenodesoxicólico são os principais ácidos biliares primários. Estes são conjugados com a taurina e glicina, secretados na vesícula biliar e, posteriormente, liberados no duodeno. A maior parte dos ácidos biliares primários é reabsorvida na porção íleo terminal e a menor, no intestino grosso, retornando pela veia porta para o fígado, onde são secretados novamente na vesícula biliar, completando, deste modo, a circulação enterohepática (QUINTÃO, 1990; MURRAY et al., 1994).

Os ácidos biliares que não foram reabsorvidos são desconjugados pela enzima bacteriana BSH (*bile salt hydrolase*; E.C.3.5.1.24) e, posteriormente, dehidroxilados por meio da enzima bacteriana 7α -dehidroxilase, que convertem os ácidos biliares primários nos ácidos biliares secundários, o ácido desoxicólico a partir do cólico e o litocólico a partir do quenodeoxicólico. Sabe-se que cerca de 98-99% dos ácidos biliares secretados no intestino são reabsorvidos pela circulação enterohepática. Entretanto, o ácido litocólico, devido à sua insolubilidade, não é reabsorvido significativamente, levando, assim, ao aumento na excreção desses ácidos (BORRIELLO, 1986; MURRAY et al., 1994). O colesterol não absorvido passa para o cólon, onde é transformado pela microbiota intestinal em óxidos de colesterol (coprostanol, coprostanona, entre outros), que são excretados nas fezes. O colesterol hepático pode ser ainda excretado nas lipoproteínas do plasma, na urina, nas glândulas mamárias e na superfície das membranas celulares (MURRAY et al., 1994). Na Figura 2 está a biossíntese de ácidos biliares.



Adaptação: MURRAY et al. (1994) e VLAHCEVIC et al. (1999). QDO: ácido quenodesoxicólico.

Figura 1 – Resumo das principais vias metabólicas do colesterol em seres humanos.



Adaptação: GANONG (1997) e MURRAY et al. (1994).

Figura 2 – Metabolismo dos principais ácidos biliares verificados em humanos: A = 7 α -hidroxilase; B = BSH; e C = 7 α -dehidroxilase.

2.3.1. Transporte de colesterol

Os lipídios são pouco solúveis em solução aquosa, sendo transportados no sistema circulatório ligado a lipoproteínas. Existem quatro grupos de lipoproteínas responsáveis pelo transporte de colesterol: quilomícrons, VLDL (lipoproteína de muita baixa densidade), LDL e HDL-C. Os quilomícrons são formados no intestino e sua principal função é o transporte dos triacilgliceróis e do colesterol exógeno do intestino para os sítios de metabolização e estocagem (fígado, músculos e tecido adiposo). As VLDL-C transportam os triglicerídios endógenos e o colesterol para os tecidos periféricos, mas durante o percurso são hidrolisadas pela lipase lipoprotéica, formando partículas intermediárias denominadas IDL-C (lipoproteína de densidade intermediária) (remanescentes de VLDL-C) e, posteriormente, resultando em LDL-C, que são as principais moléculas transportadoras de colesterol para as células extra-hepáticas. As HDL-C transportam o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, processo denominado “transporte reverso de colesterol”. A concentração dessas lipoproteínas está relacionada com os níveis séricos de colesterol (QUINTÃO, 1992; MURRAY et al., 1994; SHILS, 1994).

A captação de LDL pelas células é um processo altamente regulado. O aumento do conteúdo celular de colesterol livre desencadeia três efeitos regulatórios: i) supressão da síntese endógena de colesterol, pela inibição da enzima HMG-CoA redutase e também pela supressão da transcrição do gene para esta enzima, além de sua acelerada degradação; ii) ativação da enzima acil-colesterol aciltransferase (ACAT), promovendo o armazenamento do excesso de colesterol na forma de gotículas de ésteres de colesterol; iii) regulação da síntese do próprio receptor de LDL, pela redução do conteúdo de mRNA para o receptor, assegurando que o colesterol não seja captado em excesso pela célula quando a colesterolemia está elevada. Entretanto, quando a concentração de colesterol intracelular diminui, a regulação faz-se no sentido contrário, ocorrendo maior produção dos receptores celulares (MATHEWS e VAN HOLDE, 1990). Nas células, a síntese de colesterol é controlada pela taxa na qual o colesterol é

captado a partir da corrente sangüínea. A homeostase é mantida por um mecanismo que coordena a ingestão dietética, a síntese endógena e sua utilização pelas células (LENINGHER, 2000).

Geralmente, a quantidade aceitável de colesterol total deve estar abaixo de 200 mg/dL, a concentração de LDL-C deve estar abaixo de 130 mg/dL e a de HDL-C acima de 40 mg/dL (SANTOS, 2001). Embora variáveis ambientais e genéticas influenciem o nível de colesterol sérico, existe grande correlação entre ingestão dietética de gordura saturada e concentração de colesterol sangüíneo em diferentes populações (ROSSOUW, 1990). Atualmente, a estratégia dietética deve representar a medida inicial no tratamento da hipercolesterolemia, entretanto, quando os objetivos não são atingidos, deve ser considerada a associação com drogas hipolipemiantes.

2.4. Modelos animais utilizados no estudo da colesterolemia

Embora alguns animais de laboratório apresentem semelhanças com o metabolismo humano, existem várias diferenças quando se observam os aspectos fisiológicos e bioquímicos de cada espécie. Por exemplo, diferentemente de humanos, vários modelos animais apresentam perfil de lipoproteína diferenciado quando estão em estado de colesterolemia normal e elevado. Em decorrência disto, os dados do metabolismo de colesterol gerados a partir do uso desses animais devem ser vistos com cautela, servindo de parâmetro para mais estudos que utilizam outros modelos experimentais. A seguir será discutido o metabolismo de colesterol de ratos, camundongos e coelhos.

Ratos e camundongos são as espécies mais amplamente utilizadas em experimentação animal, devido à disponibilidade de linhagens isogênicas, ao baixo custo e à facilidade de manutenção e observação em laboratório (ARRINGTON, 1972). Entretanto, diferentemente do metabolismo humano, os ratos e os camundongos transportam a maior parte do colesterol na fração HDL-C (70%), são bastante resistentes à hipercolesterolemia induzida por dieta rica em colesterol e, ou, gordura (SPADY e CUTHBERT, 1992; SEHAYEK et al., 2000)

e não possuem a enzima plasmática CETP (*cholesteryl ester transfer protein*), responsável pela transferência de colesterol esterificado entre as lipoproteínas (BARTER e LALLY, 1978; TAKAHASHI et al., 2001). Além disto, diferentemente de outros modelos convencionais de laboratório, os ratos não apresentam vesícula biliar (SCHAIQUEVICH et al., 2002). Apesar dessas diferenças, ratos, camundongos e seres humanos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas (HOFKER et al., 1998).

O coelho foi o primeiro modelo animal utilizado no estudo da lipidemia (IGNATOWKI, 1908). Diferentemente dos modelos citados anteriormente, os coelhos são muito suscetíveis à dieta rica em colesterol, fazendo deste animal um bom modelo para estudo da hipercolesterolemia e aterosclerose (KOVANEN et al., 1981). Essa espécie animal apresenta algumas semelhanças com o metabolismo humano, por exemplo, apresenta a mesma composição e conteúdo de apo-B nas lipoproteínas (CHAPMAN, 1980), produção de VLDL-C contendo apoB-100 (GREEVE et al., 1993) e concentração plasmática elevada da enzima CETP (TALL, 1993). A fração LDL-C transporta a maior parte do colesterol plasmático, de forma similar aos humanos, contudo a suplementação de colesterol dietético promove nos coelhos um aumento acentuado da fração VLDL-C (KOVANEN et al., 1981). Ao contrário dos ratos, camundongos e humanos, a enzima lipase hepática apresenta baixa atividade nesses animais, responsável pela hidrólise de fosfolípidios, principalmente das partículas de HDL-C (FANE et al., 1994).

Algumas espécies de coelhos desenvolvem dislipidemias naturalmente, semelhantes às verificadas em humanos. O perfil das lipoproteínas das linhagens WHHL (*Watanabe heritable hyperlipidemic*) e STH (*St. Thomas hospital*) é similar ao dos pacientes que apresentam hiperlipoproteinemia do tipo IIa (hipercolesterolemia) e IIb (hipertrigliceridemia com ou sem hipercolesterolemia), respectivamente (TANZAWA et al., 1980; BEATY et al., 1992). Essas alterações estão relacionadas com o desenvolvimento da aterosclerose nessas espécies, assim como em humanos (UPSTON et al., 2001).

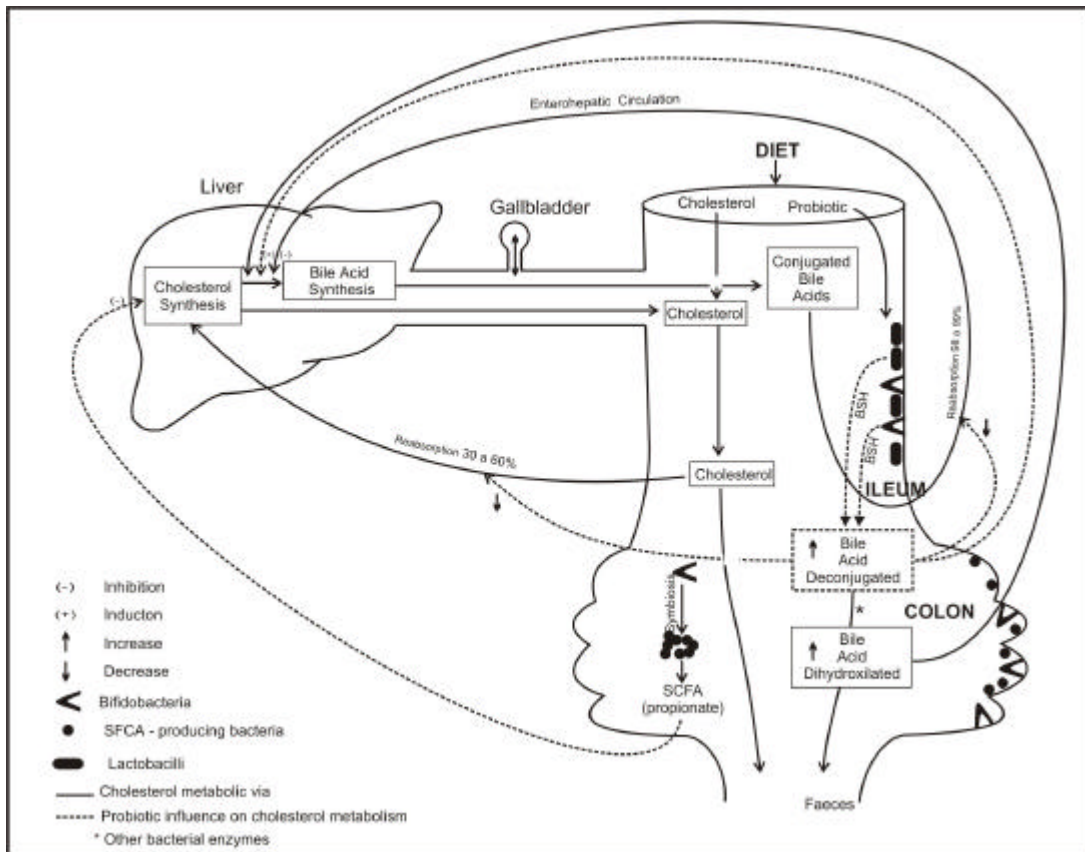
2.5. Ação das bactérias probióticas na redução do colesterol

Quando ingeridos, os leites fermentados carreadores de bactérias probióticas promovem a modulação na população microbiana do trato intestinal (FULLER, 1999). Essas bactérias são encontradas distribuídas em regiões específicas do trato gastrointestinal, de acordo com as condições de cada região, como disponibilidade de nutrientes, pH, potencial redox e fatores químicos e físicos. Portanto, os lactobacilos colonizam o intestino delgado, enquanto as bactérias bífidas colonizam o intestino grosso (HOLZAPFEL et al., 1998). Os efeitos fisiológicos da administração oral de células de bactérias probióticas têm sido estudados, resultando no acúmulo de informações sobre a atuação desses microrganismos no metabolismo de colesterol de diversos modelos: animal e humano. Os possíveis mecanismos de ação das bactérias probióticas sobre o metabolismo do colesterol estão demonstrados na Figura 3.

2.5.1. Desconjugação de ácidos biliares

Alguns pesquisadores interpretaram a diminuição de colesterol pelas bactérias do ácido lático (BAL) como sendo uma assimilação de colesterol por essas bactérias. Em um desses estudos, conduzido por GILLILAND et al. (1985), investigou-se *in vitro* a diminuição do nível de colesterol no sobrenadante da cultura de *Lactobacillus acidophilus*, incubada na presença de sais biliares. Os autores observaram o aumento do nível de colesterol no concentrado celular e interpretaram esse resultado como assimilação de colesterol pelas células de *L. acidophilus*. A mesma interpretação foi feita por RASIC et al. (1992), WALKER e GILLILAND (1993), BUCK e GILLILAND (1994), NOH et al. (1997) e BRASHEARS et al. (1998) quando observaram a redução de colesterol em experimentação semelhante.

Em contrapartida, KLAVER e MEER (1993) estudaram a fermentação *in vitro* de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* na presença e na ausência de ácidos biliares conjugados. Os resultados evidenciaram uma relação entre o



Adaptação: MURRAY et al. (1994) e GANONG (1977) .

Figura 3 – Possíveis mecanismos de ação das bactérias probióticas sobre o metabolismo de colesterol.

colesterol precipitado e a desconjugação de ácidos biliares, pois as variedades de microrganismos presentes na experimentação tinham capacidade de desconjugar os ácidos biliares e causavam não apenas a precipitação desses ácidos, mas também do colesterol. Os autores concluíram que a remoção de colesterol do meio de cultura não foi resultado de assimilação pelas células bacterianas, mas da precipitação deste, em consequência da redução de solubilidade dos ácidos biliares desconjugados sob condições ácidas.

TARANTO et al. (1997) propuseram uma hipótese alternativa ao modelo de assimilação de colesterol pelas BAL. No estudo *in vitro* foi utilizado colesterol marcado ($[^3\text{H}]$ colesterol) no meio de crescimento de *Lactobacillus reuteri*. Os resultados demonstraram que, inicialmente, ocorreu aumento de colesterol no precipitado e depois redução deste no sobrenadante. Porém, quando esse precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato (pH 7,0), o colesterol

removido foi parcialmente redissolvido, concluindo-se que a remoção de colesterol foi devido à insolubilidade do composto em pH ácido. Os autores, ainda neste estudo, avaliaram a parede/membrana celular e o citoplasma das células. O colesterol marcado foi detectado em 20% da parede/membrana celular, mas não foi encontrado no citoplasma. Deste modo, concluiu-se que o modelo de assimilação de colesterol adotado por alguns pesquisadores para explicar a diminuição de colesterol nos ensaios *in vitro* poderia não ser resultado da absorção de colesterol pelas células bacterianas, mas da adsorção na parede/membrana celular. Os autores sugerem que o principal mecanismo para explicar o efeito hipocolesteremiante das bactérias lácticas é a atividade da enzima BSH, que aumentou os ácidos biliares desconjugados (menos solúveis em pH baixo) e, conseqüentemente, levou à precipitação do colesterol. No entanto, como os resultados dos estudos *in vitro* foram desenvolvidos em condições ácidas (pH < 6), e considerando o pH intestinal humano (entre 7 e 7,5), é pouco provável que o aumento de ácidos biliares desconjugados no trato gastrointestinal promova a precipitação do colesterol, diminuindo a sua absorção no intestino delgado (DU TOIT et al., 1988).

A desconjugação de ácidos biliares faz parte do metabolismo de colesterol de mamíferos e é dependente da microbiota intestinal (MURRAY et al., 1994). A enzima BSH catalisa a hidrólise da glicina ou da taurina que estão conjugadas aos ácidos biliares. Após a hidrólise, as propriedades físico-químicas dos ácidos biliares são alteradas, ocorrendo diminuição de sua solubilidade, e em pH baixo são considerados detergentes fracos quando comparados aos seus respectivos conjugados (HOFMANN e BORGSTROM, 1962). Essa enzima está presente em vários gêneros bacterianos, como *Enterococcus* (FRANZ, 2001), *Bifidobacterium* (TANAKA et al., 1999, 2000), *Clostridium* (GOPAL-SRIVASTAVA e HYLEMON, 1988), *Bacteroides* (STERRWAG e HYLEMON, 1976) e *Lactobacillus* (DE SMET et al., 1995; CORZO e GILLILAND, 1999 a, b; TANAKA et al., 1999).

A capacidade da microbiota intestinal em desconjugar ácidos biliares, por meio da enzima BSH, pode influenciar o nível de colesterol mediante dois

mecanismos. No primeiro, os ácidos biliares desconjugados absorvem baixa quantidade de lipídios do trato gastrointestinal, quando comparados aos ácidos conjugados, e ainda poderiam induzir à precipitação do colesterol intestinal, o que pode influenciar o nível de colesterol sanguíneo, visto que há redução na absorção de colesterol no intestino (KLAVER e VANDER MEER, 1993; TARANTO et al., 1997).

O segundo mecanismo envolve a circulação enterohepática. A maior parte dos ácidos biliares é reabsorvida na porção do íleo terminal. Entretanto, se eles forem desconjugados ou dehidroxilados por bactérias intestinais que convertem os ácidos biliares primários (cólico e quenodesoxicólico) em seus respectivos ácidos biliares secundários (desoxicólico e litocólico), esse reaproveitamento será reduzido, levando ao aumento da excreção desses ácidos. Objetivando a ocorrência de reposição dos ácidos biliares eliminados, haverá aumento no catabolismo do colesterol e, conseqüentemente, redução do colesterol endógeno (MURRAY et al., 1994).

Atualmente, existe grande interesse em identificar as estirpes de BAL produtoras da enzima BSH, de forma que se possa avaliar os possíveis efeitos da desconjugação de sais biliares sobre a colesterolemia de animais. Um desses estudos avaliou a atividade da enzima BSH em 273 isolados dos gêneros *Lactobacillus* (144), *Bifidobacterium* (62), *Streptococcus thermophilus* (19), *Lactococcus lactis* (44) e *Leuconostoc mesenteroides* (4). Assim, 94% dos microrganismos do gênero *Bifidobacterium* apresentaram atividade da enzima BSH, mas esse valor aumenta para 98% quando os isolados são de origem fecal. No gênero *Lactobacillus*, apenas 35% dos isolados apresentaram atividade positiva para a enzima, mas as espécies que possuem *habitat* no intestino de mamíferos, como *L. acidophilus*, *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus johnsonii*, tiveram 100% de atividade, enquanto *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus helveticus*, que são espécies muito utilizadas na indústria de laticínios, apresentaram baixa ou nenhuma incidência da enzima. Os demais gêneros não apresentaram resultado positivo (TANAKA et al., 1999). Os autores concluíram que a bifidobactéria geralmente tem maior atividade de BSH do que lactobacilli e

que a atividade desta enzima em BAL está fortemente correlacionada com seu *habitat* natural. Esses resultados indicam que apenas os produtos lácteos fermentados por bactérias probióticas, originadas do trato gastrointestinal humano, teriam efeito na redução de colesterol sérico do homem, levando-se em consideração o mecanismo de desconjugação de ácidos biliares pela presença da enzima BSH.

2.5.2. Produção de ácidos graxos de cadeia curta

Os principais substratos para fermentação das bactérias residentes no intestino grosso são os resíduos da dieta do hospedeiro que não foram hidrolisados por enzimas no intestino delgado, como carboidratos na forma de polissacarídeos e oligossacarídeos, denominados prebióticos. Os principais gêneros bacterianos envolvidos na degradação desses compostos são *Bacteroides* e *Bifidobacterium* (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991; GIBSON e ROBERFROID, 1995; GIBSON, 1998).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são os principais produtos da fermentação de polissacarídeos no cólon, devendo ser ressaltado que o acetato (50 a 60%), o propionato (20 a 25%) e o butirato (15 a 20%) produzidos perfazem cerca de 85 a 95% dos AGCC totais em toda região colônica. Os restantes (5 a 15%) são ácidos graxos de cadeia ramificada derivados da fermentação de proteínas (TOPPING, 1996; GIBSON, 1998). Esses AGCC são rapidamente absorvidos no intestino grosso, sendo o butirato, o propionato e o acetato metabolizados pelo epitélio do cólon, fígado e músculo, respectivamente (NAIDU et al., 1999).

Sabe-se que os AGCC estimulam a proliferação do epitélio do cólon (TOPPING, 1996; DEN HOND et al., 1998), no entanto alguns pesquisadores têm demonstrado também a sua relação com o metabolismo de colesterol. No estudo desenvolvido por VENTER et al. (1990), administraram-se, diariamente, cápsulas contendo 7,5 g de propionato de sódio a mulheres, durante sete semanas. Foram observados redução de LDL-C e aumento de HDL-C

plasmáticos. Entretanto, WOLEVER et al. (1991) avaliaram a administração de infusão retal de acetato marcado (^{13}C) e propionato em homens. Verificou-se que o acetato colônico (acetato marcado) foi incorporado ao colesterol e a triglicérides séricos, comprovando que o acetato produzido no cólon é também precursor da síntese de colesterol. Observou-se ainda que o acetato aumentou o colesterol total e reduziu o percentual de ácidos graxos, enquanto o propionato aumentou a taxa de glicose e reduziu a resposta hipercolesterolemia causada pelo acetato.

Em outro estudo, demonstrou-se que o propionato inibe a incorporação de acetato na formação de colesterol e triacilgliceróis (WOLEVER et al., 1995). Posteriormente, autores estudaram a concentração sanguínea de acetato e propionato e concluíram existir uma relação positiva entre a taxa de acetato: propionato e o colesterol total e LDL-C em homens, porém, essa relação não foi significativa quando o mesmo estudo avaliou mulheres (WOLEVER et al., 1996).

Os estudos citados, que relacionaram a ingestão de sais de AGCC com redução de colesterol, poderiam não resultar no mesmo efeito do propionato produzido pela fermentação bacteriana, uma vez que a ingestão oral de propionato resulta em rápida absorção intestinal, enquanto o propionato bacteriano é absorvido de forma gradual. Além disto, uma quantidade suficiente de propionato deve ser produzida pela microbiota colônica, de maneira a sobrepor o efeito da produção de acetato e, conseqüentemente, obter um efeito hipocolesterolemia. Entre as BAL, apenas o gênero *bifidobacterium* produz quantidade expressiva de AGCC na forma de acetato, que poderia ser um dos precursores da síntese de colesterol. Entretanto, deve-se levar em consideração que as bactérias do cólon convivem em relações simbióticas e que por meio de processo fermentativo é produzida uma grande variedade de compostos que poderiam ter efeito estimulatório no crescimento de bactérias produtoras de propionato, como as do gênero *Bacteroides*, *Propionibacteria* e *Veillonela* (GIBSON, 1999).

Em diversos trabalhos tem sido constatado que as bactérias do gênero *propionibacterium* produzem fatores bifidogênicos (KANEKO et al., 1994;

MORI et al., 1997; TANIGUCHI et al., 1998; BOUGLE et al., 1999; CRESCI et al., 1999). Um desses fatores foi identificado como 2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinona (MORI et al., 1997). Outras bactérias intestinais, como as do gênero *Bacteroides*, *Enterobacter* e *Enterococcus* também têm sido relacionadas com a produção de fatores bifidogênicos (KANEKO et al., 1994). Quando bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Propionibacterium* crescem juntas, observa-se um efeito simbiótico. As bactérias bífidas, utilizando a glicose como substrato, produzem ácido acético e ácido láctico (ALANDER et al., 1999; MADIGAN et al., 2000; LEE et al., 2001), enquanto as bactérias propiônicas podem utilizar esse ácido láctico em seu metabolismo, produzindo propionato e acetato (TANIGUCHI et al., 1998; PIVETEAU, 1999). Deste modo, as bactérias bífidas poderiam favorecer a produção de propionato, que possui efeito antagônico sobre a síntese de colesterol, a partir de outros gêneros bacterianos que colonizam o intestino grosso.

O primeiro trabalho que relacionou a ingestão dessas bactérias e a redução de colesterol em humanos foi realizado em 1974, no qual os autores observaram uma relação entre o consumo elevado de leites.

2.6. Efeito de bactérias probióticas na colesterolemia de animais

O primeiro estudo que relacionou o efeito da microflora sobre os níveis séricos de colesterol em modelos animais foi realizado em 1966. Observou-se que camundongos, ratos e galinhas *germ-free* (livres de microrganismos), quando alimentados com uma dieta rica em colesterol, apresentam aproximadamente duas vezes mais colesterol no sangue e no fígado do que animais convencionais (que contêm microbiota normal) alimentados com a mesma dieta. Observou-se também que os animais convencionais excretam maiores teores de colesterol nas fezes do que os *germ-free* (EYSSSEN, 1973). Desde então, diversos pesquisadores têm estudado os efeitos da microbiota intestinal sobre o metabolismo de colesterol em modelos animais.

Alguns estudos têm relacionado o efeito da mistura de espécies microbianas no abaixamento do colesterol sérico de animais. Em um desses trabalhos estudou-se o efeito da fermentação de células de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Sacharomyces* e *Candida* no farelo de arroz sobre o metabolismo lipídico de ratos hipercolesterolêmicos. Os resultados evidenciaram a redução na atividade da enzima HMG CoA redutase; diminuição de colesterol sérico e hepático, diminuição de VLDL-C, IDL-C e LDL-C e aumento do HDL-C (FUKUSHIMA e NEKANO, 1995). Em outro estudo, MOHAN et al. (1996) avaliaram a suplementação de células liofilizadas de *L. acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *B. bifidum*, *Aspergillus oryzae* e *Torulopsis* à dieta de frangos normocolesterolêmicos. Observou-se redução significativa na colesterolemia dos animais que receberam a mistura de microrganismo, quando comparada à do grupo-controle, o que evidencia diminuição na absorção intestinal de colesterol.

Ratos hipercolesterolêmicos foram alimentados com farelo de arroz fermentado por: 1) *L. acidophilus*; 2) *Streptococcus faecalis*; 3) bacilli, lactobacilli, streptococci, *Clostridium butyricum*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis*. O grupo que recebeu a mistura de microrganismos apresentou redução significativa na concentração de colesterol total, LDL-C, IDL-C, LDL-C, redução no porcentual de ácidos graxos do fígado e aumento na excreção fecal de ácidos biliares e colesterol, quando comparado com os grupos que receberam uma única espécie bacteriana. Com relação à atividade da enzima HMG CoA redutase, ocorreu redução significativa de sua atividade em todos os grupos, porém a redução foi mais acentuada no grupo que recebeu a mistura de microrganismos ou que recebeu a dieta fermentada com *L. acidophilus*. Os autores sugeriram que a ingestão da mistura de microrganismos aumentou a população bacteriana intestinal, que passou a assimilar mais colesterol e ácidos biliares, levando à diminuição na absorção de colesterol intestinal (FUKUSHIMA e NEKANO, 1996).

Os estudos que utilizaram a suplementação de diferentes espécies de microrganismos têm demonstrado a redução de colesterol sanguíneo nos modelos

estudados. Contudo, os mecanismos de ação pelo qual a mistura de espécies bacterianas favorece a redução da colesterolemia não têm sido esclarecidos. Alguns autores, no entanto, sugeriram que substâncias como compactina e AGCC produzidas pelas diferentes espécies microbianas poderiam estar envolvidas na inibição da síntese de colesterol hepático. Em adição, deve-se levar em consideração que a ingestão de uma ou mais espécies de bactérias probióticas poderia modular a população microbiana do trato intestinal e, por meio de simbiose, produzir grande variedade de compostos. Assim, novos estudos poderiam avaliar a influência desses metabólitos microbianos no metabolismo de colesterol.

Um efeito hipocolesterolemizante tem sido inferido às bactérias do iogurte (*S. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*). BEENA e PRASAD (1997) avaliaram, em ratos hipercolesterolêmicos, a administração de iogurte fortificado ou não com proteínas do soro e produzido com as culturas tradicionais adicionadas ou não de *B. bifidum*. Os resultados evidenciaram que a suplementação de iogurte não alterou a colesterolemia dos animais experimentais, no entanto os animais que receberam a suplementação de iogurte com proteínas do soro ou *B. bifidum* apresentaram redução significativa na concentração de colesterol sérico. Em outro estudo, iogurte contendo os microrganismos tradicionais ou leite acidófilo (*L. acidophilus*) foram administrados a ratos hipercolesterolêmicos. Os autores constataram que o leite acidófilo reduziu significativamente o colesterol total e a fração LDL-C, observando-se ainda aumento no percentual de *Lactobacillus* sp. nas fezes dos animais deste grupo (AKALIN et al., 1997). Resultados semelhantes foram obtidos por CANZI et al. (2000), quando suplementaram a ração de coelhos com células liofilizadas de *S. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ou *L. acidophilus*. Esses resultados evidenciam que apenas os produtos lácteos fermentados por bactérias de origem intestinal, como *B. bifidum* e *L. acidophilus*, têm efeito significativo na redução de colesterol sérico. Essas bactérias conseguem transpor barreiras e permanecer por mais tempo nas condições intestinais.

Duas estirpes de *L. johnsonii* e uma de *L. reuteri* que apresentavam atividade positiva da enzima BSH, resistência a sais biliares, tolerância a baixo pH e produção de substâncias antimicrobianas foram selecionadas entre 297 isolados de fezes de suínos. Os microrganismos foram suplementados à dieta de suínos hipercolesterolêmicos durante cinco semanas. Os resultados evidenciaram redução significativa na concentração de colesterol sérico e aumento de bactérias do gênero *Lactobacillus* nas fezes dos animais que receberam os microrganismos probióticos. Os autores atribuíram o efeito hipocolesterolemiantes observado à atividade da enzima BSH presente nos microrganismos administrados (DU TOIT et al., 1998). Apesar de não analisar a composição de ácidos biliares desconjugados e colesterol nas fezes, esse estudo demonstrou a necessidade de utilizar bactérias probióticas com atividade da enzima BSH nas pesquisas que estudam a modulação dos níveis de colesterol sérico pelo consumo de leites fermentados. Resultados semelhantes foram obtidos por DE SMET et al. (1998), quando suplementaram a ração de suínos com *L. reuteri* que apresentavam atividade positiva da enzima BSH.

O efeito de diferentes concentrações de *L. reuteri* foi avaliado em ratos hipercolesterolêmicos. A concentração de 10^4 UFC/mL foi a menor dose que não provocou translocação desses microrganismos para o fígado e o baço dos animais experimentais, e ainda promoveu redução significativa de colesterol total e de triacilgliceróis e aumento na taxa de HDL:LDL-C. Apesar de não ter sido avaliada, os autores sugeriram que a redução do colesterol pelo *L. reuteri* deveu-se à atividade da enzima BSH (TARANTO et al., 1998). Esse estudo revelou que o *L. reuteri*, mesmo em concentração abaixo daquelas recomendadas (10^6 UFC/mL), apresenta efeito hipocolesterolemiantes. Assim, novos estudos em modelo animal seriam importantes para verificar o efeito da concentração de outras espécies probióticas sobre a redução de colesterol.

Posteriormente, TARANTO et al. (2000) administraram a mesma concentração (10^4 UFC/mL) de *L. reuteri* em camundongos normocolesterolêmicos durante sete dias, e, em seguida, induziram a hipercolesterolemia nos animais. Embora houvesse aumento generalizado no colesterol sérico dos grupos

experimentais, os animais que receberam o microrganismo probiótico apresentaram significativamente as menores concentrações de colesterol sérico. Os autores relacionaram o efeito hipocolesterolemizante observado, após a interrupção da administração de células, à colonização do trato gastrointestinal pelo *L. reuteri*.

A suplementação de diferentes estirpes de *L. gasseri* (SBT0270 e SBT0274) à dieta de ratos hipercolesterolêmicos foi estudada por USMAN e HOSONO (2000). Embora as duas estirpes fossem resistentes ao suco gástrico e aos sais biliares e apresentassem a mesma concentração de lactobacilli nas fezes dos animais experimentais, apenas a estirpe SB0270 conseguiu reduzir significativamente a concentração de colesterol e ácidos biliares séricos, aumentar a concentração de sais biliares fecal e inibir os coliformes fecais. Concluiu-se que a estirpe SBT0274 não promoveu alteração no metabolismo de colesterol devido à sua incapacidade de colonizar o trato gastrointestinal. As espécies de microrganismos que conseguem aderir à superfície da mucosa intestinal apresentam melhor desempenho na inibição de patógenos e redução da colesterolemia do que aqueles que não possuem essa capacidade (DONNET-HUGHES et al., 1999; HASHIMOTO et al., 1999).

Os estudos que investigam a relação entre as BAL e a colesterolemia, em sua grande maioria, têm utilizado animais hipercolesterolêmicos. Entretanto, ZHOU et al. (2000a) avaliaram a suplementação de *L. acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* na dieta de camundongos normocolesterolêmicos. Os resultados demonstraram que não houve alteração na lipidemia dos animais experimentais. Em outro estudo, avaliou-se o efeito do leite de soja e do leite de soja fermentado por *Bifidobacterium breve* em hamsters com os níveis de colesterol normais e elevados. Nos animais hipercolesterolêmicos, os leites promoveram redução significativa de colesterol total, VLDL-C e LDL-C no plasma e aumento de ácidos biliares fecais. Todavia, apenas o leite de soja fermentado apresentou efeito hipocolesterolemizante no grupo dos animais normocolesterolêmicos (HAYAKAWA et al., 1998). Os autores concluíram que o efeito hipocolesterolemizante do leite de soja não foi reduzido pela fermentação das bactérias bífidas.

Os produtos fermentados à base de soja, que normalmente contêm isoflavonas e proteínas da soja que são reconhecidas como atuantes na modulação do colesterol sérico, poderiam carrear bactérias probióticas e, conseqüentemente, essas substâncias poderiam atuar de forma sinérgica na modulação da colesterolemia. O estudo desenvolvido por DE BOEVER et al. (2001) ratifica esse sinergismo. A resistência do *L. reuteri* a sais biliares foi avaliada *in vitro*. Observou-se que a adição de germen de soja em pó, aumenta significativamente a sobrevivência dos lactobacilli e diminui os danos sofridos pela membrana plasmática. Os autores sugerem um aumento protetor sobre os lactobacilos probióticos contra as barreiras intestinais, por adição de germen de soja ao leite fermentado. Portanto, novos estudos poderiam investigar essa relação em modelo animal.

Alguns pesquisadores têm utilizado a suplementação de *L. acidophilus* na ração animal com a finalidade de reduzir o colesterol em diversos produtos alimentares. ABDULRAHIM et al. (1996), HADDADIN et al. (1996) e MOHAN et al. (1996) observaram a redução de colesterol na gema de ovo de galinhas; HADDADIN et al. (1999) e LUBBADEH et al. (1999) obtiveram redução de colesterol no leite e na carne de ovelhas, respectivamente; e PIETRAS et al. (2001) verificaram a redução de colesterol na carne de frangos. A redução de colesterol nos alimentos de origem animal pode trazer grandes benefícios à saúde do homem, além de ser uma importante estratégia na comercialização de produtos alimentícios, uma vez que os consumidores estão preferindo alimentos com menor concentração de colesterol.

A maioria dos estudos que utilizaram as BAL com o objetivo de reduzir colesterol utiliza parâmetros bioquímicos como triglicerídios, colesterol total, HDL-C, LDL-C e VLDL-C, peso de fígado, sais biliares fecais, colesterol fecal e hepático, entre outros, para essa verificação. Contudo, as apolipoproteínas séricas e a atividade das enzimas HMG CoA redutase, BSH e 7 α -hidroxilase que poderiam constatar a eficiência das bactérias administradas com o metabolismo de colesterol não são práticas comuns. Na maioria dos estudos, constata-se a redução de colesterol sem que os mecanismos sejam discutidos.

2.7. Efeito de bactérias probióticas na colesterolemia de humanos

MANN e SPOERRY (1974) foram os primeiros a observar o efeito hipocolesteremiante de *Lactobacillus sp.* em modelo humano. Desde então, diversos estudos passaram a relacionar a modulação dos níveis de colesterol sérico pelo consumo de leites fermentados em humanos.

Em um desses estudos, avaliou-se a ingestão de 200 mL/dia de leite fermentado por *S. thermophilus* e *Enterococcus faecium* ou leite acidificado por ácido orgânico (delta glicolactona) em indivíduos hipercolesterolêmicos, durante seis semanas. Após esse período, o grupo suplementado com leite fermentado apresentou redução significativa no colesterol total e LDL-C de 6 e 10%, respectivamente. Segundo os autores, a diminuição deveu-se ao metabolismo bacteriano intestinal aumentado pela ingestão de leite fermentado (AGERBAECK et al., 1995). No entanto, não foi proposto nenhum mecanismo para explicar a redução observada. Em estudo semelhante, porém ampliado para seis meses, RICHELSEN et al. (1996) observaram, após um mês de experimentação, redução significativa no LDL-C no grupo que recebeu leite fermentado. Esta diferença não foi mantida na avaliação final (seis meses), quando tanto o leite acidificado quanto o leite fermentado apresentaram o mesmo nível de redução em relação ao controle. Observa-se nesse estudo que os resultados podem estar sendo influenciados pela falta de controle entre os participantes da pesquisa. Em corroboração, SESSIONS et al. (1997), repetindo a mesma experimentação num período de três meses, não observaram redução significativa no mesmo parâmetro avaliado. Assim, faz-se necessário o estabelecimento de protocolos básicos para evitar conclusões ambíguas.

Embora algumas bactérias do gênero *Enterococcus* sejam utilizadas como probióticas, sua utilização em produtos destinados ao consumo humano deve ser cautelosa, pois algumas espécies são reconhecidas como patógenos oportunistas, causando infecção nosocomial, notadamente nos sistemas renal, circulatório e respiratório, principalmente em pacientes imunodeprimidos (MADIGAN et al., 2000). Adicionalmente, LUND e EDLUND (2001) observaram, *in vitro*, que o *E.*

faecium poderia atuar como possível transmissor dos genes de resistência ao antibiótico vancomicina a outras bactérias intestinais. Deste modo, tem sido recomendada a utilização de bactérias probióticas que não apresentam essa característica indesejável (ISHIBASHI e YAMAZAKI, 2001). Bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as espécies mais utilizadas pela indústria de laticínios e, ainda, são as bactérias mais estudadas em ensaios clínicos, que têm sugerido segurança em sua utilização pelo público adulto e infantil (SAAVEDRA, 2001). Assim, a segurança e a especificação de um agente probiótico para o público em geral, principalmente para os grupos de alto risco, deveriam ser extensamente documentadas antes de sua utilização.

ANDERSON e GILLILAND (1999) conduziram dois estudos clínicos em humanos. No primeiro, os indivíduos ingeriram 200 mL de leite fermentado por uma estirpe humana de *L. acidophilus* ou *L. acidophilus* de origem suína, durante três semanas. Os indivíduos que receberam *L. acidophilus* de origem humana apresentaram redução significativa de colesterol total, quando comparada à do outro grupo. No segundo estudo, duplo cego e cruzado (os grupos experimentais foram submetidos a todos os tratamentos), foram constituídos um grupo-teste, recebendo leite fermentado por *L. acidophilus* de origem humana, e um grupo placebo. Os indivíduos ingeriram o mesmo volume do primeiro estudo, durante dez semanas, com duas semanas de intervalo entre o cruzamento dos grupos. Observou-se redução significativa de colesterol total entre os indivíduos do grupo-teste no primeiro período da experimentação, contudo, após cruzamento, não houve mudança na colesterolemia dos indivíduos. Esses resultados evidenciam a dificuldade de trabalhar com a espécie humana. Assim, os próximos estudos devem estabelecer protocolos que determinem o período mínimo de tempo que não seja afetado pelas diferenças individuais dos participantes dos estudos.

Em outro estudo aleatório, duplo cego, controlado (placebo) e cruzado, foram utilizados 30 homens hipercolesterolêmicos que ingeriram 125 mL de iogurte tradicional (três vezes ao dia), contendo *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (grupo-controle) ou iogurte adicionado de *L. acidophilus*, 2,5% de

frutooligosacarídeos (FOS) e 0,5% de óleo vegetal (grupo-teste), durante sete semanas. Observou-se redução significativa no colesterol total e na fração LDL-C e redução na taxa de LDL:HDL-C nos animais do grupo-teste. Segundo os autores, o efeito hipocolesterolemizante deveu-se à presença de *L. acidophilus*, FOS e ácidos graxos insaturados da dieta (SCHAAFSMA et al., 1998).

Tem-se verificado uma associação entre o uso de bactérias probióticas, a redução de colesterol e a pressão arterial. O efeito do probiótico sobre o risco de doenças cardiovasculares em indivíduos obesos e com sobrepeso foi investigado por AGERHOLM-LARSEN (2000). Setenta homens e mulheres foram divididos em cinco grupos: 1) leite fermentado por *S. thermophilus* e *L. acidophilus*; 2) leite fermentado por *S. thermophilus* e *L. rhamnosus*; 3) leite fermentado por *S. thermophilus* e *E. faecium*; 4) leite acidificado por ácido orgânico; e 5) placebo. Os indivíduos consumiram um volume de 450 mL ou duas pílulas diariamente durante oito semanas. Não foi verificado efeito significativo entre os tratamentos, mas quando as variações de peso foram ajustadas, ocorreram redução na concentração de LDL-C e aumento de fibrinogênio no grupo 3 e redução da pressão sanguínea nos grupos 1 e 2. Os autores concluíram que o aumento de fibrinogênio poderia ser resultado da imunoestimulação de uma das espécies contidas no grupo 3.

KAWASE et al. (2000) estudaram a suplementação de leite fermentado fortificado com concentrado protéico de soro (WPC) à dieta de 20 homens hipercolesterolêmicos. Os participantes ingeriram, duas vezes ao dia, 200 mL de leite fermentado por *S. thermophilus* e *L. casei* contendo WPC ou leite acidificado (ácido láctico). Após oito semanas de avaliação, foram constatados aumento significativo de HDL-C, diminuição de triglicerídios e do índice aterogênico $\{(\text{colesterol total} - \text{HDL-colesterol})/\text{HDL-colesterol}\}$ e redução da pressão arterial no grupo que recebeu leite fermentado. Os autores sugerem um efeito estimulatório do WPC sobre os microrganismos para explicar os resultados encontrados, contudo não foram explicados os mecanismos de ação sobre a modulação da pressão arterial e lipídemia. Essas observações evidenciam a necessidade de estudos que investiguem os mecanismos das bactérias probióticas no controle da pressão arterial.

Alguns estudos que avaliaram a influência das bactérias probióticas em diferentes tipos de colesterolemia apresentaram resultados contraditórios. No estudo realizado por ASHAR e PRAJAPATI (2000), avaliou-se o efeito hipocolesteremiante de leite acidófilo (*L. acidophilus*) em homens que possuíam diferentes concentrações de colesterol: i) <200; ii) 200-220; iii) 220-250; e iv) >250 mg/dL. Os autores observaram redução significativa de colesterol total nos grupos ii e iii; redução de LDC-C nos grupos ii, iii e iv; e redução na taxa de LDL/HDL-C e CT/HDL-C no grupo ii. Constatou-se, ainda, aumento de triglicéridios e VLDL-C no grupo G-1. Concluiu-se que o melhor resultado foi verificado no grupo de indivíduos que apresentavam discreta hipercolesterolemia (200-220 mg/dL). Posteriormente, SCHAARMANN et al. (2001) encontraram aumento significativo na fração HDL-C e redução no colesterol total na fração LDL-C e em triglicéridios, quando administrou-se leite fermentado contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* a mulheres que apresentavam concentrações normais (<250 mg/dL) e elevadas (>250 mg/dL) de colesterol sérico. No entanto, JAHREIS et al. (2002) não encontraram alteração no colesterol de homens e mulheres que apresentavam discreta hipercolesterolemia (208 mg/dL) e consumiam 50 g de lingüiça (probiótica) contendo células de *Lactobacillus paracasei* durante cinco semanas. Resultados semelhantes foram obtidos por DE ROOS et al. (1999) e SPANHAAK et al. (1998), quando administraram leite fermentado contendo *L. acidophilus* e *L. casei biovariedade Shirota*, respectivamente, às pessoas, de ambos os sexos, que apresentavam concentrações variadas de colesterol sérico. Estes resultados indicam a dificuldade de trabalhar com a espécie humana, pois as diferenças individuais constituem um complicador de difícil controle. Em adição, os estudos conduzidos em humanos têm apresentado grande variabilidade nos resultados.

2.8. Considerações finais

Diante do exposto, observa-se redução no colesterol sérico na maioria dos estudos conduzidos em animais e, parcialmente, naqueles conduzidos em

humanos, o que evidencia o uso potencial de probióticos no controle da colesterolemia. Estes produtos afetam benéficamente o hospedeiro, devido ao metabolismo bacteriano intestinal aumentado pela ingestão de bactérias probióticas. Entretanto, apenas os produtos carreadores de bactérias originadas do trato gastrointestinal humano têm efeito na redução de colesterol sérico do homem e, ainda, necessitam conter microrganismos que sejam reconhecidos como seguros (GRAS) e que consigam aderir à superfície da mucosa intestinal, além da dosagem mínima de 10^6 UFC/mL, para que haja colonização no intestino e não sejam rapidamente eliminados nas fezes.

Portanto, como o principal mecanismo de ação dos probióticos na modulação da colesterolemia está relacionado com a sua capacidade de desconjugação de ácidos biliares, é importante a investigação da presença da enzima BSH nas espécies experimentais. Por outro lado, existe a necessidade de definir as dosagens das diferentes espécies probióticas que exercem efeito hipocolesteremiante em modelos normo e hipercolesterolêmicos e, ainda, de definir o efeito de dose dessas bactérias em outras propriedades funcionais do tubo digestório. Assim, o estímulo do consumo de alimentos funcionais carreadores de bactérias probióticas favorecerá a modulação da microbiota intestinal e, conseqüentemente, a obtenção de efeitos benéficos locais ou sistêmicos. Portanto, os produtos lácteos fermentados que contêm bactérias probióticas, além da sua provável propriedade hipocolesteremiante, poderiam atuar na promoção de saúde e na prevenção de doenças.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa, nos laboratórios de Culturas Láticas e de Análise de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA); de Culturas Láticas, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO); de Cromatografia, do Departamento de Química (DEQ); de Biologia Estrutural, do Departamento de Biologia Geral (DBG); de Nutrição Experimental, do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS); e de Nutrição Experimental, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) da Universidade Federal de Viçosa. As análises de colesterol foram feitas pelo Laboratório de Análises Clínicas Santa Rita, em Viçosa-MG.

3.1. Origem e manutenção das culturas de *Lactobacillus* spp.

As culturas de *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* CH5, *L. casei* spp., origem humana foram obtidas no banco de culturas do Laboratório de Culturas Láticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Viçosa. As culturas foram mantidas sob congelamento a -80°C em LDR 12% (leite desnatado reconstituído a 12% de sólidos não-gordurosos) e 50% de solução de glicerol (20%). Para completa ativação, as culturas foram

descongeladas durante a noite, sob refrigeração, e repicadas três vezes em caldo MRS (DE MAN et al., 1960) esterilizado, tendo sido utilizado 1% de inóculo, incubadas a 37° C por 24 horas e mantidas sob refrigeração a 5° C, até o momento das análises.

3.2. Preparo do concentrado celular

As culturas de *Lactobacillus* spp. foram ativadas em 200 mL de caldo MRS, em frasco erlenmeyer com tampa rosqueada, e então incubadas a 37° C, por 24 horas. Após o crescimento, as culturas foram distribuídas em tubos esterilizados de centrífuga Nalgene de polipropileno (50 mL), tampas rosqueáveis. Seguiu-se a centrifugação a 2750 x g por 15 minutos, 4° C, em centrífuga Beckman GS-6R. Após o descarte do sobrenadante, ressuspendeu-se o concentrado de células de cada cultura em 50 mL de tampão fosfato estéril (pH = 7,2) procedendo-se à nova centrifugação, nas mesmas condições já descritas, e à ressuspensão em 10 mL de leite desnatado reconstituído a 10% (LDR 10%), esterilizado, para ser utilizado no experimento que investigou o efeito de *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* CH5 e *L. casei* spp. na modulação da colesterolemia em ratos alimentados com dieta rica em colesterol e gordura, ou à ressuspensão em 10 mL de tampão fosfato, para ser utilizado na experimentação que estudou o efeito hipocolesteremiante de diferentes doses de *Lactobacillus casei* spp. em ratos e coelhos normo e hipercolesterolêmicos, constituindo, assim, um concentrado de células de aproximadamente 10¹⁰ UFC/mL, que foi plaqueado em ágar MRS em diluições decimais e incubado a 37° C por 48 horas, para confirmação do número de células viáveis de lactobacilos.

3.3. Ajuste da suspensão bacteriana de *L. casei* spp.

O *L. casei* spp. foi selecionado entre os demais lactobacilos para testar o efeito de dose nos experimentos posteriores. Portanto, foi retirada uma alíquota

de 1 mL do concentrado celular de *L. casei* spp. (10^{10} UFC/mL) e diluída em 9 mL ou 99 mL de tampão fosfato esterilizado, para gerar suspensões bacterianas de 10^9 , 10^7 e 10^5 UFC/mL. As suspensões bacterianas foram plaqueadas em ágar MRS para confirmação das doses experimentais e preparadas a cada dois dias, sendo acondicionadas em tubos de ensaio estéreis e estocadas a 5°C , até o momento da administração aos animais. Foram administrados 0,1 mL (em ratos) ou 0,3 mL (em coelhos) das doses contendo 10^9 , 10^7 e 10^5 UFC/mL, resultando nas suspensões bacterianas de 10^8 , 10^6 e 10^4 UFC/mL em ratos e 10^9 , 10^7 e 10^5 UFC/mL em coelhos.

3.4. Avaliação na atividade da enzima BSH em células de *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* CH5, *L. casei* spp.

A atividade da enzima BSH foi avaliada nas culturas descritas sem controle de pH, segundo metodologia descrita por WALKER e GILLILAND (1993). Trinta mililitros de caldo MRS foram suplementados com 0,2% de tioglicolato de sódio (Merck) e taurocolato de sódio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e autoclavado a 121°C , por 15 minutos. As culturas foram homogeneizadas e inoculadas no meio com alíquotas de 1% e incubadas a 37°C . Retirou-se um tubo para análise de pH (Digimed DM 20 - Datamed), para determinação de crescimento das células e determinação de ácido cólico desconjugado pela enzima nos tempos 0, 6 e 12 horas. Preparou-se a diluição 1:10 de cada amostra em tampão fosfato estéril para leitura da concentração celular em espectrofotômetro (Spectronic 20D+), na absorvância de 620 nm. Posteriormente, 20 mL de cada amostra foram ajustados para pH 7,0 com NaOH 1N e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume completado com água destilada. Em seguida, as células foram removidas por centrifugação em $8.000 \times g$ a 1°C , por 20 minutos. O sobrenadante (15 mL) foi ajustado para pH 1 com HCl 10 N e o volume completado para 24 mL com água destilada. Posteriormente, 3 mL da solução foram transferidos para tubos de vidro rosqueados e foram acrescentados 9 mL de acetato de etila. O conteúdo de

cada tubo foi agitado (vortex) e deixado em repouso para separação das fases. Em seguida, 3 mL da fase de acetato de etila (fase superior) foram transferidos para tubos de ensaio e evaporados a 60 °C, sob fluxo contínuo de N₂. Acrescentou-se 1 mL de NaOH 0,1 N a cada tubo, para dissolução do resíduo. Em seguida, 6 mL de H₂SO₄ 16 N foram acrescentados, seguindo-se a adição de 1 mL de furfuraldeído a 1%. Os tubos foram agitados e aquecidos a 65 °C, durante 13 minutos, e resfriados à temperatura ambiente, seguindo-se a adição de 5 mL de ácido acético glacial e agitação. Procedeu-se à leitura em espectrofotômetro (Spectronic 20D+) a 660 nm e comparou-se a uma curva-padrão de ácido cólico desconjugado (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), onde a intensidade de cor produzida pelo ácido cólico desconjugado foi diretamente proporcional à sua concentração na amostra. Os resultados foram expressos em micromoles de ácido cólico por mililitros da solução.

3.5. Ensaio biológico com ratos

3.5.1. Animais

Foram utilizados 104 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*) da linhagem Wistar, com oito semanas de vida. Os animais foram pesados e divididos em grupos de oito de forma que a média de peso inicial entre os grupos fosse o mais homogênea possível (± 150 g).

3.5.2. Dietas

As dietas experimentais foram preparadas de acordo com a dieta-padrão para roedores AIN-93M (Rhoster, São Paulo), segundo REEVES et al. (1993) (Quadro 2). Esta dieta é recomendada para roedores adultos, para manutenção do peso corpóreo. A adição de 0,6% de colesterol cristalino (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) à dieta do grupo dos animais hipercolesterolêmicos seguiu a recomendação de COSTA (1990) para indução da hipercolesterolemia. As

Quadro 2 – Composição das dietas experimentais (g/100 g de mistura)

Ingredientes	Dietas	
	Basal	Hiperlipídica
Caseína	14,00	14,00
Amido dextrinizado	15,50	15,50
Sacarose	10,00	10,00
Óleo soja	4,00	2,00
Fibra (celulose microfina)	5,00	5,00
Mistura de minerais	3,50	3,50
Mistura de vitaminas	1,00	1,00
L-cistina	0,18	0,18
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Amido milho	35,57	36,97
Colesterol cristalino	-	0,60
Banha de suíno	-	11,0

Fonte: adaptado de REEVES et al. (1993).

Basal = AIN-93M.

dietas devidamente rotuladas e acondicionadas em sacos plásticos foram armazenadas sob refrigeração a 5° C.

3.5.3. Efeito de *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* CH5 e *L. casei* spp. na modulação da hipercolesterolemia em ratos

Para determinação do efeito das estirpes de *Lactobacillus* spp. na modulação da hipercolesterolemia em ratos, foram utilizados 40 animais alocados em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada ($24 \pm 1^\circ \text{C}$) com ciclos claro e escuro de 12 horas. O ensaio biológico teve a duração de 14 dias, sendo a água destilada e as dietas experimentais (suplementadas ou não de colesterol e gordura) oferecidas *ad libitum* durante o período da experimentação. Alíquotas de 0,1 mL de LDR, contendo ou não concentrado celular, foram administradas uma vez ao dia, durante toda a fase experimental. A administração foi feita oralmente, com o auxílio de micropipeta digital. Os pesos dos animais foram monitorados semanalmente, bem como a ingestão alimentar, calculando-se assim o ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) que relaciona o ganho de peso com o consumo

alimentar. Ao final dos 14 dias da experimentação, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas, e após sacrificados sob asfixia em gás CO₂, seguida da incisão das cavidades torácica e abdominal para coleta de sangue, por punção cardíaca. O sangue foi coletado com seringas descartáveis de 10 mL. Em seguida, o baço e o fígado foram removidos, sob condições assépticas, lavados em solução salina 0,85% estéril, acondicionados individualmente em sacos plásticos estéreis (saco amostrador Whirl-Pak, Millipore) e pesados. Os animais foram submetidos aos seguintes tratamentos:

Dietas	LDR ¹ (0,1 mL/dia)	LDR ¹ + Probiótico (0,1 mL/dia)
1. Basal	Não	-
2. hiperlipídica	Sim	-
3. hiperlipídica	Sim	<i>L acidophilus</i> CH5
4. hiperlipídica	Sim	<i>L acidophilus</i> NCFM
5. hiperlipídica	Sim	<i>L. casei</i> spp.

¹ LDR = leite desnatado reconstituído.

3.5.4. Efeito hipocolesterolemiantes de diferentes concentrações de *L. casei* spp. em ratos

Os resultados da fase anterior direcionaram para a utilização do *L. casei* spp., que mostrou atividade elevada da enzima BSH e menor valor na colesterolemia dos animais que receberam as culturas probióticas.

Foram utilizados 64 ratos, que foram alocados em gaiolas individuais em ambiente com temperatura controlada ($24 \pm 1^\circ \text{C}$) com ciclos de claro e escuro de 12 horas. O ensaio biológico teve a duração de 28 dias, sendo a dieta hiperlipídica rica em colesterol introduzida no primeiro dia da experimentação no grupo dos animais hipercolesterolêmicos, enquanto o grupo de animais normocolesterolêmicos recebeu a dieta basal (Quadro 2) durante todo o período da experimentação. As dietas experimentais e a água destilada foram oferecidas *ad libitum* durante 28 dias. Após 14 dias de experimentação, alíquotas de 0,1 mL de tampão fosfato, contendo ou não suspensão celular de *L. casei* spp. (isolado

do leite fermentado Yakult e caracterizado via kit API como *L. casei* spp.), foram administradas uma vez aos grupos experimentais. A administração foi feita oralmente, com o auxílio de micropipeta digital. Os pesos dos animais foram monitorados semanalmente, bem como a ingestão alimentar, calculando-se assim o ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA). Após o período de 28 dias de experimentação, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas, e, então, sacrificados sob asfixia em gás CO₂, seguida da incisão das cavidades torácica e abdominal para coleta de sangue, por punção cardíaca, utilizando-se seringas descartáveis de 10 mL. Em seguida, foram retirados o fígado, para análise de colesterol, o baço e os fragmentos do intestino delgado e grosso, para análise microbiológica e histológica. Os animais foram submetidos aos seguintes tratamentos:

Animais normocolesterolêmicos

Dietas	TF ¹ (0,1 mL/dia)	<i>L. casei</i> spp. UFC/0,1mL/dia
1 Basal	Sim	-
2 Basal	Sim	10 ⁴
3 Basal	Sim	10 ⁶
4 Basal	Sim	10 ⁸

¹ Tampão fosfato, pH 7,2.

Animais hipercolesterolêmicos

Dietas	TF ¹ (0,1 mL/dia)	<i>L. casei</i> spp. (UFC/0,1mL/dia)
1 Hiperlipídica	Sim	-
2 Hiperlipídica	Sim	10 ⁴
3 Hiperlipídica	Sim	10 ⁶
4 Hiperlipídica	Sim	10 ⁸

¹ Tampão fosfato, pH 7,2.

3.6. Ensaio biológico com coelhos

3.6.1. Animais

Foram utilizados 48 coelhos machos, albinos da raça Nova Zelândia, com nove semanas de vida. Os animais foram pesados e divididos em grupos de seis, de forma que a média de peso inicial entre os grupos fosse o mais homogênea possível (± 2 kg).

3.6.2. Dietas

As dietas experimentais foram preparadas a partir de uma dieta comercial para coelhos, da marca Coelhil “R” (Socil Guyomarc’h, São Paulo), indicada para coelhos em crescimento (Quadro 3). A ração peletizada foi triturada para facilitar a homogeneização do colesterol no grupo de coelhos hipercolesterolêmicos. A adição de 0,5% de colesterol cristalino (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) à dieta do grupo de animais hipercolesterolêmicos seguiu a recomendação de LIMA (1999) para indução da hipercolesterolemia. Cento e vinte gramas de ração foram pesados diariamente e distribuídos aos animais durante o período experimental.

Quadro 3 - Composição da ração Coelhil “R”*

Ingrediente	g/100 g
Cálcio, máximo	2,5
Fósforo, mínimo	0,4
Extrato etéreo, mínimo	3,0
Matéria fibrosa, máxima	16,0
Matéria mineral, máxima	11,0
Proteína bruta, mínima	17,0
Umidade, máxima	13,0

* Informação do fabricante no rótulo do produto.

3.6.3. Efeito hipocolesteremiante de diferentes concentrações de *L. casei* spp. em coelhos

Os coelhos foram alocados em gaiolas individuais, a temperatura ambiente (± 21 °C). O ensaio biológico teve a duração de 28 dias, sendo a dieta rica em colesterol introduzida no primeiro dia da experimentação no grupo dos animais hipercolesterolêmicos, enquanto o grupo de animais normocolesterolêmicos recebeu dieta-controle durante todo o período da experimentação. O regime alimentar foi água potável *ad libitum* e ração comercial social, fornecendo uma quantidade de 120 g/dia por animal, durante o período experimental. Após 14 dias de experimentação, alíquotas de 0,3 mL de tampão fosfato, contendo ou não suspensão celular de *L. casei* spp., foram administradas uma vez ao dia a todos os grupos, até o final da fase experimental. A administração foi feita oralmente, com o auxílio de seringa descartável de 1 mL. Os pesos dos animais foram monitorados semanalmente, bem como a ingestão alimentar (consumo de ração dos animais entre 14 e 28 dias de experimentação), calculando-se assim o ganho de peso (peso dos animais com 28 dias de experimentação subtraído do peso com 14 dias) e o coeficiente de eficiência alimentar (ganho de peso/ingestão alimentar). Após o período de 28 dias de experimentação, os coelhos foram submetidos a um jejum de 12 horas. O sangue de cada animal foi coletado pelo plexo venoso retroorbital, por meio de capilares. Posteriormente, os coelhos foram anestesiados com injeção intravenosa de tiopental sódico (Thiopentax, Cristalia – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, BRA), por 25 mg/kg de peso, e sacrificados por decaptação. Em seguida, realizou-se a incisão abdominal, onde foram retirados o fígado, para análise de colesterol, o baço e os fragmentos do intestino, para análise microbiológica e histológica. Os animais foram submetidos aos seguintes tratamentos:

Animais normocolesterolêmicos

Dietas ¹	TF ² (0,3 mL/dia)	<i>L. casei</i> spp. (UFC/0,3mL/dia)
1 Comercial	Sim	-
2 Comercial	Sim	10 ⁵
3 Comercial	Sim	10 ⁷
4 Comercial	Sim	10 ⁹

¹ Socil Guyomarch e ² Tampão fosfato, pH 7,2.

Animais hipercolesterolêmicos

Dietas ¹	TF ² (0,3 mL/dia)	<i>L. casei</i> spp. (UFC/0,3mL/dia)	Colesterol (0,5g/100g)
1 Comercial	Sim	-	Sim
2 Comercial	Sim	10 ⁵	Sim
3 Comercial	Sim	10 ⁷	Sim
4 Comercial	Sim	10 ⁹	Sim

¹ Socil Guyomarch; ² Tampão fosfato, pH 7,2.

3.7. Análise do sangue

As amostras de sangue de ratos e coelhos foram centrifugadas a 1.500 x g por 15 minutos, para retirada do soro. Os ácidos biliares foram analisados no Laboratório de Culturas Láticas, enquanto as demais análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas Santa Rita – Viçosa, Minas Gerais.

3.7.1. Colesterol total

O colesterol total foi determinado colorimetricamente, empregando-se Kit enzimático (BioMérieux - França). A determinação do colesterol no soro sangüíneo tem como princípio a transformação do colesterol esterificado em colesterol e ácidos graxos, mediado pela enzima colesterol esterase. O colesterol formado é oxidado pela enzima colesterol oxidase em colesten-4-ona-3, liberando água oxigenada. A água oxigenada formada, juntamente com o fenol e amino 4 antipirina, pela ação da peroxidase, é transformada no cromogênio quinonimina (que absorve em 500 nm) e em água.

3.7.2. HDL-Colesterol

Para a dosagem sorológica do HDL-colesterol, utilizou-se o Kit enzimático (Labtest Diagnóstica, Minas Gerais, Brasil). O método de dosagem baseou-se na precipitação dos quilomícrons e das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e de baixa densidade (LDL) contidos no soro, pela adição do ácido fosfotungstênico em presença do íon magnésio. O sobrenadante obtido por centrifugação contém as lipoproteínas de alta densidade (HDL), e o colesterol presente nesta lipoproteína foi determinado pelo mesmo processo já descrito na dosagem de colesterol total.

3.7.3. Triacilgliceróis

Os triacilgliceróis foram determinados colorimetricamente, empregando-se Kit enzimático (BioMérieux - França). A determinação dos triacilgliceróis no soro sanguíneo tem como princípio a transformação destes em glicerol e ácidos graxos, mediado pela enzima lipase. O glicerol formado é convertido em glicerol-3-fosfato pela enzima glicerolquinase, que é transformado em dihidroxicetona fosfato pela dihidroxicetona fosfato oxidase, liberando água oxigenada. A água oxigenada formada, juntamente com o paraclorofenol e o amino-4-antipirina, pela ação da peroxidase, é transformada no cromogênio quinonimina (que absorve em 505 nm) e em água.

3.7.4. LDL-Colesterol + VLDL-Colesterol

O colesterol das frações LDL + VLDL-C foi calculado pela diferença entre os valores de colesterol total e os da HDL-C.

3.7.5. Ácidos biliares séricos

Para a dosagem sorológica dos ácidos biliares utilizou-se o Kit nº 450-A da Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Os ácidos biliares (3 α -

hidroxybile acid) são primeiramente convertidos em óxidos (3-oxo bile acids) pela enzima 3 α -HSD (3 α -hydroxysteroid dehydrogenase). Durante essa reação oxidativa, o NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) é reduzido a NADH. O NADH formado é oxidado a NAD, ocorrendo ao mesmo tempo redução do NBT (*nitro blue tetrazolium salt*) para formazan, reação catalizada pela enzima diaforase. O composto formazan apresenta absorvância máxima a 530 nm.

3.8. Avaliação da translocação de microrganismos

Para avaliação da translocação das diferentes concentrações *L. casei* spp. foi coletado o baço dos animais experimentais que receberam a dieta basal (oito ratos ou seis coelhos por tratamento). O baço foi selecionado entre os demais órgãos, porque apresentou o maior número de microrganismos translocados no estudo conduzido por MACHADO (2001). De cada animal foi retirado, sob condições assépticas, o baço, que foi lavado em solução salina 0,85% estéril, acondicionado individualmente em sacos plásticos estéreis (sacos amostradores Whirl-Pak), pesado e mantido sob refrigeração. Posteriormente, ele foi congelado em nitrogênio líquido e acondicionado a -80° C (Bio-Freezer - Forma Scientific) para posterior análise. Para contagem de microrganismos, cada baço foi macerado dentro da própria embalagem e submetido à diluição de 1/10, com solução tampão fosfato (MACHADO, 2001). Seguiu-se o plaqueamento em profundidade (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), em ágar MRS e incubação a 37° C por 48 horas, sob anaerobiose (BUG BOX, *anaerobic workstation*, United Kingdom). A contagem, obtida em UFC/g, foi multiplicada pelo peso do baço de cada animal, resultando, assim, no número total de microrganismos translocados no órgão (UFC/órgão). Após a contagem, algumas colônias foram aleatoriamente selecionadas e submetidas à coloração de Gram, ao teste da catalase e ao perfil de fermentação de açúcares, para avaliação dos microrganismos recuperados.

3.8.1. Caracterização dos isolados translocados por perfil de fermentação de carboidratos

O perfil de fermentação de açúcares dos isolados foi realizado pela fermentação de carboidratos em kit API CH 50 (BioMerieux - França). Os resultados foram analisados de acordo com SNEATH et al. (1986).

3.8.2. Preparo do inóculo das colônias selecionadas

A metodologia utilizada no preparo das amostras foi indicada por TESHIMA (2002). As culturas puras de cada colônia isolada foram ativadas três vezes em caldo MRS (DE MAN et al., 1960), sendo a última ativação feita em volumes de 20 mL. Após o crescimento, cada cultura foi distribuída em tubos de centrífuga de polipropileno, com tampas rosqueáveis (50 mL), marca Nalgene, previamente esterilizadas. Seguiu-se a centrifugação a 2.750 x g por 15 minutos, 4°C, em centrífuga Beckman GS-6R. Após o descarte do sobrenadante, ressuspendeu-se o concentrado de células de cada cultura em 5 mL de tampão fosfato (pH = 7,2) estéril, para lavagem das células. Procedeu-se à nova centrifugação, nas mesmas condições já descritas. O sobrenadante foi descartado e o concentrado foi ressuspenso em 2 mL do mesmo tampão, e utilizado como inóculo.

3.8.3. Ajuste do inóculo das colônias selecionadas

A padronização do inóculo foi feita ao adicionar de 230 a 650 µl do inóculo inicial dos isolados em 5 mL de água destilada, até obter-se uma densidade ótica de $0,70 \pm 0,2$ em espectrofotômetro (Spectronic 20D+), a 550 nm. O dobro da quantidade do volume do inóculo, ajustado para cada colônia, foi adicionado em 10 mL de meio CHL (meio MRS sem adição de extrato de carne e glicose, adicionado de púrpura de bromocresol, adquirido com o Kit API).

3.8.4. Inoculação e incubação

Empregou-se o Kit API CH50 (BioMérieux - França) para verificar a utilização de 49 substratos. As bandejas de API foram ordenadas com cinco subunidades, cada uma composta de dez cúpulas numeradas, contendo 49 substratos distintos. A suspensão bacteriana em meio CHL foi distribuída nas 50 cúpulas da bandeja, com o auxílio de uma micropipeta (120 µl) e, posteriormente, cada cúpula foi recoberta com óleo mineral, para evitar evaporação da solução.

As bandejas foram incubadas a 37°C em anaerobiose (BUG BOX, *anaerobic workstation*, United Kingdom), e nos tempos 6, 24 e 48 horas procedeu-se à leitura para cada isolado. A mudança de cor provocada pela reação de redução do púrpura de bromocresol do meio foi anotada para cada carboidrato, atribuindo-se pontuações de 1 a 5, de acordo com a intensidade obtida nos respectivos tempos, conforme a indicação do fabricante.

3.9. Avaliação da microbiota intestinal

Para avaliação da microbiota intestinal foram retiradas partes do íleo terminal dos coelhos (4 cm antes do ceco) e do cólon distal (antes do ânus) de ratos e coelhos, com as extremidades devidamente atadas. Os órgãos foram lavados com solução salina estéril e acondicionados em sacos plásticos estéreis. Após a retirada dos órgãos, eles foram mantidos em jarras de anaerobiose (GasPak System, BBL Becton Dickinson Microbiology System, Cockeysville, MD), utilizando um gerador de atmosfera com teor reduzido de oxigênio e aumentado de gás carbônico (Anaerobac, Probac, São Paulo), sob refrigeração. O conteúdo ileal e colônico dos coelhos foi retirado, e 1 g foi adicionado em 9 mL de água peptonada reduzida estéril (peptona, 1 g; NaCl, 8 g; tween 80, 1 g; cisteína, 0,5 g; glicerol, 10 g; e água destilada, 1.000 mL), enquanto o conteúdo colônico dos ratos foi retirado e 0,1 g foi adicionado em 9,9 mL de água peptonada reduzida estéril, mencionada anteriormente. A amostra diluída foi

congelada imediatamente em nitrogênio líquido e acondicionada a -80°C (Bio-Freezer-Forma Scientific), para posterior análise microbiológica. Foram realizadas contagens dos seguintes grupos bacterianos no conteúdo íleal e colônico, nos respectivos meios de cultura: *Escherichia coli*: Ágar MacConkey Sorbitol (DIFCO 0079-17-7) e *Lactobacillus* spp.: ágar LAMVAB, de acordo com HARTEMINK et al. (1997). *Clostridia* spp.: ágar Sulfite Polymyxin Sulfadiazine Agar (SPS ágar) (DIFCO 0845-17) não foi determinado em ratos devido à quantidade insuficiente de amostra fecal. Para essa avaliação foram utilizados seis animais normocolesterolêmicos em cada tratamento dos modelos estudados.

As amostras foram submetidas a diluições decimais sucessivas, e uma alíquota de 0,1 mL e 1 mL foi plaqueada à superfície e em profundidade, respectivamente, dos meios de cultura. As placas invertidas foram incubadas em anaerobiose (BUG BOX, anaerobic workstation, United Kingdom), por um período de 48 à 72 horas.

3.10. Determinação do pH intestinal

Após a retirada do conteúdo do duodeno, íleo e cólon de coelhos para avaliação microbiológica, o restante do conteúdo foi diluído com água destilada e o pH foi determinado em pH-metro (Digimed DM 20 - Datamed). O pH do conteúdo colônico de ratos não foi avaliado, devido à quantidade reduzida de amostra.

3.11. Avaliação da enzima β -glucuronidase (EC 3.2.1.31)

A solução fecal do cólon de ratos e coelhos descrita no item 3.9 foi utilizada para avaliação da enzima β -glucuronidase nos animais experimentais que receberam a dieta basal. O concentrado celular de *L. casei* spp. (10^{10} UFC/mL) descrito no item 3.3. foi usado também para essa avaliação. As células do concentrado e das amostras fecais foram primeiramente rompidas por

sonicação (Sonicador Vibra-cell - Sonics & Materials Inc - USA), com pulsos de 30 Htz durante 3 minutos (3 x 1 min), em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 500 x g por 15 minutos, sendo o sobrenadante coletado e usado imediatamente para avaliação enzimática (LING et al., 1993).

A metodologia utilizada para determinação enzimática foi indicada por DJOUZI et al. (1997). A reação enzimática constituída de 0,5 ml de solução substrato (5 mmol/L p-nitrofenil- β -D-glucuronide, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), juntamente com 1 mL do sobrenadante da solução colônica ou do concentrado celular, foi conduzida a 37 °C em anaerobiose (BUG BOX, *anaerobic workstation*, United Kingdom), por um período de 30 minutos. Após esse período, a reação foi interrompida com adição de 8 mL de carbonato de sódio (0,25 mol/L). A atividade da enzima foi determinada pela concentração de p-nitrofenol liberado a partir da solução substrato pela enzima β -glucuronidase, presente na solução fecal. Posteriormente, procedeu-se leitura em espectrofotômetro (Spectronic 20D+) a 400 nm e comparou-se à uma curva-padrão de p-nitrofenol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (Apêndice 30). A atividade enzimática foi expressa em microlitros do produto hidrolizado por minuto, por grama de amostra colônica. Para essa avaliação foram utilizados seis animais normocolesterolêmicos em cada tratamento dos modelos estudados.

3.12. Análise histológica do intestino delgado de ratos e coelhos normocolesterolêmicos: comprimento de vilosidades intestinais

Para avaliação histológica do intestino delgado de animais-controle e tratados com concentrações crescentes de *L. casei* spp., foram retirados fragmentos de aproximadamente 1 cm do íleo terminal de 20 ratos e 20 coelhos normocolesterolêmicos distribuídos nos grupos já apresentados nos itens 3.5.4. e 3.6.3. Os fragmentos de íleo foram fixados em solução aquosa de formol a 10%, durante 24 horas. Em seguida, realizou-se o processamento deste material para inclusão em parafina e subsequente microtomia, obtendo-se secções semi-seriadas com 5 μ m de espessura e intervalo de 40 μ m entre as secções. Para cada

animal foram feitas duas lâminas (preparações histológicas), uma corada com hematoxilina-eosina (HE) e outra com tricrômico de Mallory, pois o Tricrômico, em princípio, oferece duas vantagens em relação ao HE: a coloração citoplasmática das células caliciformes e o melhor contraste das camadas que formam a parede intestinal. Contudo, ambos os tipos de preparação histológica (HE e Mallory) foram utilizadas para medição do comprimento das vilosidades, visto que o padrão de coloração não influencia o resultado desta análise em específico. Assim, foram realizadas, por animal, medidas do comprimento de 34 vilosidades seccionadas longitudinalmente (Figura 4), utilizando-se para este fim o microscópio óptico Olympus BX50 acoplado ao software Image Pro® Plus para Windows, da empresa Média Cybernetics, sendo os valores expressos em micrometros (μm). As fotomicrografias foram obtidas no mesmo equipamento, a partir de campos microscópicos previamente utilizados para a medição das vilosidades.

3.13. Análise de colesterol hepático

Os fígados foram retirados, lavados em solução salina 0,85%, acondicionados individualmente em sacos plásticos estéreis (saco amostrador Whirl-Pak), pesados e mantidos sob refrigeração. Posteriormente, foram congelados em nitrogênio líquido e acondicionados a -80°C (Bio-Freezer - Forma Scientific), para extração de esteróide.

3.13.1. Extração de colesterol

A análise de colesterol foi feita seguindo modificações na metodologia proposta por NAEEMI et al. (1995). As amostras foram descongeladas durante a noite, sob refrigeração, e maceradas em cadinho de porcelana. Em seguida, uma amostra de aproximadamente 1 g ($\pm 0,01$) de fígado foi transferida para tubos de ensaio com tampa rosqueada, contendo 5 mL de solução metanólica saturada de KOH (200 g KOH em 1.000 mL de metanol), sendo a mistura aquecida em

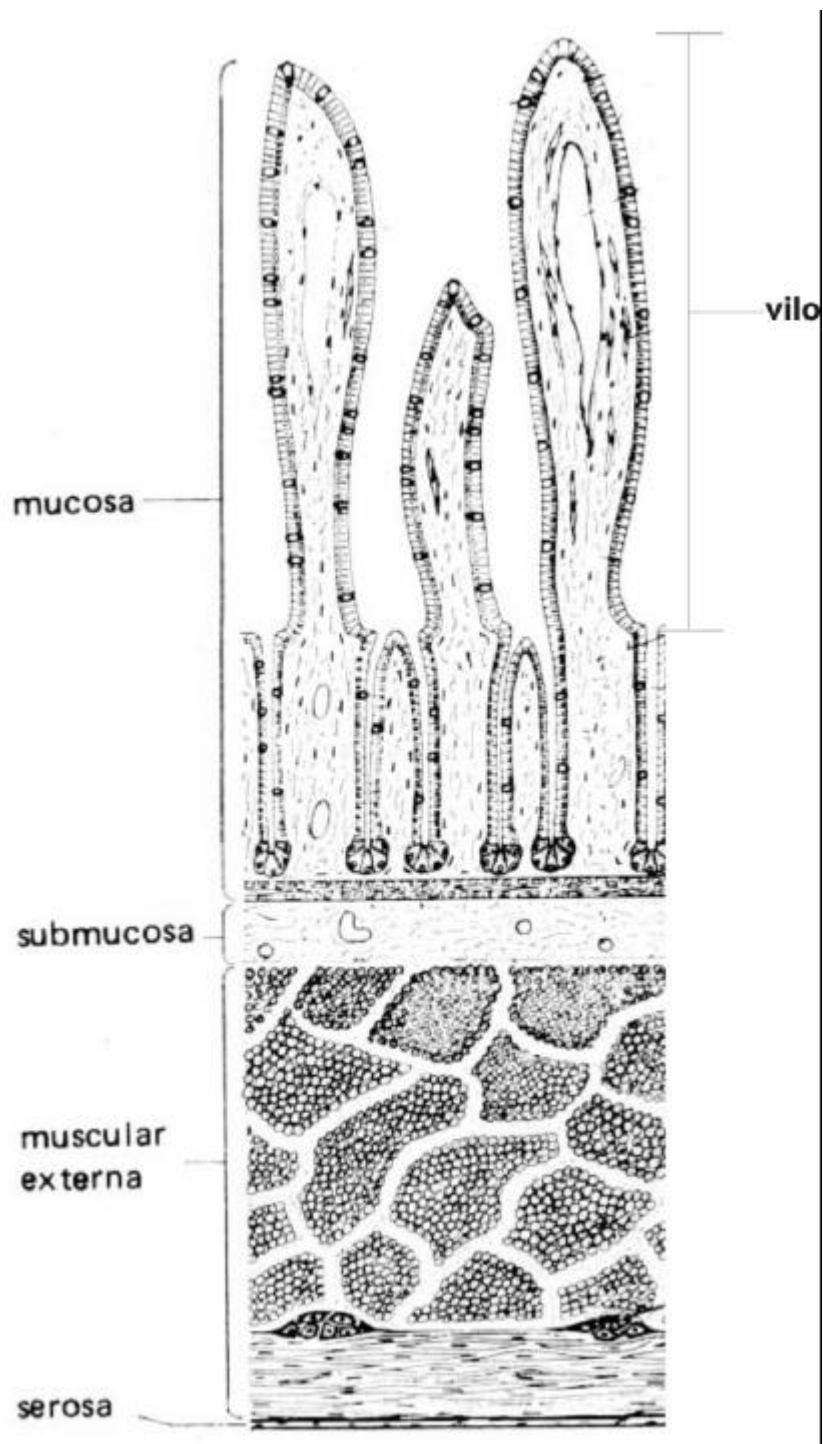


Figura 4 – Representação esquemática das camadas que formam a parede do intestino delgado. A camada mucosa emite evaginações para a luz intestinal e entre elas desembocam as glândulas intestinais ou criptas de Lieberkühn. Cada evaginação da mucosa é denominada vilo ou vilosidade. (Fonte: FREEMAN, 1985).

banho-maria à 80° C, por 30 minutos. Após o resfriamento (<50 °C), acrescentaram-se 5 mL de ciclohexano. Em seguida, os tubos foram agitados vigorosamente por meio de agitador magnético durante 1 minuto e centrifugados a 2.000 x g por 2 minutos. A fase superior, contendo ciclohexano, foi coletada para análise cromatográfica (GLC).

3.13.2. Análises cromatográficas

A análise do colesterol hepático foi realizada em cromatógrafo a gás (modelo GC-17A, Shimadzu, Tóquio, Japão), com autoinjeter Shimadzu OC17, através de um módulo de comunicação Shimadzu CBM-101, acoplado a um microcomputador Pentium 100 com o software Class – GC10 versão 1.61. Os compostos foram separados em uma coluna capilar de sílica fundida CP7483 (25 m x 0,25 µm i.d.) (Varian, St. Louis, MO). As condições utilizadas para a separação cromatográfica foram: temperatura da coluna: 275° C; temperatura do injetor: 280° C; temperatura do detector: 290° C; vazão dos gases: nitrogênio (gás de arraste) 0,68 mL/min; pressão da coluna 100 KPa; injeção: 1,0 µL de amostra; e razão do “splitter” 50.

O pico de colesterol foi identificado por comparação com o tempo de retenção de uma solução-padrão do mesmo composto (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), sendo seu tempo de retenção de aproximadamente 6,5 minutos (Figura 5). A quantificação de colesterol das amostras foi feita usando-se uma curva-padrão de diversas concentrações de colesterol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

3.14. Análise das fezes

As fezes dos ratos e coelhos foram coletadas nos três últimos dias da experimentação, sendo acondicionadas em recipientes individuais para cada animal, congeladas em nitrogênio líquido e acondicionadas a -80° C (Bio-Freezer - Forma Scientific), para extração de esteróides.

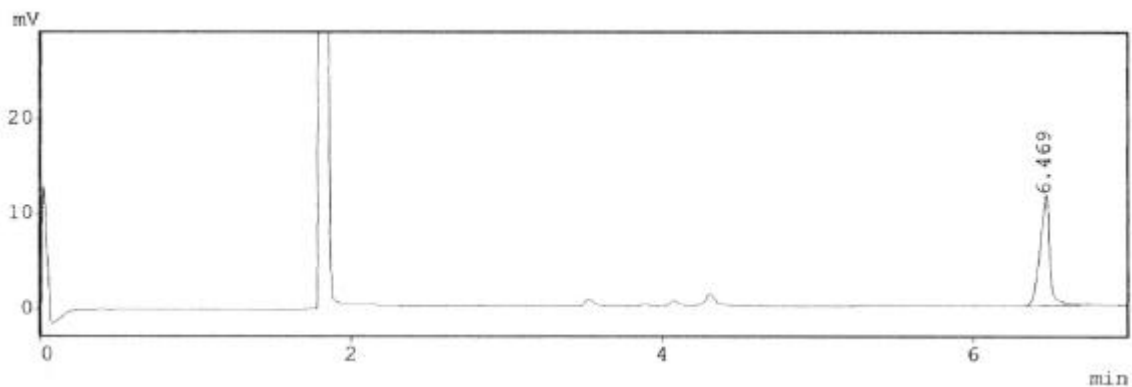


Figura 5 – Cromatograma do padrão de colesterol.

3.14.1. Extração de colesterol e ácidos biliares

A análise de colesterol e ácidos biliares foi feita seguindo-se as modificações na metodologia proposta por USMAN e HOSONO (2000). As amostras foram descongeladas durante a noite, sob refrigeração, e maceradas em cadinho de porcelana. Em seguida, uma amostra de aproximadamente 0,5 g (\pm 0,01) de fezes foi transferida para tubos de ensaio com tampa rosqueada, contendo 5 mL de etanol, sendo a mistura aquecida em banho maria a 80 °C, por 60 minutos. Após duas extrações, o etanol foi evaporado sob fluxo contínuo de nitrogênio a 50 °C. Em seguida, o resíduo foi suspenso em 2 mL de etanol para avaliação dos ácidos biliares, usando o Kit nº 450-A (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), e do colesterol (Kit colesterol liquiform, da Labtest Diagnóstica, MG). A leitura das amostras de ácidos biliares e colesterol foi realizada em espectrofotômetro (530 nm e 500 nm, respectivamente).

3.15. Análise estatística

O modelo estatístico do delineamento em blocos casualizados foi utilizado para a análise estatística dos dados, que foi feita utilizando-se o pacote estatístico SAS (*System for Statistical Analyses*, NC, USA). O teste de Duncan foi utilizado para detectar diferenças nos efeitos de tratamento. O efeito de dose foi estudado por meio do ajuste de um modelo de regressão linear do 1^o grau, quando o efeito

da interação dose/dieta foi não-significativo ($P>0,05$), ou seja, o efeito de dose independe da dieta utilizada. Passou-se, então, a estudar os fatores dose e dieta, independentemente um do outro.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito de *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* CH5 e *L. casei* spp. na modulação da colesterolemia em ratos alimentados com dieta hiperlipídica

A modulação da hipercolesterolemia em ratos alimentados com dieta hiperlipídica contendo colesterol e diferentes microrganismos probióticos foi avaliada indiretamente pela atividade da enzima BSH, pelo índice aterogênico e pela determinação da concentração de ácidos biliares, colesterol total, fração HDL-C e VLDL+LDL-C no plasma. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de escolher a espécie probiótica que apresentasse melhor desempenho sobre a colesterolemia dos animais experimentais e que, posteriormente, seria usada para testar o efeito da dose-resposta dessa cultura probiótica sobre o metabolismo de colesterol em dois modelos animais.

4.1.1. Ensaio *in vitro*

A densidade ótica e a atividade da enzima BSH das culturas de *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* CH5 e *L. casei* spp. crescidas em caldo MRS, contendo 0,2% de taurocolato de sódio, estão apresentadas nos Quadros 4 e 5.

Quadro 4 – Densidade ótica das culturas de lactobacilos crescidas a 37° C nos tempos 0, 6 e 12 horas (média de duas repetições)

	Densidade Ótica (620 nm)		
	0	6	12
<i>L. acidophilus</i> CH5	0,003	0,143	0,193
<i>L. acidophilus</i> NCFM	0,002	0,244	0,293
<i>L. casei</i> spp.	0,003	0,231	0,263

Quadro 5 – Atividade da enzima BSH nas culturas de lactobacilos crescidas a 37° C nos tempos 0, 6 e 12 horas (média de duas repetições)

	Atividade da Enzima BSH (µM/mL de ácido cólico)		
	0	6	12
<i>L. acidophilus</i> CH5	0,00	0,00	3,00
<i>L. acidophilus</i> NCFM	0,00	0,25	1,56
<i>L. casei</i> spp.	0,00	0,37	3,02

As espécies *L. acidophilus* CH5 e *L. casei* spp. apresentaram praticamente o dobro da atividade da enzima BSH de *L. acidophilus* NCFM. Esta informação foi utilizada como um dos parâmetros para definir a espécie a ser utilizada nas experimentações posteriores.

4.1.2. Ensaio biológico

Os concentrados celulares das diferentes culturas de lactobacilos empregados nesta experimentação estão apresentados no Quadro 6.

A média dos concentrados celulares de lactobacilos administrados aos animais do ensaio biológico foi de $1,6 \times 10^{10}$ UFC/mL para *L. casei* spp., de $3,8 \times 10^{10}$ UFC/mL para *L. acidophilus* NCFM e de $7,2 \times 10^9$ UFC/mL para *L. acidophilus* CH5.

O consumo alimentar, o ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais que receberam dieta hiperlipídica adicionada ou não de probióticos e dieta basal estão apresentados no Quadro 7.

Quadro 6 – Concentração (UFC/mL) dos probióticos administrados aos ratos

Período de Administração (Dias)	Espécies Probióticas (UFC/mL)*		
	<i>L. casei</i> spp.	<i>L. acidophilus</i> NCFM	<i>L. acidophilus</i> CH5
1 a 3	1,5 x 10 ¹⁰	2,3 x 10 ¹⁰	1,2 x 10 ¹⁰
4 a 6	1,9 x 10 ¹⁰	3,6 x 10 ¹⁰	1,6 x 10 ¹⁰
7 a 9	2,2 x 10 ¹⁰	5,2 x 10 ¹⁰	2,3 x 10 ⁹
10 a 12	4,2 x 10 ⁹	2,6 x 10 ¹⁰	2,2 x 10 ⁹
13 e 14	2,1 x 10 ¹⁰	6,2 x 10 ¹⁰	1,9 x 10 ⁹
Média	1,6 x 10¹⁰	3,8 x 10¹⁰	7,2 x 10⁹

* média de duas placas.

Quadro 7 – Ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos, após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 8)

Tratamento	Ganho de Peso (g/dia) *, ##	Consumo Alimentar (g/dia)** , ##	(CEA) (%)*, ##
Basal	3,99 ± 0,78a	18,10 ± 1,51	22,05 ± 3,52a
Hiperlipídica	5,07 ± 0,76b	18,48 ± 1,88	27,45 ± 4,28b
<i>L. acidophilus</i> CH5	4,88 ± 0,68	18,10 ± 0,90	26,94 ± 2,86
<i>L. acidophilus</i> NCFM	4,81 ± 0,91	17,69 ± 1,23	27,21 ± 3,89
<i>L. casei</i> spp.	4,71 ± 0,46	18,71 ± 0,40	25,20 ± 2,26

Dieta basal = dieta AIN-93M; hiperlipídica = dieta basal + colesterol + lipídios + LDR; tratamentos = dieta hiperlipídica + LDR adicionado de probiótico; CEA = ganho peso/ingestão alimentar x 100; Basal X Hiperlipídica = * ou letra minúscula; Hiperlipídica X espécies de *Lactobacillus* = # ou letra maiúscula; # ou * Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Duncan (P>0,05); e ## ou ** não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste F (P>0,05).

O ganho de peso e o CEA dos animais que receberam a dieta hiperlipídica foi superiores a dos animais que receberam a dieta basal (P<0,05), provavelmente em consequência de sua maior ingestão calórica, devido à maior densidade energética da dieta hiperlipídica. A administração de probióticos aos animais que receberam a dieta hiperlipídica não alterou o consumo de alimentos, o ganho de peso e o CEA entre os grupos experimentais (P>0,05).

Os índices de peso do baço e do fígado (g/kg de peso corpóreo) dos animais que receberam as dietas experimentais foram determinados e encontram-se no Quadro 8.

Quadro 8 – Índice de peso dos órgãos de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos, após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 8)

Tratamento	Índice de Peso dos Órgãos (g/kg de peso corpóreo)	
	Fígado ^{##, **}	Baço ^{##, **}
Basal	49,75 \pm 4,25	4,52 \pm 1,41
Hiperlipídica	50,84 \pm 4,04	4,26 \pm 2,72
<i>L. acidophilus</i> CH5	49,58 \pm 4,10	6,12 \pm 2,05
<i>L. acidophilus</i> NCFM	52,16 \pm 2,04	6,27 \pm 1,31
<i>L. casei</i> spp.	50,49 \pm 2,98	6,55 \pm 1,07

Dieta basal = dieta AIN-93M; hiperlipídica = dieta basal + colesterol + lipídios + LDR; tratamentos = dieta hiperlipídica + LDR adicionado de probiótico; CEA = ganho peso/ingestão alimentar x 100; Basal X Hiperlipídica = * ou letra minúscula; Hiperlipídica X espécies de *Lactobacillus* = # ou letra maiúscula; e ## ou ** não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste F (P>0,05).

Constatou-se que se não há diferença significativa no índice de peso de fígado e peso de baço entre os animais dos diferentes tratamentos (P>0,05). No entanto, quando foi avaliado o baço dos animais que receberam a dieta hiperlipídica observou-se a tendência de aumento em cerca de 20% nos animais que receberam suplementação de probiótico. Diante desse resultado, decidiu-se por avaliar a translocação bacteriana nesse órgão nos experimentos posteriores, uma vez que o aumento de peso verificado pode evidenciar não só o aumento na atividade do baço, mas também aumento de bactérias intestinais translocadas (ZHOU et al., 2000; MACHADO, 2001). Concluiu-se, nesta experimentação, que qualquer uma das espécies avaliadas poderia ser escolhida para compor o probiótico a ser testado posteriormente, uma vez que as espécies apresentaram o mesmo perfil quanto ao peso de órgão.

4.1.3. Parâmetros sanguíneos

Os parâmetros sanguíneos avaliados em ratos que receberam dieta basal ou dieta hiperlipídica suplementada com diferentes células de *L. acidophilus* CH5, *L. acidophilus* NCFM e *L. casei* spp. estão representados pela determinação de ácidos biliares séricos, colesterol total, triacilgliceróis e frações HDL-C e VLDL+LDL-C, além do índice aterogênico.

No Quadro 9 estão os valores de colesterol total, HDL-C, VLDL+LDL-C, triacilgliceróis e índice aterogênico dos animais experimentais, obtidos após 14 dias de administração de diferentes espécies de lactobacilos.

Quadro 9 – Colesterol total, HDL-C, VLDL+LDL-C e triacilgliceróis séricos (mg/dL) e índice aterogênico (IA) de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos, após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 8)

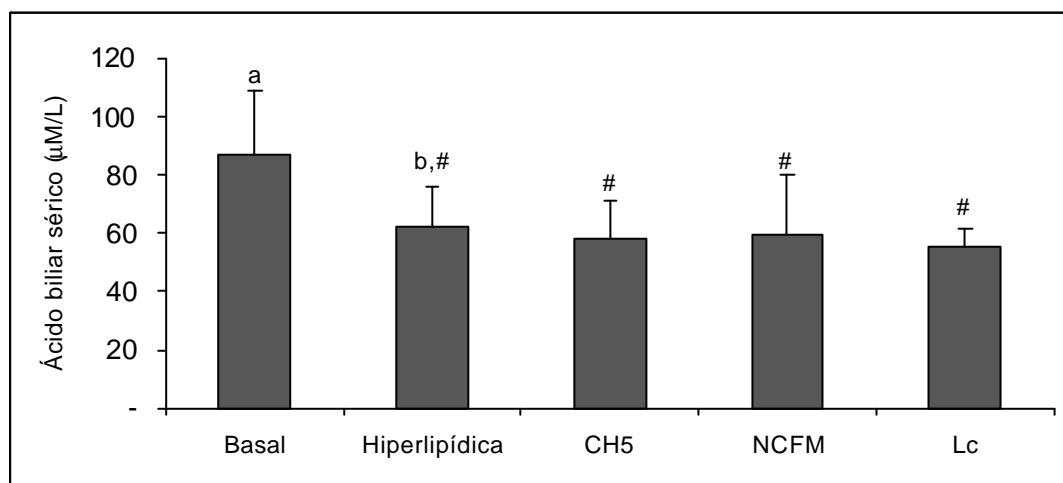
Tratamento (mg/dL)	Colesterol Total ^{###, **}	HDL-C ^{###, **}	¹ VLDL+LDL-C ^{###, **}	Triacilgliceróis ^{###, **}	² IA ^{*, ##}
Basal	97,63 ± 10,04	48,64 ± 6,81	48,99 ± 7,26	140,96 ± 50,59	1,02a
Hiperlipídica	106,190 ± 24,36	44,34 ± 5,39	61,85 ± 20,81	118,96 ± 30,17	1,38b
<i>L. acidophilus</i> CH5	122,20 ± 30,24	41,23 ± 5,00	80,97 ± 27,53	134,73 ± 27,22	1,96
<i>L. acidophilus</i> NCFM	121,88 ± 17,47	44,76 ± 3,44	77,11 ± 14,77	154,55 ± 40,66	1,72
<i>L. casei</i> spp.	109,36 ± 10,54	40,93 ± 6,05	68,44 ± 7,68	132,88 ± 20,44	1,70

Dieta basal = dieta AIN-93M; hiperlipídica = dieta basal + colesterol + lipídios + LDR; tratamentos = dieta hiperlipídica + LDR adicionado de probiótico; CEA = ganho peso/ingestão alimentar x 100; basal X hiperlipídica = * ou letra minúscula; hiperlipídica X espécies de *Lactobacillus* = # ou letra maiúscula; # ou * Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Duncan (P>0,05); e ^{###} ou ^{**} não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste F (P>0,05); ¹VLDL + LDL-C = colesterol total – HDL-C; ²IA = (VLDL + LDL-C)/HDL-C

A dieta rica em gordura e colesterol elevou o índice aterogênico dos animais experimentais (P<0,05), no entanto não induziu a sua hipercolesterolemia, como observado pelas concentrações plasmáticas de colesterol total (P>0,05). Embora ratos sejam resistentes em desenvolver hipercolesterolemia quando submetidos à dieta rica em gordura e colesterol (NGUYEN et al., 1999; XU et al., 2000), os resultados encontrados podem estar sendo influenciados pelo curto tempo de experimentação, uma vez que a indução dietética da hipercolesterolemia em roedores feitas em diferentes tempos tem revelado respostas variadas. Por exemplo, em experimentação similar, porém ampliada para 28 dias, COSTA (1992) induziu a hipercolesterolemia em ratos quando utilizou a mesma dieta. Em contraste, TARANTO et al. (2000) observaram aumento significativo na concentração plasmática de colesterol em camundongos após sete dias de experimentação, quando utilizaram dieta similar.

MACHADO (2001) demonstrou que a suplementação de colesterol e ácido cólico à dieta de ratos foi mais eficaz no acúmulo de colesterol no fígado, aumentando seu peso, do que em sua elevação no sangue. Entretanto, não é o caso deste estudo, uma vez que não foi observado aumento de peso nesse órgão nos animais experimentais ($P>0,05$) e a dieta hiperlipídica administrada aos animais não aumentou a concentração de colesterol sanguíneo. Provavelmente, também não aumentou sua deposição no fígado, o que indica que o tempo experimental utilizado não foi suficiente para induzir a hipercolesterolemia em ratos. Além disso, a administração de probióticos aos animais experimentais não alterou ($P>0,05$) os parâmetros sanguíneos (colesterol total, triacilgliceróis, HDL-C, VLDL+LDL-C e índice aterogênico) entre os grupos experimentais.

Os resultados referentes aos ácidos biliares séricos estão discriminados na Figura 6.



Dieta basal = dieta AIN-93M; hiperlipídica = dieta basal + colesterol + lipídios + LDR; tratamentos = dieta hiperlipídica + LDR adicionado de probiótico; CEA = ganho peso/ingestão alimentar x 100; basal X hiperlipídica = * ou letra minúscula; hiperlipídica X espécies de *Lactobacillus* = # ou letra maiúscula; # ou * barras seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Duncan ($P>0,05$); ## ou ** não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste F ($P>0,05$); CH5 = *L. acidophilus* CH5; NCFM = *L. acidophilus* NCFM; e LcS = *L. casei* spp.

Figura 6 – Ácidos biliares séricos de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 8).

As concentrações de ácidos biliares séricos dos animais submetidos à dieta rica em colesterol foram inferiores às encontradas nos animais que receberam a dieta basal ($P < 0,05$). Essa diferença pode ser resultado da diminuição na reabsorção intestinal dos ácidos biliares pela circulação enterohepática nos animais submetidos à dieta rica em colesterol (XU et al., 2000). No entanto, ao comparar os grupos que receberam dieta hiperlipídica, constatou-se que não houve diferença entre o controle e os animais que receberam probióticos ($P > 0,05$), indicando que os microrganismos administrados não alteraram a reabsorção intestinal desses ácidos.

Em experimentação similar, USMAN e HOSONO (2000), estudando a suplementação de diferentes estirpes de *L. gasseri* à dieta de ratos hipercolesterolêmicos, observaram redução na concentração de ácidos biliares séricos apenas nos animais que apresentaram aumento na excreção fecal desses ácidos. Os autores relacionaram os efeitos observados ao aumento na taxa de desconjugação intestinal dos ácidos biliares promovido pela ingestão da espécie probiótica. Diante desse relato, embora a concentração de ácidos biliares fecais não tenha sido avaliada no presente trabalho, sugere-se que a manutenção na concentração plasmática de ácidos biliares nos animais experimentais pode estar associada, à não-alteração no percentual de ácidos biliares nas fezes dos animais, o que evidencia que a ingestão de diferentes células de lactobacilos não aumentou a taxa de desconjugação intestinal desses ácidos, ainda que as culturas administradas apresentassem atividade da enzima BSH.

O estudo nos parâmetros sanguíneos revelou que as três culturas estudadas tiveram praticamente a mesma atuação na lipidemia dos animais experimentais, como também mostrou a necessidade de estudar as vias metabólicas do colesterol (como armazenamento e excreção desse composto) com a finalidade de investigar alguns possíveis mecanismos de ação das espécies estudadas sobre o metabolismo de colesterol. A maioria dos estudos que utilizaram as bactérias probióticas com o objetivo de reduzir colesterol usou os parâmetros sanguíneos, como triacilgliceróis, colesterol total, HDL, LDL e VLDL-C. A atividade da enzima BSH e a determinação de outros compostos originados das vias

metabólicas do colesterol, como ácidos biliares fecais e colesterol fecal e hepático, que poderiam constatar ou não a eficiência das bactérias administradas com o metabolismo de colesterol, é também uma prática que vem sendo utilizada.

Embora as espécies de lactobacilos administradas não alterassem a colesterolemia dos animais experimentais, selecionou-se *L. casei* spp. entre as espécies testadas para compor as experimentações posteriores (efeito hipocolesteremiante de diferentes concentrações probióticas em dois modelos animais) por ela apresentar elevada atividade da enzima BSH, como também pelo fato de pesquisas terem constatado seus efeitos benéficos em diversos modelos experimentais, evidenciando, inclusive, o seu uso no controle da colesterolemia.

4.2. Caracterização da cultura utilizada como probiótico na avaliação do efeito de dose na modulação da colesterolemia em ratos e coelhos

As colônias isoladas do concentrado de *L. casei* spp. que foi administrado aos animais apresentaram-se gram-positivas e catalase negativas. Os isolados apresentaram-se como bacilos isolados ou em correntes, características do gênero indicadas pelo Manual de Bergey (KANDLER e WEISS, 1993). As características fermentativas obtidas pelas colônias isoladas de *L. casei* spp., comparadas aos resultados encontrados por KANDLER e WEISS (1993), encontram-se no Quadro 10, corroborando a identidade da espécie.

4.3. Número de células viáveis no concentrado *L. casei* spp.

As médias das suspensões bacterianas de *L. casei* spp. administradas aos ratos e utilizadas para produzir as concentrações de 10^4 , 10^6 , 10^8 UFC/mL estão indicadas no Quadro 11.

As médias das suspensões bacterianas de *L. casei* spp. administradas aos coelhos e utilizadas para produzir as concentrações de 10^5 , 10^7 , 10^9 UFC/mL estão indicadas no Quadro 12.

Quadro 10 – Perfil de fermentação de carboidratos por *L. casei* spp., após 48 h de incubação, em Kit API CHL (Biomeriux - França)

Carboidratos	<i>L. casei</i> spp.*	<i>L. casei</i> spp.**
D-Arabinose	-	-
Ribose	+	+
D-Xilose	-	-
Galactose	+	+
D-Glicose	+	+
D-Frutose	+	+
D-Manose	+	+
Ramnose	-	-
Manitol	+	+
Sorbitol	+	+
Amidalina	+	+
Esculina	+	(+)
Salicina	+	+
Celobiose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	+	+
Melibiose	-	+
Sacarose	+	+
Trealose	+	+
Melezitose	+	+
D-Rafinose	-	-
Gluconato	+	+

+ : reação positiva; - : reação negativa; (+) : reação fracamente positiva; **L. casei* spp. (KLANDLER e WEISS (1993)); ***L. casei* spp. (isolado de leite fermentado).

Quadro 11 – Unidades formadoras de colônias¹ (UFC/mL) das suspensões celulares de *L. casei* spp. utilizadas para administração aos ratos durante 14 dias experimentais

Períodos de Administração (dias)	Grupos Experimentais ² (UFC/mL)		
	1	2	3
1 e 2	3,0 x 10 ⁵	2,9 x 10 ⁷	3,8 x 10 ⁹
3 a 5	5,5 x 10 ⁵	7,0 x 10 ⁷	7,0 x 10 ⁹
6 a 8	2,4 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁷	3,5 x 10 ⁹
9 a 11	7,8 x 10 ⁵	7,4 x 10 ⁷	6,7 x 10 ⁹
12 a 14	2,5 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁷	2,2 x 10 ⁹
Média	4,3 x 10⁵	4,5 x 10⁷	4,7 x 10⁹

¹ Média de duas placas e ² grupos 1, 2 e 3 receberam 0,1mL de probiótico.

Quadro 12 – Unidades formadoras de colônias¹ (UFC/mL) das suspensões celulares de *L. casei* spp. utilizadas para administração aos coelhos durante 14 dias experimentais

Períodos de Administração (dias)	Grupos Experimentais ² (UFC/mL)		
	1	2	3
1 e 2	8,0 x 10 ⁵	8,2 x 10 ⁷	6,2 x 10 ⁹
3 e 4	5,7 x 10 ⁵	4,8 x 10 ⁷	6,4 x 10 ⁹
5 e 6	3,8 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁷	2,7 x 10 ⁹
7 e 8	7,3 x 10 ⁵	6,4 x 10 ⁷	5,7 x 10 ⁹
9 e 10	2,6 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁷	2,4 x 10 ⁹
11 e 12	6,5 x 10 ⁵	6,5 x 10 ⁷	7,1 x 10 ⁹
13 e 14	6,2 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁷	6,1 x 10 ⁹
Média	5,7 x 10 ⁵	5,2 x 10 ⁷	5,2 x 10 ⁹

¹ Média de duas placas e ² grupos 1, 2 e 3 receberam 0,3 mL de probiótico.

4.4. Efeito hipocolesterolemiantes de diferentes concentrações de *Lactobacillus casei* spp. em ratos normo e hipercolesterolêmicos

4.4.1 Ganho de peso, consumo e coeficiente de eficiência alimentar

Ganho de peso, consumo e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) de ratos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp. e suas análises estatísticas estão representados nos Quadros 13 e 14, respectivamente .

Verificou-se que o efeito de dose não foi significativo ($P > 0,05$) para todas as características analisadas, o que indica que, independentemente do tipo de dieta, as diferentes concentrações de *L. casei* spp. administradas aos animais não exerceram efeito sobre o ganho de peso, consumo e CEA. No entanto, o ganho de peso e o CEA dos animais que receberam a dieta hiperlipídica foram superiores ($P < 0,05$) aos dos animais que receberam a dieta basal, provavelmente em consequência da maior ingestão calórica desses animais, devido à suplementação de lipídios em sua dieta. Resultados semelhantes foram obtidos por FUKUSHIMA e NEKANO (1996), KAWASE et al. (2000), USMAN e

Quadro 13 – Ganho de peso, consumo e CEA de ratos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 8)

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
Dieta basal				
Ganho de peso (g/dia)	2,50 ± 0,75	2,88 ± 0,90	2,45 ± 0,51	2,54 ± 0,80
Consumo alimentar (g/dia)	18,58 ± 1,11	18,79 ± 1,79	17,24 ± 1,19	17,29 ± 1,62
CEA (%)	13,45 ± 3,61	15,30 ± 3,78	14,19 ± 2,17	14,72 ± 3,66
Dieta hiperlipídica				
Ganho de peso (g/dia)	2,98 ± 0,94	3,10 ± 2,00	3,29 ± 0,80	3,31 ± 0,65
Consumo alimentar (g/dia)	17,20 ± 1,25	17,20 ± 3,30	17,55 ± 2,32	17,44 ± 1,02
CEA (%)	17,32 ± 4,97	18,01 ± 7,44	18,77 ± 3,00	18,99 ± 3,82

Dieta basal = dieta AIN-93M + tampão fosfato; dieta hiperlipídica = dieta AIN-93M + colesterol + gordura + tampão fosfato; tratamentos = dieta AIN-93M adicionada ou não de colesterol e gordura + tampão fosfato adicionado de probiótico; e CEA = ganho de peso/consumo alimentar.

Quadro 14 – Análise estatística das características apresentadas no Quadro 13 (valores de P)

Variáveis Analisadas	Ganho de Peso	Consumo Alimentar	CEA
Interação dose x dieta	0,8139	0,3232	0,8054
Fator dose	0,9143	0,6705	0,8052
Fator dieta	0,0269	0,1749	0,0013

HOSONO (2000) e MACHADO (2001), quando suplementaram a ração de ratos com diferentes espécies de lactobacilos.

4.4.2. Sobrevivência das células testadas e recuperadas no conteúdo colônico dos animais

A recuperação de células de lactobacilos no conteúdo colônico de ratos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., bem como suas análises estatísticas, está apresentada nos Quadros 15 e 16, respectivamente.

Quadro 15 – Recuperação de células de lactobacilos (Log UFC/g) no conteúdo colônico de ratos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6)

Tratamentos	Dieta Basal	Dieta Hiperlipídica
Controle	6,66 \pm 0,59	4,67 \pm 0,61
10 ⁴ UFC/mL	6,82 \pm 0,20	4,58 \pm 0,59
10 ⁶ UFC/mL	6,85 \pm 0,32	5,10 \pm 0,59
10 ⁸ UFC/mL	7,56 \pm 0,32	6,30 \pm 0,50

Dieta basal = dieta AIN-93M + tampão fosfato; dieta hiperlipídica = dieta AIN-93M + colesterol + gordura + tampão fosfato; e tratamentos = dieta AIN-93M adicionada ou não de colesterol e gordura + tampão fosfato adicionado de probiótico.

Quadro 16 – Análise estatística das características analisadas no Quadro 15 (valores de P)

Variáveis Analisadas	Recuperação de Lactobacilos
Interação dose x dieta	0,0619
Fator dose	< 0,0001
Fator dieta	< 0,0001

O efeito de dose foi significativo ($P < 0,01$) para recuperação de *L. casei* spp., mostrando que, independentemente do tipo de dieta, a ingestão de doses crescentes de *L. casei* spp. está relacionada com o aumento na recuperação de bactérias do gênero *Lactobacillus* nas fezes. Resultado semelhante foi obtido por GUERIN-DANAN et al. (1998) e YUKI et al. (1999), quando suplementaram a dieta de lactentes e camundongos, respectivamente, com *L. casei* ssp. Por outro lado, a recuperação de células nos animais que receberam a dieta basal foi superior ($P < 0,01$) à recuperação daqueles que receberam a dieta hiperlipídica. Provavelmente, a presença de ácidos graxos livres na dieta hiperlipídica poderia estar exercendo algum efeito tóxico sobre os lactobacilos, explicando a redução observada nos animais desse grupo (FERREIRA, 1999). Assim, os resultados indicam que o microrganismo probiótico *L. casei* spp., utilizado nesta experimentação, tem a capacidade de transpor barreiras e sobreviver ao ambiente intestinal em ratos, onde poderá exercer os benefícios que lhe são inferidos.

4.4.3. Metabolismo lipídico

Os níveis séricos de colesterol total, HDL-C, VLDL+LDL-C, triacilgliceróis séricos e índice aterogênico dos animais alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp. e suas análises estatísticas estão apresentados nos Quadros 17 e 18, respectivamente.

Quadro 17 – Colesterol total, HDL-C, VLDL+LDL-C, triacilgliceróis séricos (mg/dL) e índice aterogênico de ratos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp. após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 8)

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
Dieta basal				
Colesterol total	87,61 \pm 8,29	87,16 \pm 13,77	92,83 \pm 9,52	92,20 \pm 9,34
HDL-C	39,41 \pm 4,18	42,28 \pm 5,30	39,41 \pm 5,22	40,24 \pm 4,14
VLDL+LDL-C ¹	48,20 \pm 7,79	44,89 \pm 9,56	53,41 \pm 5,96	51,96 \pm 7,39
Triacilgliceróis	114,74 \pm 34,70	134,39 \pm 36,35	98,90 \pm 33,11	108,45 \pm 26,21
Índice aterogênico ²	1,24 \pm 0,27	1,06 \pm 0,17	1,37 \pm 0,19	1,30 \pm 0,19
Dieta hiperlipídica				
Colesterol total	115,30 \pm 22,65	115,18 \pm 30,17	122,21 \pm 23,33	124,65 \pm 37,37
HDL-C	34,99 \pm 3,83	33,61 \pm 8,76	33,45 \pm 2,82	34,76 \pm 5,80
VLDL+LDL-C ¹	80,31 \pm 21,23	81,56 \pm 28,82	88,76 \pm 23,68	89,89 \pm 34,82
Triacilgliceróis	94,10 \pm 31,34	72,36 \pm 28,81	73,28 \pm 21,04	64,08 \pm 22,47
Índice aterogênico ²	2,30 \pm 0,54	2,54 \pm 0,91	2,68 \pm 0,77	2,61 \pm 1,01

Dieta basal = dieta AIN-93M + tampão fosfato; dieta hiperlipídica = dieta AIN-93M + colesterol + gordura + tampão fosfato; tratamentos = dieta AIN-93M adicionada ou não de colesterol e gordura + tampão fosfato adicionado de probiótico; ¹VLDL + LDL-C = colesterol total - HDL-C; ² índice aterogênico = (VLDL + LDL-C)/HDL-C.

Quadro 18 – Análise estatística das características analisadas no Quadro 17 (valores de P)

Variáveis Analisadas	Colesterol Total	HDL-C	VLDL+LDL-C	Triacilgliceróis	Índice Aterogênico
Interação dose x dieta	0,9887	0,7079	0,9786	0,1848	0,7877
Fator dose	0,6684	0,8741	0,5404	0,1174	0,5581
Fator dieta	<0,0001	<0,0001	<0,01	<0,0001	<0,0001

Houve diferença significativa ($P < 0,01$) nos níveis de colesterol total, de triacilgliceróis, de HDL, LDL+VLDL-C e do índice aterogênico dos animais que receberam a dieta hiperlipídica, quando comparados com o grupo que recebeu dieta sem colesterol (grupo basal). Embora ratos sejam resistentes em desenvolver hipercolesterolemia quando submetidos à dieta rica em gordura e colesterol (XU et al., 2000), neste estudo a dieta hiperlipídica alterou todos os parâmetros sanguíneos avaliados, inclusive induzindo a hipercolesterolemia nos animais que receberam esta dieta. O tempo experimental utilizado (28 dias) foi suficiente para induzir a hipercolesterolemia nos animais experimentais, o que corrobora os resultados de COSTA (1992). No entanto, independentemente do tipo de dieta, as diferentes concentrações de *L. casei* spp. não exerceram efeito ($P > 0,05$) sobre a colesterolemia dos animais experimentais. Por outro lado, observa-se que a suplementação de doses crescentes de *L. casei* spp. aos ratos hipercolesterolêmicos tendeu a reduzir em cerca de 23 a 32% (para menor e maior dose, respectivamente) o nível sérico de triacilgliceróis nos animais desse grupo, quando comparados com o controle, o que indica um efeito hipotrigliceridemiante de *L. casei* spp. nos animais hipercolesterolêmicos. Resultados semelhantes foram obtidos por HAYAKAWA et al. (2000), quando suplementaram a dieta de hamsters hipercolesterolêmicos com *L. casei* spp., biovariedade Shirota, durante 14 dias.

A determinação de peso do fígado, de colesterol hepático e de ácidos biliares e colesterol fecais dos animais alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., bem como suas análises estatísticas, está apresentada nos Quadros 19 e 20, respectivamente.

Como o teste F para interação dose dieta foi não-significativo ($P > 0,05$) para peso do fígado, colesterol fecal e ácidos biliares, os fatores dose e dieta foram avaliados isoladamente para essas características. No entanto, a mesma interação foi significativa ($P < 0,01$) para colesterol hepático, mostrando que os fatores dose e dieta não atuam independentemente em nível hepático.

Quadro 19 – Peso do fígado, colesterol hepático, ácidos biliares e colesterol fecais de ratos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 8)

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
Dieta basal				
Peso do fígado (mg/g de peso corporal)	37,42 \pm 3,10	36,89 \pm 3,76	38,24 \pm 3,45	37,73 \pm 2,93
Colesterol hepático (mg/g fígado)	20,84 \pm 6,06	9,48 \pm 4,66	8,93 \pm 7,00	7,89 \pm 3,23
Colesterol fecal (mg/100 g de fezes)	5,13 \pm 3,11	6,47 \pm 3,17	6,72 \pm 2,70	7,59 \pm 3,67
Ácidos biliares fecais (μ M/100 mg/fezes)	407,19 \pm 180,40	424,45 \pm 164,06	521,08 \pm 114,90	577,75 \pm 141,01
Dieta hiperlipídica				
Peso do fígado (mg/g de peso corporal)	47,40 \pm 2,74	50,57 \pm 2,21	50,40 \pm 2,02	45,92 \pm 2,45
Colesterol hepático (mg/g fígado)	373,93 \pm 236,71	30,94 \pm 12,25	35,71 \pm 12,46	24,29 \pm 11,37
Colesterol fecal (mg/100 g de fezes)	406,09 \pm 184,25	524,57 \pm 118,98	537,49 \pm 135,19	618,27 \pm 118,15
Ácidos biliares fecais (μ M/100 mg/fezes)	720,16 \pm 194,80	734,05 \pm 120,56	835,37 \pm 255,86	840,06 \pm 220,26

Dieta basal = dieta AIN-93M + tampão fosfato; dieta hiperlipídica = dieta AIN-93M + colesterol + gordura + tampão fosfato; tratamentos = dieta AIN-93M adicionada ou não de colesterol e gordura + tampão fosfato adicionado de probiótico.

Quadro 20 – Análise estatística das características apresentadas do Quadro 19 (valores de P)

Variáveis Analisadas	Peso do Fígado	Colesterol Hepático	Colesterol Fecal	Ácidos Biliares Fecais
Interação dose x dieta	0,0580	<0,0001	0,543	0,9725
Fator dose	0,0748	<0,0001	0,0467	0,0696
Fator dieta	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

A suplementação de gordura e colesterol à dieta dos animais experimentais aumentou o peso do fígado, a concentração de colesterol hepático e a concentração de colesterol fecal e de ácidos biliares fecais (P<0,01). Estes resultados corroboram dados indicados em pesquisas tendo ratos como modelo animal na indução da hipercolesterolemia (COSTA, 1992; FUKUSHIMA e NEKANO, 1995, 1996; USMAN e HOSONO, 2000). Sabe-se que os ratos, quando submetidos à dieta rica em gordura e colesterol, utilizam vários

mecanismos, visando regular a concentração de colesterol plasmático, como aumento na síntese e excreção de ácidos biliares, redução na síntese e absorção intestinal de colesterol, além de seu armazenamento no fígado, tornando esses animais naturalmente resistentes ao desenvolvimento da hipercolesterolemia por indução dietética (BEYNEN et al., 1986; SPADY e CUTHBERT, 1992; SEHAYEK et al., 1998, 2000; NGUYEN et al., 1999; XU et al., 2000). Assim, na presente pesquisa, os aumentos verificados no peso do fígado e na concentração de colesterol hepático podem ser atribuídos à deposição de colesterol neste órgão. Já o aumento na concentração de colesterol fecal pode ser resultado de redução na absorção intestinal de colesterol, enquanto o aumento de ácidos biliares fecais pode induzir aumento na síntese de ácidos biliares a partir do colesterol. Estes resultados explicam o discreto aumento no colesterol plasmático verificado nos animais que receberam a dieta hiperlipídica, evidenciando, ainda, a limitação de se trabalhar com esse modelo animal no estudo da colesterolemia.

Embora houvesse aumento no peso do fígado, na concentração de colesterol hepático e na concentração de colesterol fecal e ácidos biliares fecais nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, quando comparados com os que receberam a dieta sem colesterol, observa-se que o efeito de dose foi significativo no colesterol hepático ($P < 0,01$) e fecal ($P < 0,05$), evidenciando que a suplementação de *L. casei* spp. à dieta dos animais experimentais reduziu a deposição de colesterol no fígado e aumentou a excreção de colesterol, independentemente do tipo de dieta. A interação dose/dieta foi significativa ($P < 0,01$) para colesterol hepático, no entanto o desdobramento do efeito da interação mostrou que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as diferentes concentrações de *L. casei* spp., independentemente da dieta, evidenciando que apesar da variação nas concentrações bacterianas estas apresentaram respostas semelhantes. Embora 10^6 UFC/mL seja a dose mínima recomendada para que um produto probiótico contendo *Lactobacillus* spp. possa exercer uma função específica no hospedeiro (LEE e SALMINEN, 1995), verificou-se que uma dose menor (10^4 UFC/mL) pode influenciar o metabolismo de colesterol.

Observou-se ainda tendência de aumento na concentração de ácidos biliares nas fezes dos animais que receberam doses crescentes de probiótico, indicando que a ingestão de *L. casei* spp. está diretamente relacionada com o aumento na excreção fecal de ácidos biliares, provavelmente devido ao aumento na taxa de desconjugação intestinal desses ácidos, uma vez que a cultura administrada apresentava atividade da enzima BSH. Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores que usaram a suplementação de lactobacilos em modelos animais (FUKUSHIMA e NEKANO, 1996; DE SMET et al., 1998; HASHIMOTO et al., 1999; USMAN e HOSONO, 2000).

Deve-se considerar ainda que a maior parte dos ácidos biliares secretados no intestino delgado é reabsorvida pela circulação enterohepática, entretanto se estes forem desconjugados ou dehidroxilados por bactérias intestinais esse reaproveitamento será reduzido, levando ao aumento da excreção desses ácidos (MURRAY et al., 1994). Objetivando a ocorrência de reposição dos ácidos biliares eliminados, haverá aumento no catabolismo do colesterol, o que explica a redução do colesterol hepático observada. O aumento de ácidos biliares verificado nas fezes dos animais que receberam probióticos poderia ser resultado da menor absorção desses ácidos pela circulação enterohepática, possivelmente devido ao aumento na desconjugação intestinal desses ácidos. Sugere-se que a elevação na concentração de colesterol fecal deveu-se ao aumento de ácidos biliares desconjugados (não avaliado nesta experimentação). Sabe-se que os ácidos biliares desconjugados absorvem baixa quantidade de lipídios no trato gastrointestinal e que eles poderiam induzir uma precipitação do colesterol intestinal (KLAVER e VANDER MEER, 1993; TARANTO et al., 1997). Adicionalmente, as células de *L. casei* spp. poderiam também adsorver colesterol (GILLILAND et al., 1985; BUCK e GILLILAND, 1994; NOH et al., 1997; BRASHEARS et al., 1998). Todas essas situações podem aumentar a concentração de colesterol e ácidos biliares fecais e influenciar a concentração de colesterol hepático, visto que há redução na absorção de colesterol no intestino e aumento na síntese de ácidos biliares.

Observou-se que a suplementação de diferentes concentrações de *L. casei* spp. não alterou os níveis séricos de colesterol nos animais experimentais, independentemente do tipo de dieta, no entanto alterou significativamente a concentração de colesterol hepático e de colesterol e ácidos biliares fecais. Assim, pode-se sugerir que embora não houvesse alteração na colesterolemia dos animais a suplementação de *L. casei* spp. exerceu alguma influência no metabolismo de colesterol do modelo experimental adotado, sugerindo que não devem ser utilizados apenas os parâmetros sanguíneos para se comprovar a influência dos probióticos sobre o metabolismo de colesterol. Por outro lado, pode-se inferir que a não-alteração na colesterolemia poderia ser devido às concentrações administradas de *L. casei* spp., uma vez que a maioria dos estudos que investigam o efeito hipocolesteremiante dos probióticos tem usado doses elevadas, geralmente acima de 10^8 UFC/mL. No entanto, este não parece ser o caso da presente experimentação. O principal mecanismo de ação dos probióticos está relacionado com a sua capacidade de desconjugação de ácidos biliares e sua conseqüente excreção, o que foi constatado nesta experimentação, juntamente com aumento na excreção de colesterol. Corroborando estes resultados, TARANTO et al. (1998) estudaram o efeito de diferentes concentrações de *L. reuteri* na colesterolemia de ratos hipercolesterolêmicos e observaram que 10^4 UFC/mL foi a menor dose que promoveu redução significativa no colesterol total e triacilgliceróis. Neste estudo, doses de 10^4 a 10^8 UFC/mL resultaram em efeito semelhante nas vias de excreção de colesterol.

Além da concentração, outros parâmetros devem ser utilizados na escolha dos microrganismos probióticos. Por exemplo, as espécies de microrganismos que conseguem aderir à superfície da mucosa intestinal apresentam melhor desempenho funcional do que aqueles que não possuem essa capacidade (DONNET-HUGHES et al., 1999). USMAN e HOSONO (2000), estudando a suplementação de *L. gasseri* (SBT0270 e SBT0274) à dieta de ratos hipercolesterolêmicos, verificaram que embora as duas estirpes fossem resistentes ao suco gástrico e aos sais biliares, e fossem encontradas nas mesmas concentrações nas fezes dos animais, somente a estirpe SB0270, por sua

capacidade de colonizar melhor o trato gastrointestinal, reduziu significativamente a concentração de colesterol e de ácidos biliares séricos, aumentou a excreção fecal de ácidos biliares e inibiu coliformes fecais. TUOMOLA et al. (1999), simulando as condições de adesão bacteriana na mucosa intestinal humana observaram que *L. casei* biovariedade Shirota possui baixo poder de adesão quando comparado com outras espécies probióticas (*Lactobacillus GG*, *L. johnsonii LJI* e *L. rhamnosus*), mas possui outras características que lhe conferem indicação para uso como probiótico.

HAYAKAWA et al. (2000) avaliaram efeito do leite fermentado por *L. casei* biovariedade *Shirota* em hamsters com os níveis de colesterol normais e elevados. Nos animais hipercolesterolêmicos, o leite fermentado reduziu significativamente os níveis de triacilgliceróis e das frações VLDL+LDL-C, além de aumentar os níveis séricos da fração HDL-C e a concentração de colesterol hepático. No entanto, não alterou outros parâmetros do metabolismo lipídico, como índice aterogênico, colesterol total plasmático e colesterol e ácidos biliares fecais. Nos animais normocolesterolêmicos verificou-se apenas a redução de triacilgliceróis. Os autores concluíram que o *L. casei* biovariedade *Shirota* possui efeito hipotrigliceridemiante. Em outro estudo, utilizando-se modelo humano, SPANHAAK et al. (1998) estudaram a suplementação de leite fermentado por *L. casei* biovariedade *Shirota* à dieta de 20 homens, durante quatro semanas. Os participantes ingeriram, três vezes ao dia, 100 mL de leite fermentado contendo 10^8 UFC/mL. Os resultados mostraram que não houve alteração significativa no percentual de colesterol, nem no percentual de ácidos biliares primários e secundários das fezes dos indivíduos do grupo-teste. KAWASE et al. (2000) estudaram a suplementação de leite fermentado fortificado com concentrado protéico de soro (WPC) à dieta de 20 homens hipercolesterolêmicos. Os participantes ingeriram, duas vezes ao dia, 200 mL de leite fermentado por *S. thermophilus* e *L. casei* TMC0409, contendo WPC e 10^8 UFC/mL, ou leite acidificado (ácido láctico). Após oito semanas de avaliação, foram constatados aumento significativo de HDL-C e redução no índice aterogênico e na pressão arterial no grupo que recebeu leite fermentado.

Na presente experimentação, as concentrações utilizadas evidenciaram o efeito de *L. casei* spp. sobre o metabolismo de colesterol de ratos normo e hipercolesterolêmicos, uma vez que houve alteração nas concentrações de triglicilgliceróis, de colesterol hepático e de ácidos biliares e colesterol fecais. No entanto, essa alteração não foi suficiente para reduzir a colesterolemia nesses animais.

4.5. Efeito hipocolesteremiante de diferentes concentrações de *L. casei* spp. em coelhos normo e hipercolesterolêmicos

O efeito da interação dose/dieta foi não-significativo ($P>0,05$) para ganho de peso e consumo alimentar; para níveis séricos de colesterol total, HDL-C, VLDL+LDL-C, triacilgliceróis; para índice aterogênico, peso no fígado; colesterol hepático e colesterol e ácidos biliares fecais, evidenciando que o efeito de dose independe da dieta utilizada em coelhos para estes parâmetros. Passou-se então a estudar os fatores dose e dieta independentemente um do outro, nesse modelo animal.

4.5.1. Ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar

Os resultados referentes ao ganho de peso, consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp. e análises estatísticas estão representados nos Quadros 21 e 22.

Verificou-se que o efeito de dose não foi significativo ($P>0,05$) para todas as características analisadas, o que evidencia que, independentemente do tipo de dieta, as diferentes concentrações de *L. casei* spp. administradas aos animais não exerceram efeito sobre o ganho de peso, o consumo alimentar e o CEA. Resultados semelhantes foram obtidos por CANZI et al. (2000), quando suplementaram a ração de coelhos com *L. acidophilus*.

Quadro 21 – Ganho de peso, consumo alimentar e CEA de coelhos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6)

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
Dieta basal				
Ganho de peso (g/dia)	11,13 \pm 5,26	10,95 \pm 3,34	10,83 \pm 3,08	12,56 \pm 5,28
Consumo alimentar (g/dia)	113,11 \pm 2,46	110,86 \pm 3,66	113,87 \pm 1,48	122,66 \pm 5,36
CEA (%)	9,81 \pm 4,56	9,82 \pm 2,73	9,53 \pm 2,78	11,01 \pm 4,33
Dieta hiperlipídica				
Ganho de peso (g/dia)	10,54 \pm 4,99	14,64 \pm 1,21	18,04 \pm 10,24	11,36 \pm 5,44
Consumo alimentar (g/dia)	113,47 \pm 4,97	111,50 \pm 6,26	118,35 \pm 1,48	108,85 \pm 15,99
CEA (%)	9,45 \pm 4,86	12,90 \pm 0,85	15,21 \pm 8,51	9,65 \pm 4,36

Dieta basal = dieta comercial + tampão fosfato; dieta hiperlipídica = dieta comercial + colesterol + tampão fosfato; tratamentos = dieta comercial adicionada ou não de colesterol + tampão fosfato adicionado de probiótico; CEA = ganho de peso/consumo alimentar.

Quadro 22 – Análise estatística das características analisadas do Quadro 21 (valores de P)

Variáveis Analisadas	Ganho de Peso	Consumo Alimentar	CEA
Interação dose x dieta	0,2272	0,5368	0,3128
Fator dose	0,4517	0,2207	0,5479
Fator dieta	0,1642	0,8327	0,1607

4.5.2. Sobrevivência das células administradas e determinação do pH intestinal dos animais

O pH do duodeno, íleo e cólon, a recuperação de células de lactobacilos no conteúdo do cólon dos animais alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp. e análises estatísticas estão apresentados no Quadro 23.

Não houve recuperação de bactérias do gênero *Lactobacillus* no conteúdo colônico dos animais experimentais, inclusive naqueles que receberam a suplementação de *L. casei* spp. Este resultado, diferentemente do observado em ratos, indica que as bactérias administradas não podem ser recuperadas com o meio de cultura utilizado (LAMVAB e HARTEMINK, 1997) do ambiente

Quadro 23 – Recuperação de células de lactobacilos no cólon e pH do conteúdo duodenal, ileal e colônico de coelhos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6)

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
Dieta basal				
Lactobacilos no íleo*	ND	ND	ND	ND
Lactobacilos no cólon*	ND	ND	ND	ND
pH do duodeno	7,47 \pm 0,50	7,88 \pm 0,63	7,32 \pm 0,92	7,69 \pm 0,31
pH do íleo	8,16 \pm 0,53	8,28 \pm 0,57	8,35 \pm 0,72	8,33 \pm 0,18
pH do cólon	7,18 \pm 0,33	7,43 \pm 0,38	7,31 \pm 0,32	7,07 \pm 0,31
Dieta hiperlipídica				
Lactobacilos no íleo	ND	ND	ND	ND
Lactobacilos no cólon	ND	ND	ND	ND
pH do duodeno	7,38 \pm 0,52	7,79 \pm 0,62	8,09 \pm 0,49	7,79 \pm 0,90
pH do íleo	8,24 \pm 0,51	8,35 \pm 0,51	8,14 \pm 0,53	8,33 \pm 0,44
pH do cólon	6,98 \pm 0,17	7,33 \pm 0,30	6,78 \pm 0,31	6,95 \pm 0,34

Dieta basal = dieta comercial + tampão fosfato; dieta hiperlipídica = dieta comercial + colesterol + tampão fosfato; tratamentos = dieta comercial adicionada ou não de colesterol + tampão fosfato adicionado de probiótico; e ND = não-detectado.

intestinal de coelhos como modelo animal. TANAKA (1995) relatou que lactobacilos não fazem parte da microbiota intestinal de coelhos. Afirmação semelhante foi feita por BROWN (2003) e MEREDITH (2003); KREMPELS (2003) em revisão sobre a microbiota intestinal do coelho, corroborando, assim, os resultados encontrados nesta experimentação. Em contraste com esses relatos, CANZI et al. (2000) suplementaram a ração de coelhos Nova Zelândia com células liofilizadas (10⁸UFC/kg de peso) de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ou *L. acidophilus*, durante 42 dias, e recuperaram células de *Lactobacillus* (10² a 10³ UFC/g de conteúdo cecal) nas fezes dos animais experimentais.

Embora CANZI et al. (2000) tenham recuperado *Lactobacillus* em material fecal de coelhos, nesta experimentação não se constatou a presença dessas bactérias nas fezes dos animais experimentais. Pode ser que o meio de cultura LAMVAB (MRS acidificado para pH \pm 5 adicionado do antibiótico vancomicina) torna o meio colhido do cólon mais sensível à presença do

antibiótico, diminuindo sua capacidade de recuperação e crescimento. Pode-se também ressaltar que, diferentemente de outros modelos animais convencionais, o coelho é considerado um monogástrico herbívoro que possui algumas particularidades no seu processo digestivo, dentre elas a falta de peristaltismo na região cárdia do estômago e a presença de um ceco desenvolvido, onde se realiza a digestão microbiana, que é responsável pela síntese de aminoácidos, digestão de fibras, formação de ácidos graxos e síntese de vitaminas do complexo B. Estes produtos são utilizados por absorção direta ou por reabsorção fecal, o que se denomina coprofagia (ARRINGTON, 1972; MELBY JR. e ALTMAN, 1977a, b; CHEEKE et al., 1986; GIDENNE, 1997; GIDENNE et al., 2002). Além disto, a microbiota dominante no intestino grosso dos coelhos é constituída de bactérias do gênero *Bacteroides*, *Propionibacteria*, *Butyrivibrio*, enquanto *Clostridium* e *E. coli* estão em níveis reduzidos (BROWN, 2003; MEREDITH, 2003). No entanto, mesmo não se tendo êxito na recuperação de *Lactobacillus* spp. do cólon, os micorganismos probióticos que atuam no íleo exerceram, de alguma forma, efeito sobre o metabolismo lipídico.

Neste estudo, observou-se que o pH do cólon e do duodeno apresentou valores próximos da neutralidade, enquanto o íleo se mostrou mais alcalino (>8). Essa constatação é importante no entendimento da microbiota intestinal dos coelhos, uma vez que existe escassez de informações na literatura a respeito de sua ecologia microbiana intestinal.

4.5.3. Metabolismo lipídico

Os níveis séricos de colesterol total, HDL-C, VLDL+LDL-C, triacilgliceróis séricos e índice aterogênico dos animais alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp. e as análises estatísticas estão apresentados nos Quadros 24 e 25, respectivamente.

Os níveis séricos de colesterol total e triacilgliceróis, HDL, LDL+VLDL-C, além do índice aterogênico nos grupos que receberam a dieta hiperlipídica, foram superiores ($P < 0,05$) aos dos grupos que receberam a dieta basal. Tal fato já

Quadro 24 – Colesterol total, HDL-C, VLDL+LDL-C, triacilgliceróis séricos (mg/dL) e índice aterogênico de coelhos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6)

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
Dieta basal				
Colesterol total	98,75 \pm 22,51	114,77 \pm 31,69	94,15 \pm 20,68	93,42 \pm 36,30
VLDL + LDL-C ¹	60,82 \pm 19,37	78,63 \pm 30,61	62,07 \pm 21,07	60,37 \pm 29,13
HDL-C	37,93 \pm 14,06	36,13 \pm 7,30	32,08 \pm 5,81	33,05 \pm 8,43
Triacilgliceróis	123,77 \pm 44,82	146,38 \pm 64,07	147,42 \pm 36,40	115,03 \pm 31,95
Índice aterogênico ²	1,84 \pm 0,81	2,25 \pm 1,15	2,01 \pm 0,95	1,76 \pm 0,56
Dieta hiperlipídica				
Colesterol total	1964,83 \pm 401,26	1638,67 \pm 486,99	1737,17 \pm 252,70	1612,75 \pm 400,08
VLDL + LDL-C ¹	1854,35 \pm 391,72	1534,97 \pm 460,32	1634,67 \pm 248,71	1523,22 \pm 385,10
HDL-C	110,48 \pm 14,86	103,70 \pm 30,85	102,50 \pm 24,40	89,53 \pm 28,65
Triacilgliceróis	99,35 \pm 41,28	92,53 \pm 44,87	89,30 \pm 42,11	60,43 \pm 24,87
Índice aterogênico ²	16,82 \pm 2,95	15,17 \pm 3,02	16,71 \pm 5,00	17,98 \pm 6,49

Dieta basal = dieta comercial + tampão fosfato; dieta hiperlipídica = dieta comercial + colesterol + tampão fosfato; tratamentos = dieta comercial adicionada ou não de colesterol + tampão fosfato adicionado de probiótico; ¹VLDL + LDL-C = colesterol total – HDL-C; e ² índice aterogênico = (VLDL + LDL-C)/HDL-C.

Quadro 25 – Análise estatística das características apresentadas do Quadro 25 (valores de P)

Variáveis Analisadas*	Colesterol Total	HDL-C	VLDL+LDL-C	Triacilgliceróis	Índice Aterogênico
Interação dose x dieta	0,4247	0,7304	0,4188	0,7566	0,6473
Fator dose	0,4457	0,4080	0,4629	0,2559	0,8473
Fator dieta	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0005	<0,0001

era esperado, uma vez que esses animais são bastante sensíveis a esse tipo de dieta e, segundo KOVANEN et al. (1981), LIMA (2001), PERCEGONI (2002), os coelhos são um bom modelo para estudo da hipercolesterolemia e aterosclerose.

Percebe-se que não houve diferença ($P > 0,05$) para os níveis séricos de colesterol total, triacilgliceróis, HDL, LDL+VLDL-C e do índice aterogênico, quando se observa o efeito de dose. No entanto, observa-se que, independentemente da concentração administrada, a suplementação de *L. casei*

spp. a coelhos hipercolesterolêmicos promoveu a tendência de redução em cerca de 18% nos níveis de colesterol total e da fração VLDL+LDL quando comparados com o controle. Ainda nesses animais, o aumento crescente da suplementação probiótica promoveu uma tendência de redução gradativa nos níveis de triacilgliceróis, alcançando 39% no grupo que recebeu a maior dose. A modulação na colesterolemia e trigliceridemia apenas nos animais hipercolesterolêmicos encontra-se em concordância com o relatado por diversos autores (CARROL e KUROWSKA, 1995; HODGSON et al., 1998; HAYAKAWA et al., 1998), que evidenciaram que o efeito hipolipidemiante dos alimentos funcionais é nulo ou insignificante em indivíduos e animais normocolesterolêmicos.

A determinação de peso no fígado, de colesterol hepático e de colesterol e ácidos biliares fecais dos animais alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp. e as análises estatísticas estão apresentados nos Quadros 26 e 27.

Nos animais hipercolesterolêmicos observou-se aumento ($P < 0,01$) no peso do fígado, na concentração de colesterol hepático e na concentração de colesterol fecal. No entanto, não houve alteração na concentração de ácidos biliares fecais ($P > 0,05$). Segundo KOVANEN et al. (1981) e SPADY e DIETSCHY (1983), os coelhos, quando submetidos à suplementação dietética de colesterol, não aumentam a síntese de ácidos biliares. Além disto, não promovem o acentuado armazenamento de colesterol no fígado, nem a excreção de colesterol nas fezes. Nessas espécies, diferentemente de ratos e assim como em humanos, a homeostasia é mantida por meio da regulação na atividade do receptor de LDL (*down regulation*) e do conseqüente aumento na concentração de colesterol plasmático (SPADY e DIETSCHY, 1983; SPADY et al., 1985). Tal fato explica o aumento acentuado na colesterolemia dos animais que receberam a dieta hiperlipídica.

Verificou-se que o efeito de dose foi não-significativo ($P > 0,05$) para as características peso do fígado, concentração de colesterol hepático e concentração de colesterol e ácidos biliares fecais. No entanto, observou-se que

Quadro 26 – Peso do fígado, colesterol hepático, ácidos biliares e colesterol fecais de coelhos alimentados com dieta basal ou hiperlipídica suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., após 14 dias de experimentação (média ± desvio-padrão, n = 6)

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
Dieta basal				
Peso do fígado (mg/g de peso corporal)	30,71 ± 1,74	30,60 ± 3,31	33,32 ± 1,98	35,10 ± 3,97
Colesterol hepático (mg/g fígado)	0,73 ± 0,18	0,68 ± 0,39	0,74 ± 0,18	0,75 ± 0,18
Colesterol fecal (mg/100 g de fezes)	6,84 ± 1,95	6,89 ± 1,64	7,87 ± 1,65	7,97 ± 3,07
Ácidos biliares fecais (µM/100 mg/fezes)	251,74 ± 129,12	257,22 ± 47,89	265,99 ± 25,49	265,13 ± 65,47
Dieta hiperlipídica				
Peso do fígado (mg/g de peso corporal)	40,57 ± 5	41,93 ± 4,85	44,03 ± 9,98	39,26 ± 7,34
Colesterol hepático (mg/g fígado)	3,70 ± 2,41	3,14 ± 1,20	2,79 ± 0,73	1,99 ± 1,39
Colesterol fecal (mg/100 g de fezes)	25,03 ± 5,32	28,76 ± 3,41	30,05 ± 5,99	32,73 ± 5,19
Ácidos biliares fecais (µM/100 mg/fezes)	185,69 ± 115,51	264,41 ± 78,29	285,26 ± 88,10	280,26 ± 112,73

Dieta basal = dieta comercial + tampão fosfato; dieta hiperlipídica = dieta comercial + colesterol + tampão fosfato; e tratamentos = dieta comercial adicionada ou não de colesterol + tampão fosfato adicionado de probiótico.

Quadro 27 – Análise estatística das características apresentadas do Quadro 27 (valores de P)

Variáveis Analisadas	Peso do Fígado	Colesterol Hepático	Colesterol Fecal	Ácidos Biliares Fecais
Interação dose x dieta	0,3627	0,2797	0,2685	0,6143
Fator dose	0,5540	0,3102	0,0676	0,3885
Fator dieta	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,8143

houve tendência de variação nessas características entre os animais que receberam a suplementação de probiótico, onde ocorreu aumento no colesterol fecal, sobretudo naqueles que receberam a dieta hiperlipídica.

O coelho foi o primeiro modelo animal utilizado em estudos da lipidemia (IGNATOWKI, 1908). Atualmente, ele tem sido utilizado no estudo da colesterolemia. No entanto, existem poucos trabalhos que avaliaram o efeito

dos probióticos na redução dos níveis de colesterol sérico nesses animais. Em um desses estudos foi avaliada a suplementação de caseína adicionada ou não de células liofilizadas (10^8 UFC/Kg de peso) de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ou *L. acidophilus* sobre o metabolismo lipídico de coelhos normocolesterolêmicos da raça Nova Zelândia (CANZI et al., 2000). Os animais que receberam a suplementação de caseína apresentaram aumento significativo na colesterolemia, quando comparados com os que receberam a suplementação adicionada de bactérias lácticas. Os resultados evidenciaram, ainda, que não houve alteração significativa na recuperação de *Lactobacillus* no conteúdo cecal nem na concentração da enzima 7- α dehidroxilase (enzima que atua na conversão de ácidos biliares primários em secundários) entre os diferentes grupos. No entanto, os animais que receberam a suplementação de bactérias apresentaram discreto aumento na atividade da enzima e nos níveis de *Lactobacillus*, quando comparados com o controle. Os autores relacionaram o efeito hipocolesterolemizante observado ao aumento na taxa de desconjugação pela microbiota intestinal.

Diante dos resultados obtidos neste estudo, observou-se que a suplementação de diferentes concentrações de *L. casei* spp. não alterou significativamente os parâmetros sangüíneos nem as concentrações de colesterol fecal e hepático e ácidos biliares fecais dos coelhos. Constatou-se, no entanto, tendência de redução nos níveis séricos de triacilgliceróis e de aumento no colesterol fecal dos coelhos que receberam a suplementação probiótica, sobretudo nos hipercolesterolêmicos. Sugere-se, portanto, que a suplementação de *L. casei* spp. exerce alguma influência sobre o metabolismo de colesterol dos coelhos, principalmente nos animais hipercolesterolêmicos. Em adição, alguns trabalhos revelam que as bactérias probióticas, mesmo perdendo a viabilidade celular, conseguem exercer efeitos funcionais no hospedeiro (OUWEHAND e SALMINEN, 1998; SALMINEN et al., 1999).

Nas ciências experimentais o modelo animal adotado pode interferir de modo significativo no resultado de uma pesquisa. Sabe-se que os modelos animais que têm sido utilizados no estudo da colesterolemia embora de grande

utilidade na elucidação de mecanismos de ação, apresentam limitações. Assim, não existe um modelo animal ideal, mas sim os mais adequados, ou seja, aqueles que guardam semelhanças com o metabolismo humano. A utilização de suínos, cobaias, coelhos das linhagens WHHL e STH e alguns animais modificados geneticamente tem sido sugerida para os estudos da colesterolemia. Embora os coelhos sejam apontados como bom modelo no estudo das substâncias hipolipidêmicas, a extrapolação dos resultados para humanos deve ser feita com cautela, uma vez que esses animais não apresentam as bactérias do gênero *Lactobacillus* na sua microbiota nativa.

4.6. Efeito das diferentes concentrações de *L. casei* spp. na supressão de grupos bacterianos do cólon de ratos e coelhos norcolesterolêmicos

4.6.1. Determinação de *E. coli* em ratos

A recuperação de células de *E. coli* no conteúdo colônico dos animais alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp. está apresentada no Quadro 28.

Quadro 28 – Recuperação de células de *E. coli* no conteúdo colônico de ratos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6)

Tratamentos	Log UFC/g de Conteúdo Colônico
Controle	5,16 \pm 0,76
10 ⁴ UFC/mL	4,72 \pm 0,60
10 ⁶ UFC/mL	4,59 \pm 0,74
10 ⁸ UFC/mL	3,85 \pm 0,53
(P<)	0,0470

Dieta-controle = dieta AIN-93M + tampão fosfato; e tratamentos = dieta-controle + tampão fosfato adicionado de probiótico.

Observa-se que o efeito de dose foi significativo (P<0,05) na recuperação de células de *E. coli*, mostrando que o aumento na ingestão de *L. casei* spp. está relacionado com a diminuição no nível desse organismo potencialmente

patogênico. Adicionalmente, em experimentação anterior, verificou-se que o aumento na ingestão de *L. casei* spp. eleva ($P < 0,01$) os níveis de *Lactobacillus* no cólon de ratos. Portanto, a elevação no número de lactobacilos e a concomitante redução no nível de *E. coli* no cólon de ratos alimentados com probiótico indicam uma modulação da microbiota intestinal. Corroborando esses resultados, FULLER (1999) sugeriu que a estimulação de um grupo de organismos pode ser responsável pela inibição do crescimento de outros grupos bacterianos na microbiota intestinal.

O mecanismo de inibição das células de *E. coli* parece ser dependente da diminuição do pH pelo *L. casei* spp. OGAWA et al. (2001) observaram *in vitro* a capacidade de *L. casei* biovariedade *Shirota* inibir o crescimento de *E. coli* O157:H7. Ainda nesse trabalho, os autores verificaram o efeito inibitório de diferentes concentrações de ácido láctico sobre a bactéria *E. coli* O157:H7, sugerindo a sensibilidade desse organismo ao ácido orgânico testado.

Atualmente, verifica-se um aumento generalizado de organismos resistentes a antibióticos no mundo (SORUM e SUNDE, 2001). Assim, a utilização de alimentos funcionais que possuam a capacidade de modular beneficemente a composição da microbiota intestinal, podendo estabelecer uma resistência à colonização de bactérias patogênicas, deveria ser estimulada. O consumo de produtos carreadores de *L. casei* spp. poderia reduzir a colonização dos organismos patogênicos, constituindo, assim, em mais uma alternativa na prevenção das infecções intestinais.

4.6.2. Determinação de *E. coli* e *Clostridium* spp. em coelhos

A recuperação de células de *E. coli* e *Clostridium* spp. no conteúdo colônico dos animais alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp. está apresentada no Quadro 29.

Diferentemente de ratos, observa-se que o efeito de dose de *L. casei* spp. não promoveu alteração significativa ($P > 0,05$) na recuperação de células de *E. coli*, nem na recuperação de *Clostridium* spp., quando se utilizou o coelho como

Quadro 29 – Recuperação de células de *E. coli* e *Clostridium* spp. no conteúdo colônico de coelhos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6)

Tratamentos	Log UFC / g de Conteúdo Colônico	
	<i>E. coli</i>	<i>Clostridium</i> spp.
Controle	3,25 \pm 1,78	1,49 \pm 0,59
10 ⁵ UFC/mL	3,12 \pm 1,70	1,69 \pm 0,61
10 ⁷ UFC/mL	2,79 \pm 1,40	1,55 \pm 0,64
10 ⁹ UFC/mL	3,12 \pm 1,66	1,75 \pm 0,83
(P<)	0,9876	0,8755

Dieta-controle = dieta comercial + tampão fosfato; e tratamentos = dieta-controle + tampão fosfato adicionado de probiótico.

modelo animal, o que provavelmente ocorreu pela redução na viabilidade do *L. casei* spp. no trato gastrointestinal desses animais, conforme discutido anteriormente.

4.7. Efeito sobre enzima β -glucuronidase no conteúdo colônico de ratos e coelhos

A atividade da enzima β -glucuronidase no conteúdo colônico de ratos e coelhos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp. está apresentada nos Quadros 30 e 31, respectivamente.

Quando foram utilizados ratos como modelo animal, observa-se que o efeito de dose foi significativo ($P < 0,01$) na redução na atividade da enzima β -glucuronidase no conteúdo colônico desses animais, mostrando que o aumento na ingestão de *L. casei* spp. está relacionado com a diminuição na atividade dessa enzima. Embora tenha sido verificado o efeito dose resposta de *L. casei* spp. na redução na atividade da enzima β -glucuronidase em ratos não se verifica o mesmo quando se utiliza coelho como modelo ($P > 0,05$). Diversos trabalhos têm relatado a redução enzima β -glucuronidase quando foram utilizadas bactérias do gênero *Lactobacillus* em outros modelos experimentais (GOLDIN e GORBACH, 1977; GOLDIN et al., 1980; GOLDIN e GORBACH, 1984a, 1984b;

Quadro 30 – Atividade da enzima β -glucuronidase no conteúdo colônico de ratos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6)

Tratamentos	$\mu\text{M}/\text{min.g}$ de Conteúdo Colônico
Controle	0,41 \pm 0,01
10 ⁴ UFC/mL	0,40 \pm 0,03
10 ⁶ UFC/mL	0,38 \pm 0,06
10 ⁸ UFC/mL	0,30 \pm 0,11
(P<)	0,0068

Dieta-controle = dieta AIN-93M + tampão fosfato; Tratamentos = dieta-controle + tampão fosfato adicionado de probiótico.

Quadro 31 – Atividade da enzima β -glucuronidase no conteúdo colônico de coelhos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6)

Tratamentos	$\mu\text{M}/\text{min.g}$ de Conteúdo Colônico
Controle	0,18 \pm 0,02
10 ⁵ UFC/mL	0,17 \pm 0,03
10 ⁷ UFC/mL	0,16 \pm 0,02
10 ⁹ UFC/mL	0,17 \pm 0,02
(P<)	0,3866

Dieta-controle = dieta comercial + tampão fosfato; Tratamentos = dieta-controle + tampão fosfato adicionado de probiótico.

GUERIN-DANAN et al., 1998). Assim, a não-alteração na atividade dessa enzima em coelhos se deve, provavelmente, à não-afinidade desse grupo micorbiano com o trato gastrointestinal desse animal.

Nesta experimentação, observou-se que o concentrado celular de *L. casei* spp. não apresentou atividade da enzima β -glucuronidase. RUSSELL e KLAENHAMMER (2001), avaliando a atividade da enzima β -glucuronidase em estirpes de diversas espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (*L. acidophilus* NCFM, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*), constataram atividade dessa enzima apenas em algumas estirpes de *L. gasseri*, sugerindo uma possível

ausência na atividade dessa enzima nos lactobacilos utilizados comercialmente como probióticos.

O intestino grosso humano é a região mais densamente colonizada do trato digestório. Sabe-se que pelo menos 50 gêneros diferentes de bactérias residem no cólon, no entanto o conhecimento desse ecossistema ainda é limitado, bem como suas interações (HOLTZAPFEL et al., 1998). FISHER et al. (1966) conduziram o primeiro estudo que relacionou o efeito da microbiota intestinal sobre a carcinogênese. Por meio de estudos com animais *germ-free*, observou-se que as bactérias intestinais têm papel importante na etiologia do câncer de cólon, visto que nestes animais a incidência desse tipo de câncer induzido quimicamente é muito menor do que em animais convencionais. Posteriormente, em pesquisas empregando modelos animais e humanos foram investigados os efeitos benéficos inferidos pelo consumo de produtos carreadores de bactérias probióticas sobre a carcinogênese do trato gastrointestinal (GOLDIN e GORBACH, 1977; GOLDIN et al., 1980; GOLDIN e GORBACH, 1984a, b; DJOUZI et al., 1997).

Sabe-se que no câncer de cólon a iniciação da carcinogênese, a mutagênese e a promoção de vários tumores podem ser desenvolvidas pela ação de várias enzimas bacterianas, sendo a enzima β -glucuronidase considerada a principal glucosidase produzida pela microbiota intestinal (GOLDIN et al., 1994; BRADY et al., 2000). Essa enzima catalisa a hidrólise dos glicosídeos, formados pela junção de um composto não-sacarídico, denominado forma aglicona, a um açúcar por ligação β ou α -glicosídica. Os glicosídeos encontrados no trato gastrointestinal são originados de duas fontes: dieta ou fígado (via bile). A dieta contém um grande número de glicosídeos, predominantemente flavonóides, enquanto os glicosídeos provenientes do fígado são originados de substâncias tóxicas que foram combinadas com unidades de hexose (GOLDIN et al., 1994). A glicosilação aumenta a solubilidade dessas substâncias em água, facilitando a sua excreção na vesícula biliar e a posterior liberação no duodeno, processo denominado de detoxicação. No intestino, a enzima bacteriana β -glucuronidase hidrolisa β -glucuronide conjugado, liberando a forma aglicona, e se esses glicosídeos forem de origem hepática o composto liberado será uma substância

tóxica que poderá sofrer reabsorção intestinal ou reagir com o DNA dos colonócitos, iniciando, assim, a carcinogênese no cólon (KNASMULLER et al., 2001).

A atividade da enzima β -glucuronidase foi investigada nos principais grupos bacterianos que compõem a microbiota intestinal (HAWKSWORTH et al. (1971). Observou-se que as bactérias do gênero *Escherichia* e *Clostridium* apresentaram maior atividade dessa enzima, enquanto *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* apresentam ausência ou pequena atividade. Percebe-se, assim, que a atividade da enzima β -glucuronidase parece ser maior nos grupos potencialmente patogênicos.

Os mecanismos de ação dos probióticos sobre a inibição ou redução da carcinogênese ainda não estão definidos. Tem-se sugerido, no entanto, que os probióticos reduzem a fonte de pró-carcinógenos ou as bactérias putrefativas, que possuem enzimas que participam na conversão de compostos carcinogênicos ou pró-carcinogênicos (BRADY et al., 2000). Assim, a redução na atividade da enzima β -glucuronidase, verificada na presente pesquisa, pode estar sendo influenciada pela redução do grupo *Escherichia* no conteúdo colônico de ratos. Adicionalmente, MATSUZAKI (1998) observou aumento na produção das citocinas IFN- γ , IL-1 β e TNF- α e redução no crescimento de tumores na cavidade torácica quando a dieta de camundongos foi suplementada com células de *L. casei* biovariedade Shirota. O autor relacionou os resultados encontrados com a imunomodulação inferida pela espécie administrada.

4.8. Determinação de peso do baço de ratos e coelhos normocolesterolêmicos

O índice de peso do baço de ratos e coelhos que receberam as dietas experimentais encontra-se nos Quadros 32 e 33, respectivamente.

Uma das maneiras indiretas de verificar algum tipo de infecção ou hiperatividade do baço é a ocorrência de esplenomegalia (ZHOU et al., 2000), que pode ser correlacionada com o índice de peso ou contagem bacteriana (a ser avaliado no tópico 4.9.) desse órgão. Nesta experimentação verificou-se que não

Quadro 32 – Índice de peso do baço de ratos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6)

Tratamentos	Peso do Baço (g/kg de peso corpóreo)
Controle	4,39 \pm 0,85
10 ⁴ UFC/mL	4,52 \pm 1,25
10 ⁶ UFC/mL	4,31 \pm 0,68
10 ⁸ UFC/mL	4,62 \pm 0,99
(P<)	0,9976

Dieta-controle = dieta AIN-93M + tampão fosfato; e tratamentos = dieta-controle + tampão fosfato adicionado de probiótico.

Quadro 33 – Índice de peso do baço de coelhos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6)

Tratamentos	Peso do Baço (g/kg de peso corpóreo)
Controle	0,62 \pm 0,31
10 ⁵ UFC/mL	0,60 \pm 0,20
10 ⁷ UFC/mL	0,49 \pm 0,15
10 ⁹ UFC/mL	0,64 \pm 0,26
(P<)	0,5838

Dieta-controle = dieta comercial + tampão fosfato; e tratamentos = dieta-controle + tampão fosfato adicionado de probiótico.

houve diferença ($P > 0,05$) no índice de peso do baço entre os vários tratamentos aplicados em ratos e coelhos, o que evidencia que as concentrações administradas aos animais experimentais durante 14 dias não apresentaram propriedades infectivas.

4.9. Determinação de translocação bacteriana no baço de ratos e coelhos nomocolesterolêmicos

Os microrganismos encontrados no baço dos animais apresentaram características básicas de lactobacilos, ou seja, gram-positivos, bacilos isolados ou em correntes e catalase negativos, características do gênero indicadas por KANDLER e WEISS (1993).

A contagem de células de *Lactobacillus* spp. no baço de ratos e coelhos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., está apresentada nos Quadros 34 e 35, respectivamente.

Quadro 34 – Contagem de células de *Lactobacillus* spp. no baço de ratos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6)

Tratamentos	Log UFC/Baço
Controle	1,77 \pm 0,73
10 ⁴ UFC/mL	1,52 \pm 1,13
10 ⁶ UFC/mL	2,08 \pm 0,51
10 ⁸ UFC/mL	2,18 \pm 0,72
(P<)	0,4059

Dieta-controle = dieta AIN-93M + tampão fosfato; e tratamentos = dieta-controle + tampão fosfato adicionado de probiótico.

Quadro 35 – Contagem de células de *Lactobacillus* spp. no baço de coelhos alimentados com dieta basal suplementada com diferentes concentrações de *L. casei* spp., após 14 dias de experimentação (média \pm desvio-padrão, n = 6)

Tratamentos	Log UFC/Baço
Controle	1,25 \pm 0,92
10 ⁵ UFC/mL	1,43 \pm 0,75
10 ⁷ UFC/mL	1,74 \pm 0,60
10 ⁹ UFC/mL	1,70 \pm 0,88
(P<)	0,7299

Dieta-controle = dieta comercial + tampão fosfato; e tratamentos = dieta-controle + tampão fosfato adicionado de probiótico.

Observa-se que não houve diferença (P>0,05) na contagem de células de *Lactobacillus* spp., no baço de ratos e coelho, o que evidencia que as concentrações administradas aos animais experimentais durante 14 dias também não apresentaram propriedades invasivas nos animais experimentais. ZHOU et al. (2000) também não verificaram propriedades invasivas nem infecciosas quando suplementaram a dieta de camundongos com *L. rhamnosus*, *L.*

acidophilus e *Bifidobacterium lactis*. As culturas reisoladas do baço de ratos e coelhos apresentaram morfologia característica de lactobacilos.

As bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. são freqüentemente associadas a efeitos benéficos para a saúde humana (REID, 1999). Entretanto, é importante que a taxa de translocação dos microrganismos utilizados nas pesquisas seja mais um parâmetro no processo de seleção de estirpes candidatas a compor um probiótico, uma vez que as implicações deste processo nos indivíduos imunodeprimidos são desconhecidas (ZHOU et al., 2000).

4.10. Análise histológica do intestino delgado de ratos e coelhos normocolesterolêmicos

Na Figura 7 observam-se dois cortes histológicos das vilosidades do íleo de rato e coelho.

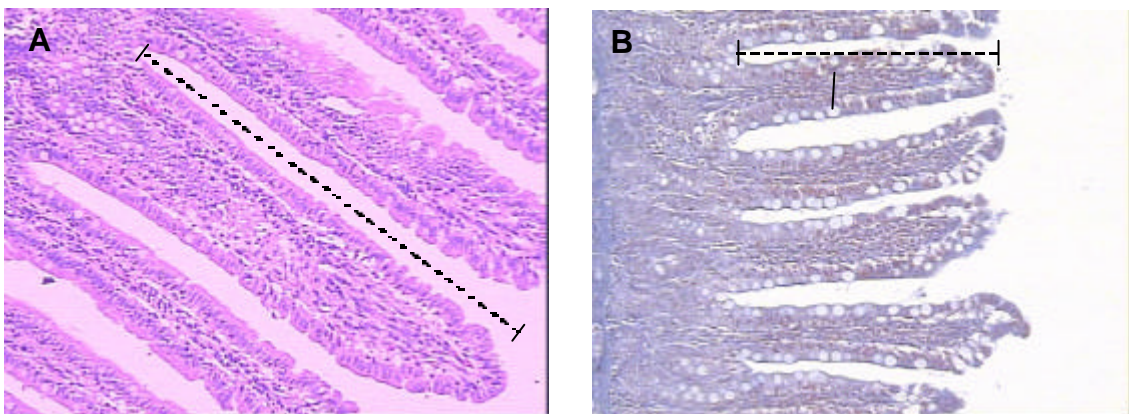


Figura 7 – Representação das vilosidades do íleo de ratos e coelhos alimentados com dieta basal: A = íleo de ratos corado pela técnica de Malory (10X); B = íleo de coelho corado pela técnica de HE (4X); seta = células caliciformes; e linha pontilhada = comprimento do vilo.

Os valores médios referentes ao comprimento de vilosidades do íleo de ratos e coelhos alimentados com dieta basal suplementada com doses crescentes de *L. casei* spp. estão apresentados nos Quadros 36 e 37, respectivamente.

Quadro 36 – Comprimento das vilosidades do íleo de ratos alimentados com dieta basal suplementada com doses crescentes de *L. casei* spp. (média ± desvio-padrão, n = 5)¹

Tratamentos	Comprimento da Vilosidade (µm)
Controle	242,49 ± 65,29
10 ⁴ UFC/mL	255,07 ± 60,11
10 ⁶ UFC/mL	277,53 ± 48,81
10 ⁸ UFC/mL	284,50 ± 54,92
(P<)	<0,0001

¹ 160 medidas por grupo; dieta-controle = dieta AIN-93M + tampão fosfato; e tratamentos = dieta-controle + tampão fosfato adicionado de probiótico.

Quadro 37 – Comprimento das vilosidades do íleo de coelhos alimentados com dieta basal suplementada com doses crescentes de *L. casei* spp. (média ± desvio-padrão, n = 5)¹

Tratamentos	Comprimento da Vilosidade (µm)
Controle	421,23 ± 101,91
10 ⁴ UFC/mL	433,07 ± 87,51
10 ⁶ UFC/mL	488,48 ± 102,63
10 ⁸ UFC/mL	531,28 ± 78,80
(P<)	<0,0001

¹ 160 medidas por grupo; dieta-controle = dieta comercial + tampão fosfato; e Tratamentos = dieta-controle + tampão fosfato adicionado de probiótico.

Observou-se que o efeito de dose foi significativo (P<0,01) no aumento do comprimento das vilosidades intestinais dos dois modelos (rato e coelho). Aparentemente, o aumento na ingestão de *L. casei* spp. estimula o crescimento das vilosidades intestinais, o que indica uma possível modulação dessa bactéria na morfologia intestinal. A possibilidade de que um grupo microbiano seja capaz de favorecer o aumento da superfície absorptiva da mucosa intestinal é de extrema importância, uma vez que pode-se aumentar a biodisponibilidade de vários nutrientes (CASPARY, 1992).

Contudo, quando se observou a recuperação das bactérias administradas nas fezes dos animais em estudo (Quadros 15 e 23, respectivamente), constatou-se que a ingestão de doses crescentes dessa espécie probiótica não promoveu aumento gradativo no nível de bactérias intestinais do gênero *Lactobacillus* em

coelhos, diferentemente de ratos. Percebe-se, assim, que a modulação da morfologia dos modelos animais adotados pode estar relacionada não só com o aumento da população microbiana intestinal (verificada em ratos), mas também devido a possíveis metabólitos liberados no rompimento das células administradas em coelhos que poderiam estar estimulando outros grupos bacterianos ou ativando resposta no hospedeiro que culminaram com o aumento do comprimento da vilosidade. Em corroboração, MARINOVA et al. (2000) administraram por via oral células inativadas de *L. acidophilus* a coelhos e observaram estimulação do sistema imune em nível de mucosa. Portanto, novos estudos poderiam investigar essa relação, uma vez que a renovação epitelial no intestino não é modulada apenas pelas bactérias intestinais, e sim pela interação de vários fatores, inclusive alimentos e fatores de crescimento produzidos neste local.

Estudos realizados em camundongos (ALLORI et al., 2000), ratos (AZEREDO, 2002) e frangos (SAMANYA e YAMAUCHI, 2002), que utilizaram a suplementação de *L. casei*, *L. acidophilus* e *Bacillus subtilis* var. *natto*, respectivamente, têm também comprovado o aumento das vilosidades intestinais nos modelos estudados. Contudo, nos estudos citados têm sido constatado os efeitos sem que os mecanismos sejam discutidos. Porém, os pesquisadores não mencionam a recuperação das células administradas nos animais experimentais, não deixando claro se os efeitos observados são devidos ao aumento da população microbiana intestinal do produto utilizado ou fruto dos metabólitos originados dessas culturas, tornando difícil o entendimento da influência dos probióticos sobre a morfologia intestinal. Por outro lado, estudos desenvolvidos por RITZ et al. (1995) e SAMANYA e YAMAUCHI (2002) indicam que a enzima amilase é responsável pelo aumento no comprimento das vilosidades intestinais em peru e frangos, respectivamente. Para essa constatação, os autores suplementaram a dieta dos animais com amilase dietética (RITZ et al., 1995) ou com diferentes concentrações da bactéria probiótica *Bacillus subtilis natto*, que eleva a atividade da amilase no intestino dos animais experimentais (SAMANYA e YAMAUCHI, 2002). Estes resultados abrem a perspectiva de

novos estudos para avaliar a influência dos probióticos na atividade de enzimas intestinais e sua relação com a morfologia gastrointestinal.

Em estudos desenvolvidos com animais *germ-free*, observou-se que a microbiota intestinal tem papel importante na produção de muco e no desenvolvimento das vilosidades intestinais, visto que nestes animais a mucosa intestinal e a camada de muco são relativamente menores do que em animais convencionais (FALK et al., 1998). Em adição, ALLORI et al. (2000), estudando os efeitos da suplementação de probióticos na recuperação de camundongos desnutridos, observaram que os animais que receberam a dieta adicionada de *L. casei* recuperavam a morfologia normal do epitélio do intestino delgado mais rapidamente quando comparados com os animais que receberam a mesma dieta sem a suplementação probiótica, sugerindo o efeito benéfico de *L. casei* na renovação epitelial. Resultados semelhantes foram obtidos por GUÉRIN-DANAN et al. (2001), quando administraram *L. casei* DN-114 001 a ratos infectados com rotavírus.

Sugere-se que a ingestão de probióticos pode modular a população microbiana do trato intestinal e, por meio de simbiose, produzir grande variedade de compostos que possivelmente estariam envolvidos na proliferação celular da mucosa intestinal. Por exemplo, diversos estudos indicam a importância dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) na manutenção das funções do epitélio intestinal. Sabe-se que os enterócitos utilizam estes ácidos como fonte energética, principalmente butirato e propionato, que estão largamente envolvidos na proliferação e diferenciação celular do epitélio do cólon (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991; TOPPING, 1996; GIBSON, 1998; DEN HOND et al., 1998; NAIDU et al., 1999). Embora os efeitos dos AGCC sejam constatados no intestino grosso (e não no intestino delgado) e considerando que as bactérias probióticas produzem esses compostos sobretudo na forma de acetato, o aumento na ingestão de produtos carreadores dessas bactérias poderia favorecer a produção de butirato e propionato a partir de outros gêneros bacterianos que colonizam não só o intestino grosso, como também a porção terminal do intestino delgado, ou seja, o íleo que é o principal sítio de colonização dos lactobacilos.

Em corroboração, RAMOS et al. (1999) verificaram em camundongos *germ-free* que a administração oral de AGCC protege não só a mucosa do cólon, mas também do intestino delgado, quando induziram lesões no trato gastrointestinal desses animais.

Diante dos resultados encontrados no presente trabalho, conclui-se que a suplementação de doses crescentes de *L. casei* spp. modulou de maneira benéfica a morfologia intestinal de ratos e coelhos, uma vez que houve aumento no comprimento das vilosidades intestinais nesses animais.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Cinco experimentos foram conduzidos, envolvendo 104 ratos e 48 coelhos, com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes concentrações de microrganismos probióticos sobre o metabolismo de colesterol nesses animais. Avaliou-se ainda o efeito de concentração nos níveis de *E. coli* na atividade da enzima β -glucuronidase, na taxa de translocação dos microrganismos administrados e na morfologia intestinal. Com base nos resultados das experimentações, pode-se concluir que:

i) o aumento na suplementação de *L. casei* spp. à dieta de ratos elevou os níveis de bactérias do gênero *Lactobacillus* no conteúdo colônico, o que indica que as bactérias administradas transpuseram as barreiras intestinais nesses animais;

ii) as diferentes doses de *L. casei* spp. não reduziram significativamente os níveis séricos de colesterol nos dois modelos animais estudados, independentemente se normo ou hipercolesterolêmicos

iii) houve tendência de redução na trigliceridemia de ratos e coelhos hipercolesterolêmicos;

iv) os ratos suplementados com probióticos reduziram significativamente a concentração de colesterol hepático e aumentaram sua excreção nas fezes. Embora a interação dose/dieta fosse significativa nos níveis de colesterol hepático, o desdobramento da interação mostrou que não houve diferença

significativa entre as diferentes concentrações testadas, evidenciando que o efeito observado não foi dose dependente e que níveis de 10^4 UFC/mL foram suficientes para inferir as modificações observadas. Não foi observada redução no colesterol hepático nos coelhos, embora apresentasse tendência de aumento na excreção de colesterol nas fezes;

v) houve aumento significativo na concentração de ácidos biliares nas fezes de ratos que receberam as dietas com probióticos, independentemente se normo ou hipercolesterolêmicos, indicando que numa concentração mais elevada de microrganismos probióticos os efeitos foram mais acentuados. Nos coelhos, no entanto, essa alteração não foi significativa;

vi) as diferentes concentrações probióticas aplicadas em ratos e coelhos não alteraram o peso do baço, nem a contagem bacteriana nesse órgão, o que indica que as doses administradas não apresentaram propriedades invasivas ou infectivas nesses animais;

vii) os ratos normocolesterolêmicos que receberam as maiores concentrações de probióticos apresentaram menores níveis de *E. coli*. Nesses animais foram observadas também as menores atividades da enzima β -glucuronidase. No entanto, nos coelhos o aumento nas concentrações do probiótico não resultou em diferenças nos níveis de *E. coli* e nem na atividade da enzima β -glucuronidase; e

viii) os animais experimentais que receberam as maiores concentrações do probiótico foram os que apresentaram maiores comprimentos de vilosidades do íleo. Assim, mesmo nos coelhos onde não foi possível a recuperação das células microbianas no meio de cultura empregado, o benefício da presença dessas células foi confirmado pelo aumento das vilosidades.

Sugere-se que estudos futuros investiguem os possíveis mecanismos de ação dos metabólitos produzidos pelos probióticos que poderiam ter relação com o metabolismo de colesterol, sobretudo na atividade das enzimas envolvidas nesse processo metabólico, como HMG CoA redutase, BSH e 7 α -hidroxilase, além da influência dos probióticos na atividade de enzimas intestinais e sua relação com a morfologia gastrointestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

ABDULRAHIM, S. M.; HADDADIN, M. S. Y.; ROBINSON, R. K. The influence of *Lactobacillus acidophilus* and Bacitracin on layer performance of chickens and cholesterol content of plasma and egg yolk. **British Poultry Science**, v. 37, p. 341-346, 1996.

AGERBAECK, M.; GERDES, L. U.; RICHELSEN, B. Hypocolesterolemic effects of a new fermented milk product in healthy middle-age men. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, p. 346-352, 1995.

AGERHOLM-LAERSEN, L.; RABEN, A.; HAULRIK, N.; HANSEN, A.; MANDERS, M.; ASTRUP. A Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.54, p. 288-297, 2000.

AKALIN, A. S.; GONC, S.; DUZEL, S. Influence of yogurt and acidophilus yogurte on serum cholesterol levels in mice. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 2721-2725, 1997.

ALANDER, M.; DE SMET, I.; NOLLET, L.; VERSTRAETE, W.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLHM, T. The effect of probiotic starins on the microbiota of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME). **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 71-79, 1999.

ALLORI, C.; AGUERO, G.; HOLGADO, A. P. R.; NADER, O. M.; PERDIGON, G. Gut mucosa morphology and microflora changes in malnourished mice after renutrition with milk and administration of *Lactobacillus casei*. **Journal Food Protection**, v. 63, p. 83-90, 2000.

ANDERSON, J. W., GUSTAFSON, N. J., SPENCER, D. B., TIETYEN, J., BRYANT, C. A. Serum lipid response of hypercholesterolemic men to single and divided doses of canned beans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.51, p.1013-1019, 1990.

ANDERSON, J. W.; GILLILAND, S. E. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 18, p. 43-50, 1999.

ANTHONY, M. S.; CLARKSON, T. B.; HUGHES JR., C. L.; MORGAN, T. M.; BURKE, G. L. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 43-50, 1996.

ANTISCHKOW, N.; CHALATOW, S. Ueber experimentelle Cholesterinsteatose und ihre bedeutung für die entstehung einiger pathologischer prozesse. **Zentralblatt für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie**, v. 24, p. 1- 9, 1913.

ARRINGTON L. R. **Introductory laboratory animal science**. Danville, Illinois: The Interstate, 203 p. 1972.

ASHAR, M. N.; PRAJAPATI, J. B. Verification of hypocholesterolemic effect of fermented milk on human subjects with different cholesterol levels. **Folia Microbiologica**, v. 45, p. 263-268, 2000.

ASSMANN, G.; CARMENA, R.; CULLEN, P.; FRUCHART, J. C.; LEWIS, B.; MANCINI, M.; OLSSON, A.; PAOLETTI, R.; POMETTA, D.; TIKKANEN, M. Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease a worldwide view. **Nutrition of Metabolism Cardiovascular Disease**, v. 8, p. 205-271, 1998.

AZEREDO, E. **Efeito de *Lactobacillus* spp na absorção de minerais em ratos**. Viçosa-MG: UFV, 2001. 71 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa.

BARTER, P. J.; LALLY, J. I. The activity of an esterified cholesterol transferring factor in human and rat serum. **Biochemical Biophysica Acta**, v. 531, Issue 2, p. 233-236, 1978.

BEATY, T. H.; PRENGER, V. L.; VIRGIL, D. G.; LEWIS, B.; KWITEROVICH, P. O.; BACHORIK, P. S. A genetic model for control of hypertriglyceridemia and apolipoprotein B levels in Johns Hopkins colony of St. Thomas Hospital rabbits. **Genetics**, v. 132, p. 1095-1104, 1992.

BEENA, A.; PRASAD, V. Effect of yogurt and bifidus yogurt fortified with skim milk powder, condensed whey and lactose-hydrolyzed condensed whey on serum cholesterol and triacylglycerol concentrations in rats. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p. 453-457, 1997.

BERLINER, J. A.; NAVAB, M.; FOGERMAN, A. Atherosclerosis: Basic mechanisms: oxidation, inflammation and genetics. **Circulation**, v. 91, p. 2488-2496, 1995.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J. P.; GUEGUEN, M. Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in prompting grow in post-weaning Swiss mice. **Intitute Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 19-27, 2002.

BOK, S. H.; LEE, S. H.; PARK, Y. B.; BAE, K. H.; SON, K. H.; JEONG, T. S.; CHOI, M. S. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of HMGCoA reductase and ACAT are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1182-1185, 1999.

BORRADAILE, N. M.; CARROL, K. K.; KUROWSKA, E. M. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. **Lipids**, v. 34, p. 591-598, 1999.

BORRIELLO, S. P. Microbial flora of the gastrointestinal tract. In: HILL, M.J. (Ed.) **Microbial Metabolism in the Digestive Tract**. Boca Raton: CRC Press, 1986, p.2-16.

BOUGLE, D.; ROLAND, N.; LEBEURRIER, F.; ARTHAN, P. Effect of propionibacteria supplementation on fecal bifidobacteria and segmental colonic transit time in health human subjects. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 34, p. 144-148, 1999.

BRADY, L. J.; GALLAHER, D. D.; BUSTA, F. F. The papel of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 410S-414S, 2000.

BRASHEARS, M. M.; GILILLAND, S. E.; BUCK, L. M. Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacilus casei*. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2103-2110, 1998.

BROWN, S. A. **Rabbit GI physiology and nutrition**. Documento da internet: <http://www.hrschicago.org/gitractfr.html>. Acesso em 4.4.2003

BUCK, L. M.; GILILLAND, S. E. Comparisons of freshly strains of *Lactobacilus acidophilus* of human intestinal origen for ability to assimilate cholesterol during growth. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2925-2933, 1994.

CANZI, E.; ZANCHI, R.; CAMASCHELLA, P.; CRESCI, A.; GREPI, G. F.; ORPIANESI, C.; SERRANTONI, M.; FERRARI, A. Modulation by lactic acid bacteria of the intestinal ecosystem and plasma cholesterol in rabbits fed a casein diet. **Nutrition Research**, v. 20, p. 1329-1340, 2000.

CARROL, K. K.; KUROWSKA, E.M. Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and humans studies. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 594S- 597S, 1995.

CASPARY, W. F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption **American Journal of Clinical Nutrition**, v.55, p. 299S-308S, 1992.

Chapman, M. J. Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. **Journal of Lipid Research**, v. 21, p. 789-853, 1980.

CHEEKE, P. R.; GROBNER, M. A; PATTON, N. M. Fiber digestion and utilization in rabbits. **Journal of Applied Rabbit Research**, v. 9, p. 25-30, 1986.

CHOUHDURY, S. R.; UESHIMA, H.; KITA, Y.; KOBAYASHI, K. M.; OKAYAMA, A.; YAMAKAWA, M.; HIRAO, Y.; ISHIKAWA, M.; MIYOSHI, Y. Alcohol intake and serum lipids in japanese population. **International Journal of Epidmiology**, v. 23, p. 940-947, 1994.

CORZO, G.; GILLILAND, S. E. Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 472-480, 1999a.

CORZO, G.; GILLILAND, S.E. Measurement of bile salt hydrolase activity from *Lactobacillus acidophilus* based on disappearance of conjugated bile salts. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 466-471, 1999 b.

COSTA, N. M. B. **Investigations into the cholesterol-lowering property of baked beans**. Thesis of Dissertation (Ph.D.). University of Reading, 1990.

CRESCI, A.; ORPIANESI, C.; SILVI, S.; MASTRANDREA, V.; DOLARA, P. The effect of sucrose or starch based diet on short chain fatty acids and faecal microflora in rats. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 245-250, 1999.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. **Journal Applied Bacteriology**, v. 70, p. 443-459, 1991.

DAWBER, T. R.; KANNEL, W. B. The Framingham study. An epidemiological approach to coronary heart disease. **Circulation**, v. 34, p. 553-555, 1966.

DAYTON, S.; PEARCE, M. L.; HASHIMOTO, S.; DIXON, W. J.; TOMIYASU, U. A controlled clinical trial of a diet high in unsaturated fat. **Circulation**, v. 63, p. 39-40, 1969.

DE BOEVER, P.; WOUTERS, R.; VERSTRAETE, W. Combined use of *Lactobacillus reuteri* and soygerm powder as food supplement. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 420-424, 2001.

DE ROOS, N. M.; KATAN, M. B. Effects of probiotic bacetria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 405-411, 2000.

DE ROOS, N. M.; SCHOUTEN, G.; KATAN, M. B. Yoghurt enriched with *Lactobacillus acidophilus* does not lower blood lipids in healthy men and women with normal to border line high serum cholesterol levels. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 277-280, 1999.

DE SMET, I.; DE BOEVER, P.; VERSTRAETE, W. Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. **British Journal of Nutrition**, v. 79, p. 185-194, 1998.

DE SMET, I.; HORDE, L. V.; WOESTYNE, M. V.; CHRISTIAENS, H.; VERSTRAETE, W. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. **Journal Applied Bacteriology**, v. 79, p. 292-301, 1995.

DE VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 421-429, 2001.

DEN HOND, E.; HIELE, M.; EVENEPOEL, P.; PEETERS, M.; GHOOS, Y.; RUTGEERTS, P. In vivo butyrate metabolism and colonic permeability in extensive ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 115, p. 584-590, 1998.

DETRE, K. M.; SHAW, L. Long-term changes of serum cholesterol with cholesterol altering drugs in patients with coronary heart disease. Veterans Administration drug-lipid cooperative study. **Circulation**, v. 50, p. 998-1005, 1974.

DJOUZI, Z.; ANDRIEUX, C.; DEGIRY, M. C.; BOULEY, C. The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* DN 114.001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal microflora in germ-free rats and human flora-associated rats. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 2260-2266, 1997.

DONALDSON, L. Disease emergence and health transitions in the last millennium. **Journal of the Royal College of Physicians of London**, v. 34, p. 543-548, 2000.

DONNET-HUGHES, A.; ROCHAT, F.; SERRANT, P.; AESCHLIMANN, J. M.; SCHIFFRIN, E. J. Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: Effective dose. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 863-869, 1999.

DORR, A. E.; GUNDERSEN, K.; SCHNEIDER, J. C.; SPENCER, T. W.; MARTIN, W. B. Colestipol hydrochloride in hypercholesterolemic patients - effect on serum cholesterol and mortality. **Journal of Chronic Diseases**, v. 31, p. 5-14, 1978.

DU TOIT, M.; FRANZ, C.; DICKS, L. M. T.; SCHILLINGER, U.; HABERER, P.; WARLIES, B.; AHRENS, F.; HOLZAPFEL, W. H. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, p. 93-104, 1998.

EYSEN, H. Role of the gut microflora in metabolism of lipids and sterols. **Proceedings of Nutritional Society**, v. 32, p. 69-73, 1973.

FALK, P. G.; HOOPER, L. V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J. I. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: What we know and need to know from gnotobiology. **Microbiology Molecular Biological Review**, v. 62, p. 1157-1170, 1998.

FAN, J.; WANG, J.; BENSADOUN, A.; LAUER, S. J.; DANG, Q.; MAHLEY, R. W.; TAYLOR, J. M. Overexpression of hepatic lipase in transgenic rabbits leads to a marked reduction of plasma high density lipoproteins and intermediate density lipoproteins. **Proceedings of National Academic Science**, v. 91, p. 8724-8728, 1994.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos lácteos fermentados**. p. 89, 1999.

FERREIRA, C. L. L. F. Produtos lácteos probióticos: uma realidade. **Leite e Derivados**, v. 42, p. 66-69, 1998.

FISCHER, L. J.; MILLBURN, P.; SMITH, R. L.; WILLIAM, R. T. The fate of [¹⁴C] stilboestrol en the rat. **Biochemical Journal**, v. 100, p. 69, 1966.

FLAVANHAN, N. A. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. **Circulation**, v. 85, p. 1927-1938, 1992.

FRANZ, C. M.; SPECHT, I.; HABERER, P.; HOLZAPFEL, W. H. Bile salt hydrolase activity of Enterococci isolated from food: screening and quantitative determination. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 725-729, 2001.

FREEMAN, W.H. **Atlas de histologia** 2. ed. Rio de Janeiro: Discos CBS, 1985. 138p.

FUKUSHIMA, M.; NEKANO, M. Effect of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on a fat and cholesterol enriched diet. **British Journal of Nutrition**, v. 76, p. 857-886, 1996.

FUKUSHIMA, M.; NEKANO, M. The effect of a probiotic on faecal and liver lipid classes in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 73, p. 701-710, 1995.

FUKUSHIMA, M.; YAMANDA, A.; ENDO, T.; NEKANO, M. Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on $\Delta 6$ -desaturase activity in the livers of rats fed a fat and cholesterol enriched diet. **Nutrition**, v. 15, p. 373-378, 1999.

FULLER, R. Modulation of the intestinal microflora by probiotics. **Nestle Nutrition Workshop Series**, v. 42, p. 33-45, 1999.

GANONG, N. F. **Medical physiology**: California: Lange, 1977, 612 p.

GIBSON, G. R. Dietary modulation of human gut microflora using prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 80, p. 209-212, 1998.

GIBSON, G. R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1438S-1441S, 1999.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R.; BEATTY, E. R.; WANG, X.; CUMMINGS, J. H. Selective stimulation of Bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**, v. 108, p. 975-982, 1995.

GIDENNE, T. Caeco-colic digestion in the growing rabbit: impact of nutritional factors related disturbances. **Liv. Prod. Science**, v. 51, p. 73-88, 1997.

GIDENNE, T.; JEHL, N.; SEGURA, M.; DOREAU, B. M. Microbial activity in the caecum of the rabbit around weaning: impact of dietary fibre deficiency and of intake level. **An. Feed Science Technology**, v. 99, p. 107-118, 2002.

GILLILAND, S. E.; NELSON, C. R.; MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied Microbiology Environmental**, v. 33, p. 15-18, 1985.

GOLDIN, B. R., LICHTENSTEIN, A. H., GORBACH, S. L. Nutritional and metabolic roles of intestinal flora. In: SHILS, M. E., OLSON, J. A., SHIKE, M. (Ed.) **Modern nutrition in health and disease**. 8. ed., USA: Williams & Wilkins, 1994, v. I, p. 569-582.

GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L. Alterations fecal microflora enzymes related to diet, age, lactobacillus supplements, and dimethylhydrazine. **Cancer**, v. 40, p. 2421-2426, 1977.

GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L. Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics, and *Lactobacillus*: decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes, and glucuronides. **JNCI**, v. 73, p.689-695. 1984a.

GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L. The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 39, p. 756-761. 1984b.

GOLDIN, B. R.; SWENSON, L.; DWYER, J.; SEXTON, M; GORBACH, S. L. Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. **JNCI**, v. 64, p. 255-261, 1980.

GOLDSTEIN, J.; HO, Y.; BASU, S.; BROWN, M. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. **Proceedings of the National Academic Science**, v. 76, p. 333-337, 1979.

GOPAL-SRIVASTAVA, R.; HYLEMON, P.B. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Clostridium perfringens*. **Journal of Lipid Research**, v. 29, p. 1079-1085, 1988.

GRACEY, M. Child health in the new millennium. **Pediatrics International**. v. 42, p. 461-463, 2000.

GREEVE, J.; ALTKEMPER, I.; DIETERICH, J-H.; GRETEN, H.; WINDLER, E. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 34, p. 1367-1383, 1993.

GROSS, L.; FIGUEREDO, R. Long-term cholesterol-lowering effect of colestipol resin in humans. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 21, p. 552-556, 1973.

GROUP of Physicians of the Newcastle upon Tyne Region. Trial of clofibrate in the treatment of ischaemic heart disease. **British Medical Journal**. v. 4, p. 767-775, 1971.

GRUNDY, S. M. Cholesterol metabolism in man (medical progress). **Western Journal of Medicine**, v. 128, p. 13-25, 1978.

GUERIN-DANAN, C.; MESLIN, J.; CHAMBARD, A.; CHARPILLENNE, A.; RELANO, P.; BOULEY, C.; COHEN, J.; ANDRIEUX, C. Food supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* DN-114 001 protects suckling rats from rotavirus-associated diarrhea. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 1, p. 111-117, 2001.

GUERIN-DANAN, C.; CHABANET, C.; PEDONE, C.; POPOT, F.; VAISSADE, P.; BOULEY, C.; SZYLIT, O. E.; ANDRIEUX, C. Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, p. 111-117, 1998.

GURALNIK, J. M.; FRIED, L. P.; SALIVE, M. E. Disability as a public health outcome in the aging population. **Annual Review of Public Health**, v. 17, p. 25-46, 1996.

HADDADIN, M. S. Y.; ABDULRAHIM, S. M.; ROBINSON, R. K. The effect of *Lactobacillus acidophilus* on the production and chemical composition of hen's eggs. **Poultry science**, v. 75, p. 491-494, 1996.

HADDADIN, M. S. Y.; LUBBADEH, W.; AL-TAMIMI, M. A.; ROBINSON, R. K. A preliminary appraisal of the effect on the cholesterol content of fresh ovine milk of supplementing the feed of Awassi ewes with *Lactobacillus acidophilus*. **Milchwissenschaft**, v. 54, p. 502-505, 1999.

HARRIS, W. S.; CONNOR, W. E.; ILLINGWORTH, R.; ROTHROCK, D. W.; FOSTER, D. M. Effects of fish oil on VLDL triglyceride in humans. **Journal of Lipid Research**, v. 31, p. 1549-1558, 1990.

HARTEMINK, R.; DOMENECH, V. R.; ROMBOUTS, F. M. LAMVAB - A new selective medium for isolation of lactobacilli from faeces. **Journal of Microbiological Methods**, v. 29, p. 77-84, 1997.

HASHIMOTO, H.; YAMAZAKI, K.; HE, F.; KAWASE, M.; HOSODA, M.; HOSONO, A. Hipocolesterolemic effects of *Lactobacillus casei* subsp. *Casei* TMC 0409 strain observed in rats fed cholesterol contained diets. **Animal Science Journal**, v. 70, p. 90-97, 1999.

HAWKSWORTH, G.; DRASAR, B. S.; HILL, M. J. Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bonds. **Journal of Medicine Microbiological**, v. 4, p. 451-459, 1971.

HAYAKAWA, H. K.; ONODERA, N.; MATSUBARA, S.; YASUDA, E.; SHIMAKAWA, Y.; ISHIKAWA, F. Effects of soya milk and Bifidobacteria fermented soya milk on plasma and liver, and faecal steroids in hamsters fed on a cholesterol free or cholesterol enriched diet. **British Journal of Nutrition**, v. 79, p. 97-105, 1998.

HAYAKAWA, H. K.; SONE, H. S.; OSADA, K.; MASUOKA, N. O.; ISHIKAWA, F. Lower plasma triglyceride level in Siryan hamstrs fed on skin milk fermented with *L. casei* strain shirota. **Bioscience Biotechnology Biochemical**, v. 64, p. 466-475, 2000.

HAYFLICK, L. The future ageing. **Nature**, v. 408, p. 267-269, 2000.

HEBBACHI, A.; SEELAENDER, M. C. L.; BAKER, P. W.; GIBBONS, G. F. Decreased secretion of very-low-density lipoprotein triacylglycerol and apolipoprotein B is associated with decreased intracellular triacylglycerol lipolysis in hepatocytes derived from rats fed orotic acid or n-3 fatty acid. **Biochemical Journal**, v. 325, p. 711-719, 1997.

HODGSON, J. M.; PUDDEY, I. B.; BEILIN, L. J.; MORI, T. A.; CROFT, K. D. Supplementation with isoflavonoid phytoestrogens does not alter serum lipid concentrations: a randomized controlled trial in humans. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 728-732, 1998.

HOFKER, M. H.; van VLIJMEN, B. J.; HAVEKES, L. M. **Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis**, *Atherosclerosis*, Volume 137, Issue 1, March 1998, Pages 1-11

HOFMANN, A. F.; BORGSTROM, B. Physico-chemical state of lipids in intestinal content during their digestion and absorption. **Federation Proceedings**, v. 21, p. 43-47, 1962.

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

HORIUCT, S. Greater lifetime expectations. **Nature**, v. 405, p. 744-745, 2000.

HORNSTRA, G.; BARTH, C. A.; GALLI, C.; MENSINK, R. P.; MUTANEN, M.; RIEMERSMA, R. A.; ROBERFROID, M.; SALMINEN, K.; VANSANT, G.; VERSCHUREN, P. M. Functional food science and the cardiovascular system. **British Journal of Nutrition**, v. 80, p. 113-146, 1998.

IGNATOWSKI, A. C. Influence of animal food on the organism of rabbits. **Izv Imp. Voenno-Med Akad Peter**, v. 16, p. 154-173, 1908.

IGNATOWSKI, A. C. Influence of animal food on the organism of rabbits. **Izv Imp Voenno-Med Akad Peter**, v. 16, p 154-173, 1908.

ISHIBASHI, N.; YAMAZAKI, S. Clinical applications of probiotic agents. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 465S-470S, 2001.

JAHREIS, G.; VOGELANG, H.; KIESSLING, G.; SCHUBERT, R.; BUNTE, C.; HAMMES, W. P. Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. **Food Research International**, v. 35, p. 133-138, 2002.

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular, nonsporing gram-positive rods. In: BERGEY, D.H. **Bergey's manual of sistematic bacteriology**. 9. ed., Baltimore: Willians e Wilkins, v.2, p.1208-1223, 1993.

KANEKO, T.; MORI, H.; IWATA, M.; MEGURO, S. Growth stimulator for Bifidobacteria produced by propionibacterium freudenreichi and several intestinal bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 393-404, 1994.

KAWASE, M.; HASHIMOTO, H.; HOSODA, M.; MORITA, H.; HOSONO, A. Concentrate to rats and healthy men on serum lipids and effect of administration of fermented milk containing whey protein blood pressure. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 255-263, 2000.

KEYS, A.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; VAN BUCHEM, F.; BUZINA, R.; DJORDJEVIC, B. Epidemiological studies related to coronary heart disease: characteristics of men aged 40-59 in seven countries. **Acta Medica Scandinavica**, v. 480, p. 1-392, 1967.

KLAVER, F. A. M.; MEER, R. V. D. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and bifidobacterium bifidum is due to their salt desconjugation activy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1120-1124, 1993.

KNASMULLER, S.; STEINKELLNER, H.; HIRSCHL, A. L.; RABOT, S. Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. **Mut. Res.**, v. 480-481, p. 129-138, 2001.

KOVANEN, P. T.; BROWN, M. S.; BASU, S. K.; BILHEIMER, D. W.; GOLDSTEIN, J. L. Saturation and suppression of hepatic lipoprotein receptors: a mechanism for the hypercholesterolemia of cholesterol-fed rabbits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, p. 1396-1400, 1981.

KOVANEN, P. T.; BROWN, M. S.; BASU, S. K.; BILHEIMER, D. W.; GOLDSTEIN, J. L. Saturation and suppression of hepatic lipoprotein receptors: a mechanism for the hypercholesterolemia of cholesterol-fed rabbits. **Proceedings of National Academic of Science**, v. 78, p. 1396-1400, 1981.

KREMPLES, D. M. GastroIntestinal Stasis, The Silent Killer. Documento da internet: <http://fig.cox.miami.edu/Faculty/Dana/ileus.html>. Acesso em 4.4.2003.

KUROWSKA, E. M.; BORRADAILE, N. M. Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juice in rabbits. **Nutrition Research**, v. 20, p. 121-129, 2000.

LAW, M.; WALD, N. Why disease mortality is low in France: the time lag explanation. **British Medical Journal**, v. 318, p. 1471-1480, 1999.

LAW, M. R.; THOMPSON, S. G.; WALD, N. J. Assessing possible hazards of reducing serum cholesterol. **British Medical Journal**, v. 308, p. 373-379, 1994 c.

LAW, M. R.; WALD, N. J.; THOMPSON, S. G. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? **British Medical Journal**, v. 308, p. 367-373, 1994b.

LAW, M. R.; WALD, N. J.; WU, T.; HACKSHAW, A.; BAILEY, A. Systematic underestimation of association between serum cholesterol concentration and ischaemic heart disease in observational study: data from the BUPA study. **British Medical Journal**, v. 308, p. 363-366, 1994a.

LEE, K.; SO, J. S.; HEO, T. R. Layer chromatographic determination of organic acids for rapid identification of Bifidobacteria at genus level. **Journal of Microbiological Methods**, v. 45, p.1-6, 2001.

LEE, K. N.; KRITCHEVSKY, L.; PARIZA, M. W. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, v. 108, p. 19-25, 1994.

LEE, Y. K.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends in food Sci Tech.**, v. 6, p. 241-245, 1995.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da bioquímica.** 2. ed. São Paulo: Savier, 2000. 839 p.

LEREN, P. The effect of plasma cholesterol lowering diet in male survivors of myocardial infarction. **Acta Medica Scandinavica**, v. 466, p. 1-92, 1966.

LEVINE, G. N.; KEANEY, J. F.; VITA, J. A. Cholesterol reduction in cardiovascular disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 512-521, 1995.

LIMA, I. R. P. **Efeitos farmacológicos e toxicológicos e mecanismos de ação dos flavonóides e corantes naturais extraídos do urucum no metabolismo lipídico de coelhos.** Viçosa, MG: UFV, 2001.

LING, W. H.; KORPELA, R.; MYKKANEN, H.; SALMINEN, S.; HANNINEN, O. Lactobacillus strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. **Journal of Nutrition**, v. 124, p. 18-23, 1993.

LUBBADEH, W.; HADDADIN, M. S. Y.; AL-TAMIMI, M. A.; ROBINSON, R. K. Effect on the cholesterol content of fresh lamb of supplementing the feed of Awassi ewes and lambs with Lactobacillus acidophilus. **Meat science**, v. 52, p. 381-385, 1999.

LUND, B.; EDLUND, C. Probiotic Enterococcus faecium strain is a possible recipient of the vanA gene cluster. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 1384-1385, 2001.

MACHADO, D. F. **Efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico e na taxa de translocação de Lactobacillus spp. em ratos 2001.** Viçosa-MG: UFV, 2001. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms.** 9. ed. Ney Jersey: Prentice-Hall, 2000.

MANN, G. V.; SPOERRY, A. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Massai. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 27, p. 464-469, 1974.

MARINOVA, S.; TCHORBADJIISKA, L.; PETRUNOV, B.; CVETANOV, J. Immunostimulating and protective effects of an oral polybacterial immunomodulator 'Dentavax' in a rabbit experimental model. **International Journal of Immunology**, v. 22, p. 843-854, 2000.

MATHEWS, C. K., VAN HOLDE, K. E. **Biochemistry**. Reedwood: Benjamin/Cummings Publishing Company, 1990. 1129 p.

MATSUZAKI, T. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 133-140, 1998.

MELBY J. R., ALTMAN, N. H. **Handbook of laboratory animal science**. Volume I. Cleveland, Ohio: CRC Press. 1977a.

MELBY, J. R.; ALTMAN, N. H. **Handbook of laboratory animal science**, Volume II. Cleveland, Ohio: CRC Press. 1977b.

MEREDITH, A. The rabbit. Documento da internet: <<http://www.aquavet.i12.com/Rabbit.htm>>. Acesso em 04.04.2003

METCHNIKOFF, E. **The prolongation of life**. London: Heinemann, 1908.

MILNER, J. A. Functional foods: the US perspective. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1654-1658, 2000.

MOHAN, B.; KADIRVEL, R.; BHASKARAN, M.; NATARAJAN, A. Effect of probiotic supplementation on serum/yolk cholesterol and on egg shell thickness in layers. **British Poultry Science**, v. 36, p. 799-803, 1995.

MORI, H.; SATO, Y.; TAKETOMO, N.; KAMIYAMA, T.; YOSHIYAMA, Y.; MEGURO, S.; SATO, H.; KANEKO, T. Isolation and structural identification of bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichi*. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1959-1964, 1997.

MOUGIOS, V.; MATSAKAS, A.; PETRIDOU, A.; RING, S.; SAGREDOS, A.; MELISSOPOULOU, A.; TSIGILIS, N.; NIKOLAIDIS, M. Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 585-594, 2001.

MULLER, C.; XANTHOMATA. Hypercholesterolemia, angina pectoris. **Acta Medica Scandinavica**, v. 89, p. 75-84, 1938.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWEL, V. W. **Harper: Biochemistry**. São Paulo: Atheneu, 1994.

NAEEMI, E. D.; AHMAD, N.; AL-SHARRAH, T. K. Rapid and simple method for determination of cholesterol in processed food. **J. AOAC Int.**, v. 78, p. 1522-1525, 1995.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 13-126, 1999.

NAKAJIMA, H.; SUZUKY, Y.; HIROTA, T. Cholesterol-lowering activity of rropy fermented milk. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 1327-1329, 1992.

NANCY, N. D.; CLEEMAN, J. I. National cholesterol education program keeps a priority on lifestyle modification to decrease cardiovascular disease risk. **Current Opinion in Lipidology**, v. 13, p. 69-73, 2002.

NESTEL, P. J.; YAMASHITAT e SASAHARA, T. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 17, p. 3392-3398, 1997.

NGUYEN, L. B.; GUORONG, X.; SHEFER, S.; TINT, G. S.; BATT A.; SALEN, G. Comparative regulation of hepatic sterol 27-hydroxylase and cholesterol α -hydroxylase activities in the rat, guinea pig and rabbit: Effects of cholesterol and bile acids. **Metabolism**, v. 48, p. 1542-1548, 1999.

NICOLISI, R. J.; ROGERS, E. J.; KRITCHEVSKY, D.; SCIMECA, J. A.; HUTH, P. J. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamster. **Artery**, v. 22, p. 266-277, 1997.

NOH, D. O.; KIM, S. H.; GILILLAND, S. E. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 3107-3113, 1997.

NORA, J. J.; LORTSCHER, R. H.; SPANGLER, R. D.; NORA, A. H.; KIMBERLING, W. J. Genetic-epidemiology study of early-onset ischemic heart disease. **Circulation**, v. 61, p. 503-509, 1980.

OGAWA, M.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI, S. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 135-140, 2001.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 749-756.

PEDERSEN, A.; SANDSTROM, B.; VAN AMELSVOORT, J. M. M. The effect of ingestion of inulin on blood lipids and gastrointestinal symptoms in healthy females. **British Journal of Nutrition**, v. 78, p. 215-222, 1997.

PERCEGONI, N. **Efeitos do flavonoide crisina, xantona e das proteínas de soja e caseína nos lipídeos sanguíneos e hepáticos de coelhos**. Viçosa-MG: UFV, 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa.

PIETRAS, M. The effect of probiotics on selected blood and meat parameters of broiler chickens. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 10, p. 297-302, 2001.

PIVETEAU, P. Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review. **Lait**, v. 79, p. 23-41, 1999.

QUINTÃO, E. **Colesterol e aterosclerose**. Rio de Janeiro: Quality Mark., 1992. 276 p.

RAMOS, M. G.; BAMBIRRA, E. A.; NICOLI, J. R.; CARA, D. C.; VIEIRA, E. C.; LEITE, J. A. Proctition by short-chain fatty acids against 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine- induced intestinal lesions in germfree mice. **Ant. Ag. Chem.**, v. 43, p.950-953, 1999.

RASIC, J. L.; VUJICIC, I. F.; SKRINJAR, M.; VULIC, M. Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 39-44, 1992.

REEVES, P. G., NIELSEN, F. H., FAHEY, G. C .J. 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 rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

RICHELSEN, B.; KRISTENSEN, K.; PEDERSEN, S. B. Long-term (6 months) effect of a new fermented milk product on the level of plasma lipoproteins – a placebo-controlled and double blind study. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 50, p. 811-813, 1996.

RITZ, C. W.; HULET, R. M.; SELF, B. B.; DENBOW, D. M. Grow and intestinal morphology of male turkeys as influenced by dietary supplementation of anylase and xylanase. **Poultry Science**, v. 74, p. 1329-1334, 1995.

ROBERFROID, M. B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1660-1663, 2000b.

ROBERFROID, M. B. Concepts in functional food: the case of inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1398-140, 1999 a.

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

ROBERFROID, M. B. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 406-409, 2001.

ROBERTSON, T. L.; KATO, H.; RHOADS, G. G.; KAGAN, A.; MARMOT, M.; SYME, S. L. Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California. **American Journal of Cardiology**, v. 39, p. 239-49, 1977.

ROSA, C. O. B.; COSTA, N. B.; LEAL, P. F. G.; OLIVEIRA, T. T. Efeito dos feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) preto, cariquinho e vermelho na redução do colesterol sanguíneo em ratos hipercolesterolêmicos. **Archivos LatinoAmericanos de Nutricion**, v. 48, p. 306-311, 1998b.

ROSA, C. O. B.; COSTA, N. B.; LEAL, P. F. G.; OLIVEIRA, T. T. Efeito do feijão-preto (*Phaseolus vulgaris* L.) sem casca na redução do colesterol sanguíneo em ratos hipercolesterolêmicos. **Archivos LatinoAmericanos de Nutricion**, v. 48, p. 299-305, 1998a.

ROSE, G. A.; THOMSON, W. B.; WILLIAMS, R. T. Corn oil in treatment of ischaemic heart disease. **British Medical Journal**, v. 1, p. 1531-1533, 1965.

ROSSOUW, J. E. Current in lipid lowering therapy: treatment of hyperlipidaemia in the young, in the elderly and in women. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 4, p. 81-88, 1990.

RUSSELL, W. M.; KLAENHAMMER, T. R. Identification and cloning of gusA, encoding a new beta-glucuronidase from *L. gasseri* ADH. **Applied Environment Microbiology**, v. 67, p. 1253-1261, 2001.

SAAVEDRA, J. M. Clinical applications of probiotic agents. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 1147S-1151S, 2001.

SALMINEN, S. J.; OUWEHAND, A. C.; BENNO, Y. Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 107-110, 1999.

SAMANYA, M; YAMAUCHI, K. E. Histological alterations of intestinal vili in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var, *natto*. **Compendium Biochemical Physiology**, v. 133, p. 95-104, 2002

SANDERS, M. E. Probiotics. **Food technology**, v. 53, p. 67-77, 1999.

SANDERS, M. E. Effect of consumption of lactic cultures on health. **Advances Food and Nutrition Research**, v. 37, p. 92-98, 1993.

SANTOS, R. D. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 77, p. 1-48, supl. 3, 2001.

SCHAAFSMA, G.; MEULING, W. J. A.; VAN DOKKUM, W.; BOULEY, C. Effects of a milk product, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, p. 436-440, 1998.

SCHAARMANN, G.; SCHNEIDER, J.; ZORN, A.; VILSER, C.; JAHREIS, G. Influence of probiotic yogurt on serum lipids in women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 496, 2001.

SCHAIQUEVICH, P.; NISELMAN, A.; RUBIO, M. Comparison of two compartmental models for describing ranitidine's plasmatic. **Pharmacological Research**, v. 45, p. 399-405, 2002.

SEHAYEK, E.; ONO, J. G.; SHEFER, S.; NGUYEN, L. B.; WANG, N.; Bhatta, A. K.; SALen, G.; SMITH, J. D.; TALL, A. R.; BRESLOW, J. L. Biliary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption. **Proceedings of National Academic Science**, v. 95, p. 10194-10199, 1998.

SEHAYEK, E.; SHEFER, S.; NGUYEN, L. B.; ONO, J. G.; MERKEL, M.; BRESLOW, J. L. **Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Volume 97, Issue 7, March 28, p. 3433-3437, 2000.

SEHAYEK, E.; SHEFER, S.; NGUYEN, L. B.; ONO, J. G.; MERKEL, M.; BRESLOW, J. L. Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice. **Proceedings of National Academic Science**, v. 97, p. 3433-3437, 2000.

SESSIONS, V. A.; LOVEGROVE, J. A.; TAYLOR, G. R. J.; DEAN, T. S.; WILLIAMS, C. M.; SANDERS, T. A. B.; MACDONALD, I.; SALTER, A. The effects of a new fermented milk product on total plasma cholesterol, LDL cholesterol and apolipoprotein B concentration in middle aged men and women. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 56, p. 120, 1997.

SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M. **Modern nutrition in health and disease**. 8. ed. Philadelphia: Malvern, 1994. 923p.

SORUM, H.; SUNDE, M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animal. **Veterinary Research**, v. 32, p. 227-241, 2001.

SPADY, D. K.; DIETSCHY, J. M. Sterol synthesis in vivo in 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster, and rat. **Journal of Lipid Research**, v. 24, p. 303-315, 1983.

SPADY, D. K.; TURLEY, S. D.; DIETSCHY, J. M. Rates of low density lipoprotein uptake and cholesterol synthesis are regulated independently in the liver. **Journal of Lipid Research**, v. 26, p. 465-472, 1985.

SPADY, D. K.; CUTHBERT, J. A. Regulation of hepatic sterol metabolism in the rat. **Journal of Biology Chemistry**, v. 267, p. 5584-5591, 1992.

SPADY, D. K.; CUTHBERT, J. A. Regulation of hepatic sterol metabolism in the rat. **Journal of Biology Chemistry**, v. 267, p. 5584-5591, 1992.

SPANHAAK, S.; HAVENAAR, R.; SCHAAFSMA, G. Effects of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microbiota and immune parameters in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, p. 899-907, 1998.

STERRWAG, E. J.; HYLEMON, P. B. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 452, p. 165-176, 1976.

STRONG, J. P. Atherosclerotic lesions: natural history, risk factors, and topography. **Archives Pathology and Laboratory Medicine**, v. 116, p. 1268-1275, 1992.

SZRETER, S.; MOONEY, G. Urbanization, mortality, and the standard of living debate: new estimates of the expectation of life at birth in nineteenth-century British cities. **Economic History Review**, v. 51, p. 84-89, 1998.

TAKAHASHI, H; TAKAHASHI, A.; MAKI, M.; SASAI, H.; KAMADA, M. **Effect of CETP on the plasma lipoprotein Profile in four strains of transgenic mouse**. Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 283, Issue 1, 27 April, p. 118-123, 2001.

TALL, A. Plasma cholesteryl ester transfer protein. **Journal of Lipid Research**, v. 34, p. 1255-1274, 1993.

TANAKA, H.; DOESBURG, K.; IWASAKI, T.; MIERAU, I. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2530-2535, 1999.

TANAKA, H.; HASHIBA, H.; KOK, J.; MIERAU, I. Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*-biochemical and genetic characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2502-2512, 2000.

TANIGUCHI, M.; NAKAZAWA, H.; TAKEDA, O.; KANEKO, T.; HOSHINO, K.; TANAKA, T. Production of a mixture of antimicrobial organic acids from lactose by co-culture of *Bifidobacterium longum* na *Propionibacterium freudenreichi*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, p. 1522-1527, 1998.

TANNOCK, J. Microecology of the Gastrointestinal. **International Dairy Journal**, v. 5, p.1059-1070, 1995.

TARANTO, M. P.; MEDICI, M.; PERDIGON, G.; HOLGADO, A. P. R.; VALDEZ, G. F. Evidence for hypocoesterolemic effect of *Lactobacillus reuti*. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2336-2340, 1998.

TARANTO, M. P.; MEDICI, M.; PERDIGON, G.; RUIZ ROLGADO, A. P. R.; VALDEZ, G.F. Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 401-403, 2000.

TARANTO, M. P.; SESMA, F.; HOLGADO, A. P. R.; VALDEZ, G. F. Bile salts hydrolase plays a key role on cholesterol removal by *Lactobacillus reuti*. **Biothechnology Letters**, v. 19, p. 845-847, 1997.

TESHIMA, E. **Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota por meio do uso de probiótico, prebiótico e simbiótico.** Viçosa-MG: UFV, 2001. 113 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa.

THANNHAUSER, S. J.; MAGENDANTZ, H. The different clinical groups of xanthomatous disease: a clinical physiological study of 22 cases. **Annals of Internal Medicine**, v. 11, p. 1662-1746, 1938.

TOOPING, D.L. Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 5, p. 15-19, 1996.

TUOMOLA, E. M.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. **FEMS Im. Medical Microbiology**, v. 26, p. 137-142, 1999.

UPSTON, J. M.; WITTING, P. K.; BROWN, A. J.; STOCKER, R.; KEANEY JR., J. F. Effect of vitamin E on aortic lipid oxidation and intimal proliferation after arterial injury in cholesterol-fed rabbits. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1245-1253, 2001.

USMAN e HOSONO, A. Effect of administration of *Lactobacillus gasseri* on serum lipids and fecal steroids in hypercholesterolemic rats. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1705-1711, 2000.

VENTER, C. S.; VORSTER, H. H.; CUMMINGS, J. H. Effects of dietary propionate on carbohydrate and lipid metabolism in healthy volunteers. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 85, p. 549-553, 1990.

WALKER, A. R. P. Cholesterol: how low is low enough? Effect of a given concentration depends on several factors. **British Medical Journal**, v. 315, p. 538-538, 1999.

WALKER, D. K.; GILILLAND, S. E. Relationship among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Journal Dairy Science**, v. 76, p. 956-961, 1993.

WOLEVER, T. M. S.; FERNANDES, J.; RAO, A. V. Serum acetate: propionate ratio is related to serum cholesterol in men but not women. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 2790-2797, 1996.

WOLEVER, T. M. S.; SPADAFORA, P. J.; ESHUIS, H. Interaction between colonic acetate and propionate in man. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 681-687, 1991.

WOLEVER, T. M. S.; SPADAFORA, P. J.; CUNNANE, S. C.; PENCHARZ, P. B. Propionate inhibits incorporation of colonic [1,2,¹³C] acetate into plasma lipids in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p. 1241-1247, 1995.

WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B. L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 451-455, 2001.

WOODHILL, J. M.; PALMER, A. J.; LEELARTHAEPIN, B.; MCGILCHRIST, C.; BLACKET, R. B. Low fat, low cholesterol diet in secondary prevention of coronary heart disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 109, p. 317-301, 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Conquering suffering, enriching humanity**. Geneva: World Health Report, 1997.

XU, G; SHNEIDER, B. L; SHEFER, S.; NGUYEN, L. B.; BATTA, A. K.; TINT, G. S.; ARRESE, M.; THEVANANTHER, S.; MA, L.; STENGELIN, D.; KRAMER, W.; GREENBLATT, D. Ileal bile acid transport regulates bile acid pool, synthesis, and plasma cholesterol levels differently in cholesterol-fed rats and rabbits. **Journal of Lipid Research**, v. 41, p. 298-304, 2000.

YBARRA, L. M.; SANTOS, F. L.; RAMÍREZ-CÁRDENAS, L.; COSTA, N. M. B.; SANT'ANA, L. F. R.; NOBRE, L. N.; PIRES, I. S. C.; ROSADO, E. L.; FERREIRA, A. S. R. Effect of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on anemia recovery in rats: A preliminary study. In: 38th Annual Meeting of the Association for Gnotobiotic, Belo Horizonte. 8 Abstr. Minas Gerais, Brazil: UFMG, 2001.

YUKI, N.; WATANABE, K.; MIKE, A.; TAGAMI, Y.; TANAKA, R.'OHWAKI, M. Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: Seletive isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48, p. 51-57, 1999.

ZHOU, J. S.; SHU, Q.; RUTHERFURD, K. J.; PRASAD, J.; BIRTLES, M. J.; GOPAL, P. K.; GILL, H. S. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. Acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 87-96, 2000.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Quadro 1A – Atividade da enzima BSH, pH, densidade óptica em células de *L. acidophilus* CH5 nos tempos 0, 6 e 12 horas

	Ácido Cólico Desconjugado ($\mu\text{M}/\text{mL}$)			pH			Densidade Óptica		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12
Repetição 1	0,00	0,00	2,92	6,38	4,90	4,28	0,019	0,138	0,187
Repetição 2	0,00	0,00	3,07	6,38	4,93	4,28	0,019	0,149	0,199
Média	0,00	0,00	3,00	6,38	4,91	4,29	0,019	0,143	0,193

Quadro 2A – Atividade da enzima BSH, pH e densidade óptica em células de *L. casei* spp. nos tempos 0, 6 e 12 horas

	Ácido Cólico Desconjugado ($\mu\text{M}/\text{mL}$)			pH			Densidade Óptica		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12
Repetição 1	0,00	0,37	2,93	6,36	5,02	4,68	0,021	0,233	0,257
Repetição 2	0,00	0,35	3,09	6,36	5,06	4,83	0,021	0,229	0,269
Média	0,00	0,36	3,01	6,36	5,04	4,75	0,021	0,231	0,263

Quadro 3A – Atividade da enzima BSH, pH e densidade óptica em células de *L. acidophilus* NCFM nos tempos 0, 6 e 12 horas

	Ácido Cólico Desconjugado ($\mu\text{M}/\text{mL}$)			pH			Densidade Óptica		
	0	6	12	0	6	12	0	6	12
Repetição 1	0,00	0,24	1,59	6,38	4,89	4,24	0,024	0,246	0,301
Repetição 2	0,00	0,27	1,53	6,38	4,94	4,29	0,024	0,243	0,286
Média	0,00	0,255	1,56	6,38	4,91	4,26	0,024	0,244	0,293

Quadro 4A – Ganho de peso diário de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)

	Ganho de peso (g/dia)				
	Basal	Controle	<i>L acidophilus</i> CH5	<i>L acidophilus</i> NCFM	<i>L. casei</i> spp.
1	4,00	5,29	5,00	5,57	5,43
2	3,50	4,86	5,07	4,71	4,86
3	2,71	6,00	5,43	3,43	4,50
4	3,86	5,07	5,29	4,86	5,07
5	4,14	4,50	5,50	4,07	4,57
6	5,00	3,93	4,93	5,71	4,64
7	5,07	6,21	3,43	4,14	3,86
8	3,64	4,71	4,36	6,00	4,79
Média	3,99	5,07	4,88	4,81	4,71
DP	0,78	0,76	0,68	0,90	0,46

Quadro 5A – Consumo alimentar diário de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)

	Consumo Alimentar (g/dia)				
	Basal	Controle	<i>L acidophilus</i> CH5	<i>L acidophilus</i> NCFM	<i>L. casei</i> spp.
1	19,97	19,31	18,33	18,39	19,46
2	18,46	21,89	18,41	16,95	18,79
3	15,79	18,74	18,77	17,71	19,09
4	17,08	19,20	18,53	17,23	18,38
5	20,09	15,48	19,11	16,44	18,46
6	19,09	16,94	18,18	19,77	18,24
7	18,26	17,83	16,96	16,19	18,53
8	17,05	18,42	16,49	18,81	18,7
Média	18,1	18,48	18,1	17,69	18,71
DP	1,51	1,88	0,90	1,23	0,40

Quadro 6A – Conversão alimentar de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)

	Conversão Alimentar (%)				
	Basal	Controle	<i>L acidophilus</i> CH5	<i>L acidophilus</i> NCFM	<i>L. casei</i> spp.
1	21,08	27,38	27,28	30,29	27,9
2	18,96	22,19	27,54	27,81	25,86
3	17,19	32,01	28,92	19,35	23,57
4	22,58	26,41	28,53	28,19	27,59
5	20,62	29,07	28,79	24,76	24,77
6	26,20	23,2	27,11	28,9	25,45
7	27,77	34,86	20,21	25,58	20,82
8	21,37	25,59	26,42	31,9	25,59
Média	22,05	27,45	26,94	27,21	25,2
DP	3,52	4,28	2,82	3,89	2,26

Quadro 7A – Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos concentrados de lactobacilos administrados aos ratos (pré-tratamento)

	UFC/mL		
	<i>L. casei</i> spp.	<i>L acidophilus</i> NCFM	<i>L acidophilus</i> CH5
1	1,5 x 10 ¹⁰	2,3 x 10 ¹⁰	1,2 x 10 ¹⁰
2	1,5 x 10 ¹⁰	2,3 x 10 ¹⁰	1,2 x 10 ¹⁰
3	1,5 x 10 ¹⁰	2,3 x 10 ¹⁰	1,2 x 10 ¹⁰
4	1,9 x 10 ¹⁰	3,6 x 10 ¹⁰	1,6 x 10 ¹⁰
5	1,9 x 10 ¹⁰	3,6 x 10 ¹⁰	1,6 x 10 ¹⁰
6	1,9 x 10 ¹⁰	3,6 x 10 ¹⁰	1,6 x 10 ¹⁰
7	2,2 x 10 ¹⁰	5,2 x 10 ¹⁰	2,3 x 10 ⁹
8	2,2 x 10 ¹⁰	5,2 x 10 ¹⁰	2,3 x 10 ⁹
9	2,2 x 10 ¹⁰	5,2 x 10 ¹⁰	2,3 x 10 ⁹
10	4,2 x 10 ⁹	2,6 x 10 ¹⁰	2,2 x 10 ⁹
11	4,2 x 10 ⁹	2,6 x 10 ¹⁰	2,2 x 10 ⁹
12	4,2 x 10 ⁹	2,6 x 10 ¹⁰	2,2 x 10 ⁹
13	2, 1 x 10 ¹⁰	6,2 x 10 ¹⁰	1,9 x 10 ⁹
14	2, 1 x 10 ¹⁰	6,2 x 10 ¹⁰	1,9 x 10 ⁹
Média	1,6 x 10 ¹⁰	3,8 x 10 ¹⁰	7,2 x 10 ⁹

Quadro 8A – Peso do fígado de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (gramas)

	Basal	Controle	<i>L acidophilus</i> CH5	<i>L acidophilus</i> NCFM	<i>L. casei</i> spp.
1	10,80	14,35	12,63	13,66	12,28
2	11,04	12,60	11,21	11,03	13,14
3	12,28	14,33	13,22	12,22	11,68
4	11,36	11,77	13,72	11,99	12,25
5	12,69	10,31	12,22	11,38	12,25
6	11,69	11,80	10,85	13,11	11,05
7	11,58	10,10	10,37	10,63	11,35
8	10,02	11,57	12,54	13,95	12,85
Média	11,43	12,10	12,10	12,25	12,11
DP	0,84	1,60	1,18	1,23	0,71

Quadro 9A – Peso do baço de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (gramas)

	Basal	Controle	<i>L acidophilus</i> CH5	<i>L acidophilus</i> NCFM	<i>L. casei</i> spp.
1	1,19	2,35	1,10	2,14	1,55
2	1,60	1,59	1,09	1,53	1,94
3	1,10	1,42	1,48	1,20	1,57
4	0,58	1,15	1,70	1,51	2,03
5	1,05	1,08	1,30	1,79	1,26
6	1,35	0,37	2,42	1,26	1,65
7	0,75	0,44	1,74	1,14	1,20
8	0,73	0,22	1,04	1,20	1,41
Média	1,04	1,08	1,48	1,47	1,58
DP	0,34	0,72	0,47	0,35	0,30

Quadro 10A – Colesterol total de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)

Colesterol Total (mg/dL)					
	Basal	Controle	<i>L acidophilus</i> CH5	<i>L acidophilus</i> NCFM	<i>L. casei</i> spp.
1	102,70	104,30	122,20	139,00	105,10
2	85,60	137,80	100,70	137,80	113,10
3	110,70	90,30	103,90	124,70	118,70
4	111,10	76,00	126,60	119,50	104,70
5	91,10	90,70	121,90	111,10	117,10
6	86,00	113,10	107,10	85,60	87,60
7	95,50	145,00	107,90	133,80	119,50
8	98,30	92,30	187,30	123,50	109,10
Média	97,63	106,19	122,20	121,88	109,36
DP	10,04	24,36	28,00	17,47	10,54

Quadro 11A – HDL-C de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)

	HDL-C (mg/dL)				
	Basal	Controle	<i>L acidophilus</i> CH5	<i>L acidophilus</i> NCFM	<i>L. casei</i> spp.
1	48,10	51,40	41,23	45,90	44,30
2	37,20	49,20	43,70	45,40	36,10
3	48,10	37,20	33,90	43,70	46,40
4	62,30	42,60	42,10	45,40	36,60
5	46,40	38,80	45,40	42,10	44,30
6	48,10	45,40	41,50	38,30	30,10
7	49,70	49,70	35,00	49,20	42,10
8	49,20	40,40	47,00	48,10	47,50
Média	48,64	44,34	41,23	44,76	40,93
DP	6,81	5,39	4,63	3,44	6,05

Quadro 12A – VLDL + LDL-C de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)

	VLDL + LDL-C (mg/dL)				
	Basal	Controle	<i>L acidophilus</i> CH5	<i>L acidophilus</i> NCFM	<i>L. casei</i> spp.
1	54,60	52,90	80,97	93,10	60,80
2	48,40	88,60	57,00	92,40	77,00
3	62,60	53,10	70,00	81,00	72,30
4	48,80	33,40	84,50	74,10	68,10
5	44,70	51,90	76,50	69,00	72,80
6	37,90	67,70	65,60	47,30	57,50
7	45,80	95,30	72,90	84,60	77,40
8	49,10	51,90	140,30	75,40	61,60
Média	48,99	61,85	80,97	77,11	68,44
DP	7,26	20,81	25,49	14,77	7,68

Quadro 13A – Triglicerídios de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)

	Triglicerídios (mg/dL)				
	Basal	Controle	<i>L acidophilus</i> CH5	<i>L acidophilus</i> NCFM	<i>L. casei</i> spp.
1	162,70	131,90	134,73	136,00	97,50
2	95,70	166,20	89,80	192,30	125,90
3	247,40	131,90	117,00	138,40	137,80
4	135,40	86,80	136,60	158,50	133,60
5	158,50	77,90	144,90	140,10	167,40
6	87,40	131,90	127,70	141,90	120,00
7	121,20	133,00	175,70	231,40	148,40
8	119,40	92,10	151,40	97,50	132,40
Média	140,96	118,96	134,73	154,51	132,88
DP	50,59	30,17	25,20	40,66	20,44

Quadro 14A – Índice aterogênico de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)

	Basal	Controle	<i>L. acidophilus</i> CH5	<i>L. acidophilus</i> NCFM	<i>L. casei</i> spp.
1	1,14	1,03	1,96	2,03	1,37
2	1,30	1,80	1,30	2,04	2,13
3	1,30	1,43	2,06	1,85	1,56
4	0,78	0,78	2,01	1,63	1,86
5	0,96	1,34	1,69	1,64	1,64
6	0,79	1,49	1,58	1,23	1,91
7	0,92	1,92	2,08	1,72	1,84
8	1,00	1,28	2,99	1,57	1,30
Média	1,02	1,38	1,96	1,71	1,70
DP	0,19	0,37	0,50	0,26	0,29

Quadro 15A – Ácidos biliares séricos de ratos suplementados com diferentes culturas de lactobacilos (pré-tratamento)

	Basal	Controle	<i>L. acidophilus</i> CH5	<i>L. acidophilus</i> NCFM	<i>L. casei</i> spp.
1	1,17	0,80	0,73	0,82	0,59
2	0,99	0,60	0,70	0,75	0,79
3	1,47	0,87	0,64	0,67	0,63
4	0,82	0,74	0,53	0,65	0,78
5	1,01	1,10	0,79	0,69	0,68
6	1,41	0,82	0,81	0,61	0,68
7	0,82	0,70	1,03	1,29	0,77
8	0,82	0,63	0,62	0,49	0,68
Média	1,06	0,78	0,73	0,75	0,70
DP	0,26	0,16	0,15	0,24	0,07

Quadro 16A – Unidade formadora de colônias (UFC/mL) das doses de *L. casei* spp. administrados aos ratos (0,1 mL)

	UFC/mL		
	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	3,0 x 10 ⁵	2,9 x 10 ⁷	3,8 x 10 ⁹
2	3,0 x 10 ⁵	2,9 x 10 ⁷	3,8 x 10 ⁹
3	5,5 x 10 ⁵	7,0 x 10 ⁷	7,0 x 10 ⁹
4	5,5 x 10 ⁵	7,0 x 10 ⁷	7,0 x 10 ⁹
5	5,5 x 10 ⁵	7,0 x 10 ⁷	7,0 x 10 ⁹
6	2,4 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁷	3,5 x 10 ⁹
7	2,4 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁷	3,5 x 10 ⁹
8	2,4 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁷	3,5 x 10 ⁹
9	7,8 x 10 ⁵	7,4 x 10 ⁷	6,7 x 10 ⁹
10	7,8 x 10 ⁵	7,4 x 10 ⁷	6,7 x 10 ⁹
11	7,8 x 10 ⁵	7,4 x 10 ⁷	6,7 x 10 ⁹
12	2,5 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁷	2,2 x 10 ⁹
13	2,5 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁷	2,2 x 10 ⁹
14	2,5 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁷	2,2 x 10 ⁹
Média	4,3 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁹

Quadro 17A – Efeito de diferentes concentrações de *L. casei* spp. no ganho de peso diário de ratos normocolesterolêmicos

	Ganho de Peso (g/dia)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	3,93	2,57	2,50	1,43
2	2,57	3,57	2,43	2,57
3	1,21	2,64	2,21	2,71
4	2,50	4,50	2,14	2,93
5	2,64	2,14	2,93	2,21
6	2,07	1,86	2,07	3,50
7	2,64	2,21	3,43	3,50
8	2,43	3,50	1,86	1,50
Média	2,50	2,88	2,45	2,54
DP	0,75	0,90	0,51	0,80

Quadro 18A – Efeito de diferentes concentrações de *L. casei* spp. no ganho de peso diário de ratos hipercolesterolêmicos

	Ganho de Peso (g/dia)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	4,43	1,21	2,64	2,93
2	2,57	7,71	3,86	2,93
3	3,36	2,57	3,64	2,93
4	2,50	3,00	2,57	4,07
5	3,64	1,71	4,93	2,36
6	2,98	3,43	3,00	3,29
7	2,86	2,93	2,86	4,21
8	1,50	2,21	2,86	3,79
Média	2,98	3,10	3,29	3,31
DP	0,87	2,00	0,80	0,65

Quadro 19A – Efeito de diferentes concentrações de *L. casei* spp. no consumo alimentar diário de ratos normocolesterolêmicos

	Consumo Alimentar (g/dia)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	20,51	19,26	18,48	16,82
2	19,49	21,26	17,74	16,91
3	18,19	19,27	15,64	18,41
4	18,72	21,30	16,86	19,08
5	17,99	17,96	17,65	15,65
6	18,64	16,68	16,21	18,31
7	16,69	17,20	19,06	18,66
8	18,43	17,40	16,31	14,46
Média	18,58	18,79	17,24	17,29
DP	1,11	1,79	1,19	1,62

Quadro 20A – Efeito de diferentes concentrações de *L. casei* spp. no consumo alimentar diário de ratos hipercolesterolêmicos

	Consumo Alimentar (g/dia)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	17,88	14,34	15,56	19,60
2	16,87	22,63	19,66	17,07
3	16,34	17,84	20,26	16,63
4	15,66	18,02	17,24	18,28
5	18,45	11,61	20,07	16,69
6	17,20	19,35	15,18	17,38
7	18,98	17,80	14,44	16,94
8	16,21	16,05	17,99	16,95
Média	17,20	17,20	17,55	17,44
DP	1,16	3,30	2,32	1,02

Quadro 21A – Efeito de diferentes concentrações de *L. casei* spp. na conversão alimentar diária de ratos normocolesterolêmicos

	Conversão Alimentar (%)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	19,16	13,35	13,53	8,49
2	13,19	16,80	13,69	15,21
3	6,68	13,71	14,16	14,74
4	13,35	21,13	12,71	15,35
5	14,69	11,93	16,59	14,15
6	11,11	11,13	12,78	19,12
7	15,84	12,87	17,98	18,76
8	13,18	20,11	11,38	10,37
Média	13,45	15,30	14,19	14,72
DP	3,61	3,78	2,17	3,66

Quadro 22A – Efeito de diferentes concentrações de *L. casei* spp. na conversão alimentar diária de ratos hipercolesterolêmicos

	Conversão Alimentar (%)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	24,77	8,47	16,99	14,94
2	15,24	34,09	19,62	17,15
3	20,54	14,42	17,98	17,61
4	15,96	16,65	14,92	22,27
5	19,74	14,76	24,56	14,13
6	17,22	17,72	19,76	18,91
7	15,05	16,45	19,79	24,88
8	9,25	13,80	15,88	22,33
Média	17,22	18,01	18,77	18,99
DP	4,60	7,44	3,00	3,82

Quadro 23A – Viabilidade de células de lactobacilos em conteúdo colônico de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	Lactobacilos Log ₁₀ UFC/g			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	5,54	7,04	6,70	7,67
2	6,52	6,81	7,41	7,10
3	7,04	6,85	6,49	7,37
4	7,01	7,02	7,01	7,45
5	7,06	6,73	6,77	7,84
6	6,80	6,50	6,69	7,95
Média	6,66	6,82	6,85	7,56
DP	0,59	0,20	0,32	0,32

Quadro 24A – Viabilidade de células de lactobacilos em conteúdo colônico de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	Lactobacilos (Log UFC/g)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	4,22	3,95	4,36	6,62
2	4,48	4,26	4,43	5,37
3	4,94	4,44	5,85	6,28
4	3,79	4,21	5,21	6,35
5	5,18	5,27	5,25	6,82
6	5,38	5,36	5,49	6,38
Média	4,67	4,58	5,10	6,30
DP	0,61	0,59	0,59	0,50

Quadro 25A – Peso do fígado de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	Peso do Fígado (mg)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	10,30	10,56	11,38	9,15
2	11,89	10,06	11,45	9,85
3	8,79	11,21	9,05	10,65
4	8,98	12,04	9,65	10,45
5	10,30	11,12	9,15	10,55
6	10,65	9,49	11,25	10,05
7	9,28	9,06	11,15	8,55
8	9,24	8,05	9,75	9,45
Média	9,93	10,20	10,35	9,84
DP	1,05	1,30	1,05	0,74

Quadro 26A – Peso do fígado de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	Peso do Fígado (mg)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	13,35	14,35	14,45	12,15
2	13,25	15,55	16,05	12,55
3	13,25	14,35	15,05	11,65
4	12,55	15,45	14,85	12,95
5	14,95	10,85	15,45	12,65
6	13,22	17,65	11,65	11,45
7	14,05	13,55	12,05	12,15
8	11,15	13,75	15,45	11,15
Média	13,22	14,44	14,38	12,09
DP	1,10	1,95	1,63	0,63

Quadro 27A – Peso do baço de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	Peso do baço (mg)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	1,18	0,80	1,17	1,45
2	1,28	1,06	1,35	1,05
3	1,06	1,40	0,95	1,45
4	1,21	1,61	1,45	0,85
5	1,00	1,86	1,05	1,45
6	1,10	1,29	1,25	0,95
7	0,85	1,18	0,95	1,25
8	1,65	0,81	1,15	1,15
Média	1,17	1,25	1,17	1,20
DP	0,24	0,37	0,18	0,24

Quadro 28A – Peso do baço de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	Peso do Baço (mg)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	0,96	0,95	1,35	1,05
2	1,05	1,45	1,35	1,05
3	1,45	1,15	1,25	0,85
4	1,25	1,65	1,25	1,65
5	1,25	1,05	1,25	1,15
6	1,24	1,45	1,05	0,95
7	1,45	1,05	1,65	1,15
8	1,25	0,85	1,05	1,05
Média	1,24	1,20	1,28	1,11
DP	0,17	0,28	0,19	0,24

Quadro 29A – Colesterol total de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	Colesterol Total (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	78,80	103,90	76,00	85,20
2	99,10	95,90	86,80	101,10
3	84,40	81,20	92,30	88,40
4	84,40	103,90	91,10	90,30
5	95,50	89,20	92,70	91,90
6	86,00	84,80	93,10	89,60
7	95,90	69,60	105,10	80,80
8	76,80	68,80	105,50	110,30
Média	87,61	87,16	92,83	92,20
DP	8,29	13,77	9,52	9,34

Quadro 30A – Colesterol total de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	Colesterol Total (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	154,60	105,50	116,70	91,50
2	110,30	109,90	122,70	180,50
3	135,00	97,90	91,10	84,40
4	93,90	99,50	102,30	99,90
5	98,70	89,60	123,90	175,30
6	115,30	184,90	169,30	117,10
7	118,70	107,50	135,00	143,00
8	95,90	126,60	116,70	105,50
Média	115,30	115,18	122,21	124,65
DP	20,97	30,17	23,33	37,37

Quadro 31A – HDL-C de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	HDL-C (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	40,40	47,00	35,00	39,90
2	47,00	44,80	36,60	39,90
3	39,90	40,40	33,30	37,20
4	37,70	49,70	36,60	44,80
5	38,80	45,40	39,90	42,10
6	31,70	36,60	39,90	41,00
7	39,90	39,90	48,10	32,20
8	39,90	34,40	45,90	44,80
Média	39,41	42,28	39,41	40,24
DP	4,18	5,30	5,22	4,14

Quadro 32A – HDL-C de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	HDL-C (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	36,10	28,40	32,80	29,50
2	29,00	51,90	31,10	42,10
3	41,00	27,90	31,70	33,30
4	34,40	33,30	35,50	35,00
5	31,70	31,10	30,60	39,90
6	34,99	38,30	33,30	41,00
7	36,10	23,00	33,30	26,20
8	36,60	35,00	39,30	31,10
Média	34,99	33,61	33,45	34,76
DP	3,55	8,76	2,82	5,80

Quadro 33A – VLDL + LDL-C de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	VLDL + LDL-C (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	38,40	56,90	41,00	45,30
2	52,10	51,10	50,20	61,20
3	44,50	40,80	59,00	51,20
4	46,70	54,20	54,50	45,50
5	56,70	43,80	52,80	49,80
6	54,30	48,20	53,20	48,60
7	56,00	29,70	57,00	48,60
8	36,90	34,40	59,60	65,50
Média	48,20	44,89	53,41	51,96
DP	7,79	9,56	5,96	7,39

Quadro 34A – VLDL + LDL-C de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	VLDL + LDL-C (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	118,50	77,10	83,90	62,00
2	81,30	58,00	91,60	138,40
3	94,00	70,00	59,40	51,10
4	59,50	66,20	66,80	64,90
5	67,00	58,50	93,30	135,40
6	80,31	146,60	136,00	76,10
7	82,60	84,50	101,70	116,80
8	59,30	91,60	77,40	74,40
Média	80,31	81,56	88,76	89,89
DP	19,65	28,82	23,68	34,82

Quadro 35A – Triglicerídios de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	Triglicerídios (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	129,50	160,90	64,90	74,40
2	175,70	169,80	85,00	112,90
3	114,10	176,90	118,20	137,80
4	76,70	163,30	105,80	100,40
5	101,60	89,20	81,50	107,00
6	149,00	101,60	115,90	97,50
7	83,90	107,00	160,30	84,40
8	87,40	106,40	59,60	153,20
Média	114,74	134,39	98,90	108,45
DP	34,70	36,35	33,11	26,21

Quadro 36A – Triglicerídios de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	Triglicerídios (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	89,80	57,20	72,60	40,60
2	76,10	94,50	90,40	81,50
3	158,50	60,70	67,30	69,60
4	65,50	51,30	98,10	105,20
5	107,00	42,40	52,40	37,60
6	94,10	132,40	51,90	56,60
7	75,00	70,20	101,60	51,30
8	86,80	70,20	51,90	70,20
Média	94,10	72,36	73,28	64,08
DP	29,01	28,81	21,04	22,47

Quadro 37A – Índice aterogênico de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	0,95	1,21	1,17	1,14
2	1,11	1,14	1,37	1,53
3	1,12	1,01	1,77	1,38
4	1,24	1,09	1,49	1,02
5	1,46	0,96	1,32	1,18
6	1,71	1,32	1,33	1,19
7	1,40	0,74	1,19	1,51
8	0,92	1,00	1,30	1,46
Média	1,24	1,06	1,37	1,30
<i>L. casei</i> spp. DP	0,27	0,17	0,19	0,19

Quadro 38A – Índice aterogênico de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes concentrações de *L. casei* spp.

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	3,28	2,71	2,56	2,10
2	2,80	1,12	2,95	3,29
3	2,29	2,51	1,87	1,53
4	1,73	1,99	1,88	1,85
5	2,11	1,88	3,05	3,39
6	2,30	3,83	4,08	1,86
7	2,29	3,67	3,05	4,46
8	1,62	2,62	1,97	2,39
Média	2,30	2,54	2,68	2,61
DP	0,54	0,91	0,77	1,01

Quadro 39A – Colesterol hepático de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	21,56	6,73	2,67	6,36
2	20,03	8,01	8,56	7,84
3	18,42	11,93	2,40	6,88
4	10,06	13,69	13,08	5,77
5	31,29	10,04	0,77	15,20
6	24,27	16,59	21,50	9,23
7	23,02	1,56	9,14	6,86
8	18,07	7,32	13,34	4,94
Média	20,84	9,48	8,93	7,89
DP	6,06	4,66	7,00	3,23

Quadro 40A – Colesterol hepático de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	500,68	30,90	35,54	18,74
2	451,76	42,16	32,50	25,86
3	577,20	22,59	31,86	10,44
4	385,40	24,15	27,06	22,95
5	662,60	36,33	49,86	14,37
6	366,32	49,97	22,83	20,29
7	25,79	30,96	26,97	43,72
8	21,72	10,51	59,05	37,95
Média	373,93	30,94	35,71	24,29
DP	236,71	12,25	12,46	11,37

Quadro 41A – Colesterol fecal de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	1,94	4,35	8,84	6,77
2	7,46	3,67	7,46	12,97
3	1,60	9,18	4,35	11,59
4	1,25	1,94	9,18	4,70
5	5,73	5,39	5,39	10,90
6	9,18	9,52	9,87	5,73
7	7,80	6,77	6,77	3,67
8	6,08	10,90	1,94	4,35
Média	5,13	6,47	6,72	7,59
DP	3,11	3,17	2,70	3,67

Quadro 42A – Colesterol fecal de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	661,89	696,36	515,41	390,47
2	545,57	373,24	437,86	562,80
3	153,52	627,42	679,12	735,13
4	592,96	442,17	493,87	636,04
5	192,30	584,34	278,46	687,74
6	399,09	498,18	653,27	588,65
7	386,17	381,86	597,27	765,29
8	317,23	592,96	644,66	580,03
Média	406,09	524,57	537,49	618,27
DP	184,25	118,98	135,19	118,15

Quadro 43A – Ácidos biliares fecais de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	239,06	503,26	524,27	722,42
2	447,72	239,06	521,27	728,42
3	338,14	677,38	590,32	668,38
4	212,04	332,13	377,16	438,71
5	740,43	422,20	444,71	677,38
6	318,62	332,13	443,21	380,17
7	368,16	626,35	512,26	566,30
8	593,32	263,08	755,44	440,21
Média	407,19	424,45	521,08	577,75
DP	180,40	164,06	114,90	141,01

Quadro 44A – Ácidos biliares fecais de ratos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	746,43	830,50	641,36	707,41
2	536,28	596,32	1.204,27	1.061,66
3	776,46	800,47	979,10	705,90
4	1.091,69	680,39	890,54	842,50
5	434,21	548,29	1.139,72	949,08
6	701,40	890,54	530,28	617,34
7	677,38	710,41	596,32	617,34
8	797,47	815,48	701,40	1.219,28
Média	720,16	734,05	835,37	840,06
DP	194,80	120,56	255,86	220,26

Quadro 45A – Contagem bacteriana de *E. coli* em conteúdo colônico de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

(Log ₁₀ UFC/g)				
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	3,92	4,35	5,36	4,27
2	6,13	5,01	4,45	3,69
3	5,42	4,21	5,35	3,33
4	5,54	4,15	4,49	3,59
5	4,75	5,70	3,36	3,53
6	5,21	4,91	4,54	4,71
Média	5,16	4,72	4,59	3,85
DP	0,76	0,60	0,74	0,53

Quadro 46A – Atividade da enzima beta-d-glucuronide em ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	(μM/min.g de conteúdo colônico)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	0,40	0,39	0,28	0,17
2	0,42	0,35	0,42	0,33
3	0,41	0,40	0,42	0,42
4	0,40	0,42	0,31	0,17
5	0,42	0,42	0,41	0,40
6	0,42	0,42	0,42	0,32
Média	0,41	0,40	0,38	0,30
DP	0,01	0,03	0,06	0,11

Quadro 47A – Translocação de células de lactobacilos em baços de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	(UFC/órgão)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	1,55	0,60	1,55	2,55
2	0,81	2,10	2,60	1,67
3	2,57	2,40	1,93	3,01
4	1,48	2,29	1,97	0,93
5	1,30	3,24	1,50	2,90
6	2,66	0,81	2,69	1,76
7	2,60	0,07	1,68	2,00
8	1,22	0,61	2,70	2,64
Média	1,77	1,52	2,08	2,18
DP	0,73	1,13	0,51	0,72

Quadro 48A – Unidade formadora de colônia (UFC/mL) dos concentrados celulares de *L. casei* spp. administrados em coelhos (0,3 mL)

	UFC/mL		
	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	8,0 x 10 ⁶	8,2 x 10 ⁷	6,2 x 10 ⁹
2	8,0 x 10 ⁶	8,2 x 10 ⁷	6,2 x 10 ⁹
3	5,7 x 10 ⁵	4,8 x 10 ⁷	6,4 x 10 ⁹
4	5,7 x 10 ⁵	4,8 x 10 ⁷	6,4 x 10 ⁹
5	3,8 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁷	2,7 x 10 ⁹
6	3,8 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁷	2,7 x 10 ⁹
7	7,3 x 10 ⁵	6,4 x 10 ⁷	5,7 x 10 ⁹
8	7,3 x 10 ⁵	6,4 x 10 ⁷	5,7 x 10 ⁹
9	2,6 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁷	2,4 x 10 ⁹
10	2,6 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁷	2,4 x 10 ⁹
11	6,5 x 10 ⁵	6,5 x 10 ⁷	7,1 x 10 ⁹
12	6,5 x 10 ⁵	6,5 x 10 ⁷	7,1 x 10 ⁹
13	6,2 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁷	6,1 x 10 ⁹
14	6,2 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁷	6,1 x 10 ⁹
Média	5,7 x 10 ⁵	5,2 x 10 ⁷	5,2 x 10 ⁹

Quadro 49A – Efeito de diferentes doses de *L. casei* spp. no ganho de peso diário de coelhos normocolesterolêmicos

	Ganho de Peso (g/dia)			
	Controle	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	10 ⁹ UFC/mL
1	2,50	8,21	12,50	12,86
2	12,50	11,79	5,71	16,79
3	11,79	7,50	11,79	6,79
4	17,86	15,00	13,93	16,43
5	8,21	14,64	12,50	5,36
6	13,93	8,57	8,57	17,14
Média	11,13	10,95	10,83	12,56
DP	5,26	3,34	3,08	5,28

Quadro 50A – Efeito de diferentes doses de *L. casei* spp. no ganho de peso diário de coelhos hipercolesterolêmicos

	Ganho de Peso (g/dia)			
	Controle	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	10 ⁹ UFC/mL
1	18,21	16,07	16,43	15,71
2	4,29	13,21	38,57	11,07
3	10,36	13,93	13,57	0,00
4	9,64	14,29	15,00	2,14
5	6,79	0,00	10,71	13,21
6	13,93	15,71	13,93	14,64
Média	10,54	12,20	18,04	9,46
DP	4,99	6,08	10,24	6,72

Quadro 51A – Efeito de diferentes doses de *L. casei* spp. no consumo alimentar diário de coelhos normocolesterolêmicos

	Consumo Alimentar (g/dia)			
	Controle	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	10 ⁹ UFC/mL
1	112,62	111,36	114,04	116,22
2	113,14	110,79	114,38	117,11
3	116,31	104,66	112,45	103,50
4	115,24	114,04	112,49	115,69
5	109,38	114,89	113,42	108,87
6	111,99	109,44	116,42	114,55
Média	113,11	110,86	113,87	112,66
DP	2,46	3,66	1,48	5,36

Quadro 52A – Efeito de diferentes doses de *L. casei* spp. no consumo alimentar diário de coelhos hipercolesterolêmicos

	Consumo Alimentar (g/dia)			
	Controle	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	10 ⁹ UFC/mL
1	105,94	115,76	119,91	119,81
2	117,94	105,99	119,51	119,13
3	112,81	116,87	117,26	84,37
4	112,29	114,21	116,29	92,69
5	120,00	101,46	119,48	120,00
6	111,84	114,69	117,64	117,11
Média	113,47	111,50	118,35	108,85
DP	4,97	6,26	1,48	15,99

Quadro 53A – Efeito de diferentes doses de *L. casei* spp. na conversão de coelhos normocolesterolêmicos

	Conversão Alimentar (%)			
	Controle	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	10 ⁹ UFC/mL
1	2,22	7,38	10,96	11,06
2	11,05	10,64	5,00	14,33
3	10,13	7,17	10,48	6,56
4	15,50	13,15	12,38	14,20
5	7,51	12,75	11,02	4,92
6	12,44	7,83	7,36	14,97
Média	9,81	9,82	9,53	11,01
DP	4,56	2,73	2,78	4,33

Quadro 54A – Efeito de diferentes doses de *L. casei* spp. na conversão de coelhos hipercolesterolêmicos

	Conversão Alimentar (%)			
	Controle	10 ⁵ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	10 ⁹ UFC/mL
1	17,19	13,88	13,70	13,12
2	3,63	12,47	32,27	9,29
3	9,18	11,92	11,57	0,00
4	8,59	12,51	12,90	2,31
5	5,65	0,00	8,97	11,01
6	12,45	13,70	11,84	12,50
Média	9,45	10,75	15,21	8,04
DP	4,86	5,32	8,51	5,54

Quadro 55A – pH do conteúdo duodenal, íleo e colônico de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Duodeno				Íleo				Cólono			
	0	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁹	0	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁹	0	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁹
1	7,20	7,84	7,20	7,73	7,50	8,31	9,31	8,09	7,01	7,28	7,16	6,92
2	7,25	6,75	5,61	7,54	8,92	8,28	8,88	8,58	7,04	7,06	7,22	7,27
3	6,79	7,69	7,77	7,58	7,74	8,24	7,92	8,15	7,44	7,66	7,57	6,94
4	8,21	8,52	7,31	8,15	8,04	9,21	8,18	8,43	7,22	7,69	7,78	6,62
5	7,62	8,24	8,32	7,24	8,14	7,41	8,51	8,36	6,74	6,97	6,86	7,49
6	7,74	8,21	7,68	7,90	8,60	8,23	7,29	8,38	7,65	7,90	7,26	7,18
Média	7,47	7,88	7,32	7,69	8,16	8,28	8,35	8,33	7,18	7,43	7,31	7,07
DP	0,50	0,63	0,92	0,31	0,53	0,57	0,72	0,18	0,33	0,38	0,32	0,31

Quadro 56A – pH do conteúdo duodenal, íleo e colônico de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Duodeno				Íleo				Cólono			
	0	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁹	0	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁹	0	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁹
1	7,70	6,65	7,83	8,14	8,38	8,07	8,42	8,64	6,87	7,16	6,42	6,93
2	6,68	8,32	8,08	6,01	8,25	8,05	7,92	7,71	7,11	7,01	6,61	7,20
3	7,06	7,77	8,02	8,57	8,92	8,50	8,63	8,68	6,87	7,10	7,14	7,11
4	7,06	7,92	8,09	8,14	7,42	7,72	8,74	8,74	6,95	7,51	7,15	7,35
5	7,76	8,37	8,98	8,04	7,96	9,15	7,70	8,33	7,26	7,37	6,78	6,59
6	8,03	7,70	7,51	7,86	8,53	8,58	7,45	7,90	6,82	7,80	6,57	6,50
Média	7,38	7,79	8,09	7,79	8,24	8,35	8,14	8,33	6,98	7,33	6,78	6,95
DP	0,52	0,62	0,49	0,90	0,51	0,51	0,53	0,44	0,17	0,30	0,31	0,34

Quadro 57A – Viabilidade de células de lactobacilos em conteúdo colônico de ratos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Lactobacilos			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
Média	0	0	0	0
DP	0	0	0	0

Quadro 58A – Viabilidade de células de lactobacilos em conteúdo colônico de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Lactobacilos (Log UFC/g)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
Média	0	0	0	0
DP	0	0	0	0

Quadro 59A – Peso do fígado de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Peso do Fígado (mg)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	68,85	76,78	79,51	79,14
2	76,74	70,89	61,06	86,55
3	67,64	54,22	73,98	62,40
4	63,82	76,32	77,08	96,71
5	78,50	76,24	74,59	75,38
6	86,26	57,05	74,92	78,28
Média	73,64	68,58	73,52	79,74
DP	8,34	10,30	6,44	11,46

Quadro 60A – Peso do fígado de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Peso do Fígado (mg)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	81,60	100,77	125,16	118,62
2	76,57	92,48	118,88	83,03
3	97,49	107,29	83,95	57,05
4	112,96	107,03	112,16	61,01
5	115,84	75,94	75,12	102,37
6	83,40	101,35	104,87	89,74
Média	94,64	97,48	103,36	85,30
DP	16,83	11,85	19,85	23,73

Quadro 61A – Peso do baço de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Peso do baço (mg)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	1,20	2,14	0,93	0,77
2	0,96	1,98	0,82	1,37
3	1,20	0,86	1,57	0,78
4	0,73	1,09	1,21	2,41
5	3,01	1,30	0,77	1,99
6	0,91	0,88	1,12	1,47
Média	1,32	1,38	1,07	1,60
DP	0,84	0,56	0,30	0,65

Quadro 62A – Peso do baço de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Peso do baço (mg)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	0,91	0,81	1,25	1,32
2	1,37	1,16	1,16	0,71
3	0,60	1,03	1,30	1,14
4	1,37	0,86	0,62	1,03
5	1,90	1,22	1,51	0,95
6	1,72	1,36	1,36	2,08
Média	1,31	1,07	1,20	1,21
DP	0,49	0,21	0,31	0,47

Quadro 63A – Colesterol total de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Colesterol total (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	122,70	114,30	105,50	90,00
2	81,60	122,30	100,70	61,20
3	117,50	143,40	125,10	46,10
4	84,80	131,80	84,80	118,70
5	115,90	123,50	66,00	144,60
6	70,00	53,30	82,80	99,90
Média	98,75	114,77	94,15	93,42
DP	22,51	31,69	20,68	36,30

Quadro 64A – Colesterol total de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Colesterol Total (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	1.672,00	1.686,00	1.646,00	1.924,00
2	2.384,00	1.118,00	1.585,00	1.834,00
3	2.498,00	2.005,00	1.946,00	1.573,00
4	1.890,00	1.780,00	2.005,00	910,50
5	1.876,00	1.006,00	1.351,00	1.980,00
6	1.469,00	2.237,00	1.890,00	1.455,00
Média	1.964,83	1.638,67	1.737,17	1.612,75
DP	401,26	486,99	252,70	400,08

Quadro 65A – HDL-C de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	HDL-C (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	40,20	32,50	41,40	38,90
2	25,50	45,30	33,80	24,90
3	40,20	27,40	25,50	21,00
4	55,50	44,00	30,60	33,80
5	48,40	37,00	26,80	42,70
6	17,80	30,60	34,40	37,00
Média	37,93	36,13	32,08	33,05
DP	14,06	7,30	5,81	8,43

Quadro 66A – HDL-C de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	HDL-C (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	108,40	98,80	91,80	119,80
2	130,00	98,20	124,90	123,60
3	121,70	116,00	133,20	86,70
4	110,90	120,50	73,90	54,20
5	86,70	49,10	79,70	61,80
6	105,20	139,60	111,50	91,10
Média	110,48	103,70	102,50	89,53
DP	14,86	30,85	24,40	28,65

Quadro 67A – VLDL + LDL-C de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	VLDL + LDL-C (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	82,50	81,80	64,10	51,10
2	56,10	77,00	66,90	36,30
3	77,30	116,00	99,60	25,10
4	29,30	87,80	54,20	84,90
5	67,50	86,50	39,20	101,90
6	52,20	22,70	48,40	62,90
Média	60,82	78,63	62,07	60,37
DP	19,37	30,61	21,01	29,13

Quadro 68A – VLDL + LDL-C de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	VLDL + LDL-C (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	1.563,60	1.587,20	1.554,20	1.804,20
2	2.254,00	1.019,80	1.460,10	1.710,40
3	2.376,30	1.889,00	1.812,80	1.486,30
4	1.779,10	1.659,50	1.931,10	856,30
5	1.789,30	956,90	1.271,30	1.918,20
6	1.363,80	2.097,40	1.778,50	1.363,90
Média	1.854,35	1.534,97	1.634,67	1.523,22
DP	391,72	460,32	248,71	385,10

Quadro 69A – Triglicerídios de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Triglicerídios (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	120,00	210,70	166,20	124,70
2	154,40	98,70	173,30	108,70
3	130,10	185,20	192,30	61,90
4	63,70	204,10	112,30	143,10
5	86,80	127,70	141,10	102,20
6	187,60	51,90	99,30	149,60
Média	123,77	146,38	147,42	115,03
DP	44,82	64,07	36,40	31,95

Quadro 70A – Triglicerídios de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Triglicerídios (mg/dL)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	156,10	68,40	107,00	95,70
2	83,90	81,50	63,70	37,00
3	95,70	116,40	91,60	84,40
4	56,00	88,00	163,30	34,70
5	141,90	34,70	48,90	57,80
6	62,50	166,20	61,30	53,00
Média	99,35	92,53	89,30	60,43
DP	41,28	44,87	42,11	24,87

Quadro 71A – Índice aterogênico de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	2,05	2,52	1,55	1,31
2	2,20	1,70	1,98	1,46
3	1,92	4,23	3,91	1,20
4	0,53	2,00	1,77	2,51
5	1,39	2,34	1,46	2,39
6	2,93	0,74	1,41	1,70
Média	1,84	2,25	2,01	1,76
DP	0,81	1,15	0,95	0,56

Quadro 72A – Índice aterogênico de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	14,42	16,06	16,93	15,06
2	17,34	10,38	11,69	13,84
3	19,53	16,28	13,61	17,14
4	16,04	13,77	26,13	15,80
5	20,64	19,49	15,95	31,04
6	12,96	15,02	15,95	14,97
Média	16,82	15,17	16,71	17,98
DP	2,95	3,02	5,00	6,49

Quadro 73A – Colesterol hepático de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp. (mg/g de fígado)

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	0,73	0,87	0,89	0,65
2	0,73	0,78	0,86	0,96
3	1,03	0,23	0,90	0,78
4	0,45	0,39	0,56	0,46
5	0,73	0,50	0,74	0,89
6	0,72	1,30	0,50	0,75
Média	0,73	0,68	0,74	0,75
DP	0,18	0,39	0,18	0,18

Quadro 74A – Colesterol hepático de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	2,89	2,57	3,24	0,09
2	7,55	3,96	3,26	2,93
3	0,91	5,21	3,64	3,05
4	2,84	2,68	2,71	3,47
5	2,44	2,11	2,11	1,77
6	5,56	2,29	1,78	0,62
Média	3,70	3,14	2,79	1,99
DP	2,41	1,20	0,73	1,39

Quadro 75A – Colesterol fecal de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp. (mg/100 g de fezes)

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	5,55	5,12	7,56	5,40
2	6,70	6,27	5,55	7,27
3	9,86	5,69	10,57	9,28
4	7,70	7,56	7,27	11,58
5	7,13	6,98	7,70	10,57
6	4,11	9,71	8,56	3,68
Média	6,84	6,89	7,87	7,97
DP	1,95	1,64	1,65	3,07

Quadro 76A – Colesterol fecal de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	28,04	31,78	37,52	30,05
2	22,59	24,02	26,03	36,37
3	19,43	29,48	29,48	35,22
4	24,60	26,61	20,86	32,35
5	21,44	33,21	32,06	38,38
6	34,07	27,47	34,36	24,02
Média	25,03	28,76	30,05	32,73
DP	5,32	3,41	5,99	5,19

Quadro 77A – Ácidos biliares fecais de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	111,97	253,07	272,09	237,06
2	136,99	173,88	229,06	361,15
3	409,19	277,09	256,08	270,09
4	222,05	310,11	252,50	209,04
5	223,05	240,06	300,11	193,03
6	407,19	289,10	286,10	320,42
Média	251,74	257,22	265,99	265,13
DP	129,12	47,89	25,49	65,47

Quadro 78A – Ácidos biliares fecais de coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	195,03	289,10	233,06	240,06
2	127,98	349,14	405,18	505,26
3	145,99	177,02	385,17	278,09
4	126,98	347,14	191,03	230,06
5	104,96	250,07	257,08	212,04
6	413,19	174,02	240,06	216,05
Média	185,69	264,41	285,26	280,26
DP	115,51	78,29	88,10	112,73

Quadro 79A – Contagem bacteriana de *E. coli* em conteúdo colônico de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

(Log UFC/g)				
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	1,00	5,00	1,00	3,71
2	4,47	1,00	4,01	4,54
3	1,00	4,03	3,49	1,00
4	3,64	4,09	3,50	4,36
5	4,50	3,63	3,72	1,00
6	4,86	1,00	1,00	4,09
Média	3,25	3,12	2,79	3,12
DP	1,78	1,70	1,40	1,66

Quadro 80A – Contagem bacteriana de *Clostridium* spp. em conteúdo colônico de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	(Log UFC/g)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	1,40	1,00	1,40	2,88
2	0,70	1,54	1,40	0,70
3	1,00	2,73	1,30	2,13
4	1,60	1,24	1,00	1,00
5	2,00	1,95	1,40	2,32
6	2,27	1,70	2,81	1,48
Média	1,49	1,69	1,55	1,75
DP	0,59	0,61	0,64	0,83

Quadro 81A – Atividade da enzima beta-d-glucuronide em coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	μM/min.g			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	0,18	0,18	0,16	0,19
2	0,17	0,20	0,15	0,15
3	0,18	0,12	0,13	0,17
4	0,16	0,17	0,18	0,19
5	0,22	0,17	0,16	0,17
6	0,16	0,20	0,17	0,17
Média	0,18	0,17	0,16	0,17
DP	0,02	0,03	0,02	0,02

Quadro 82A – Translocação de células de lactobacilos em baços de coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

	(Log UFC/g)			
	Controle	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
1	0,08	1,33	1,90	2,21
2	2,20	2,27	1,65	0,14
3	0,68	1,41	2,61	1,37
4	2,21	2,02	0,78	1,68
5	0,56	0,11	1,54	2,17
6	1,78	1,42	1,98	2,61
Média	1,25	1,43	1,74	1,70
DP	0,92	0,75	0,60	0,88

Quadro 83A – Comprimento das vilosidades intestinais do íleo de ratos e coelhos normocolesterolêmicos suplementados com diferentes doses de *L. casei* spp.

Comprimento do Vilo (mm)								
n	Ratos				Coelhos			
	Controle	10 ⁴ UFC/ mL	10 ⁶ UFC/ mL	10 ⁸ UFC/ mL	Controle	10 ⁵ UFC/ mL	10 ⁷ UFC/ /mL	10 ⁹ UFC/ mL
1	195,96	263,74	350,16	416,30	487,7	372,4	533,2	585,0
2	196,91	236,56	333,58	327,68	464,2	367,0	522,6	543,0
3	214,68	281,43	303,09	366,16	401,9	393,4	718,8	495,6
4	215,74	178,73	387,59	402,19	326,3	483,3	695,2	594,7
5	154,36	298,67	260,77	328,21	422,3	287,1	680,4	597,0
6	169,72	302,32	272,09	377,92	417,3	438,3	520,2	604,6
7	146,91	295,46	249,74	364,61	431,8	416,1	728,9	634,2
8	121,75	220,27	266,72	338,87	330,9	442,0	719,2	566,0
9	143,75	317,61	279,20	348,90	493,8	396,1	563,3	524,1
10	128,67	313,46	304,86	381,56	373,8	384,6	563,8	512,2
11	128,26	311,61	326,24	377,68	388,6	364,3	620,4	676,1
12	124,95	326,00	308,00	375,40	427,2	385,1	661,8	604,2
13	138,28	325,92	287,96	347,76	313,3	409,5	547,2	521,9
14	171,17	202,59	262,24	363,14	407,0	408,7	537,5	556,9
15	150,78	299,56	297,77	360,56	392,7	294,3	585,3	587,1
16	178,25	175,41	274,07	357,75	389,0	449,6	561,7	595,5
17	167,18	270,08	275,05	330,39	370,9	373,9	589,3	613,1
18	169,91	169,69	327,98	382,41	440,3	360,7	548,0	490,8
19	182,92	292,60	274,99	394,19	418,7	317,5	567,0	578,8
20	182,09	117,93	295,04	361,62	476,5	358,9	305,2	399,8
21	147,72	127,79	326,27	308,74	358,0	331,7	306,7	546,4
22	171,20	200,89	335,89	355,15	342,9	253,4	499,3	668,7
23	165,16	211,23	323,31	344,17	308,0	238,4	513,5	596,0
24	186,11	213,42	308,12	353,87	344,1	269,4	453,2	600,0
25	161,87	265,85	298,07	391,98	575,2	252,3	429,0	617,8
26	149,42	171,83	302,52	411,99	598,8	388,1	482,7	510,0
27	165,04	129,40	290,80	321,03	543,2	367,1	538,1	485,6
28	143,97	301,73	310,05	351,43	548,3	372,0	455,6	551,0
29	129,35	300,65	263,54	378,54	471,2	428,7	328,0	467,6
30	145,96	141,76	302,73	272,60	374,5	309,2	313,9	570,7
31	128,63	242,18	254,83	215,00	477,9	386,4	450,9	537,7
32	117,58	170,51	306,28	210,33	638,0	372,7	330,9	484,1
33	327,21	228,81	261,12	223,00	547,3	389,4	377,8	533,3
34	313,84	295,00	316,29	232,99	616,3	368,4	408,0	519,9
35	352,94	177,03	358,01	326,45	601,0	331,4	380,5	566,0
36	307,29	141,98	360,89	294,00	595,3	350,5	452,3	449,4
37	260,69	183,78	293,62	315,69	535,0	365,9	472,0	498,0
38	234,21	379,60	302,94	282,64	517,0	311,4	384,7	345,0
39	247,39	290,64	369,59	296,04	510,3	443,6	512,2	486,4
40	250,57	276,47	315,89	305,76	430,2	401,1	360,6	556,8
41	320,13	245,22	373,93	293,34	343,9	352,6	364,3	632,1
42	288,98	244,80	340,15	274,90	433,2	384,8	450,0	585,5
43	296,80	290,94	260,83	258,84	444,6	384,4	386,9	566,4
44	250,55	278,99	281,53	248,66	483,7	373,9	476,1	566,4
45	345,22	247,35	266,46	285,11	481,3	334,7	375,0	678,0
46	254,27	246,37	254,00	280,85	372,6	336,9	414,4	643,3
47	242,75	235,78	265,53	288,54	379,4	612,1	336,9	613,3
48	339,97	229,97	261,26	278,99	401,0	536,8	427,7	695,2
49	346,30	224,18	317,61	297,00	459,0	600,6	324,5	600,5
50	298,71	240,07	271,48	316,47	576,6	461,2	420,5	682,9

Continua...

Quadro 83A, Cont.

Comprimento do Vilo (mm)								
n	Ratos				Coelhos			
	Controle	10 ⁴ UFC/ mL	10 ⁶ UFC/ mL	10 ⁸ UFC/ mL	Controle	10 ⁵ UFC/ mL	10 ⁷ UFC/ /mL	10 ⁹ UFC/ mL
51	305,76	243,62	294,78	305,76	441,9	546,1	414,5	515,8
52	289,20	264,27	301,92	282,42	348,1	499,3	322,9	693,9
53	258,31	283,31	299,58	292,26	549,5	266,7	382,2	644,8
54	329,13	267,92	306,95	226,79	424,6	413,2	590,8	603,1
55	311,13	288,04	324,71	235,64	305,6	420,2	647,2	580,0
56	289,27	302,49	339,91	220,99	390,9	386,4	508,1	575,7
57	288,77	299,00	305,01	233,23	349,7	428,7	508,7	590,4
58	321,43	266,88	291,21	303,81	401,7	399,8	530,1	578,5
59	254,83	344,92	293,11	291,16	463,1	315,3	529,8	520,7
60	109,75	272,46	332,60	283,38	397,6	378,8	629,6	582,3
61	119,78	246,72	294,66	286,11	388,8	542,6	652,2	563,4
62	129,51	264,76	294,27	266,13	428,9	497,2	633,2	517,1
63	137,41	381,52	280,62	222,66	501,5	614,1	521,5	510,1
64	226,49	271,91	308,24	267,83	435,4	559,3	426,4	612,4
65	219,57	162,05	257,65	314,82	450,2	517,0	482,7	574,7
66	193,05	292,17	319,59	297,40	330,6	460,2	606,3	662,1
67	259,32	294,48	359,29	309,75	445,7	471,0	493,2	645,6
68	278,79	285,63	331,71	305,67	406,8	460,2	566,9	650,5
69	302,92	275,20	296,39	294,06	313,7	469,1	452,4	588,4
70	309,70	278,17	253,26	365,25	484,7	439,3	394,0	650,5
71	311,90	259,81	270,74	318,17	538,7	528,5	609,0	588,4
72	332,26	300,46	209,54	293,58	472,5	503,3	472,2	580,8
73	256,10	299,94	220,54	315,50	426,3	306,5	506,0	574,4
74	278,58	274,35	231,17	301,65	427,3	519,1	509,4	570,1
75	331,86	272,92	230,97	295,03	564,7	438,9	505,1	586,2
76	264,41	296,66	239,98	280,63	505,3	422,9	427,6	494,9
77	300,41	304,79	218,01	276,92	412,9	448,9	398,4	392,5
78	326,23	268,56	226,15	267,43	343,4	528,9	633,1	538,4
79	298,01	368,08	241,65	281,20	309,1	486,6	318,9	427,2
80	307,91	265,73	245,15	265,44	317,7	391,4	476,2	543,0
81	303,56	140,23	228,85	249,65	288,2	497,4	469,7	422,2
82	306,69	143,66	300,05	273,69	316,4	505,0	540,1	428,5
83	122,76	237,80	335,32	269,53	347,7	436,9	532,1	489,1
84	280,92	326,58	341,70	280,57	253,4	394,8	570,6	502,3
85	281,71	134,43	321,71	285,73	246,3	355,3	522,9	504,2
86	262,71	266,18	274,32	228,92	341,3	407,5	446,9	503,4
87	224,19	146,77	246,24	252,89	323,4	349,7	452,2	645,2
88	225,98	250,64	241,60	273,94	306,2	421,2	480,5	600,7
89	304,06	242,46	241,19	265,55	200,0	502,0	410,7	484,2
90	266,40	168,45	221,80	253,73	195,4	621,6	493,6	522,2
91	277,14	236,99	226,54	200,01	206,8	668,6	414,1	408,2
92	254,05	255,42	359,17	235,32	254,1	642,8	431,7	508,3
93	258,15	193,03	304,23	143,59	287,2	574,7	543,6	518,9
94	241,62	169,07	350,59	241,44	265,9	553,1	465,1	464,6
95	244,67	274,93	388,13	299,80	303,5	523,0	670,0	484,6
96	287,05	261,26	234,68	282,23	303,5	457,0	543,4	510,6
97	304,19	165,19	219,31	275,58	196,5	538,3	543,8	493,4
98	327,48	255,78	237,95	255,19	260,8	524,1	649,4	526,1
99	259,89	141,48	210,08	223,00	249,4	570,9	512,1	571,4
100	261,35	130,42	376,80	253,19	235,7	488,9	488,0	520,9
101	268,53	352,63	366,61	237,93	354,8	546,1	503,6	543,8
102	244,66	219,01	333,50	240,28	391,0	496,6	411,9	381,4

Continua...

Quadro 83A, Cont.

n	Comprimento do Vilo (mm)							
	Ratos				Coelhos			
	Controle	10 ⁴ UFC/ mL	10 ⁶ UFC/ mL	10 ⁸ UFC/ mL	Controle	10 ⁵ UFC/ mL	10 ⁷ UFC/ /mL	10 ⁹ UFC/ mL
103	278,74	235,45	349,47	165,88	337,9	421,4	504,0	411,2
104	275,04	284,74	264,68	256,32	333,0	454,0	435,6	484,0
105	279,74	301,86	245,88	248,92	381,3	460,0	330,7	568,7
106	308,15	188,20	205,53	264,50	313,7	423,7	644,4	342,8
107	310,73	199,04	263,63	227,22	259,6	517,4	637,9	467,9
108	303,81	319,18	264,11	262,01	260,4	445,9	515,5	408,3
109	307,37	311,75	270,79	221,08	292,3	454,3	519,9	549,0
110	307,97	299,57	234,95	239,61	275,1	481,6	491,8	584,2
111	288,75	319,68	220,56	183,11	429,6	571,2	627,5	501,4
112	286,49	312,53	243,69	221,05	465,8	553,3	567,0	463,6
113	253,34	316,65	281,41	205,05	379,3	456,5	573,9	508,0
114	290,50	305,49	265,58	225,34	434,5	401,4	428,5	512,2
115	283,54	343,21	203,55	227,72	479,4	372,0	560,6	519,8
116	293,49	288,56	180,12	192,80	389,1	409,6	480,5	531,1
117	294,86	293,31	222,57	207,57	566,9	425,9	590,9	545,1
118	289,16	280,24	185,79	176,80	557,7	362,6	492,8	303,1
119	228,99	210,08	182,05	152,62	530,7	381,5	536,4	276,6
120	181,44	293,53	159,33	221,13	393,2	408,7	510,8	509,4
121	213,85	302,60	200,08	220,51	379,6	442,5	571,3	316,0
122	190,94	309,38	174,35	223,37	491,2	399,9	567,1	453,7
123	201,74	319,07	330,65	196,85	404,9	548,8	437,3	553,4
124	159,27	306,42	280,69	183,01	416,8	477,8	397,6	468,6
125	164,37	212,24	259,17	188,55	383,5	498,7	348,0	529,5
126	140,24	315,81	194,67	270,96	348,2	575,9	341,6	424,3
127	193,63	313,12	316,13	285,32	380,3	532,4	512,6	513,5
128	171,18	261,55	295,64	291,16	504,8	445,1	472,4	452,6
129	183,03	258,04	279,98	300,97	406,0	398,3	544,9	527,8
130	232,16	257,12	296,08	296,02	498,6	414,7	575,7	501,7
131	186,96	286,54	156,04	288,60	493,5	497,7	343,8	505,6
132	212,57	234,22	310,39	284,58	573,3	500,6	453,9	546,3
133	200,32	246,85	234,43	291,04	596,1	537,8	378,8	447,2
134	192,16	261,03	253,19	294,96	458,7	333,7	308,3	440,2
135	155,77	241,55	240,90	309,18	450,6	453,9	443,2	468,8
136	171,19	255,84	238,62	309,90	436,4	518,1	376,0	402,6
137	245,69	120,51	247,49	281,62	580,0	398,5	450,5	427,6
138	313,42	292,61	266,55	327,57	495,6	488,5	385,4	414,4
139	267,81	290,55	255,35	310,41	591,3	533,8	289,3	527,7
140	237,45	173,15	215,83	314,15	553,7	438,4	467,2	503,6
141	249,18	246,40	277,07	335,16	530,7	500,7	427,8	591,6
142	231,50	271,17	271,03	302,57	392,1	473,4	410,3	593,1
143	259,07	229,14	369,71	311,02	603,5	414,1	441,2	516,1
144	316,17	287,46	276,31	312,34	578,4	484,8	370,0	505,8
145	279,98	270,03	361,15	389,13	557,9	381,3	332,1	546,4
146	326,21	289,86	319,79	287,32	487,5	359,7	450,0	483,3
147	306,79	268,35	227,67	263,04	347,8	385,9	375,7	497,1
148	324,98	119,33	236,46	278,50	381,1	394,3	478,1	483,6
149	246,30	289,45	223,92	211,14	456,7	338,8	458,7	540,5
150	244,85	269,18	265,08	255,98	525,6	315,5	374,3	451,3
151	291,43	336,57	254,64	220,57	510,5	282,6	391,9	482,3
152	225,46	338,03	267,50	233,42	497,9	301,9	285,1	558,0
153	322,32	149,21	189,44	298,74	504,6	408,1	410,2	427,1
154	308,70	188,04	251,16	298,90	427,5	425,5	706,8	555,0

Continua...

Quadro 83A, Cont.

n	Comprimento do Vilo (mm)							
	Ratos				Coelhos			
	Controle	10 ⁴ UFC/ mL	10 ⁶ UFC/ mL	10 ⁸ UFC/ mL	Controle	10 ⁵ UFC/ mL	10 ⁷ UFC/ /mL	10 ⁹ UFC/ mL
155	313,50	366,76	246,66	338,02	567,8	484,3	631,6	591,7
156	300,08	219,07	227,89	329,82	347,8	462,3	602,5	594,2
157	303,75	297,42	280,90	248,49	552,8	431,1	670,8	725,3
158	316,62	192,38	277,90	293,57	301,5	401,8	674,9	534,6
159	252,84	138,20	204,74	268,34	555,1	215,9	567,9	590,3
160	161,71	340,63	275,00	337,03	561,3	647,8	544,2	501,4
\bar{X}	242,49	255,07	277,53	284,50	421,23	433,07	488,48	531,28
DP	65,29	60,11	48,81	54,92	101,91	87,51	102,63	78,80

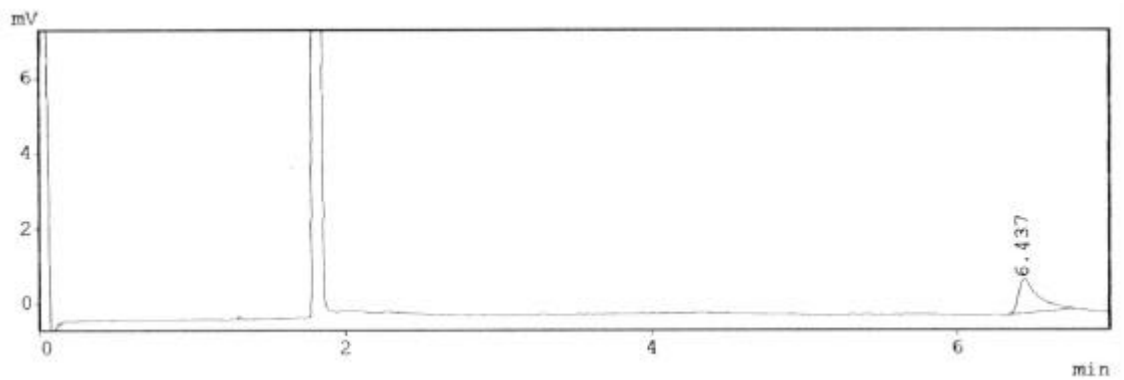


Figura 1 A – Cromatograma de coelhos normocolesterolêmicos.

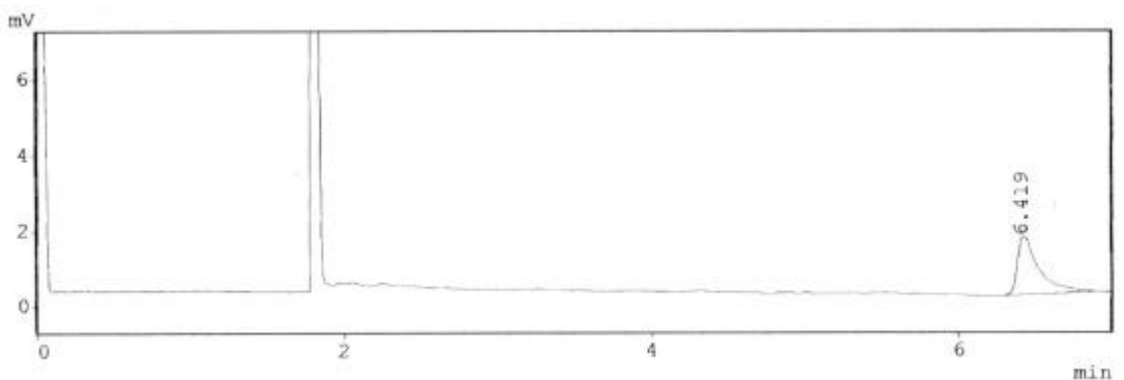


Figura 2A – Cromatograma de coelhos hipercolesterolêmicos.

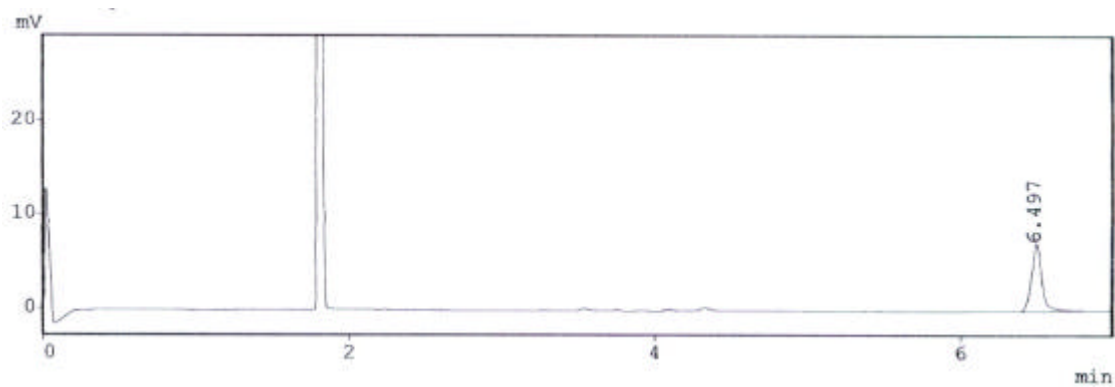


Figura 3A – Cromatograma de ratos normocolesterolêmicos.

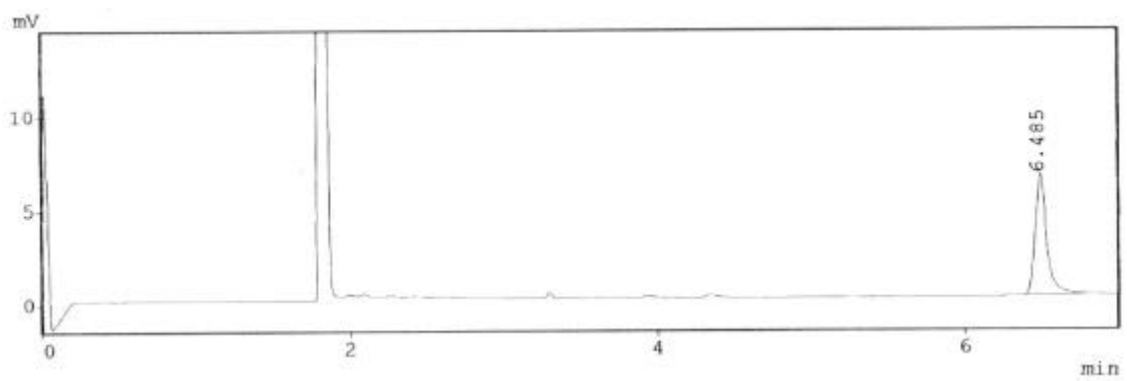


Figura 4A – Cromatograma de ratos hipercolesterolêmicos.