

DAYSE FONTES MACHADO

**EFEITO DE PROBIÓTICO NA MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE
COLESTEROL SÉRICO E NA TAXA DE TRANSLOCAÇÃO DE
Lactobacillus spp. EM RATOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

DAYSE FONTES MACHADO

**EFEITO DE PROBIÓTICO NA MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE
COLESTEROL SÉRICO E NA TAXA DE TRANSLOCAÇÃO DE
Lactobacillus spp. EM RATOS**

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

APROVADA: 27 de março de 2001

Prof^ª. Neuza Maria Brunoro Costa
(Conselheira)

Prof^ª. Tânia Toledo de Oliveira
(Conselheira)

Prof. José Carlos Gomes

Prof. Afonso Mota Ramos

Prof^ª. Célia Lúcia L.F. Ferreira
(Orientadora)

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar o Curso de Mestrado.

À FAPEMIG e à CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais, pelo apoio e confiança durante toda minha vida acadêmica.

À Professora Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, pela orientação e sugestões.

Às professoras Neuza Maria Brunoro Costa e Tânia Toledo de Oliveira, pelo aconselhamento e avaliação da tese.

Aos professores Paulo Roberto Cecon e José Benício Paes Chaves, pelas contribuições e sugestões na análise estatística dos dados.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela contribuição para o êxito deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde, em especial, ao Sr. Adão e D. Zezinha, pela oportuna colaboração.

À Cristina e ao Nando, pela grande contribuição na elaboração da tese.

À Eveline, Lorena, Izabelle, Rosimar, Ferlando, Selma e Paulo, pela preciosa ajuda e consideração.

Aos colegas do Laboratório de Culturas Láticas pela colaboração e amizade.

Aos colegas de pós-graduação, pela convivência amigável.

Ao Laboratório de Análises Clínicas Santa Rita, em especial, à Dr^a Linda, pela grande colaboração na realização das análises.

À Divisão de Saúde da Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Dr. Jaime, pela colaboração na realização das análises.

Ao técnico do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, José Geraldo, pela colaboração nas análises realizadas.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	vii
.....	
ABSTRACT.....	x
.....	
1.INTRODUÇÃO.....	1
.....	
2.REVISÃO	3
BIBLIOGRÁFICA.....	
2.1.Colesterol e seu	3
metabolismo.....	
2.1.1.Biossíntese do	5
colesterol.....	
2.1.2.Absorção intestinal do	8
colesterol.....	
2.1.3.Catabolismo – conversão em ácidos	10
biliares.....	
2.1.4.Transporte do colesterol – lipoproteínas	14
plasmáticas.....	
	16
2.1.4.1.Quilomícrons.....	
2.1.4.2.Lipoproteínas de muito baixa densidade –	18
VLDL.....	
2.1.4.3.Lipoproteínas de baixa densidade –	19
LDL.....	
2.1.4.4.Lipoproteínas de alta densidade –	21
HDL.....	
	24

2.2.Hipercolesterolemia.....		
....		
2.3.A	microbiota	25
gastrointestinal.....		
2.3.1.Funções	da microbiota	26
gastrointestinal.....		
2.3.1.1.Papel da microbiota intestinal no metabolismo lipídico.....		27
	Página	
2.4.Características de culturas lácticas candidatas ao uso como adjunto dietético.....		27
2.5.Caracterização do <i>Lactobacillus acidophilus</i>		28
2.6.Considerações terapêuticas e nutricionais do uso de <i>L. acidophilus</i> como adjunto dietético.....		29
2.6.1.Efeito na intolerância à lactose por indivíduos lactase não persistentes.....		29
....		
2.6.2.Atividade antimicrobiana e proteção contra patógenos.....		30
2.6.3.Efeito anticarcinogênico.....		31
2.6.4.Efeito na modulação dos níveis de colesterol sanguíneo.....		32
		35
2.7.Translocação.....		
...		
3.	MATERIAL	E 38
MÉTODOS.....		
3.1.Origem e manutenção da cultura.....		38
3.2.Obtenção do concentrado de células de <i>L. acidophilus</i> NCFM.....		39
3.3.Preparo das dietas experimentais.....		39
3.4.Ensaio biológico.....		41
3.4.1.	Delineamento	41
experimental.....		
3.4.2.		44

Translocação.....		
3.5. Dosagens dos constituintes sangüíneos.....		45
3.5.1.Dosagem de colesterol total.....		45
3.5.2.Dosagem de HDL-colesterol.....		46
3.5.3.Dosagem de LDL-colesterol.....		46
3.6 Análise Estatística.....		47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		49
4.1.Cacterização da cultura utilizada como probiótico.....		49
4.2. Número de células viáveis no concentrado de <i>L. acidophilus</i>		50
4.3.Ensaio biológico.....		51
4.3.1. Peso do fígado dos animais experimentais.....		51
4.3.2. Indução da hipercolesterolemia.....		53
4.3.3. Efeito do probiótico na modulação dos níveis de colesterol total e lipoproteínas séricas.....	Página	55
4.3.4. Ganho de peso e ingestão alimentar dos animais.....		58
4.3.5.Translocação.....		60
4.3.5.1.Identificação dos microrganismos translocados.....		60
4.3.5.2. Contagem de <i>L. acidophilus</i> no coração, rins, fígado e baço dos animais experimentais.....		60
4.3.5.3. Desaparecimento de células viáveis de <i>L. acidophilus</i> dos órgãos dos animais que receberam o probiótico.....		64
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....		67
BIBLIOGRAFIA.....		70

.....
APÊNDICE **A** **79**
.....
APÊNDICE **92**
B.....

MACHADO, Dayse Fontes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2001. Efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico e na taxa de translocação de *Lactobacillus spp.* em ratos. **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 na modulação dos níveis de colesterol sérico e na taxa de translocação de *Lactobacillus spp.* para o baço, fígado, coração e rins, foi conduzido uma experimentação com duração de 56 dias, utilizando-se 170 ratos machos Wistar, com peso médio inicial de 250 ± 32 g, distribuídos em quatro tratamentos e alojados individualmente. Os grupos experimentais foram: Padrão; Controle; LDR e P. O grupo Padrão recebeu a dieta AIN-93G durante todo o período experimental. Os demais grupos receberam por 56 dias a mesma dieta acrescida de 1% de colesterol e 0,1% de ácido cólico. Do 15º ao 28º dia (após um período inicial de 14 dias de indução de hipercolesterolemia) o grupo LDR recebeu suplementação de 0,1 mL/dia/animal de leite desnatado reconstituído a 10% de sólidos não gordurosos e o grupo P recebeu 0,1 mL/dia/animal de probiótico na forma de um concentrado de células contendo 10^{10} UFC/mL de *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Avaliou-se o colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol nos 28º, 42º e 56º dias de experimento (0, 14 e 28 dias após o término da administração do probiótico, respectivamente). Determinou-se também a taxa de translocação de *Lactobacillus spp.*, nos mesmos tempos, no baço, fígado, coração e rins dos animais. O ganho de peso e a ingestão alimentar dos animais foram monitorados semanalmente, calculando-se assim, o coeficiente de eficiência alimentar (CEA). Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos, quanto ao consumo alimentar, ganho de peso e CEA aos 56 dias. O acréscimo dietético de 1% de colesterol cristalino e 0,1% de ácido cólico não promoveu hipercolesterolemia nos animais, evidenciado pela diferença não significativa ($P > 0,05$) entre os grupos Padrão e Controle em relação aos níveis de colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol após 14 dias de dieta hipercolesterolêmica. No entanto, provocou aumento significativo do peso e alteração da coloração normal do fígado (de vermelho intenso para vermelho

amarelado) devido ao acúmulo de gordura neste órgão, nos animais que receberam dieta rica em colesterol comparado ao grupo Padrão. O consumo de *L. acidophilus* pelos animais, nas concentrações indicadas, não alterou seus níveis séricos de colesterol e frações ($P>0,05$), pois estes se mantiveram normocolesterolêmicos. Constatou-se translocação de *Lactobacillus spp.* para o baço, fígado, coração e rins dos animais que receberam suplementação com *L. acidophilus* (grupo P). Nos órgãos dos animais dos grupos Padrão, Controle e LDR não foi observado crescimento nos tempos avaliados. Constatou-se diferença significativa ($P<0,05$) na contagem de células microbianas translocadas para o baço em comparação aos demais órgãos analisados. Entre o fígado e o coração não foi observada diferença significativa ($P>0,05$), mas ambos diferiram estatisticamente dos rins ($P<0,05$). As contagens, em UFC/órgão, foram; $8,6 \times 10^2$; $4,8 \times 10^2$; $4,7 \times 10^2$ e $1,3 \times 10^2$ para o baço, fígado, coração e rins, respectivamente. Observou-se eliminação constante das células translocadas, após o término da administração do probiótico. Vinte e oito dias após o consumo do probiótico, de acordo com o modelo de regressão ajustado, a contagem de células viáveis indicou maior eliminação dos microrganismos translocados do baço (69,8%), seguido do coração (61,7%), fígado (57,0%) e rins (37,8%). O tempo para completa eliminação dos microrganismos translocados, de acordo com o modelo de regressão ajustado, permanecendo a tendência verificada no intervalo de tempo estudado (28 dias), corresponderia a 40, 45, 49 e 74 dias, para o baço, coração, fígado e rins, respectivamente. Sugere-se que, ao se desenvolver um probiótico, além da estirpe do microrganismo, do número de células e da frequência de dosagem, devem ser definidas as taxas de translocação e de eliminação (“clearing”) destes microrganismos em modelos animais, uma vez que se desconhece como este processo poderá afetar o hospedeiro.

ABSTRACT

MACHADO, Dayse Fontes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2001. Probiotic effects on the modulation of serum cholesterol levels and translocation rate of *Lactobacillus spp.* in rats. **Adviser: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira. Committee Members: Neuza Maria Brunoro Costa and Tânia Toledo de Oliveira.**

Probiotics, as milk fermented products or not, are known as functional foods and have been recommended as dietary adjunct for individuals with high serum cholesterol levels. To evaluate probiotics effects on the modulation of serum cholesterol and on translocation rate of *Lactobacillus spp.* for the spleen, liver, heart and kidneys, an experiment was carried out during 56 days, using 170 Wistar male rats, distributed in four treatments and individually housed, with initial average weight of 250 ± 32 g. The experimental groups were: Standard; Control; LDR and P. The Standard group received the AIN-

93G diet during the whole experimental period. The other groups received for 56 days the AIN-93G diet added of 1% of cholesterol and 0,1% of cholic acid. Of the 15th to the 28th day (after an initial period of 14 days of hipercholesterolemia induction) the LDR group received the supplement of 0,1 mL/day/animal of reconstituted skimmed milk at 10% of non fat solids and, the group P received 0,1 mL/day/animal of a probiotic in the form of a concentrate of cells contends 10^{10} UFC/mL of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) and low density lipoprotein (LDL) were evaluated at 28th, 42th and 56th days of experiment (0, 14 and 28 days after the end of probiotic administration respectively). Translocation rate of *Lactobacillus* spp. was monitored at the same times, in spleen, liver, heart and kidney of all animals. The weight gain and alimentary ingestion were weekly verified, in order to calculate the coefficient of alimentary conversion (CEA). No significant differences ($P>0,05$) were observed between groups, relative to alimentary consume, weight increase and CEA at the 56th day. The dietary increment of 1% of crystalline cholesterol and 0,1% of cholic acid did not promote hipercholesterolemia in the animals, evidenced by the non significant difference ($P>0,05$), among the groups Standart and Control, of levels of total cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol levels after 14 days receiving hipercholesterolemic diet. However it provoked significant increase of the weight and alteration of normal coloration of liver (of red intense for red yellowish) due to fat accumulation in this organ, in the animals that received rich diet in cholesterol compared to the Standart group. Consumption of *L. acidophilus*, in the suitable concentrations, did not altered serum cholesterol levels and its fractions ($P>0,05$) of the animals, once they stayed normocholesterolemic. Translocation of *Lactobacillus* spp was verified at the spleen, liver, heart and kidneys of animals supplemented with *L. acidophilus* (group P). The evaluation of the organs from the Standard, Control and LDR groups did not indicate the presence of *Lactobacillus*. Significant difference was verified ($P<0,05$) in the translocated microbial cells count for the spleen in comparison to the other analyzed organs. Significant difference ($P>0,05$) was not observed between the liver and the heart translocated microbial cells count, but both differed statisticaly of the kidneys ($P<0,05$). The average translocation, expressed as CFU/organ, were $8,6 \times 10^2$; $4,8 \times 10^2$; $4,7 \times 10^2$ and $1,3 \times 10^2$ for spleen, liver, heart and kidney, respectively. A constant elimination of the translocated cells was observed after the end of the probiotic administration. The eliminated translocated cell numbers were constantly during the evaluation period. Twenty-eight days after probiotics consumption, according to

the adjusted regression model, the viable cells count indicated larger elimination of translocated microorganismis from spleen (69,8%), heart (61,7%), liver (57,0%) and kidneys (37,8%). The time required for the complete elimination of translocated *Lactobacillus* spp., according to the adjusted regression model and supposing that the elimination of translocated cells by the organism stays constant, correspond to 40; 45; 49 and 74 days, respectively for spleen, heart, liverand kidneys. Translocation and elimination rate (“clearing”) of microorganisms in animal models are suggested as important parameters on the development of probiotic products. The dose frequency, number of viable cells and microorganism lineage must be analyzed and selection of strains that do not present translocation must be considered, since the implication of this process in the host is not known.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de 300 mil falecimentos por ano, ou seja, 820 por dia. Nos Estados Unidos, são responsáveis por 70 a 80% das mortes de pessoas com mais de 65 anos e de acordo com estimativa, no ano 2003, um em cada cinco indivíduos terá mais de 65 anos (REVISTA SAÚDE, 1997).

As doenças cardiovasculares incluem o infarto e a aterosclerose, que podem causar problemas vasculares, como o derrame cerebral. A causa principal dessa enfermidade é a obstrução do fluxo de sangue nos vasos sangüíneos em virtude da formação de placas gordurosas que reduzem o fluxo até que, em caso extremo, chegam a obstruí-los por completo (JENKINS e JENKINS, 1994).

Sabe-se que níveis altos de colesterol sangüíneo têm sido associados ao risco de doenças cardiovasculares e uma pequena redução do seu nível plasmático está relacionada a um decréscimo significativo desse risco (ANDERSON, 1990).

Em 1994, Law estimou que uma redução de 10% nos níveis de colesterol em adultos, poderia resultar em uma redução de 10 a 25% na taxa de mortalidade por doenças arteroscleróticas (TAYLOR, 1998).

Embora muitas variáveis ambientais e genéticas influenciem o nível de colesterol sérico, existe grande correlação entre ingestão dietética de gordura saturada e níveis de colesterol sangüíneo em diferentes populações (ROSSOUW, 1990).

Esse fato tem causado uma crescente preocupação em se buscar dietas mais saudáveis que diminuam o nível de colesterol sérico, com conseqüente redução na incidência de doenças cardiovasculares (SABOYA, 1997).

As bactérias do ácido láctico, na forma de produtos lácteos fermentados ou não, estão sendo freqüentemente associadas a efeitos benéficos para a saúde humana. Elas estão amplamente distribuídas na natureza e têm sido utilizadas como promotoras de saúde há cerca de cem anos (NADER DE

MACIAS, 1993). São empregadas na indústria de alimentos, em produtos farmacêuticos e também como aditivos em ração animal, sendo que algumas espécies colonizam o intestino do homem e animais (SANDERS, 1993).

O termo probiótico foi usado inicialmente por Lilley e Stillwell em 1965, para descrever substâncias produzidas por um microrganismo que estimulam o crescimento de outros microrganismos (OUWEHAND, 1999).

FULLER (1989) definiu probiótico como um adjunto dietético, onde o microrganismo viável afeta benéficamente o hospedeiro pelo estabelecimento do balanço desejável da microbiota intestinal produzindo vários efeitos terapêuticos.

Entre os papéis potencialmente benéficos dessas bactérias, como suplemento dietético, são citadas a manutenção da microbiota intestinal, ativação do sistema imune, efeito na encefalopatia portal sistêmica, atividade anticarcinogênica, síntese de vitaminas do complexo B, melhora na digestão da lactose por indivíduos lactase não persistentes e a modulação dos níveis de colesterol sérico. Além disto, estes microrganismos, ditos probióticos, produzem efeitos bioquímicos e biológicos sobre o leite, inferindo-lhe características organolépticas e nutricionais de elevada importância (SANDERS, 1993).

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico em ratos albinos. Avaliou-se ainda a taxa de translocação e de eliminação de *Lactobacillus spp.* para o baço, rins, coração e fígado dos animais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

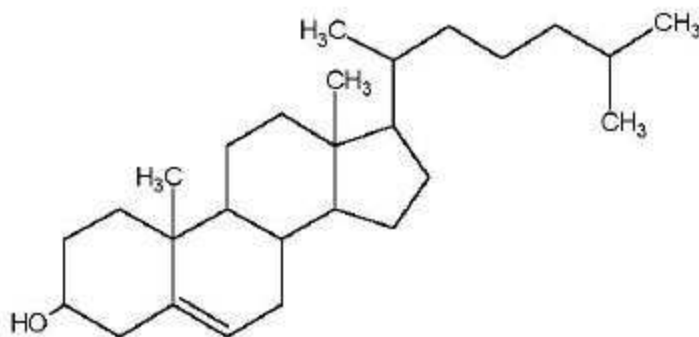
2.1 Colesterol e seu metabolismo

O colesterol é um lipídio esterol que pode ser apresentado sob a forma livre ou esterificada (ésteres de colesterol) e que está presente no organismo animal, tanto nos tecidos como nas lipoproteínas plasmáticas, não sendo encontrado em vegetais (MAYES, 1994). A estrutura do colesterol está apresentada na Figura 1.

O colesterol livre é a principal forma presente em muitos tecidos, constituindo-se exceções o córtex adrenal, o plasma e as placas ateroscleróticas, onde ésteres de colesterol predominam. Também na linfa intestinal e no fígado, uma significativa proporção de colesterol encontra-se esterificada (MAYES, 1994).

O colesterol desempenha função estrutural, formando a dupla camada que constitui as membranas celulares e a camada única que reveste as lipoproteínas, sendo também um componente essencial das membranas estruturais de todas as células nervosas, onde atua como moderador da fluidez, estabilizando suas estruturas, sobretudo no lado externo das membranas plasmáticas, onde geralmente é mais abundante (GRANNER, 1990; STRYER, 1995). É também precursor de sais biliares e de hormônios glicocorticóides e mineralocorticóides, participando da síntese de hormônios sexuais e na formação de vitamina D (BRODY, 1994).

Por outro lado, é também o principal constituinte dos cálculos biliares e exerce um importante papel nos processos patológicos, como na gênese da aterosclerose das artérias vitais, causando doença cerebrovascular, coronariana e vascular periférica (MAYES, 1994).



Fonte : VOET e VOET, 1995

Figura 1 – Estrutura do colesterol

2.1.1. Biossíntese do Colesterol

A via biossintética do colesterol pode ser dividida em três etapas: formação do mevalonato, síntese de esqualeno a partir do mevalonato e ciclização do esqualeno a lanosterol e sua conversão a colesterol (MATHEWS e VAN HOLDE, 1990). As principais reações estão esquematizadas na Figura 2.

O precursor da síntese de colesterol é o acetil-CoA produzido durante o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. A etapa inicial da síntese de

colesterol inclui a formação de aceto acetil-CoA, β -hidroxil- β -metil glutarato e ácido mevalônico.

A conversão de β -hidroxi- β -metil glutarato para ácido mevalônico procede-se pela atividade da enzima β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA redutase (HMG CoA redutase), sendo essa reação irreversível e considerada etapa limitante na síntese do colesterol. Através de uma série de reações de condensação, o mevalonato é transformado em um hidrocarboneto de cadeia longa (esqualeno). Por movimentação de elétrons por meio de quatro ligações duplas e migração de dois grupos metila, ocorre a ciclização do esqualeno, formando lanosterol, catalisada pela enzima óxido esqualeno:lanosterol ciclase. Finalmente ocorre a conversão de lanosterol à colesterol, nas membranas do retículo endoplasmático, compreendendo cerca de vinte reações que envolvem a remoção de três grupos metila, a redução de uma dupla ligação por NADPH e a migração de outra dupla ligação (BRODY, 1994).

A maior parte do colesterol corporal é originada de síntese endógena, onde o fígado é o principal órgão de síntese, participando de pelo menos da metade da síntese corporal diária (GUYTON, 1997).

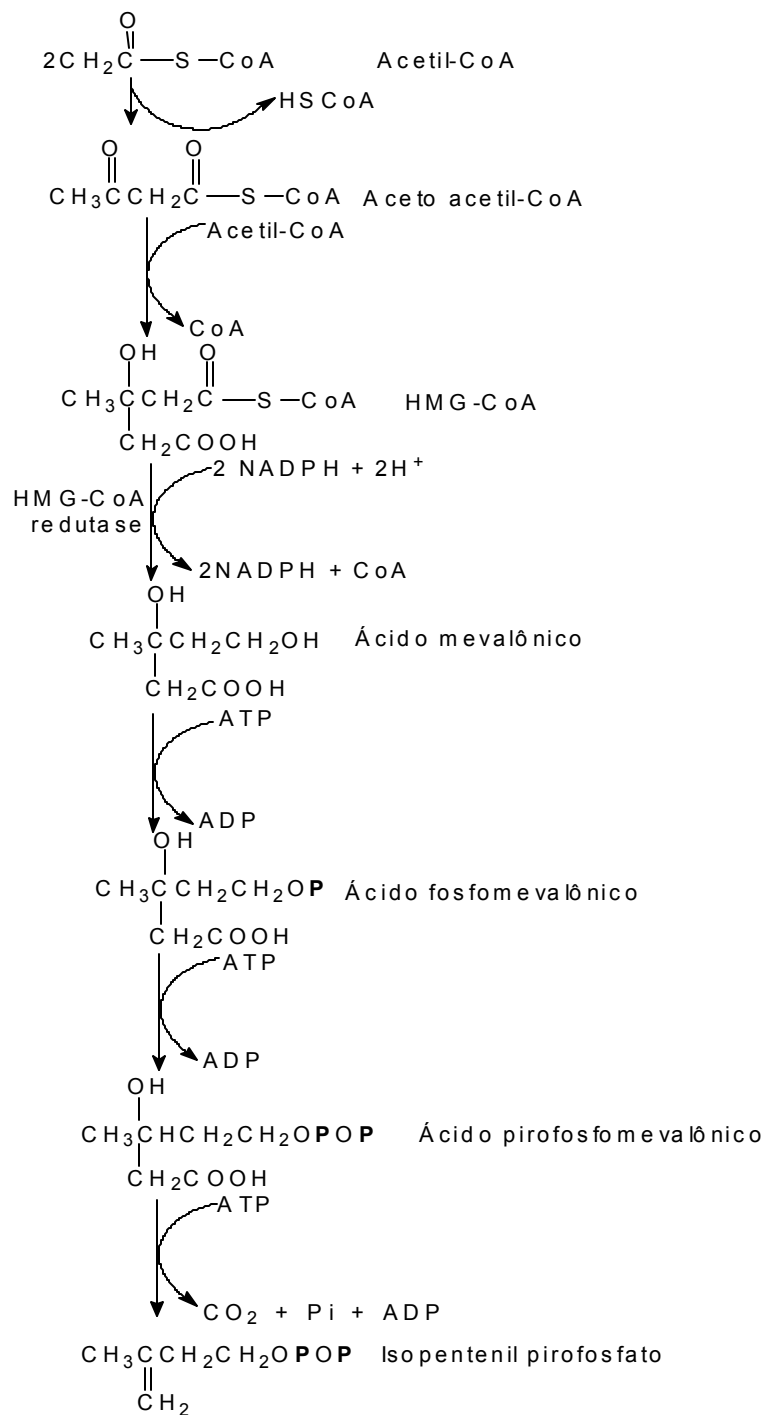
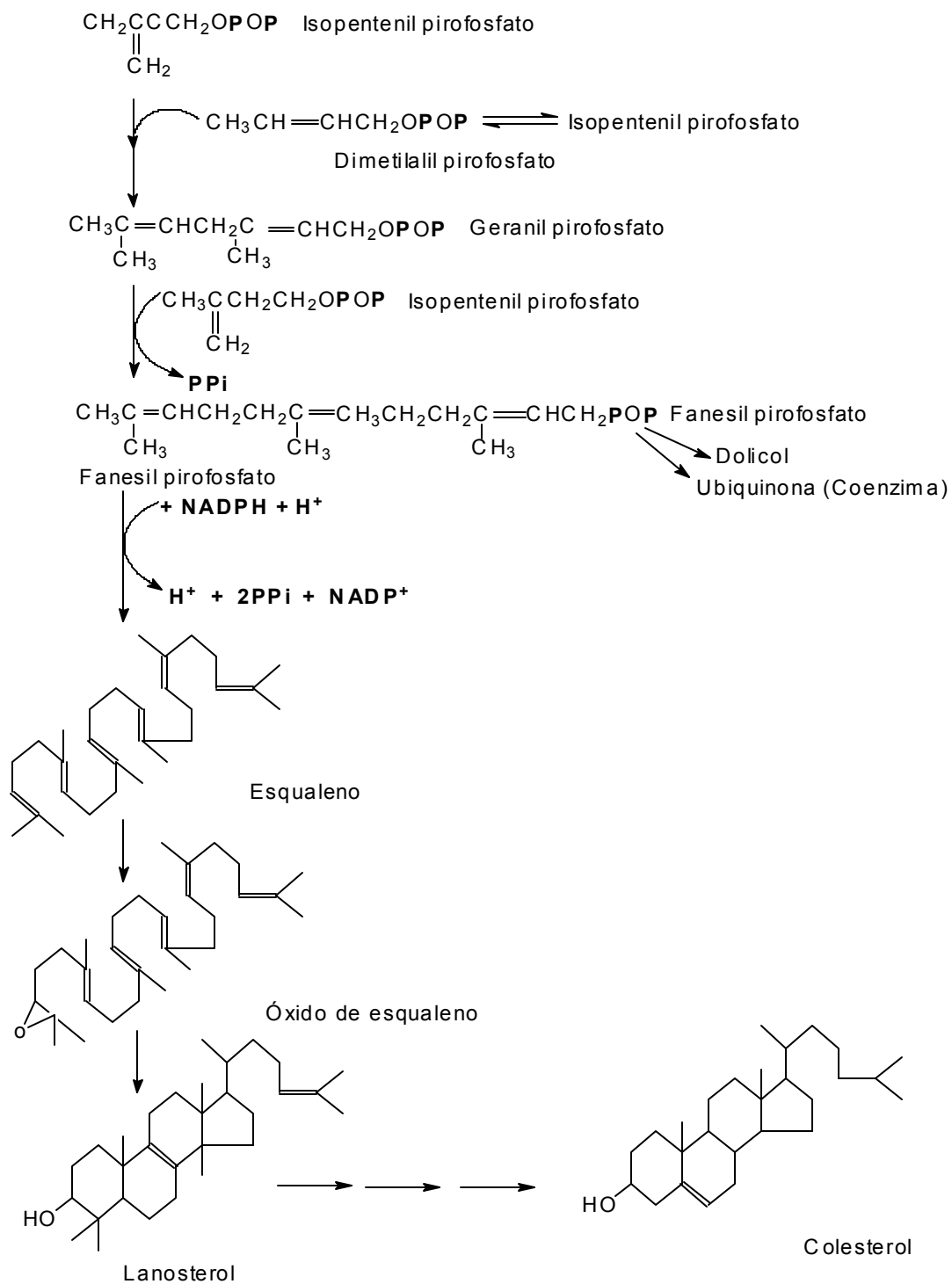


Figura 2 – Via de biossíntese do colesterol



Fonte : BRODY, 1994

Figura 2 – Via de biossíntese do colesterol (cont.)

Muitos fatores que regulam a síntese de colesterol atuam modulando a atividade da enzima β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA redutase, a qual reduz HMG-CoA a ácido mevalônico (GUYTON, 1997).

A síntese hepática de colesterol pode ser influenciada por vários fatores. Sabe-se que o colesterol exerce inibição por “feed-back” em sua própria síntese no fígado, uma vez que tanto a síntese quanto a atividade da HMG CoA redutase é inibida pelo colesterol (GUYTON, 1997).

Os ácidos biliares também podem influenciar a síntese de colesterol de duas maneiras: i) o aumento dos ácidos biliares no intestino, promove uma maior absorção de colesterol, que por sua vez irá suprimir a síntese do mesmo, porém uma deficiência de ácidos biliares exerce um efeito contrário, promovendo uma síntese de colesterol aumentada; ii) os ácidos biliares suprimem sua própria síntese a partir do colesterol, aumentando assim, as concentrações hepáticas de colesterol, mecanismo esse, que reduz a síntese por meio da inibição por “feed-back” (GUYTON, 1997).

Fatores hormonais têm sido também relacionados com a regulação da síntese do colesterol. A administração de insulina ou de hormônios tireoidianos aumenta a atividade da HMG CoA redutase, enquanto glucagon ou os glicorticóides, reduzem-na (MAYES, 1994).

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 de colesterol, a taxa de colesterol endógeno e a taxa de colesterol utilizado pelas células (MATHEWS e VAN HOLDE, 1990).

2.1.2. Absorção intestinal do colesterol

O colesterol é absorvido somente na forma livre e incorporado aos quilomícrons e somente 30 a 60% do “pool” de colesterol (colesterol livre excretado pela bile, colesterol secretado pelo lúmen intestinal por descamação, colesterol livre e esterificado que chegam ao duodeno) é absorvido, o restante é excretado nas fezes. O colesterol não absorvido pode ser metabolizado pela flora intestinal e convertido em colestanol e coprostanol, os quais são muito pouco absorvidos e portanto, eliminado nas fezes (MARINETTI, 1990).

O colesterol biliar é mais rapidamente absorvido porque alcança o intestino na forma livre e agregado à micelas, enquanto o colesterol dietético encontra-se principalmente na forma esterificada, insolúvel no meio aquoso intestinal. A hidrólise do colesterol esterificado é catalizada pela enzima colesterol esterase do suco pancreático e é ativada pelos sais biliares (MAYES, 1994).

Antes da absorção, o colesterol é solubilizado por incorporação no centro hidrofóbico das micelas que são partículas gordurosas microscópicas, arranjadas de tal forma que suas regiões hidrofóbicas se agregam no centro da partícula e seus grupos hidrofílicos permanecem na superfície em contato com a água. As micelas aumentam acentuadamente a velocidade de liberação dos produtos da digestão lipídica para a mucosa intestinal do jejuno. O colesterol livre se incorpora à fase micelar das gorduras, que são absorvidas por difusão passiva (transporte de substâncias através da membrana, em consequência do movimento molecular). As micelas não são absorvidas como tal, e no momento da absorção, seus componentes se separam (GUYTON, 1997).

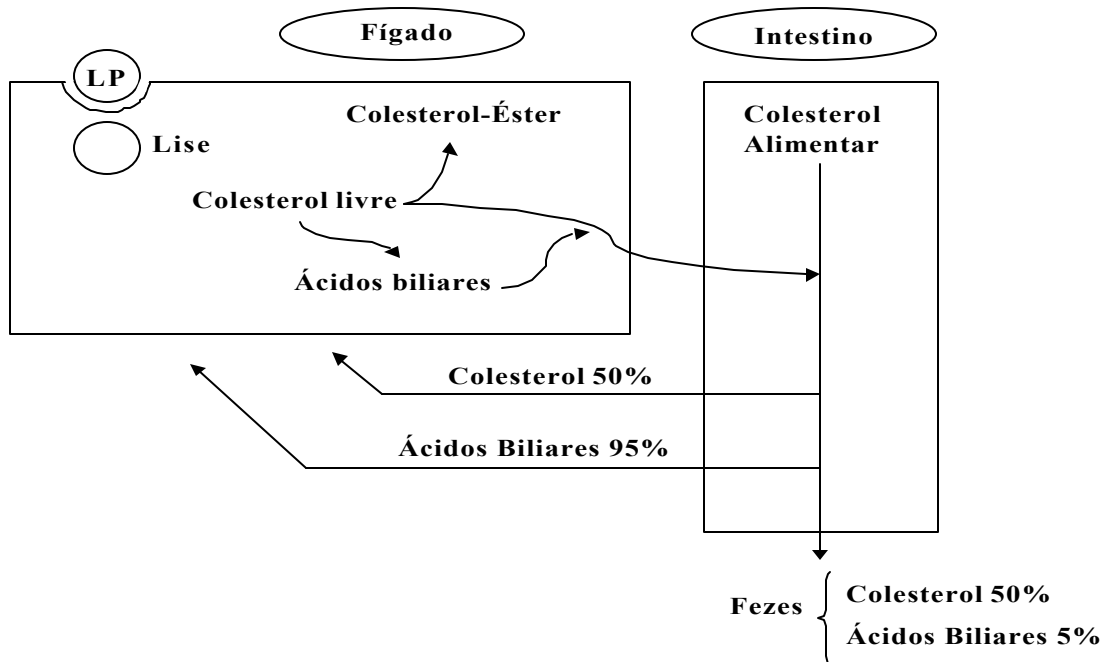
Vários fatores metabólicos podem ser considerados como determinantes de uma menor absorção de colesterol. Dentre estes, destacam-se a baixa quantidade de sais biliares; o aumento da velocidade do trânsito intestinal, com redução no tempo de absorção; a redução na secreção da lipase pancreática, retirando o colesterol da fase micelar; a deficiência na capacidade da mucosa intestinal em esterificar o colesterol; e a competição para absorção do colesterol biliar com o colesterol exógeno (MARINETTI, 1990).

Outros fatores que também podem reduzir a absorção de colesterol intestinal incluem esteróis de plantas, como o β -sitosterol, por inibição competitiva, fibras solúveis na dieta, as quais aumentam a excreção fecal de sais biliares, além da dieta baixa em gorduras, pela redução da quantidade de ácidos graxos para formação de micelas (HOPEWELL et al., 1993).

2.1.3. Catabolismo – conversão em ácidos biliares

Os principais produtos do catabolismo do colesterol são os ácidos biliares, os quais são formados no fígado e transportados ao intestino delgado na secreção biliar. Esses compostos, juntamente com o próprio colesterol, representam o único percurso expressivo para a eliminação do colesterol do organismo (MAYES, 1994).

Uma grande proporção da excreção biliar de sais biliares é reabsorvida pela circulação portal, captada pelo fígado e reexcretada na bile. Este processo denomina-se circulação êntero-hepática (Figura 3).



Fonte: GARCIA e OLIVEIRA, 1992

Figura 3 – Representação esquemática da circulação êntero-hepática

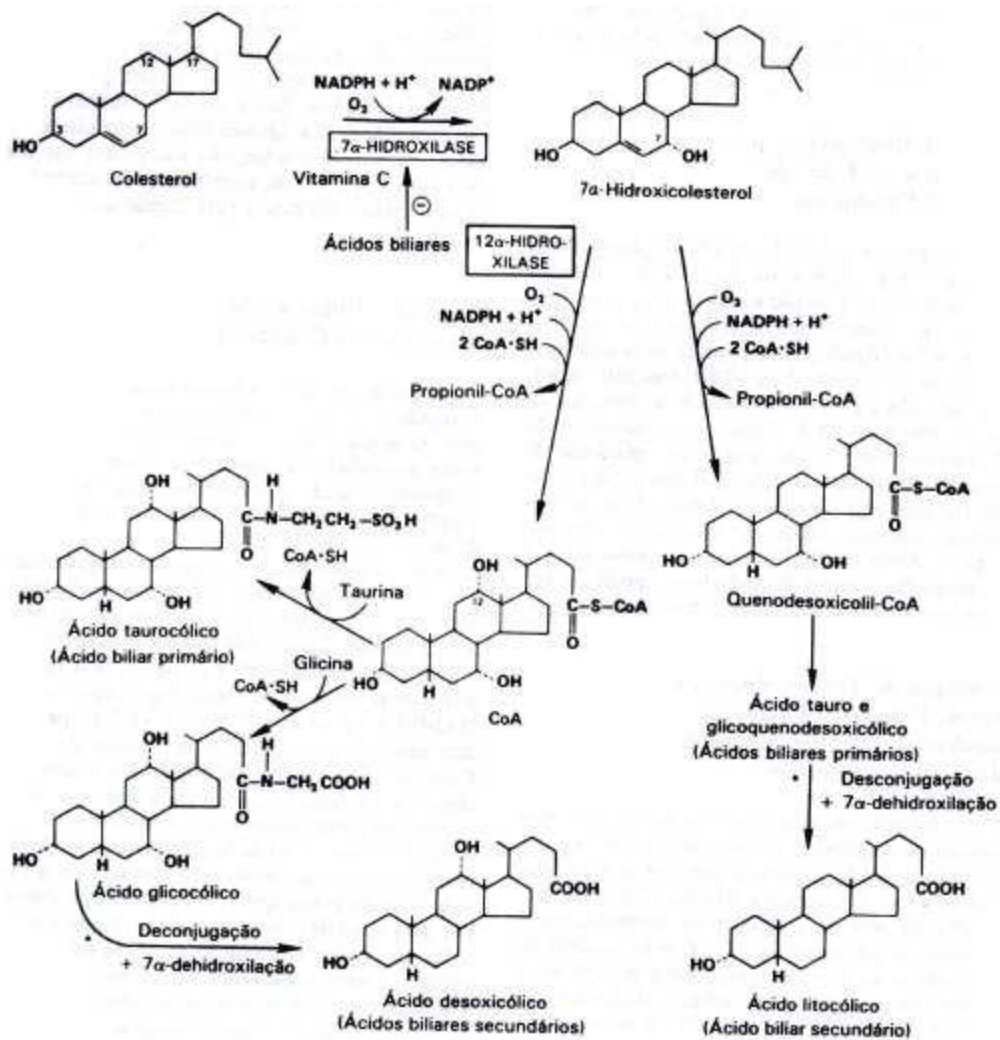
Cerca de 80% do colesterol metabolizado é convertido em ácidos biliares. Os ácidos biliares, após promoverem a emulsificação, hidrólise e absorção de lipídios no intestino, submetem-se a absorção passiva no jejuno e cólon, ou à absorção ativa (movimento de íons ou substâncias, através da membrana, em combinação com uma proteína carreadora, contra um gradiente de concentração) no íleo terminal, retornando ao fígado através da circulação portal e incorporados ao pool hepático (BHAGAVAN, 1997; MARINETTI, 1990).

Após absorção, os sais biliares são reutilizados no fígado, sendo estocados na vesícula biliar e, por estímulo alimentar, liberados no duodeno através da bile. No processo da circulação êntero-hepática, o pool de sais biliares no organismo pode circular duas ou mais vezes durante a digestão de uma refeição e, em um período de 24 horas, dez vezes ou mais. Assim, embora a quantidade total de sais biliares presentes no organismo humano seja de cerca de 2 a 4 g, este utiliza uma quantidade muito superior durante a digestão (BRODY, 1994).

Os sais biliares são necessários para emulsificação dos ésteres de colesterol e para a subsequente emulsificação do colesterol livre. A solubilização do colesterol e outros produtos da digestão lipídica, através da incorporação em micelas mistas com sais biliares conjugados é, no entanto, considerada essencial no processo de absorção.

A biossíntese dos sais biliares, no fígado, envolve reações de hidroxilação e diminuição da cadeia lateral da molécula do colesterol, formando suas estruturas (MAYES, 1994). A Figura 4 mostra essa conversão esquematizada.

A 7 α hidroxilação do colesterol é o primeiro passo na biossíntese dos sais biliares e é a reação que limita a velocidade da via de síntese desses compostos. As reações seguintes constituem-se também de hidroxilações, além da modificação da cadeia lateral, na qual um hidrocarboneto saturado com oito carbonos é convertido em uma cadeia de cinco carbonos com um terminal carboxilado (MAYES, 1994).



Fonte : MAYES, 1994

Figura 4 – Biossíntese e degradação dos sais biliares

* catalisada por enzimas bacterianas

Os principais ácidos biliares sintetizados pelo fígado humano são o ácido cólico, o mais abundante, e o ácido quenodesoxicólico. Em ratos, além desses, ainda está presente um terceiro ácido biliar denominado ácido muricólico, que facilita mais a eliminação do colesterol (LEITE, 1993).

Na bile, os ácidos cólico e quenodesoxicólico, ditos primários, encontram-se conjugados com os aminoácidos glicina e taurina. A conjugação ocorre nas células hepáticas, onde os ácidos biliares recentemente sintetizados encontram-se na forma de ésteres da coenzima A, ou seja colil ou quenodesoxicolil-CoA. Esses derivados da coenzima A são acoplados, por meio de ligação amídica, com a glicina e taurina, formando os ácidos glicocólico ou glicodesoxicólico e taurocólico ou taurodesoxicólico. Esta conjugação dos ácidos biliares torna-os mais solúveis no pH do conteúdo intestinal e, assim, possibilita realizar suas funções (MAYES, 1994).

Após a secreção no intestino delgado, os ácidos biliares primários podem ainda sofrer alterações estruturais por atividade de bactérias intestinais. Essas alterações incluem a clivagem da ligação peptídica dos ácidos biliares conjugados - essas ligações resistem à hidrólise por proteases e peptidases intestinais, mas são rapidamente clivadas por enzimas bacterianas (BRODY, 1994) - e a 7α dehidroxilação, que produz os ácidos biliares secundários: ácido desoxicólico, a partir do ácido cólico e ácido litocólico, a partir do ácido quenodesoxicólico (Figura 4).

Os ácidos biliares são secretados na bile na forma de sais de sódio e potássio. Segundo MATHEWS e VAN HOLDE (1990) todos os ácidos biliares encontram-se na forma de sais, em pH alcalino, o que torna o termo sais biliares mais exato que ácidos biliares.

A circulação êntero-hepática dos sais biliares é um processo eficiente, com somente uma pequena fração dos sais biliares, cerca de 500mg/dia, sendo eliminada nas fezes. Entretanto, a cada dia uma quantidade equivalente aquela perdida é sintetizada a partir do colesterol, pelo fígado, mantendo-se o reservatório de sais biliares na mesma dimensão (MAYES, 1994). Situações que causam bloqueio na reabsorção dos sais biliares, como é o caso do emprego da resina colestiramina, estimulam a síntese desses compostos, com conseqüente aumento da degradação de colesterol no fígado, levando à

redução significativa do colesterol plasmático. Esse recurso terapêutico vem sendo usado no tratamento da hipercolesterolemia (BRODY, 1994).

A síntese de sais biliares é regulada pela enzima 7α hidroxilase e a biossíntese do colesterol, pela HMG-CoA redutase. As atividades dessas duas enzimas, freqüentemente, ocorrem em paralelo, sendo difícil afirmar se a inibição da síntese ocorre primeiramente no passo da HMG-CoA redutase ou na reação da 7α hidroxilase. Esta última enzima pode também ser regulada por fosforilação-desfosforilação, como ocorre com a HMG-CoA redutase. No entanto, ao contrário do que ocorre com a HMG-CoA redutase, a forma fosforilada é a forma ativa (MARINETTI, 1990; MAYES, 1994).

2.1.4. Transporte de colesterol – lipoproteínas plasmáticas

O colesterol e os ésteres de colesterol, triacilgliceróis e fosfolipídios são insolúveis em água. Esses lipídios precisam, entretanto, ser transportados de um tecido de origem (o fígado, onde são sintetizados, ou o intestino, onde são absorvidos) para os tecidos onde eles são armazenados ou metabolizados. Eles são, então, transportados pelo plasma sangüíneo na forma de estruturas organizadas denominadas lipoproteínas (LEHNINGER, 1995).

As lipoproteínas são agregados moleculares de proteínas transportadoras específicas, denominadas apolipoproteínas, com combinações variadas de fosfolipídios, colesterol, ésteres de colesterol e triacilgliceróis. A interação entre as apoproteínas e os lipídios das lipoproteínas ocorre através de regiões apolares hidrofóbicas das apoproteínas com colesterol esterificado, triacilgliceróis e com as cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolipídios e, ainda, através de ligações iônicas entre aminoácidos da região alfa-hélice das apoproteínas e a extremidade polar dos fosfolipídios (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

As lipoproteínas plasmáticas são caracterizadas por suas propriedades físico-químicas, como mobilidade eletroforética e o intervalo de densidade (LOPES et al., 1996), sendo porém a densidade, a propriedade física na qual se baseia a atual classificação (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

As lipoproteínas são classificadas em quatro tipos:

1. Quilomícrons;
2. VLDL – Very Low Density Lipoprotein (lipoproteína de muito baixa densidade)
3. LDL – Low Density Lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)
4. HDL – High Density Lipoprotein (lipoproteína de alta densidade)

A densidade das lipoproteínas aumenta proporcionalmente ao aumento do teor protéico e à redução do conteúdo lipídico, conforme o Quadro 1.

Quadro 1 – Principais características das lipoproteínas plasmáticas, em humanos

Classe de Lipoproteínas	QM	VLDL	IDL	LDL	HDL ₂	HDL ₃
Densidade inferior (g/mL)	-	0,950	1,006	1,019	1,063	1,125
Densidade superior (g/mL)	0,950	1,006	1,019	1,063	1,125	1,210
Diâmetro (Å)	800-5000	300-800	250-350	180-280	90-120	50-90
Mobilidade eletroforética	origem	pré-beta	pré-beta	beta	alfa	alfa
colesterol esterificado	5	12	23	38	16	12
colesterol livre	2	7	8	10	6	3
triglicerídeos	84	55	32	9	4	4
fosfolípidos	7	18	21	22	30	26
apolipoproteínas	2	8	16	21	44	55
Principais apolipoproteínas	A-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, E	B-100, E	B-100	A-I, A-II	A-I, A-II

QM =Quilomícrons

VLDL = lipoproteína de muito baixa densidade

IDL = lipoproteína de densidade intermediária

LDL = lipoproteína de baixa densidade

HDL₂ e HDL₃ = lipoproteína de alta densidade

Fonte: GARCIA e OLIVEIRA (1992); DE JONES et al. (1994)

A composição de apoproteína de cada lipoproteína é variável. As apolipoproteínas desempenham diversos papéis na regulação de enzimas e de proteínas que participam do metabolismo lipídico. O Quadro 2 mostra as principais características das apoproteínas.

Quadro 2 – Características das apolipoproteínas

Apo-Lp	Principal Lipoproteína	Síntese	Função
A-I	HDL ₃	Intestino e Fígado	Ativador de LCAT e remoção celular de colesterol
A-II	HDL ₂ e HDL ₃	Intestino e Fígado	Inibe remoção celular do colesterol
A-IV	QM e HDL	Intestino e Fígado	Remoção do colesterol de macrófagos; diminui a remoção de VLDL
B-100	VLDL LDL	Fígado	Reconhece o receptor B/E
B-48	QM	Intestino Fígado	Reconhece o receptor B/E e α -2macroglobulina
C-I	QM VLDL HDL	Fígado	Ativador da LCAT
C-II	QM VLDL HDL	Fígado	Ativador da enzima lipoproteína lipase (LLP)
C-III	QM VLDL HDL	Fígado	Inibidor da captação de VLDL e QM por receptores
E	QM VLDL LDL HDL	Fígado	Reconhecimento por receptores

QM = Quilomícrons

VLDL = lipoproteína de muito baixa densidade

IDL = lipoproteína de densidade intermediária

LDL = lipoproteína de baixa densidade

HDL₂ e HDL₃ = lipoproteína de alta densidade

Fonte : QUINTÃO e NAKANDAKARE, 1992

2.1.4.1. Quilomícrons

Essas lipoproteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático das células da mucosa intestinal. São as maiores lipoproteínas e as menos densas, contendo uma alta concentração de triacilgliceróis e quantidades menores de

fosfolipídios, colesterol livre, ésteres de colesterol e proteínas. São responsáveis pelo transporte dos lipídios provenientes da dieta aos seus locais de metabolismo ou armazenamento (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

Após a síntese no retículo, migram para o complexo de Golgi para serem liberadas por exocitose na linfa mesentérica. As partículas liberadas são chamadas de quilomícrons nascentes e são transportados, via ducto torácico, até a circulação sistêmica, interagindo no plasma com as lipoproteínas de alta densidade (HDL), as quais transferem apoC e apoE para os quilomícrons e estes, apoA-I e A-IV para as HDL (GARCIA e OLIVEIRA, 1992; LOPES et al., 1996).

Por ação da lipase lipoprotéica, localizada na superfície dos capilares dos tecidos, adiposo, cardíaco, muscular esquelético e a glândula mamária em lactação, ocorre a hidrólise de triacilgliceróis, permitindo a liberação de ácidos graxos livres, monoglicerídeos e glicerol que poderão ser utilizados pelo organismo para armazenamento, síntese hepática ou substrato energético (LOPES et al. , 1996).

Com a ação da lipase lipoprotéica periférica, que é ativada pela apoC-II, sobre os triacilgliceróis, ocorre uma diminuição do núcleo dos quilomícrons tornando-os partículas menores e mais densas, denominadas de quilomícrons remanescentes. O excesso do material de superfície, primeiramente fosfolipídios e colesterol livre, é transferido para a lipoproteína de alta densidade (HDL).

Os quilomícrons remanescentes são captados pelas células hepáticas, através de endocitose mediada por receptor. Na superfície das células endoteliais hepáticas, outra lipase lipoprotéica (lipase hepática) atua na hidrólise de triacilgliceróis dessas partículas remanescentes, constituindo-se a última etapa do metabolismo dos quilomícrons antes de sua remoção plasmática (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

No interior das células hepáticas, pela ação de enzimas específicas, os quilomícrons são degradados a seus componentes básicos, ou seja, aminoácidos livres, ácidos graxos, glicerol, bases nitrogenadas (colina, etanolanina e serina) e colesterol livre (MARINETTI, 1990).

O pico de quilomicronemia ocorre normalmente entre três e seis horas após a ingestão de lipídios na alimentação e, então, declina gradualmente. A

taxa de remoção de quilomícrons do plasma é rápida, com meia vida de menos de uma hora, e normalmente eles não são detectados após 12 horas de jejum (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

Níveis elevados de quilomícrons conferem ao plasma uma aparência leitosa e podem causar hipertrigliceridemia, devido ao alto teor de triacilgliceróis destas partículas (NOVAZZI e MARTINEZ, 1994).

2.1.4.2. Lipoproteína de muito baixa densidade – VLDL

São formadas no retículo endoplasmático das células hepáticas e transportam triacilgliceróis, fosfolípidios e colesterol de origem endógena aos tecidos periféricos, para suprimento energético, durante períodos de reduzida disponibilidade exógena (LOPES et al., 1996).

A síntese de VLDL é estimulada pelo aumento do fluxo de ácidos graxos livres para o fígado e também em situações que ocasionem aumento da taxa de síntese de ácidos graxos endógenos, como ocorre durante a alta ingestão de carboidratos (GUYTON, 1997).

O metabolismo das VLDL assemelha-se ao dos quilomícrons. As partículas adquirem no plasma, apoC-I, apoC-II, apoC-III e apoE das HDL circulantes, resultando nas VLDL maduras. Estas partículas têm também sua estrutura alterada pela interação com a lipase lipoprotéica, na superfície do endotélio capilar, e além disso, são enriquecidas com moléculas de colesterol esterificado proveniente das HDL. Concomitantemente, a VLDL cede triacilgliceróis, fosfolípidios, apoC e apoE para as HDL. Os remanescentes de VLDL gerados recebem a denominação de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). As IDL, são partículas menores que as VLDL e possuem somente apoB-100 e apoE em sua estrutura. Essas lipoproteínas seguem duas vias metabólicas; são removidas pelo fígado e degradadas em seus componentes básicos ou transformadas em LDL. Em condições normais, 60 a 70% das IDL são removidas rapidamente da circulação pelas células hepáticas, através de receptores específicos: receptores B/E e receptores de partículas remanescentes (LOPES et al., 1996).

As partículas não removidas pelo fígado interagem com a lipase lipoprotéica hepática, perdendo mais triacilgliceróis e fosfolípidios, além da

perda de apoE, o que acarreta alterações adicionais de composição e propriedades, produzindo as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

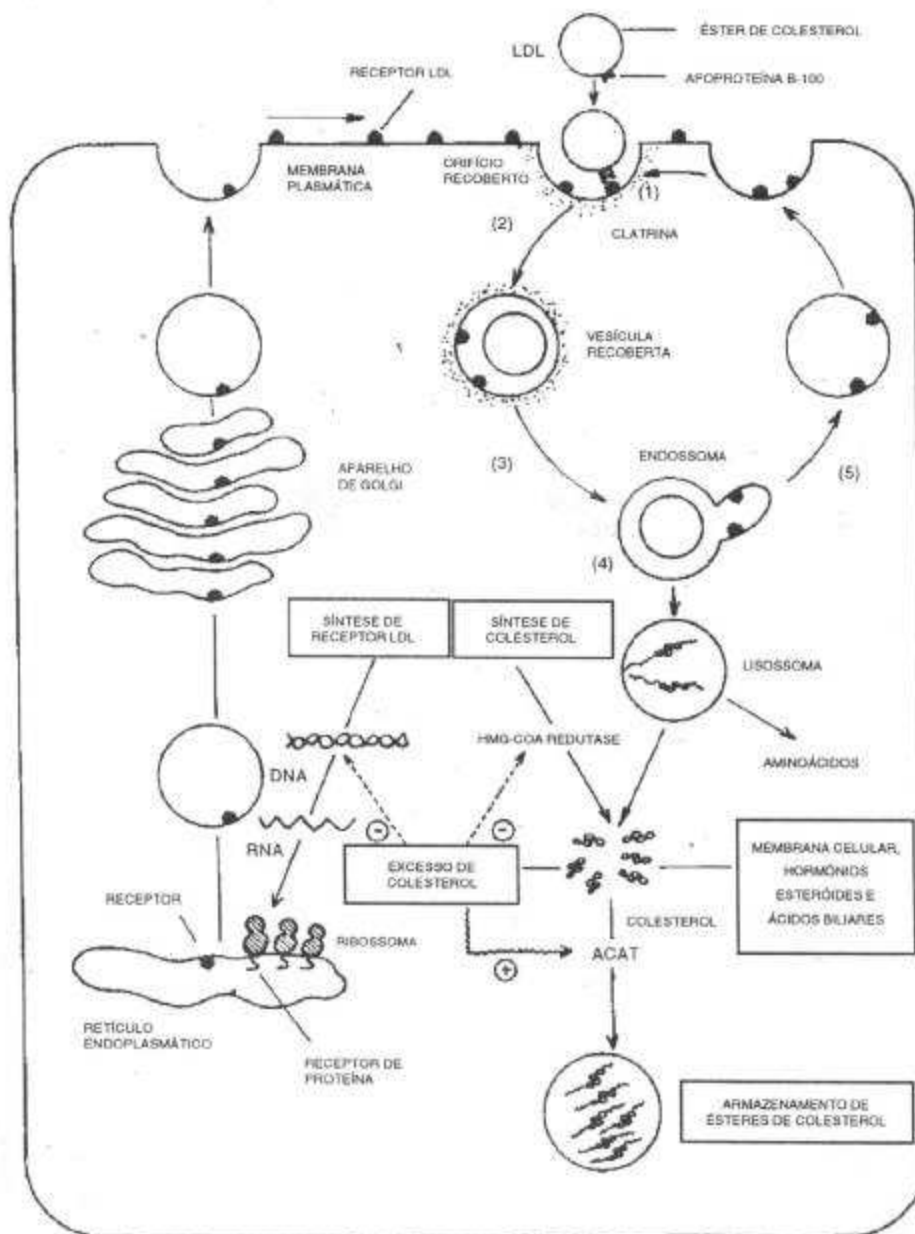
2.1.4.3. Lipoproteína de baixa densidade – LDL

As LDL contêm quase que exclusivamente ésteres de colesterol e apoB-100 como principal apolipoproteína. A composição e as propriedades das LDL estão relacionadas no Quadro 1.

As LDL são as principais moléculas transportadoras de colesterol para as células extra-hepáticas, sendo esta a forma preferencial de obtenção de colesterol, em detrimento da síntese intracelular. Nas células, este colesterol poderá ser utilizado na síntese de membranas celulares e hormônios esteroidais (LOPES et al., 1996).

As LDL têm vida-média longa (aproximadamente 3 dias). Após cumprirem suas funções como carreadoras de colesterol, 70 a 75% das LDL são captadas pelo fígado através de ligação com receptores específicos B/E. O restante utiliza uma segunda via, não dependente de receptor, de ação mais lenta (LOPES et al. 1996).

A captação através de receptores ocorre pelo processo de endocitose (MARINETTI, 1990). A internalização das LDL inicia-se com a ligação dessas partículas aos receptores, na membrana plasmática da célula, conforme mostrado na Figura 5.



Fonte : MARINETTI, 1990

FIGURA 5 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO METABOLISMO DE LDL (CAPTAÇÃO E INTERNALIZAÇÃO DA PARTÍCULA POR RECEPTORES ESPECÍFICOS)

A captação de LDL pelas células é um processo altamente regulado. O aumento do conteúdo celular de colesterol livre desencadeia três efeitos regulatórios; 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 acelerada degradação da mesma; ativação da acil-CoA: colesterol aciltransferase, promovendo o armazenamento do excesso de colesterol na forma de gotículas de ésteres de colesterol; e regulação da síntese do próprio receptor de LDL, pela redução do conteúdo de mRNA para o receptor. A redução da síntese do receptor assegura que o colesterol não será captado em excesso pela célula, retirando-o de outras células que dele necessitem, mesmo quando os níveis extracelulares se encontram muito elevados. Quando os níveis de colesterol intracelular diminuem, a regulação faz-se no sentido contrário, ocorrendo maior produção de receptores B/E (MATHEWS e VAN HOLDE, 1990).

A alimentação com alto teor de colesterol pode sobrecarregar o fígado, diminuindo assim o número de receptores de LDL e, em decorrência, elevar o nível dessa lipoproteína no plasma. Por outro lado, manipulações que diminuem o conteúdo tecidual de colesterol - como as resinas quelantes de sais biliares - diminuem a reabsorção intestinal desses ácidos, induzindo aumento na conversão hepática de colesterol em sais biliares. Ainda, a administração de inibidores da HMG-CoA redutase é acompanhada de aumento no número de receptores hepáticos para LDL, o que, conseqüentemente, diminui o nível plasmático de LDL (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

2.1.4.4. Lipoproteína de alta densidade– HDL

Como o colesterol não pode ser degradado nos tecidos periféricos, ele deve retornar ao fígado para excreção ou degradação. Este processo é chamado de transporte reverso do colesterol (GARCIA E OLIVEIRA, 1992).

As HDL são as principais lipoproteínas envolvidas no mecanismo de remoção do colesterol dos tecidos extra-hepáticos. São constituídas de um núcleo de ésteres de colesterol recoberto com colesterol não esterificado,

fosfolipídios e apoproteínas, onde as principais são apoA-I e apoA-II e quantidades menores de apoC e apoE. Podem ser sintetizadas no fígado e intestino ou formadas a partir dos constituintes de superfície liberados pela lipólise das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, como quilomícrons e VLDL (GARCIA E OLIVEIRA, 1992).

Quando quilomícrons e VLDL perdem triacilgliceróis, ocorre diminuição do volume da partícula; dessa forma, componentes de superfície, como colesterol livre, fosfolipídios e apoproteínas, são liberados, formando macroagregados moleculares de forma discoidal; precursores da HDL plasmática. Esse mecanismo é mediado por uma enzima presente na superfície da HDL, denominada lecitina colesterol aciltransferase (LCAT). A LCAT é uma enzima sintetizada no fígado, exercendo sua função no plasma, onde esterifica o colesterol agregado à superfície da HDL. É ativada por apoA-I, apoA-II e possivelmente por apoC-I (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

As HDL nascentes, lipoproteínas de forma discóide, ricas em fosfolipídios, contendo apoA e possivelmente apoE, são partículas que têm alta afinidade por colesterol não-esterificado. O processo de incorporação de colesterol pelas HDL inicia-se com a interação destas partículas com estruturas que contêm colesterol livre na interface com o meio aquoso, como lipoproteínas menos densas (quilomícrons e VLDL) ou membranas celulares (macrófagos, fibroblastos, hemácias ou outras células extra-hepáticas). Através deste mecanismo as células eliminam o excesso de colesterol livre (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

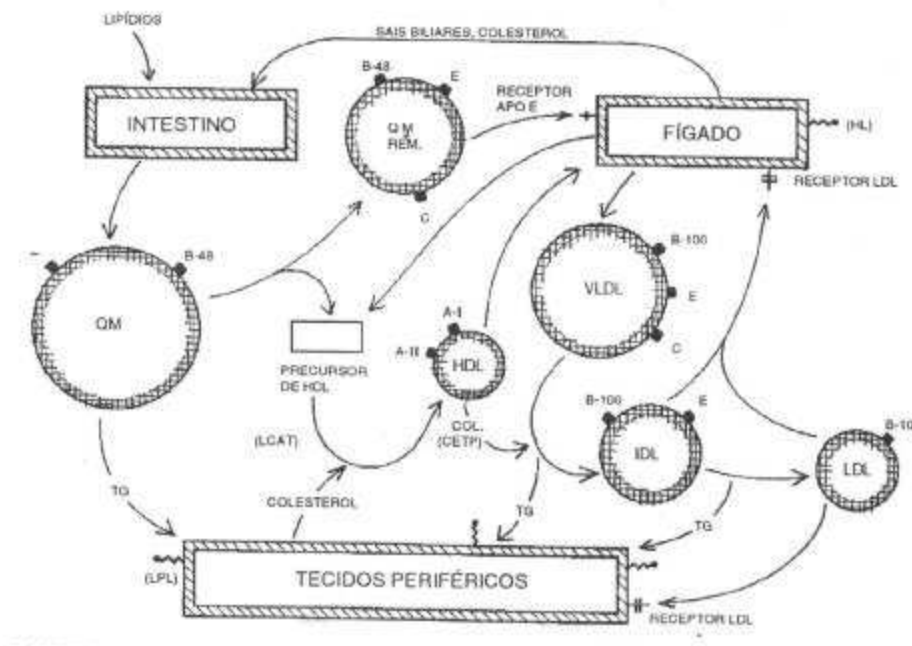
O colesterol, após esterificação na superfície da HDL, é incorporado ao seu núcleo, resultando em partículas esféricas denominadas HDL₃. Na circulação, HDL₃ recebe constituintes adicionais. Além do colesterol celular ser uma fonte contínua de colesterol, ele pode ser adquirido durante degradação de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (quilomícrons e VLDL). Colesterol não-esterificado, fosfolipídios e apoC e apoE liberadas durante a lipólise podem também ser incorporados a HDL. Essas modificações, juntamente com a ação contínua da LCAT, podem expandir a HDL₃, produzindo uma partícula maior, a HDL₂ (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

A HDL₂ transfere colesterol esterificado para outras classes de lipoproteínas como, quilomícrons, quilomícrons remanescentes, VLDL e IDL,

que são rapidamente removidas pelo fígado, caracterizando o transporte reverso de colesterol (GARCIA e OLIVEIRA, 1992).

O processo de transporte reverso do colesterol, permitindo que o excesso de colesterol dos tecidos periféricos seja levado ao fígado, onde pode ser metabolizado, segundo MARINETTI (1990), poderia explicar porque níveis elevados de HDL-colesterol conferem proteção à aterosclerose e à doença arterial coronariana.

NA FIGURA 6 É MOSTRADO UM ESQUEMA GERAL DO METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS, EM HUMANOS.



FONTE : MARINETTI, 1990

Figura 6 – Esquema geral do metabolismo de lipoproteínas

2.2. Hipercolesterolemia

O colesterol, componente vital de todas células do corpo, é constituinte normal do sangue. Apesar da maior parte do colesterol ser sintetizado pelo fígado, a quantidade que aparece no sangue é influenciada pela composição da dieta. Altos índices de colesterol no sangue estão associados a uma dieta, em geral, altamente calórica e com alto nível de gordura animal (MARTINEZ, 1992).

Existe uma relação bem definida entre níveis séricos de colesterol e a quantidade e o tipo de gordura consumida. O fator alimentar mais importante na elevação do colesterol plasmático é a ingestão de ácidos graxos de cadeia saturada. Esses, elevam a concentração de todas as classes de lipoproteínas, principalmente, LDL e VLDL (PITTA, 1997).

Tem-se que os níveis de colesterol sérico são também determinados geneticamente e portanto, a mesma composição dietética provoca níveis de colesterol sangüíneo que podem variar enormemente de indivíduo para indivíduo (MONTEIRO e ROSADO, 1993).

Encontra-se no Quadro 3, os níveis de colesterol total para indivíduos de diversas idades e o referente risco de doenças cardiovasculares.

Quadro 3 - Referência dos níveis de colesterol total (mg/dl) com relação ao risco e faixa etária, em humanos

Idade (anos)	Risco moderado	Alto Risco
2-19	> 170	>185
20-29	>200	>220
30-39	>220	>240
40 ou mais	>240	>260

Fonte: MARTINEZ, 1992

2.3. A microbiota gastrointestinal

A microbiota intestinal tem sido exaustivamente estudada nos últimos anos, em virtude do interesse em conhecer suas relações com o hospedeiro.

Os grupos microbianos que convivem em relações simbióticas ou antagônicas no trato gastrointestinal de homens e animais formam a “microbiota gastrointestinal”. Estes microrganismos possuem uma alta atividade metabólica, afetando a estrutura intestinal e o desenvolvimento de fatores de resistência neste local (RASIC e KURMANN, 1983).

A microbiota intestinal de um indivíduo é um ecossistema extremamente complexo, contendo cerca de 100 trilhões de bactérias de mais de 400 diferentes espécies (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991).

Ao nascer, o indivíduo não possui bactérias em seu intestino, porém, logo após o nascimento, inicia-se um processo de colonização do trato intestinal, que inclui uma variedade de organismos. A chamada microbiota indígena é derivada primeiramente da mãe e depois do meio ambiente externo (SHAHANI e AYEBO, 1980).

Os lactobacilos constituem parte significativa dessa microbiota original, porém, outros gêneros também colonizam o intestino, como *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Fusobacter* e *Escherichia*. Esses gêneros são isolados de todas as porções do trato gastrointestinal do homem (GREENE e KLAENHAMMER, 1994).

Dentre as bactérias que colonizam o trato intestinal, algumas vivem por um longo período no intestino e são chamadas residentes, enquanto outras aparecem apenas por alguns dias, as chamadas transientes. As bactérias residentes se estabelecem durante todo o processo evolutivo do homem e incluem as bactérias mais adaptadas para terem uma relação simbiótica com o hospedeiro (MITSUOKA, 1978).

O trato digestivo do ser humano consiste em boca, cavidade oral, esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso (ceco, cólon ascendente, cólon transversal, cólon descendente e cólon sigmoidal) e reto (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991).

A cavidade oral e o intestino grosso são os órgãos que apresentam o maior número de microrganismos, conforme apresentado na Quadro 4.

Quadro 4 – Principais gêneros de bactérias residentes no trato gastrointestinal

Segmento	Gênero
Cavidade oral ($10^2 - 10^3$ / ml de saliva)	<i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Neisseria</i>
Estômago e intestino delgado ($10^2 - 10^3$ UFC/g de conteúdo)	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> <i>Bifidobacterium</i>
Intestino Grosso ($10^7 - 10^9$ UFC/g de conteúdo)	<i>Bacteroides</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Peptostreptococcus</i>

Fonte: Adaptado de MITSUOKA (1978), HULL (1992)

2.3.1. Funções da microbiota gastrointestinal

ATRAVÉS DE ESTUDOS COM ANIMAIS “GERM FREE” (LIVRES DE FORMAS DE VIDA MICROBIANA) E ANIMAIS CONVENCIONAIS (MICROBIOTA NORMAL), CONSTATOU-SE QUE A MICROBIOTA INFLUENCIA A BIOQUÍMICA DO HOSPEDEIRO, ATUANDO NA TRANSFORMAÇÃO DE MOLÉCULAS PRODUZIDAS; A FISIOLOGIA, INFLUENCIANDO A TAXA DE RENOVAÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS E A IMUNOLOGIA, POR MEIO DO EFEITO ADJUVANTE DE ANTÍGENOS BACTERIANOS (TANNOCK, 1991).

Os microrganismos da microbiota intestinal podem inibir o crescimento de patógenos pela produção de ácidos orgânicos, principalmente ácidos graxos de cadeia curta, pela produção de bacteriocinas e pela desconjugação de ácidos biliares (ALM, 1991).

A microbiota possui ainda várias enzimas que podem atuar metabolicamente no intestino, na conversão de substâncias em compostos que podem ser benéficos ou nocivos ao hospedeiro. Esses compostos podem afetar a nutrição e a fisiologia do hospedeiro, a eficácia de drogas, a carcinogênese e o processo de envelhecimento, assim como a resistência do hospedeiro à infecção (MITSUOKA, 1992; SELLARS, 1991).

A MICROBIOTA INTESTINAL, QUANDO PERTURBADA OU DIMINUÍDA, PODE SER RESTABELECIDADA PELA ADMINISTRAÇÃO DE PROBIÓTICOS (FULLER, 1989).

2.3.1.1. PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL NO METABOLISMO DE LIPÍDIOS

ESTUDOS COM ANIMAIS GERM-FREE E CONVENCIONAIS REVELAM QUE A MICROBIOTA INTESTINAL INTERFERE ATIVAMENTE NO METABOLISMO DE LIPÍDIOS E ESTERÓIS. BACTÉRIAS INTESTINAIS TRANSFORMAM ÁCIDOS BILIARES PRIMÁRIOS EM UMA GRANDE VARIEDADE DE ÁCIDOS BILIARES SECUNDÁRIOS, REDUZEM O POOL DE ÁCIDOS BILIARES NO INTESTINO, PROMOVEM A EXCREÇÃO FECAL E ACELERA O “TURNOVER” DE ÁCIDOS BILIARES. ISTO RESULTA EM AUMENTO NA TAXA DE CATABOLISMO DE COLESTEROL A ÁCIDOS BILIARES. A MICROBIOTA INTESTINAL PROMOVE A EXCREÇÃO DE COLESTEROL PELAS FEZES E CONVERTE ESTERÓIDES INSATURADOS EM DERIVADOS SATURADOS. TAMBÉM INTERFERE NA ABSORÇÃO DE GORDURA, NA PRODUÇÃO BACTERIANA DE ÁCIDOS GRAXOS E CONVERTE ÁCIDO LINOLÉICO E OLÉICO EM ÁCIDO ESTEÁRICO POR HIDROGENAÇÃO DA DUPLA LIGAÇÃO (EYSEN, 1973).

2.4. Características de culturas lácticas candidatas ao uso como adjunto dietético

Vários critérios têm sido usados para seleção de culturas para uso como adjunto dietético. A cultura candidata a probiótico deve possuir características básicas tais como; ser habitante normal do trato intestinal; ser capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal e colonizar o intestino onde produziram substâncias antimicrobianas (ácidos orgânicos e outros) ativas contra microrganismos enteropatogênicos, putrefativos e proteolíticos, controlando assim o ambiente microbiano; produzir efeitos benéficos ao hospedeiro quando no intestino e manter-se viável no alimento carreador antes do consumo (GOLDIN, 1998).

A MAIORIA DAS BACTÉRIAS NÃO SOBREVIVEM À PASSAGEM PELO TRATO GASTROINTESTINAL, DEVIDO ÀS CONDIÇÕES EXTREMAMENTE ÁCIDAS DO ESTÔMAGO E À BILE QUE É LIBERADA NO DUODENO. CONTUDO, MUITOS MICRORGANISMOS TÊM SIDO UTILIZADOS COM O PROPÓSITO DE PRODUZIR RESPOSTAS BENÉFICAS À SAÚDE DE ANIMAIS E HUMANOS (GOLDIN, 1998). ALGUNS DESSES MICRORGANISMOS ESTÃO APRESENTADOS NO QUADRO 5.

QUADRO 5 - ALGUNS MICRORGANISMOS USADOS COMO PROBIÓTICOS PARA ANIMAIS E HUMANOS:

BACTÉRIA			
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>acidophilus</i>	<i>bifidum</i>	<i>faecium</i>	<i>mesenteroides</i>
<i>plantarum</i>	<i>infantis</i>		
<i>casei</i>	<i>longum</i>		
<i>rhamnosum</i>	<i>thermophilum</i>		
<i>gg</i>	<i>adolescents</i>		
<i>delbrueck subs. bulgaricus</i>	<i>animalis</i>		
<i>reuteri</i>			
<i>fermentum</i>			
<i>brevis</i>			
<i>lactis</i>			
<i>cellobiosus</i>			

FONTE: ADAPTADO DE GOLDIN (1998)

2.5. Caracterização do *Lactobacillus acidophilus*

KANDLER e WEISS (1993) caracterizaram os lactobacilos como bactérias gram-positivas, em forma de bastonetes retos ou algumas vezes de coco bacilo, catalase negativas, aerotolerantes ou microaerofílicas e sacarolíticas. *Lactobacillus acidophilus* é homofermentativo, grande produtor de lactato. Os lactobacilos não esporulam, não formam pigmentos, são

mesofílicos, quimiorganotróficos e crescem em meio complexo. Fazem parte da microbiota normal do intestino, boca e vagina de vários animais homeotérmicos, incluindo o homem.

Crescem a 45°C, mas não a 10°C. Não produzem amônia a partir da arginina, fermentam celobiose, galactose, glicose, lactose, maltose, sacarose, trealose e esculina, mas não fermentam manitol, melezitose, ramnose, sorbitol e xilose (GILLILAND et al. 1985).

Os *Lactobacillus* sobrevivem ao suco gástrico e à bile e têm mostrado efeito inibitório no crescimento de patógenos, como *Listeria monocytogenes* e *Shigella sonnei* (NADER de MACÍAS, et al., 1992).

2.6. Considerações terapêuticas e nutricionais do uso de *Lactobacillus acidophilus* como adjunto dietético

2.6.1. Efeito na intolerância à lactose por indivíduos lactase não persistentes

A intolerância à lactose é resultado da quantidade insuficiente de lactase ou β -galactosidase no intestino delgado humano, dificultando a hidrólise da lactose. Estes indivíduos, quando consomem leite, apresentam sintomas tipo, flatulência, dores abdominais e diarreia. Tais sintomas são resultado da fermentação da lactose não digerida, por bactérias, com produção de H_2 , CH_4 , CO_2 e ácidos orgânicos de cadeia curta.

O consumo de produtos lácteos contendo culturas, promove grande alívio dos sintomas apresentados por esses indivíduos (MONTES et al., 1995).

SEGUNDO SAVAIANO ET AL (1984) O CONSUMO DE IOGURTE MELHORA SIGNIFICATIVAMENTE A DIGESTÃO DA LACTOSE EM INDIVÍDUOS LACTASE-DEFICIENTES, QUANDO COMPARADO COM O LEITE OU IOGURTE PASTEURIZADO. ESSE AUMENTO DA DIGESTÃO DA LACTOSE DO IOGURTE É PROVAVELMENTE DEVIDO A ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE INERENTE AOS MICRORGANISMOS UTILIZADOS NA FERMENTAÇÃO DO IOGURTE. ESSA ENZIMA, POR SER INTRACELULAR, SOBREVIVE À PASSAGEM PELO ESTÔMAGO, ATUANDO NOS INTESTINOS.

NOH E GILLILAND (1993) EM ESTUDO UTILIZANDO UMA FORMULAÇÃO DE IOGURTE, CONSTATARAM QUE ESTE ERA CAPAZ DE AMENIZAR A MÁ DIGESTÃO DA LACTOSE EM INDIVÍDUOS LACTASE NÃO-PERSISTENTES.

De acordo com relatos de GILLILAND (1989), o consumo de leite acidófilo não fermentado pode melhorar a digestão da lactose em indivíduos deficientes em lactase, por um mecanismo similar ao observado para o iogurte. As células de *L. acidophilus*, se viáveis no leite acidófilo, podem conter a β -galactosidase. No intestino, a presença de bile, não impede que as células de *L. acidophilus* produzam a enzima e hidrolisem a lactose, já que essa espécie é tolerante à bile.

2.6.2. Atividade antimicrobiana e proteção contra patógenos

A POSSÍVEL AÇÃO PROTETORA QUE AS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO POSSUEM CONTRA OS MICRORGANISMOS CAUSADORES DE DOENÇAS GASTROINTESTINAIS TEM RECEBIDO BASTANTE ATENÇÃO POR PARTE DOS PESQUISADORES, DESDE O INÍCIO DOS ANOS 80.

L. ACIDOPHILUS E *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* TÊM DEMONSTRADO ANTAGONISMO À ENTEROPATÓGENOS, COMO *E. COLI*, *SHIGELLA DYSENTERIAE*, *SAMONELLA TYPHI*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *CANDIDA ALBICANS* E *CAMPYLOBACTER JEJUNI* EM VÁRIOS ESTUDOS “IN VITRO” E “IN VIVO” (GILLILAND, 1979; GILLILAND E SPECK, 1977; RASIC E KURMAN, 1983; SANDINE, 1979).

Os mecanismos dessa inibição à patógenos intestinais exercida por certas culturas lácticas, ainda não são completamente entendidos. Sabe-se que este efeito é devido à produção de ácidos orgânicos, ácidos graxos de cadeia curta ou à produção de substâncias antibacterianas (GILLILAND, 1989).

GILLILAND e SPECK (1977) demonstraram que *L. acidophilus* inibiu *S. aureus*, *S. typhimurium* e *E. coli* enteropatogênica “in vitro” e que o efeito antagônico não foi devido somente à produção de ácidos pelo *L. acidophilus*. Os autores fazem referência às bacteriocinas produzidas por esta bactéria láctica e revelam que o efeito inibidor do *L. acidophilus* sobre patógenos envolve a interação de mais de um mecanismo de ação.

Leite fermentado contendo *L. casei* e *L. acidophilus* promoveu resistência contra infecção por *Salmonella typhimurium* em ratos. Os resultados sugeriram que essa resistência foi devido a imunidade protetora anti-salmonela mediada pelo tecido da mucosa intestinal (PERDIGÓN, 1990).

GONZALES et al. (1993) estudaram a inibição de enteropatógenos por linhagens de lactobacilos presentes em leites fermentados “in vitro”. Constatou-se que *L. casei* e *L. acidophilus* inibiram totalmente o crescimento de *E. coli*, após 24 horas de incubação a 37°C. Segundo os autores, esta inibição não foi somente devida a mudanças de pH, visto que meios complementados somente com ácidos orgânicos, não inibiram o crescimento desse patógeno.

2.6.3. Efeito anticarcinogênico

Várias bactérias lácticas têm demonstrado produzir atividades anticarcinogênicas e antimutagênicas e algumas dessas atividades são devido a substâncias produzidas durante seu crescimento. Também é possível que essa atividade seja devido a ação antagonista dessas bactérias, nos intestinos, evitando que os microrganismos inibidos possam converter substâncias procarcinogênicas em carcinogênicas. Certos aminoácidos, lipídios, ácidos biliares secundários e metabólitos do colesterol são algumas dessas substâncias (GILLILAND, 1989).

A produção de ácidos orgânicos e agentes antimicrobianos por bactérias lácticas pode resultar no decréscimo de bactérias putrefativas, que possuem enzimas que participam na conversão de compostos potencialmente carcinógenos (MITSUOKA, 1978).

Algumas evidências sugerem a participação de certos microrganismos na tumorigênese. Números elevados de tumores no fígado foram desenvolvidos em camundongos germ-free associados com *E. coli*, *Enterococcus faecalis* e *Clostridium paraputrificum*. Entretanto, a proliferação de tumores nos animais diminuiu consideravelmente na presença de *Bifidobacterium longum*. Têm sido sugerido que bactérias bífidas removem a fonte de pró-carcinógenos ou as enzimas que conduzem à sua formação (MITSUOKA, 1978).

SHAHANI e al (1983) utilizando ratos como modelo animal, estudaram a influência de *L. acidophilus* na tumorigênese. Foi observado menor número

de tumores nos ratos que receberam leite fermentado com *L. acidophilus* em comparação com os animais que receberam somente leite desnatado. Os autores concluíram que o *L. acidophilus* produziu alguma substância (não identificada), durante seu crescimento, que promoveu efeito antagônico na proliferação das células cancerosas.

GOLDIN e GORBACH (1984) estudaram a influência da administração de células de *L. acidophilus* na atividade das enzimas fecais, β -glucuronidase, azoredutase e nitroredutase (enzimas que convertem substâncias procarcinógenas em carcinógenas no trato intestinal) em ratos e constataram redução significativa na atividade das três enzimas nos animais que receberam leite contendo células viáveis de *L. acidophilus*.

2.6.4. Efeito na modulação dos níveis de colesterol sanguíneo

Considera-se que produtos lácteos fermentados inibem a síntese e absorção de colesterol e estimulam seu metabolismo (FUKUSHIMA, 1995).

Em 1974, MANN e SPOERRY conduziram um estudo com o objetivo de avaliar a influência de compostos surfactantes, como o Tween 20, na absorção de colesterol, em humanos. A experimentação envolveu 24 homens de uma tribo africana que, geralmente, apresentam uma menor incidência de doenças cardiovasculares, comparada à populações de outras regiões. Os indivíduos foram distribuídos em dois grupos: um recebeu o leite fermentado com uma cultura “selvagem” de lactobacilos adicionado de placebo (azeite de oliva) e o outro recebeu o mesmo leite fermentado, adicionado de “Tween 20”. O estudo teve duração de 6 dias, onde foram consumidos de 4 a 5 litros do produto por indivíduo por dia. Devido ao consumo elevado do produto, todos os indivíduos ganharam peso. No entanto, os níveis de colesterol sérico reduziram em ambos os grupos. Os que ganharam mais peso, apresentaram menores níveis de colesterol sérico. Os autores concluíram que um fator produzido no leite fermentado, impediu a síntese de colesterol pelo organismo, resultando na redução das concentrações séricas. Contudo, nem o microrganismo utilizado na fermentação, nem o fator produzido, foram identificados.

Desde então, o efeito hipocolesterolemizante de produtos contendo *Lactobacillus* tem sido demonstrado em estudos com animais e humanos.

HARRISON e PEAT (1975) estudando o efeito de *L. acidophilus* em crianças de 6 a 9 dias de vida, concluíram que essa bactéria atuava no colesterol presente no intestino, reduzindo a sua absorção.

Sabendo-se que para formar sais biliares há necessidade de colesterol e que na bile os ácidos biliares se encontram conjugados com os aminoácidos glicina e taurina, certos microrganismos atuam na redução dos níveis de colesterol sangüíneo de uma forma indireta, desconjugando ou desidroxilando os sais biliares, ou seja, atuam na quebra da ligação dos ácidos biliares com a glicina e taurina, por enzimas bacterianas. De acordo com EYSEN (1973) a diminuição dos ácidos biliares por desconjugação bacteriana é compensada, para manter o equilíbrio necessário ao organismo, pelo aumento do catabolismo do colesterol, promovendo uma redução do colesterol total.

Além disso, os ácidos biliares desconjugados absorvem baixa quantidade de lipídios no trato gastrointestinal comparado com os ácidos biliares conjugados. Isso pode influenciar o nível de colesterol sangüíneo por ocorrer uma redução na absorção de colesterol no intestino (GILLILAND, 1989).

GILLILAND et al (1977) estudaram a capacidade de vários lactobacilos intestinais em desconjugar ácidos biliares e encontraram grandes variações entre as estirpes testadas. Todas as estirpes de *L. acidophilus* isoladas de fezes humanas, desconjugaram taurocolato, no entanto somente uma das seis estirpes testadas, desconjugaram glicocolato. Nove dos 13 isolados de *L. casei* desconjugaram taurocolato e 9, desconjugaram glicocolato.

GILLILAND et al. (1985) sugeriram que o efeito hipocolesterolemizante do *L. acidophilus* era devido à capacidade de assimilar colesterol de algumas estirpes resistentes à bile. Em experimentos “in vitro”, o decréscimo do nível de colesterol foi observado no sobrenadante das culturas de *L. acidophilus* incubadas na presença de sais biliares. Ao mesmo tempo, um aumento do nível de colesterol nas células do “pellet” foi observado. Os autores se referiram a este fenômeno como assimilação (ou remoção) de colesterol pelas células.

No entanto, KLAVER e VAN DER MEER (1993) desenvolveram um estudo “in vitro” em que células de várias estirpes de *L. acidophilus* e *B. bifidum* foram postas para fermentar na presença e ausência de sais biliares. Os resultados demonstraram uma relação entre o colesterol precipitado e a

desconjugação de sais biliares, pois os microrganismos que conseguiram desconjugar os sais biliares, causavam uma precipitação não apenas desses sais, mas também do colesterol. O colesterol é precipitado sob condições ácidas na presença de sais biliares desconjugados, concluindo-se que a precipitação do colesterol é resultado da redução da solubilidade dos sais biliares desconjugados e a assimilação do colesterol por células bacterianas provavelmente não é necessária para a remoção do colesterol do meio.

GILLILAND et al (1985) testaram várias estirpes de *L. acidophilus* de origem suína (C1-5; C2-5; GP1B; GP2B; GP4A; P47; RP32; RP43; S-1), quanto à capacidade para crescer na presença de bile e para assimilar colesterol de um meio de cultura sob condições de anaerobiose e constataram grandes variações entre as estirpes. A estirpe RP32 foi a que assimilou maior quantidade de colesterol e a P47, assimilou pouco ou nenhum colesterol do meio de cultura. Suínos alimentados com dieta rica em colesterol suplementada com a estirpe RP32 tiveram o colesterol sérico diminuído significativamente. Já a dieta contendo a estirpe P47, selecionada por sua capacidade de crescer bem na presença de bile, mas com baixa capacidade de remover colesterol de meio de cultura, não exerceu o mesmo efeito nos níveis sangüíneos de colesterol dos animais (GILLILAND et al., 1985).

Em outro estudo, DAMBEKOD e GILLILAND (1998) estudaram a incorporação de colesterol pela membrana celular de *B. longum* tolerante à bile e com capacidade de desconjugar taurocolato de sódio e relataram que a desconjugação do taurocolato de sódio não tinha ligação direta com a quantidade de colesterol removido da cultura. No entanto, a inclusão de taurocolato de sódio no meio de crescimento, aumentou a capacidade da *B. longum* de remover colesterol do meio. A porção do colesterol que foi removida do meio foi recuperada por uma fração da membrana celular, sugerindo alguma assimilação de colesterol pela membrana.

FUKUSHIMA et al. (1995) investigaram o efeito de um probiótico composto de espécies de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Sacharomyces* e *Candida*, no metabolismo lipídico de ratos e demonstrou que o efeito do probiótico foi claramente observado, quando este foi adicionado a uma dieta com alto teor de gordura e colesterol. Esses efeitos foram o decréscimo da concentração de colesterol sérico e hepático, tendo a fração

HDL aumentada e VLDL, IDL e LDL, reduzidas, em comparação ao controle; o aumento na excreção de esteróis nas fezes e a inibição da atividade da HMG-CoA redutase. Possivelmente o probiótico restabeleceu o balanço da microbiota intestinal, sendo constatado um aumento de *Bifidobacterium* e *Eubacterium* e um decréscimo de *E. coli* e ainda, a desconjugação dos ácidos biliares e a inibição da formação de micelas no intestino (FUKUSHIMA, 1995).

FUKUSHIMA (1995) atribuiu os efeitos sobre a síntese e metabolismo do colesterol promovidos pelo probiótico composto por diversas espécies de microrganismos, a uma relação simbiótica dentro da flora intestinal, mais do que por efeitos isolados de cada espécie.

Alguns testes feitos com grupos de voluntários, aos quais foram administradas doses de iogurte, mostraram uma redução de 5 a 10% no colesterol sangüíneo. O efeito persistiu durante todo o período de administração do iogurte, mas se anulou rapidamente após a retirada deste da dieta (HEPNER et al., 1979).

Estudo conduzido por KHEDKAR et al. (1993) com 20 indivíduos saudáveis de 50 a 60 anos, objetivou observar os efeitos da administração de leite acidófilo (200mL/dia) durante 30 dias, sobre o colesterol plasmático dos voluntários. O nível de colesterol sérico foi determinado antes, durante e após a administração do leite acidófilo. Um aumento não significativo no colesterol sérico, foi observado 15 dias após a interrupção do ensaio, concluindo-se que o efeito hipocolesterolemizante do leite acidófilo se anulou após o término de sua administração, retornando aos valores do início da experimentação.

2.7. Translocação

O termo translocação foi citado primeiramente em 1966 por WOLOCHOW et al, para descrever a passagem de bactérias viáveis provenientes do trato gastrointestinal para sítios extra-intestinais ou tecidos.

Verifica-se translocação bacteriana quando a população de certas bactérias intestinais alcança níveis elevados; quando o sistema imunológico se encontra de alguma maneira comprometido e quando a mucosa intestinal, que funciona como uma barreira, está fisicamente alterada. Além destes, fatores

ambientais, como dieta, stress e outros, podem alterar o delicado balanço ecológico no trato gastrointestinal, promovendo também a translocação (BERG, 1992).

Translocação bacteriana da microbiota nativa, que normalmente colonizam o trato gastrointestinal em níveis elevados, pode ocorrer em taxa reduzida, de forma “espontânea”, através da mucosa de animais saudáveis (BERG, 1992).

Na presença de uma barreira mucosa intacta, a migração dos microrganismos através da parede intestinal ocorre por pinocitose (processo de ingestão de quantidades muito pequenas de líquido extracelular e de substâncias nele dissolvidas, sob a forma de pequenas vesículas) (BERG, 1995).

No entanto, translocação bacteriana envolve interações complexas entre os mecanismos de defesa e a capacidade para transpor a barreira intestinal e sobreviver em outro ambiente, sendo necessários mais pesquisas para elucidar os mecanismos envolvidos na passagem de microrganismos do trato gastrointestinal para outros sítios, no hospedeiro saudável ou debilitado (BERG, 1992). Esse mesmo autor relata ainda que a translocação de *L. acidophilus* do trato gastrointestinal para outros órgãos e, ou tecidos não causa doença severa, porém, é necessário o conhecimento dos mecanismos de ação envolvidos na translocação de bactérias utilizadas como probióticos, para uma definição de seu consumo por pessoas com algum tipo de debilitação. Existem casos excepcionais de infecção local e, ou sistêmica que podem favorecer a translocação de bactérias do ácido láctico do lúmen intestinal para o sangue (BERG, 1992).

TARANTO et al. (1998) estudaram o efeito de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 na translocação da microbiota intestinal em ratos, em várias dosagens (10^4 a 10^8 células/dia/animal) e observaram que ocorreu colonização no fígado e baço, após 2 dias de tratamento com doses de 10^6 a 10^8 cel/dia. Porém nenhuma translocação foi observada após 7 dias de tratamento com dose de 10^4 cel/dia, sugerindo que a taxa de translocação é dose dependente.

Entretanto, ZHOU et al (2000), alimentando ratos com estirpes de *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, com doses de 10^{11} UFC/animal/dia, durante 8 dias, não observaram translocação dos

microrganismos ingeridos para os nódulos linfáticos, baço e fígado dos animais testados. De acordo com os autores, nenhuma alteração morfológica na mucosa intestinal dos animais foi observada, já que danos à esta estrutura, está altamente associada com a taxa de translocação bacteriana. Não houve diferença significativa na incidência de translocação entre as diferentes estirpes e o grupo controle, sugerindo que a translocação observada não estava associada à administração das bactérias lácticas. Concluíram que, ou as estirpes testadas não tinham capacidade para translocar do trato gastrointestinal para outros órgãos ou tecidos, ou então, ocorreu a translocação, mas os microrganismos foram eliminados pelo sistema de defesa do hospedeiro (ZHOU et al., 2000).

ALLORI et al. (2000) estudaram translocação bacteriana em ratos desnutridos que receberam suplementação com leite desnatado (controle) e leite desnatado enriquecido com *L. casei* (teste) e revelaram que em condições normais, a microbiota intestinal é estável e previne a colonização de tecidos e, ou órgãos pelas bactérias ingeridas, mas sob condições de desnutrição, essa flora é severamente afetada e a translocação bacteriana pode ser induzida. Os autores constataram translocação nos ratos desnutridos, porém, esta foi imediatamente cessada quando se administrou leite ou leite com *L. casei*, como suporte nutricional para recuperação da desnutrição.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Culturas Láticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) e de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde 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 da cultura utilizada como probiótico

A cultura de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, de origem humana, foi obtida no Banco de Culturas do Laboratório de Culturas Láticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

Foi mantida sob congelamento a -18°C em LDR 12% (leite desnatado reconstituído a 12% de sólidos não gordurosos) e 50% de solução de glicerol (20%). Para completa ativação, a cultura foi descongelada a temperatura ambiente e repicada três vezes em caldo MRS (De Mann, Rogosa e Sharpe) esterilizado, sendo que para a 1ª repicagem utilizou-se 2% de inóculo e para as demais, 1%. Seguiu-se a incubação a 37°C por 24 horas. No período entre as repicagens a cultura foi mantida sob refrigeração (5°C).

Para a confirmação da identidade, a cultura foi submetida à coloração de Gram e aos testes de fermentação de açúcares e da catalase. Para o teste de fermentação dos principais carboidratos (galactose, lactose, maltose, sorbitol, rafinose e manitol), utilizou-se caldo MRS adicionado de 2% do açúcar-teste e 0,004% do indicador púrpura de bromocresol, com incubação a $37^{\circ}\text{C}/48\text{ h}$, segundo a metodologia de DAVIS, 1973.

3.2. Obtenção do concentrado de células de *L. acidophilus* NCFM

A cultura de *L. acidophilus* NCFM foi ativada três vezes em caldo MRS, sendo a última ativação feita em volume de 200 mL do caldo em frasco erlenmeyer, seguida da incubação a 37°C por 24 horas. Após crescimento, a cultura foi distribuída em tubos de centrífuga Nalgene de polipropileno (50ml) com tampas rosqueáveis, previamente esterilizados. Seguiu-se a centrifugação por $2000 \times g$ por 20 minutos, em centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, FANEM. Após descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensionado em LDR 10% esterilizado, constituindo-se assim um concentrado de células contendo cerca de 10^{10} UFC/mL. Uma alíquota de 1 mL foi retirada para contagem de células viáveis de *L. acidophilus* NCFM em ágar MRS.

O plaqueamento “pour-plate” foi feito nas diluições 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} , com incubação a 37°C por 48 horas.

O concentrado foi preparado a cada dois dias, acondicionado em tubos de 5 mL estéreis e estocados a 5°C até o momento da administração aos animais.

3.3. Preparo das dietas experimentais

As dietas experimentais foram preparadas de acordo com a dieta padrão para roedores AIN-93G, segundo REEVES et al (1993). Esta dieta é indicada para experimentações utilizando-se animais roedores adultos, para manutenção de seu peso corpóreo.

A composição dos grupos (dietas) experimentais, Padrão (adaptada da AIN-93G, com 3,5% de óleo de soja e 3,5% de gordura hidrogenada); Controle (dieta Padrão + colesterol + ácido cólico); LDR (dieta Controle suplementada com leite desnatado reconstituído a 10%) e P (dieta Controle suplementada com probiótico, na forma de um concentrado de células contendo 10^{10} UFC/ml de *L. acidophilus* NCFM) está indicada no Quadro 6.

Concentrações de 1% de colesterol cristalino (Vetec) e 0,1% de ácido cólico (Sigma), foram adicionadas às dietas dos grupos Controle, LDR e P para indução da hipercolesterolemia nos animais.

Quadro 6 - Composição das dietas experimentais (g/100g de mistura)

Ingredientes	Dietas			
	Padrão	Controle	LDR	P
Caseína	20	20	20	20
Amido dextrinizado	13,2	13,2	13,2	13,2
Sacarose	10,0	10,0	10,0	10,0
Óleo soja	3,5	3,5	3,5	3,5
Colesterol cristalino	-	1,0	1,0	1,0
Ácido cólico	-	0,1	0,1	0,1
Gordura vegetal hidrogenada	3,5	3,5	3,5	3,5
Fibra (celulose microfina)	5,0	5,0	5,0	5,0
Mistura de Minerais	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura de Vitaminas	1,0	1,0	1,0	1,0
L-cistina	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido milho	39,75	38,65	38,65	38,65
Probiótico	-	-	-	0,1*

LDR 10%	-	-	0,1*	-
---------	---	---	------	---

Fonte : Adaptado de REEVES et al. (1993)

Padrão = AIN-93G

Controle = dieta Padrão + colesterol +ácido cólico

LDR = dieta Controle + LDR 10%

P = dieta Controle + probiótico

* mL/dia/animal

O grupo Padrão serviu como referência dos níveis basais de colesterol sanguíneo dos animais.

Do total de lipídios da dieta (7%), metade foi fornecido na forma de óleo de soja e metade, como gordura vegetal hidrogenada, para intensificar o efeito hipercolesterolemizante.

Para o preparo das dietas, o colesterol e o ácido cólico foram previamente incorporados ao óleo de soja e à gordura hidrogenada derretida, sendo, então, misturados aos demais ingredientes. A gordura hidrogenada foi derretida em fogo brando para melhor homogeneização. Procedeu-se, então a mistura em batedeira semi industrial marca LIEME. As dietas foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente rotuladas, armazenadas sob refrigeração a 10°C e utilizadas no período da experimentação.

3.4. Ensaio biológico

O ensaio biológico foi realizado com o objetivo de investigar o efeito do probiótico na modulação dos níveis de colesterol sanguíneo e na taxa de translocação de *Lactobacillus acidophilus* NCFM para o baço, rins, coração e fígado de ratos albinos.

Utilizaram-se 170 ratos machos (*Rattus norvegicus* variedade *albinus*) da linhagem Wistar. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente com temperatura controlada (26±2°C) e com ciclo claro-escuro de 12 horas. O peso médio inicial dos animais foi de 250±32g.

3.4.1. Delineamento experimental

Devido à limitação de espaço físico, a experimentação foi dividida em duas etapas. Cada etapa foi composta de 85 animais, distribuídos em quatro grupos experimentais: grupo Padrão, com 25 animais e os grupos Controle, LDR e P, com 20 animais em cada grupo. Cada etapa teve duração de 56 dias.

No 1º dia de experimentação, cinco animais do grupo Padrão foram sacrificados e os níveis sanguíneos de colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol foram analisados. Esses níveis de colesterol serviram como padrão de referência do colesterol basal para os demais grupos.

Cada etapa foi dividida em 4 fases de avaliação, sendo;

1ª fase: Indução da hipercolesterolemia

Esta fase teve duração de 14 dias e objetivou promover hipercolesterolemia nos animais que receberam dieta rica em colesterol, para em seguida, iniciar a administração do probiótico. Nesta fase, o grupo Padrão, recebeu dieta Padrão (AIN-93G) e os grupos Controle, LDR e P, receberam dieta Padrão acrescida de colesterol + ácido cólico. Ao final destes 14 dias, 20 animais (5 de cada grupo) foram sacrificados para a avaliação dos níveis sanguíneos de colesterol total e frações e da taxa de translocação, cujos níveis, serviram de controle para a taxa observada após a 2ª fase (administração do probiótico).

2ª fase: Administração do probiótico e tempo 0 de monitoramento dos níveis de colesterol sérico e da taxa de translocação

Após a fase de indução da hipercolesterolemia, iniciou-se, então a administração do probiótico durante 14 dias. Nesta fase as dietas administradas foram: grupo Padrão (dieta padrão AIN-93G); grupo Controle, (dieta Padrão + colesterol + ácido cólico); grupo LDR (dieta Controle + 0,1 mL de LDR 10%) e grupo P (dieta Controle + 0,1 mL de probiótico contendo 10^{10} UFC/mL de *L. acidophilus*). Ao final destes 14 dias de administração, que constituiu também, o tempo 0 de monitoramento dos efeitos do probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico e na taxa de translocação, 5 animais de cada grupo (20 animais) foram analisados quanto ao colesterol total e frações e translocação.

Alíquotas de 0,1 mL de LDR 10% e probiótico foram administrados diariamente por via oral com auxílio de seringa descartável introduzidos diretamente na boca dos animais dos respectivos grupos.

3ª fase : Monitoramento do colesterol sérico e da taxa de translocação, 14 dias após o término da administração do probiótico

Nessa fase o grupo Padrão recebeu dieta Padrão (AIN-93G) e os grupos Controle, LDR e P receberam dieta Padrão + colesterol + ácido cólico. Ao final dessa fase, 20 animais (5 de cada grupo) foram sacrificados para a avaliação dos níveis sanguíneos de colesterol total e frações e da taxa de translocação.

4ª fase : Monitoramento do colesterol sérico e da taxa de translocação, 28 dias após o término da administração do probiótico

Nessa fase os grupos receberam as mesmas dietas da 3ª fase e ao final do período, mais 20 animais (5 de cada grupo) foram sacrificados para a avaliação dos níveis sanguíneos de colesterol total e frações e da taxa de translocação.

As dietas experimentais e água destilada foram oferecidas *ad libitum* durante as 4 fases (56 dias). O peso, bem como a ingestão alimentar dos animais foram monitorados semanalmente, calculando-se assim o ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA), que relaciona o ganho de peso (g) pelo consumo alimentar (g).

Ao final de cada fase, os animais foram mantidos em jejum por doze horas, e então, 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 utilizando-se seringas descartáveis de 10 mL.

As amostras de sangue foram primeiramente colocadas em banho-maria a 37°C por 15 minutos e logo após, centrifugadas a 1500 x g por 15 minutos para retirada do soro, que foi analisado quanto a colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol. Todo o procedimento descrito acima foi observado nas duas etapas da experimentação.

O esquema do delineamento experimental está indicado na Figura 7.

Etapas 1 e 2

1ª fase (14 dias)		2ª (14 dias)		3ª (14 dias)		4ª (14 dias)	
1º dia	dietas	14º	dietas + probiótico	28º	dietas	42º	dietas
↓		↓		↓		↓	
5 animais		5		5		5	
↓		↓		↓		↓	
-col. total		-col. total		- col. total		- col total	
-frações		-frações		- frações		- frações	
		- translocação		- translocação		- translocação	- transl.

1ª fase – Indução da hipercolesterolemia (1º ao 14º dia)

2ª fase – Administração do probiótico e seu efeito no colesterol sanguíneo e na translocação logo após o consumo (14º ao 28º dia) – tempo 0

3ª fase - Efeito do probiótico no colesterol sanguíneo e na translocação 14 dias após o consumo (28º ao 42º dia) – tempo 14

4ª fase - Efeito do probiótico no colesterol sanguíneo e na translocação 28 dias após o consumo (42º ao 56º dia) – tempo 28

Figura 7 – Esquema do delineamento experimental

3.4.2. Translocação

Para avaliação da translocação, foram coletados os órgãos dos animais, nas quatro fases. Na 1ª fase, ou seja, antes da administração do probiótico, os níveis de translocação serviram de controle para a taxa observada após o consumo do probiótico. As 2ª, 3ª e 4ª fases constituíram, respectivamente, da avaliação dos níveis de microrganismos translocados no tempo 0 e da conseqüente eliminação destes, nos tempos 14 e 28 dias após o término do consumo do probiótico. De cada animal foram retirados, sob condições assépticas, coração, rins, fígado e baço, os quais foram lavados em solução salina 0,9% estéril, acondicionados individualmente em sacos plásticos estéreis (sacos amostradores Whirl-Pak), pesados e armazenados a - 80°C (Bio-Freezer, Forma Scientific).

Para contagem de microrganismos, cada órgão foi macerado dentro da própria embalagem e submetido a diluição de 1/10 ou 1/100, conforme o órgão, com solução tampão fosfato (NADER de MACIAS et al, 1992, 1993). Seguiu-se plaqueamento em profundidade (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), em ágar MRS e incubação a 37°C por 48 horas. A contagem, obtida em UFC/g, foi multiplicada pelo peso de cada órgão, resultando, assim, no número total de microrganismos translocados no órgão (UFC/órgão).

Após contagem, as colônias foram submetidas à coloração de Gram e ao teste da catalase para a avaliação dos microrganismos recuperados dos órgãos analisados.

3.5. Dosagens dos constituintes sangüíneos

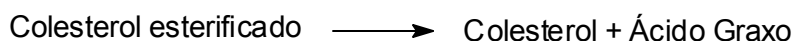
3.5.1. Dosagem de colesterol total

O colesterol total foi determinado colorimetricamente empregando-se o Kit enzimático Biolab, da Biolab-Mérieux S/A.

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 COMO O FENOL E AMINO 4 ANTIPIRINA, PELA AÇÃO DA PEROXIDASE, SÃO TRANSFORMADOS NO CROMOGÊNIO (QUE ABSORVE EM 500NM) E EM ÁGUA, SEGUNDO AS EQUAÇÕES:



PARA A DETERMINAÇÃO, UTILIZOU-SE O EQUIPAMENTO DE DOSAGENS MULTIPARAMÉTRICO DA MARCA ALISÊ. COLOCOU-SE NO EQUIPAMENTO UMA SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO PH 7,00 A 0,1 MOL/L, CONTENDO AS RESPECTIVAS ENZIMAS SOLUBILIZADAS E, SEPARADAMENTE, OS SOROS SANGÜÍNEOS A SEREM ANALISADOS.

APÓS PROGRAMAÇÃO, O EQUIPAMENTO MISTUROU A SOLUÇÃO MENCIONADA ACIMA COM O SORO A SER ANALISADO, SEGUINDO-SE A INCUBAÇÃO POR UM TEMPO DETERMINADO A 37° C E LEITURA EM COMPRIMENTO DE ONDA DE 500 NM.

O APARELHO SUBTRAI A ABSORVÂNCIA REFERENTE AO BRANCO (SOLUÇÃO TAMPÃO DAS ENZIMAS COM SORO FISIOLÓGICO) E A COMPARA COM A CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA PADRÃO EXISTENTE, FORNECENDO O RESULTADO EM MG/DL DE COLESTEROL TOTAL NO SORO SANGÜÍNEO.

A FÓRMULA GERAL PARA A CONVERSÃO DA ABSORVÂNCIA NA CONCENTRAÇÃO EM MG/DL FOI A SEGUINTE:

$$A_{\text{AMOSTRA}} / A_{\text{PADRÃO}} \times [\text{PADRÃO}], \text{ ONDE } A = \text{ABSORVÂNCIA}$$

3.5.2. DOSAGEM DE HDL-COLESTEROL

PARA A DOSAGEM SOROLÓGICA DO HDL-COLESTEROL UTILIZOU-SE O KIT BIOMÉRIEUX, DA BIOLAB-MÉRIEUX S/A. 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.

3.5.3. Dosagem de LDL-colesterol

PARA A DOSAGEM SOROLÓGICA DO LDL-COLESTEROL UTILIZOU-SE KIT BIOMÉRIEUX, DA BIOLAB-MÉRIEUX S/A. AS DIVERSAS CLASSES DE LIPOPROTEÍNAS SE DIFERENCIAM PELA SUA DENSIDADE, COMPORTAMENTO ELÉTRICO E SUA REAÇÃO FRENTE A ANTICORPOS ESPECÍFICOS. O MÉTODO DE DOSAGEM BASEOU-SE NA PRECIPITAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL) CONTIDA NO SORO, PELA ADIÇÃO DO REATIVO PRECIPITANTE (SURFACTANTE POLICÍCLICO POLICONDENSADO, SURFACTANTE ANIÔNICO POLICÍCLICO, DIOXANO POLISUBSTITUÍDO E TAMPÃO IMIDAZOL PH 6.1). O PRECIPITADO CONTENDO LDL FOI, ENTÃO, SOLUBILIZADO. O COLESTEROL PRESENTE NESTA LIPOPROTEÍNA FOI DETERMINADO PELO MESMO PROCESSO JÁ DESCRITO NA DOSAGEM DE COLESTEROL TOTAL.

3.6. Análise estatística

A 1ª etapa da experimentação foi constituída por 4 grupos experimentais (Padrão, Controle, LDR e P) e 4 fases (1ª, 2ª, 3ª e 4ª),

constituindo-se 16 tratamentos (4 grupos X 4 fases) com 5 repetições em cada tratamento, totalizando-se 80 animais. Os 5 animais restantes foram sacrificados no 1º dia da experimentação para obtenção dos níveis basais de colesterol sérico em ratos. O mesmo foi verificado na 2ª etapa.

Na análise estatística dos dados, considerou-se então, o delineamento inteiramente casualizado, com 16 tratamentos (4 grupos X 4 fases), com 10 repetições (5 de cada etapa), totalizando-se 160 animais. Os dez restantes foram eliminados no 1º dia de experimentação.

Para análise estatística do ganho de peso, do consumo alimentar, da indução da hipercolesterolemia e peso do fígado entre os grupos experimentais, utilizou-se ANOVA ao nível de 5% de probabilidade para o delineamento inteiramente casualizado. Para “F” significativo, utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparação entre as médias.

O efeito do probiótico na concentração do colesterol sérico e as frações, em relação aos tempos monitorados, foi testado pela ANOVA ao nível de 5% de probabilidade para o delineamento inteiramente casualizado em parcela subdividida.

A dispersão da média foi expressa, nas tabelas de resultados, como desvio padrão da média.

Na análise dos resultados da translocação, o teste de Tukey foi utilizado para comparar as médias de contagem de microrganismos entre os órgãos no tempo 0. Procedeu-se a análise de regressão para avaliar o efeito do tempo de eliminação sobre a contagem de microrganismos em cada órgão.

O modelo de regressão testado foi descrito pela equação:

$$= \beta_0 + \beta_1 X$$

= UFC/órgão

X = tempo (dias após administração do probiótico)

β_0 e β_1 = parâmetros do modelo

Para a avaliação deste modelo de regressão foram feitos o teste F da regressão, teste t para os parâmetros e o teste F da falta de ajustamento do modelo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da cultura utilizada como probiótico

A cultura probiótica mantida no Banco de culturas UFVCC, administrada aos animais, foi caracterizada como *Lactobacillus acidophilus*. As colônias apresentaram-se Gram-positivas e catalase negativas, bacilos isolados ou em correntes, características do gênero indicadas por KANDLER e WEISS (1993).

O resultado da fermentação dos principais açúcares, comparado aos resultados encontrados por KANDLER e WEISS (1993), encontra-se no Quadro 7.

Quadro 7 – Fermentação de açúcares por *L. acidophilus*

Açúcar	<i>L. acidophilus</i> NCFM	* <i>L. acidophilus</i>
Galactose	+	+
Lactose	+	+
Maltose	+	+
Sorbitol	-	+
Rafinose	-	-
Manitol	-	-

* KANDLER e WEISS, 1993

A cultura utilizada neste estudo apresentou o perfil de fermentação de carboidratos característico de *L. acidophilus*, fermentando galactose, lactose, maltose e não fermentando sorbitol, rafinose e manitol, no entanto os resultados observados por KLANDLER e WEISS (1993), indicam a fermentação de sorbitol por 90% das estirpes de *L. acidophilus*, sugerindo que a estirpe selecionada nesta experimentação encontra-se entre os 10% que não fermentam o sorbitol.

4.2. Número de células viáveis no concentrado *L. acidophilus*

O concentrado de *L. acidophilus* NCFM empregado nesta experimentação consistiu, em média, de $1,4 \times 10^{10}$ UFC/mL (Quadro 8).

Quadro 8 - Unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de *L. acidophilus* NCFM no concentrado

Repetição	Diluição			UFC/ml
	10^{-7} *	10^{-8} *	10^{-9} *	
1	>300/>300	115/111	8/8	$1,1 \times 10^{10}$
2	>300/>300	85/99	23/25	$9,2 \times 10^9$
3	>300/>300	246/251	84/56	$2,4 \times 10^{10}$
4	>300/>300	213/210	85/87	$2,1 \times 10^{10}$
5	>300/>300	264/260	54/53	$2,6 \times 10^{10}$
6	>300/>300	66/87	8/2	$7,6 \times 10^9$
7	>300/>300	117/96	12/18	$1,0 \times 10^{10}$
8	>300/>300	93/99	6/14	$9,6 \times 10^9$
9	>300/>300	98/101	6/4	$9,9 \times 10^9$
Média				$1,4 \times 10^{10}$
Desvio-Padrão				$7,2 \times 10^9$

* dados em duplicata

De acordo com RASIC e KURMANN (1983) para que um produto probiótico possa exercer uma função específica no hospedeiro é necessário que os microrganismos estejam presentes, no momento do consumo, em uma concentração mínima de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. A concentração de microrganismos utilizada neste estudo garante um número suficiente para que o probiótico exerça suas funções no hospedeiro.

Embora, *L. acidophilus* seja de origem intestinal, a dose administrada aos animais foi elevada (10^9 UFC/dia), visto que, células em excesso podem ser translocadas do trato gastrointestinal para sítios extra-intestinais, se a população de certos microrganismos atinge números elevados (BERG, 1992).

4.3. Ensaio Biológico

4.3.1. Peso do fígado dos animais experimentais

Observou-se nesta experimentação, que a média de peso do fígado dos animais que receberam dieta hipercolesterolêmica (grupo Controle)

adicionadas ou não de probiótico foi superior ($P < 0,05$) a dos que receberam dieta sem colesterol (grupo Padrão) (Quadro 11).

Quadro 11 - Peso do fígado fresco dos animais, segundo os grupos (média $\pm$ desvio padrão) após 56 dias de experimentação

Grupos	Peso do Fígado (g)
Padrão	$14,70 \pm 1,56^a$
Controle	$18,81 \pm 2,57^b$
LDR	$18,26 \pm 2,79^b$
P	$19,49 \pm 2,98^b$

As médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Padrão = AIN-93G (REEVES et al., 1993)

Controle = dieta Padrão + colesterol + ácido cólico

LDR = dieta Controle + LDR 10%

P = dieta Controle + probiótico

O consumo de colesterol e ácido cólico na dieta causa aumento do peso dos fígados, em ratos (COSTA, 1992), o que corrobora o observado neste estudo, onde a adição de 1% de colesterol e 0,1% de ácido cólico à dieta, promoveu aumento no peso do fígado dos animais, em relação aos animais que receberam uma dieta sem as substâncias que provocam hipercolesterolemia (grupo Padrão).

O aumento de peso do fígado dos animais, nesta experimentação, foi atribuído à deposição de gordura, pois, ratos tendem a acumular lipídios no fígado, principalmente, sob a forma de ésteres de colesterol, quando submetidos à uma dieta rica em colesterol e, ou ácido cólico (WILSON, 1964). A deposição de gordura nesse órgão causou também alteração de sua coloração normal, como pode ser observado na Figura 9. O fígado dos animais dos grupos Controle (grupo II), LDR (grupo III) e P (grupo IV), que receberam dieta acrescida de colesterol e ácido cólico, apresentaram uma coloração vermelho amarelado em comparação ao grupo Padrão (grupo I), que recebeu dieta sem colesterol e sem ácido cólico (coloração vermelho intenso).

Figura 9 - Alteração na coloração do fígado dos animais dos grupos II (Controle), III (LDR) e IV (P) em comparação ao grupo I (Padrão)

BEYNEN et al., (1986) constataram um aumento de 30% no peso do fígado de ratos alimentados com uma dieta contendo colesterol. Porém, quando, além do colesterol, adicionou-se ácido cólico, esse aumento foi de 84%. Segundo os autores, o ácido cólico potencializa o efeito do colesterol dietético. Este ácido biliar aumenta a absorção de colesterol, mas, por outro lado, inibe a conversão de colesterol à ácidos biliares, favorecendo o acúmulo de gordura no fígado com conseqüente aumento de seu peso. Os relatos de BEYNEN et al. (1986) corroboram o resultado da presente experimentação, onde o ácido cólico causou efeito semelhante nos animais experimentais.

4.3.2. Indução da hipercolesterolemia

O Quadro 10 mostra os valores de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, para os grupos Padrão e Controle, obtidos após 14 dias de administração da dieta de indução da hipercolesterolemia.

Quadro 10 - Colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol (mg/dl) dos grupos Padrão e Controle após 14 dias de dieta hipercolesterolêmica (média $\pm$ desvio padrão)

	Padrão	Controle	% variação
Colesterol total *	94,00 $\pm$ 14,71	108,4 $\pm$ 19,91	+ 15,31
LDL-colesterol *	44,48 $\pm$ 10,79	47,68 $\pm$ 10,86	+ 7,19
HDL-colesterol *	39,40 $\pm$ 4,69	42,60 $\pm$ 10,49	+ 8,12
LDL:HDL *	1,13	1,12	- 0,88

Padrão = AIN-93G (REEVES et al., 1993)

Controle = dieta Padrão + 1% de colesterol cristalino + 0,1% de ácido cólico

* As médias (dentro da mesma linha) não diferem significativamente entre si, pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade

Para produzir hipercolesterolemia nos ratos, na presente experimentação, adicionou-se à dieta, 1% de colesterol cristalino e 0,1% de ácido cólico, com base no estudo feito por COSTA (1992), onde esta adição foi eficaz em induzir hipercolesterolemia moderada em ratos. ROSA et al. (1998) utilizando as mesmas quantidades de colesterol e ácido cólico adicionadas a dieta, observaram um aumento de 58% nos níveis séricos de colesterol total (de 75, 8 para 119,5 mg/dl).

Após 14 dias de dieta rica em colesterol e ácido cólico, os resultados indicaram um aumento de 15,31%, 7,19% e 8,12% para colesterol total, e as frações LDL e HDL, respectivamente. No entanto, embora o colesterol não tivesse se elevado no sangue, em concentrações significativas ($P > 0,05$), acumulou-se no fígado, aumentando seu peso e alterando sua coloração normal (Figura 9) corroborando os resultados de PORTMAN e BRUNO (1960)

onde o ácido cólico, foi mais eficaz no acúmulo de colesterol no fígado do que em sua elevação no sangue, em ratos que receberam dieta rica em colesterol e ácidos biliares. Do mesmo modo, BEHER et al. (1962) constataram um acúmulo de lipídios no fígado e nenhuma elevação do colesterol sérico, em ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido cólico.

A relação LDL:HDL, que comumente é indicada como índice de aterogenicidade, também não apresentou diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos Padrão e Controle.

Sabe-se que HDL-colesterol é pouco afetada por constituintes dietéticos (STEIN et al., 1996; RADCLIFFE e LIEBSCH, 1985). Verificou-se, nesta experimentação, um aumento de 8,12% nos níveis desta fração, no grupo que recebeu dieta com colesterol e ácido cólico. Segundo STEIN et al. (1996), ratos, quando submetidos à dieta hipercolesterolemiantes, exibem um aumento nessa lipoproteína, o que lhes confere grande resistência ao desenvolvimento da hipercolesterolemia e aterosclerose, pelo efeito protetor exercido por esta fração do colesterol. Apesar do aumento verificado (8,12%) não ter sido significativo ($P>0,05$) sugere-se que este, pode ter contribuído para a não elevação dos níveis de colesterol plasmático, neste estudo.

A utilização de ratos como modelo animal para estudos sobre o colesterol intensificou-se na década de 50, com o interesse crescente na etiologia da aterosclerose.

No entanto, ratos são bastante resistentes em desenvolver hipercolesterolemia e aterosclerose. De acordo com STEIN et al. (1996) a hipercolesterolemia induzida por componentes da dieta, nestes animais, é bastante atenuada por um aumento da apolipoproteína A no plasma, a qual é a maior componente das HDL, que comprovadamente, tem efeito antiaterogênico por seu papel no transporte reverso de colesterol e na prevenção da peroxidação de LDL.

Ainda, segundo STEIN et al. (1996) ratos têm grande resistência à formação de placas ateromatosas nos grandes vasos, como a aorta, quando submetidos à uma dieta rica em colesterol e/ou gordura. Estes autores, constataram um acúmulo discreto e não significativo, de éster de colesterol na aorta dos animais, após 20 meses de administração de uma dieta rica em gordura (1% colesterol + 5% de gordura saturada).

Pelos resultados obtidos nesta experimentação, sugere-se que o rato não seria o melhor modelo experimental para pesquisas sobre o colesterol e aterosclerose, devido à grande tendência no acúmulo de gordura no fígado e à resistência na elevação do colesterol plasmático, quando submetidos à dieta rica em colesterol e ácido cólico.

O ácido cólico, por causar a inibição da conversão de colesterol à ácidos biliares, pode interferir na ação de componentes dietéticos que agem no metabolismo do colesterol influenciando esta conversão, como é o caso dos microrganismos probióticos. Portanto, sugere-se que a adição, de somente colesterol cristalino, à dieta poderia proporcionar resultados mais satisfatórios na elevação dos níveis do colesterol plasmático, em estudos de indução da hipercolesterolemia por constituintes dietéticos, em modelo animal.

4.3.3. Efeito do probiótico na modulação dos níveis de colesterol total e lipoproteínas séricas

Os níveis de colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol no soro sanguíneo dos animais, após a administração do probiótico (tempos 0 e 28 dias) estão apresentados no Quadro 11.

Quadro 11- Colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol no soro sanguíneo dos animais dos grupos experimentais nos tempos 0 e 28 dias após administração do probiótico (média $\pm$ desvio padrão)

Tempo		Grupos			
		Padrão	Controle	LDR	P
0	CT*	120,0 $\pm$ 10,2	121,6 $\pm$ 9,84	120,6 $\pm$ 24,03	118,3 $\pm$ 16,87
	LDL*	69,0 $\pm$ 10,0	69,9 $\pm$ 4,99	69,2 $\pm$ 5,71	69,9 $\pm$ 5,52
	HDL*	35,5 $\pm$ 5,6	36,3 $\pm$ 2,79	37,0 $\pm$ 2,49	36,5 $\pm$ 2,32
	LDL:HDL*	1,90	1,93	1,87	1,92

	CT*	111,0 ± 10,52	117,4 ± 16,04	132,4 ± 31,39	119,4 ± 10,30
28	LDL*	68,0 ± 9,63	70,6 ± 4,59	69,9 ± 3,84	69,3 ± 5,83
	HDL*	36,9 ± 6,35	37,1 ± 3,98	35,7 ± 2,11	36,2 ± 2,93
	LDL:HDL*	1,89	1,90	1,96	1,91

* As médias (dentro da mesma linha) não diferem significativamente entre si, pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade

CT = Colesterol total

Padrão = AIN-93G (REEVES et al, 1993)

Controle = dieta Padrão + colesterol + ácido cólico

LDR = dieta Controle + LDR 10%

P = dieta Controle + probiótico

As concentrações médias dos parâmetros avaliados, não diferiram estatisticamente ($P>0,05$) entre os grupos testados, nos tempos avaliados. A relação LDL:HDL encontrada para o grupo Controle (1,93) não diferiu significativamente ($P>0,05$) da observada no grupo que recebeu placebo (1,87) e probiótico (1,92). Do mesmo modo e como esperado, 28 dias após o término do tratamento com o probiótico e placebo, os valores encontrados não diferiram significativamente ($P>0,05$) do Controle, indicando que os animais não foram afetados pelo consumo do probiótico.

O efeito positivo dos probióticos na modulação dos níveis de colesterol sérico, em modelos animais e humanos tem sido constatado por vários estudos (GRUNEWALD, 1982; TARANTO et al., 1998; FUKUSHIMA, 1995; ROSSOUW et al., 1981), mas, em todos eles os animais ou indivíduos tinham níveis iniciais de colesterol sérico elevados, diferindo das condições da presente experimentação.

TARANTO et al (1998) observaram um decréscimo de 38% no colesterol do soro de ratos alimentados com suplementação de leite contendo *Lactobacillus reuteri*, por 7 dias, e uma redução de 20% na relação LDL:HDL, no entanto, a dieta rica em gordura utilizada na indução da hipercolesterolemia, promoveu a elevação dos níveis plasmáticos de colesterol, em 90% (de 67,4 para 128,4 mg/dl).

No presente estudo, a dieta rica em colesterol e ácido cólico foi ineficaz em aumentar as concentrações séricas de colesterol, no entanto, provocou

acúmulo de gordura no fígado, com aumento significativo de seu peso. Assim, como os animais apresentaram-se normocolesterolêmicos durante todo o período experimental, não foram afetados pelo consumo de *L. acidophilus*.

O mesmo foi observado por ROOS et al. (1999), onde um iogurte enriquecido com *L. acidophilus* não reduziu os níveis de lipídios séricos em homens e mulheres com níveis normais de colesterol sérico, e também por LIN et al. (1989) que não encontraram alteração significativa nos níveis de lipídios séricos do grupo que recebeu *Lactobacillus* (192 mg/dL), com média de colesterol inicial menor do que grupo que recebeu placebo (221 mg/dL). Segundo estes autores, parece que valores iniciais mais baixos de colesterol sérico são mais difíceis de reduzir do que valores mais altos, o que poderia justificar o observado na presente experimentação (ROOS et al. 1999; LIN et al., 1989).

HAYAKAWA et al., (1998) estudando o efeito de leite de soja fermentado com *Bifidobacterium* nos lipídios séricos em ratos, constataram que entre os animais que receberam dieta livre de colesterol, os níveis de colesterol sérico total após o tratamento, não foram afetados. Já nos animais que foram alimentados com dieta enriquecida com colesterol cristalino, os níveis de colesterol sérico foram cerca de 15% inferior, nos grupos que receberam leite de soja ou leite de soja fermentado com *Bifidobacterium*, em relação ao grupo controle.

Pesquisas com vários outros constituintes dietéticos, como proteína de soja, ácidos graxos e fitoesteróis, evidenciaram que o efeito hipolipidêmico destes constituintes é bem menor ou quase nenhum, em indivíduos e animais normocolesterolêmicos (CARROL e KUROWSKA, 1995; HODGSON et al., 1998), corroborando as observações da presente experimentação.

CARROL e KUROWSKA (1995) relataram que indivíduos hipercolesterolêmicos, geralmente, exibem um decréscimo no colesterol total e LDL-colesterol após consumo de proteína de soja, o que já não acontece em indivíduos com colesterol sérico normal. Os níveis de HDL-colesterol praticamente não são alterados pelo consumo de proteína de soja. Igualmente ao colesterol total e LDL-colesterol, não foi evidenciado efeito nesta fração do colesterol em indivíduos normocolesterolêmicos.

HODGSON et al. (1998) evidenciaram que a suplementação da dieta com 55mg de isoflavonóides por dia não alterou significativamente as concentrações de lipídios séricos em indivíduos saudáveis de meia idade que exibiam concentrações iniciais de colesterol sangüíneo aproximadamente igual à média da população. Segundo os autores, é bastante provável que isoflavonóides tenham um efeito hipolipidêmico, pois, estes atuam na inibição da enzima β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA, na ativação da lipase e outros, no entanto, pouca atividade tem sido comprovada em indivíduos normocolesterolêmicos.

É possível que no modelo experimental testado, o efeito hipocolesterolemizante do *L. acidophilus* poderia ter sido confirmado se os animais tivessem alcançado a hipercolesterolemia.

4.3.4. Ganho de peso e ingestão alimentar dos animais

O ganho de peso, a ingestão alimentar e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos grupos experimentais são mostrados no Quadro 12.

Quadro 12 - Média de ganho de peso (GP), ingestão alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) semanal dos grupos experimentais (média $\pm$ desvio padrão), ao longo dos 56 dias de experimentação

Grupos	GP *	Ingestão alimentar *	% CEA *
	(g/semana)	(g/semana)	
Padrão	23,12 $\pm$ 0,91	124,62 $\pm$ 2,24	18,53 $\pm$ 0,007
Controle	23,01 $\pm$ 0,88	124,38 $\pm$ 0,97	18,53 $\pm$ 0,007
LDR	22,52 $\pm$ 3,36	124,16 $\pm$ 2,42	18,09 $\pm$ 0,027
P	23,34 $\pm$ 1,13	124,45 $\pm$ 1,36	18,79 $\pm$ 0,009

* As médias (dentro da mesma coluna) não diferem significativamente entre si, pelo teste F ($P>0,05$)

Padrão = AIN-93G (REEVES et al., 1993)

Controle = dieta Padrão + colesterol + ácido cólico

LDR = dieta Controle + LDR 10%

P = dieta Controle + probiótico

% CEA = $\text{ganho peso} / \text{ingestão alimentar} \times 100$

Pode-se observar que os animais dos grupos Padrão, Controle, LDR e P tiveram ganho de peso similares durante o período de 56 dias e, também, consumiram quantidades semelhantes de alimento, o que refletiu em uma variação não significativa ($P>0,05$) do coeficiente de eficiência alimentar (CEA).

Apesar da suplementação da dieta, com LDR 10% e probiótico (grupos LDR e P, respectivamente) os animais destes grupos não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$) no ganho de peso, quando comparados aos do grupo Controle (dieta sem suplementação) como poderia ser esperado. No entanto, o volume da suplementação (0,1 mL/dia) não promoveu aumento de peso nos animais. Já, PULUSANI e RAO (1983) observaram diferença significativa no ganho de peso de ratos, quando estes foram alimentados com dieta padrão suplementada com 40 a 50 mL /dia de leite acidófilo em comparação com a dieta padrão.

Em função da homogeneidade dos parâmetros, ganho de peso e consumo alimentar, atribuíram-se os efeitos observados nos constituintes sangüíneos e no fígado dos animais às variáveis controladas na experimentação, quais sejam, a adição de colesterol e ácido cólico e de probiótico às dietas.

4.3.5. Translocação

4.3.5.1. Identificação dos microrganismos translocados

Os microrganismos encontrados nos órgãos 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).

Sugere-se que a translocação observada foi resultado do microrganismo componente do probiótico, ou seja *L. acidophilus*.

4.3.5.2. Contagem de *L. acidophilus* no coração, rins, fígado e baço dos animais experimentais

Os Quadros 13, 14, 15 e 16 mostram as médias $\pm$ desvio padrão, em UFC/órgão, da contagem de lactobacilos no baço, fígado, coração e rins de acordo com os grupos experimentais e tempos monitorados.

Quadro 13 - Contagem (média $\pm$ desvio padrão) em UFC/órgão, de lactobacilos no baço dos animais, de acordo com os grupos experimentais e tempos monitorados (0, 14 e 28 dias após o término do consumo do probiótico)

Tempo	Grupos			
	Padrão	Controle	LDR	P
0	0,00	0,00	0,00	$8,5 \times 10^2 \pm 19,32$

14	0,00	0,00	0,00	$5,7 \times 10^2 \pm 19,13$
28	0,00	0,00	0,00	$2,5 \times 10^2 \pm 12,31$

Padrão = AIN-93G (REEVES et al., 1993)

Controle = dieta Padrão + colesterol + ácido cólico

LDR = dieta Controle + LDR 10%

P = dieta Controle + probiótico

Quadro 14 - Contagem (média $\pm$ desvio padrão) em UFC/órgão, de lactobacilos no fígado dos animais, de acordo com os grupos experimentais e tempos monitorados (0, 14 e 28 dias após o término do consumo do probiótico)

Tempo	Grupos			
	Padrão	Controle	LDR	P
0	0,00	0,00	0,00	$5,0 \times 10^2 \pm 130,94$
14	0,00	0,00	0,00	$3,0 \times 10^2 \pm 87,90$
28	0,00	0,00	0,00	$2,3 \times 10^2 \pm 114,96$

Padrão = AIN-93G (REEVES et al., 1993)

Controle = dieta Padrão + colesterol + ácido cólico

LDR = dieta Controle + LDR 10%

P = dieta Controle + probiótico

Quadro 15 - Contagem (média $\pm$ desvio padrão) em UFC/órgão, de lactobacilos no coração dos animais, de acordo com os grupos experimentais e tempos monitorados (0, 14 e 28 dias após o término do consumo do probiótico)

Tempo	Grupos			
	Padrão	Controle	LDR	P
0	0,00	0,00	0,00	$4,8 \times 10^2 \pm 18,80$

14	0,00	0,00	0,00	$3,0 \times 10^2 \pm 20,45$
28	0,00	0,00	0,00	$1,9 \times 10^2 \pm 13,68$

Padrão = AIN-93G (REEVES et al., 1993)

Controle = dieta Padrão + colesterol + ácido cólico

LDR = dieta Controle + LDR 10%

P = dieta Controle + probiótico

Quadro 16 - Contagem (média $\pm$ desvio padrão) em UFC/órgão, de lactobacilos nos rins dos animais, de acordo com os grupos experimentais e tempos monitorados (0, 14 e 28 dias após o término do consumo do probiótico)

Tempo	Grupos			
	Padrão	Controle	LDR	P
0	0,00	0,00	0,00	$1,3 \times 10^2 \pm 83,09$
14	0,00	0,00	0,00	$1,0 \times 10^2 \pm 25,25$
28	0,00	0,00	0,00	$8,2 \times 10^1 \pm 38,36$

Padrão = AIN-93G (REEVES et al., 1993)

Controle = dieta Padrão + colesterol + ácido cólico

LDR = dieta Controle + LDR 10%

P = dieta Controle + probiótico

No modelo experimental empregado, constatou-se a passagem de microrganismos viáveis do trato gastrointestinal para todos os órgãos avaliados (baço, fígado, coração e rins) quando os animais receberam dieta rica em colesterol suplementada com probiótico na concentração média de 10^{10} UFC/mL de *L. acidophilus* NCFM, durante 14 dias.

Nos órgãos dos animais dos grupos Padrão, Controle e LDR não foi observado a presença de *L. acidophilus* nos tempos analisados.

Constatou-se diferença significativa ($P < 0,05$) na contagem de células de *Lactobacillus acidophilus* encontrada no baço em comparação aos demais órgãos analisados. Entre o fígado e o coração não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$), mas ambos diferiram estatisticamente dos rins ($P < 0,05$).

Imediatamente após a administração do probiótico (tempo 0), de acordo com o modelo de regressão ajustado, o número de células de *L. acidophilus* encontradas nos órgãos foram, em UFC/órgão: baço ($8,6 \times 10^2$); fígado ($4,8 \times 10^2$); coração ($4,7 \times 10^2$) e rins ($1,3 \times 10^2$).

Embora, os números de microrganismos translocados, neste estudo, sejam considerados baixos, corroboram informações de BERG (1992) onde o autor se refere ao *L. acidophilus* como um microrganismo que possui pouca capacidade de translocar, mesmo quando administrado em concentrações elevadas.

Nesta experimentação, os números ministrados aos animais foram elevados (10^9 UFC/dia) e sendo o trato gastrointestinal um órgão, cujo ecossistema deva ser mantido balanceado, de alguma maneira, permitiu que as células em excesso fossem translocadas.

Ainda, segundo BERG (1992) fatores ambientais, como a dieta, podem alterar o delicado balanço ecológico no trato gastrointestinal e promover a passagem de microrganismos para outros órgãos e/ou tecidos.

Sugere-se que a dieta rica em colesterol e ácido cólico, de algum modo, pode ter afetado a mucosa intestinal dos ratos, com aumento de sua permeabilidade, facilitando a translocação para os órgãos, nos níveis observados, como foi verificado por MOREHOUSE et al. (1986) que constataram a passagem de bactérias anaeróbias estritas e facultativas do trato intestinal para órgãos, como o fígado e baço, em ratos que tinham perdido a integridade da mucosa pela administração de ácido ricinoléico.

4.3.5.3. Desaparecimento de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* dos órgãos dos animais que receberam o probiótico

Após o período de administração do probiótico, verificou-se que os microrganismos foram eliminados em diferentes taxas de acordo com os órgãos analisados (Figura 10).

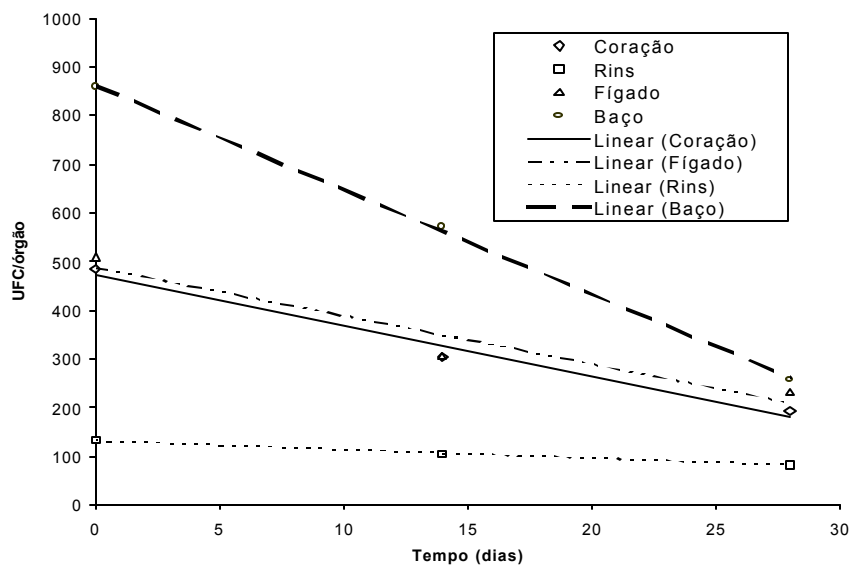


Figura 10 - Contagem de *Lactobacillus acidophilus* nos diferentes órgãos, durante os 28 dias após o término da administração do probiótico

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

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X$$

Y = UFC/órgão

X = tempo (dias após administração do probiótico)

β_0 e β_1 = parâmetros do modelo

O tempo de eliminação completa dos microrganismos translocados, para cada órgão, foi calculado a partir dos modelos de regressão ajustados (Quadro 17).

Quadro 17 – Modelos de regressão ajustados para os diferentes órgãos

Órgão	Modelo ajustado	R ²
Baço	= 863,9500 – 21,5542 X	0,99
Coração	= 472,5416 – 10,4196 X	0,98
Fígado	= 487,8023 – 9,9409 X	0,93
Rins	= 131,3616 – 1,7742 X	0,99

Em todos os órgãos, a eliminação completa não foi alcançada dentro do período de tempo estudado. Vinte e oito dias após o consumo do probiótico, os números de células presentes nos órgãos (em UFC/órgão), estimados pelos modelos de regressão ajustados, foram: $2,6 \times 10^2$, para o baço; $2,0 \times 10^2$, para o fígado; $1,8 \times 10^2$, para o coração e $8,1 \times 10^1$, para os rins. Permanecendo a tendência verificada neste período, a eliminação completa aconteceria, no baço, em 40 dias, no coração, em 45, no fígado, em 49 e nos rins, em 74 dias. O baço, apresentou o maior número de células translocadas (860 UFC/órgão), no entanto, foi o órgão que as eliminou mais rapidamente. Ao final do período analisado, 69,8% das células presentes no baço, haviam sido eliminadas.

As bactérias que conseguem ultrapassar a barreira da mucosa intestinal, antes de alcançarem a circulação sistêmica geral, passam pelos seios hepáticos (GUYTON, 1997), o que poderia justificar, no modelo experimental empregado, a presença de microrganismos no fígado. Neste órgão, as células de Kupffer (células de defesa), têm a função de remover bactérias do sangue porta que vem do intestino e impedir que atinjam a circulação geral, constituindo-se assim uma primeira linha de defesa. As células translocadas que não foram retidas nesta primeira linha de defesa, podem atingir o baço, pela circulação sangüínea. No baço, o número elevado de

histiócitos (células fagocíticas pertencentes à classe dos leucócitos que desempenham papel essencial na proteção do organismo contra a invasão de bactérias), poderia justificar o menor tempo de eliminação dos microrganismos translocados para este órgão, apesar do número inicial de células ter sido maior, quando comparado com o fígado, coração e rins. Os microrganismos que não foram eliminados pelas duas primeiras linhas de defesa (fígado e baço), alcançam a circulação geral, podendo assim chegar aos rins e coração (GUYTON, 1997).

Produtos probióticos têm sido indicados como adjunto dietético na promoção da saúde e na prevenção de doenças. É importante, pois, que a taxa de translocação dos microrganismos utilizados nestes produtos e o tempo para sua completa eliminação sejam mais um parâmetro no processo de seleção de estirpes candidatas a compor um probiótico, uma vez que se desconhece, atualmente, as implicações deste processo.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico em ratos albinos adultos. Avaliou-se também a taxa de translocação e de desaparecimento de *Lactobacillus acidophilus* NCFM do baço, rins, coração e fígado dos animais.

Foi realizado um ensaio biológico com 170 ratos machos Wistar, com peso médio inicial de 250 ± 32 g, alimentados com as dietas experimentais por um período de 56 dias. Os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais, sendo, Padrão (dieta AIN-93G); Controle (dieta Padrão acrescida de 1% de colesterol + 0,1% de ácido cólico); LDR (dieta Controle + com 0,1 mL de leite desnatado reconstituído a 10% de sólidos não gordurosos) e P (dieta Controle + 0,1mL de probiótico, na forma de um concentrado de células contendo 10^{10} UFC/ml de *L. acidophilus* NCFM).

Para indução da hipercolesterolemia nos animais dos grupos Controle, LDR e P, utilizou-se colesterol cristalino (1g/100g) e ácido cólico (0,1g/100g) acrescidos à dieta Padrão.

O probiótico e o LDR 10% (placebo) foram administrados durante 14 dias e os níveis de colesterol total, as frações LDL e HDL e a taxa de translocação foram monitorados nos dias 28°, 42° e 56°, ou seja, tempos 0, 14 e 28 dias após o término da administração.

O ganho de peso, bem como, a ingestão alimentar foram monitorados semanalmente, calculando-se assim o coeficiente de eficiência alimentar (CEA).

Constatou-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos, com relação ao ganho de peso, ingestão alimentar e coeficiente de eficiência alimentar. Também não foi constatada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos Padrão e Controle, quanto ao nível de colesterol sérico total e as frações, após administração da dieta rica em colesterol, ou seja, a adição de 1% de colesterol e 0,1% de ácido cólico à dieta, mostrou-se ineficaz na promoção de hipercolesterolemia significativa ($P > 0,05$) nos animais, mantendo-os normocolesterolêmicos durante todo o período estudado. No

entanto, provocou aumento significativo de peso ($P < 0,05$) e alteração na coloração normal do fígado (de vermelho intenso para vermelho amarelado) devido à deposição de gordura neste órgão.

Como os animais se apresentaram normocolesterolêmicos, não observou-se diferença significativa ($P > 0,05$) entre o grupo que recebeu probiótico (P) e o grupo Controle, em relação aos níveis de colesterol total e as frações, nos tempos analisados.

Sugere-se que novos modelos animais sejam testados em estudos futuros para produção de hipercolesterolemia, visando avaliar o efeito de microrganismos probióticos no metabolismo lipídico.

Foi constatada translocação de microrganismos para o baço, coração, fígado e rins dos animais do grupo que recebeu dieta rica em colesterol suplementada com probiótico contendo 10^{10} UFC/mL de *L. acidophilus* viáveis. Os grupos, Padrão, Controle e LDR não apresentaram contagem de microrganismos nos órgãos e tempos estudados. As colônias recuperadas dos órgãos comportaram-se como lactobacilos, sugerindo que a translocação observada foi resultado do microrganismo consumido na dieta.

Logo após o término da administração do probiótico (tempo 0), os números translocados (em UFC/órgão), estimados pelos modelos de regressão ajustados, foram; $8,6 \times 10^2$; $4,8 \times 10^2$; $4,7 \times 10^2$ e $1,3 \times 10^2$, para o baço, fígado, coração e rins, respectivamente. Constatou-se diferença significativa ($P < 0,05$) na contagem de células de *Lactobacillus acidophilus* encontrada no baço em comparação aos demais órgãos analisados. Entre o fígado e o coração não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$), mas ambos diferiram estatisticamente dos rins ($P < 0,05$).

Os números elevados de microrganismos exógenos aliados a uma dieta rica em gordura, pode de algum modo ter afetado a mucosa intestinal, facilitando a translocação para os órgãos, nos níveis observados.

O tempo necessário para a completa eliminação dos microrganismos translocados, segundo o modelo de regressão ajustado, corresponderia a 40, 45, 49 e 74 dias, para o baço, coração, fígado e rins, respectivamente. O baço foi o órgão com maior índice de translocação, no entanto, foi também o que apresentou o menor tempo para eliminação total desses microrganismos translocados, possivelmente pela presença de grande número de histiócitos,

que destroem, por fagocitose, agentes estranhos que atingem a circulação sistêmica.

Já que as implicações da translocação bacteriana para o hospedeiro, são ainda desconhecidas, este é um importante parâmetro na seleção de estirpes para o uso em probióticos.

BIBLIOGRAFIA

- ALM, L. The therapeutic effects of various cultures – an overview. In: ROBINSON, R.K. (Ed). **Therapeutic properties of fermented milks**. London: Elsevier Applied Science, cap.3, p.45-64, 1991.
- ALLORI, C., AGÜERO, A. P., RUIZ HOLGADO, NADER de MÁCIAS, O, PERDIGÓN, G. Gut mucosa morphology and microflora changes in malnourished mice after renutrition with milk e administration of *Lactobacillus casei*. **J. Food Prot.**, v.63, n.1, 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. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.51, p.1013-1019, 1990.
- BEHER, W.T., BAKER, G.D., PENNEY, D.G. A comparative study of the effects of bile acids and cholesterol on cholesterol metabolism in the mouse, rat, hamster and guinea pig. **J. Nutr.**, v.79, n. 63, p.523-530, 1962.
- BERG, R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends Microbiol.**, v.3, p.149-54, 1995.
- BERG, R.D. Translocation and the indigenous gut flora. In: FULLER, R. (Ed.) **Probiotics: the scientific basis**. London: Champman e Hall, p. 55-85, 1992.
- BEYNEN, A C., LEMMENS, A G., DE BRUIJNE, J.J., KATAN, M. B., VAN ZUTPHEN, L.F.M. Interaction of dietary cholesterol with cholate in rats: effect on serum cholesterol, liver cholesterol and liver function. **Nutr. Rep. Inter.** v.34, n.4, p. 557-563, 1986.
- BHAGAVAN, N. V. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Interamericana, 819p., 1997.

BRODY, T. **Nutritional biochemistry** San Diego: Academic Press, 658p, 1994.

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

COSTA, N.M. B. **Investigation into the cholesterol lowering property of baked bean (*Phaseolus vulgaris*)**. Reading: University of Reading, 200p. tese (Doutorado em Ciência de Alimentos – Nutrição Humana), 1992.

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

DAMBEKOD, P. C., GILLILAND, S.E. Incorporation of Cholesterol into the Cellular Membrane of *Bifidobacterium longum*. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.1818-1824, 1998.

DAVIS, B.D. **Microbiology: immunology and molecular genetics**. New York: Harper e Row, 1562p., 1973.

DE JONES, P.H., PATSCH, J., GOTTO JÚNIOR, A.M. The biochemistry of blood lipid regulation and the assessment of lipid abnormalities. In: SCHLANT, R.C., ALEXANDER, R.W. (Eds.) **The heart arteries and veins**. 8.ed. New York: Mc Graw-Hill, p.973-987, 1994.

EYSEN, H. Role of the gut microflora in metabolism of lipids and sterols. **Proc. Nutr. Soc.**, v.32, p.59-63, 1973.

FULLER, R. A review: probiotics in man and animals. **Journal of applied bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

FUKUSHIMA, M., MASUO, N. The effect of a probiotic on faecal and liver lipid classes in rats. **Brit. J. Nutr.**, v.73, p.701-710, 1995.

GARCIA, R. C., OLIVEIRA, H. C. F. Fisiologia das Lipoproteínas. In: QUINTÃO, E. (Ed.). **Colesterol e aterosclerose**. Rio de Janeiro: Qualitymark, p.1-30, 1992.

GILLILAND, S.E. Acidophilus milk products: a review of potential benefits for humans. **J. Dairy Sci.**, v.72, p.2483-94, 1989.

- GILLILAND, S.E., NELSON, C.R., MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol.49, p.377-381, 1985.
- GILLILAND, S.E. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. **J. Food Prot.** v.42, p.164, 1979.
- GILLILAND, S.E., SPECK, M.L. Desconjugation of Bile Acids by Intestinal Lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiol.** v.33, n.1, p.15-18, 1977.
- GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. **Br. J. Nutr.**, v.80, suppl 2, p.203-207, 1998.
- 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. **J. Natl. Cancer Inst.** v.73, p.689, 1984.
- GONZALEZ, S.N. , APELLA. M.C., ROMERO, N.C., NADER de MACIAS, M.E. OLIVER, G. Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strains used in fermented milk. **J. Food Prot.**, v.56, n.9, p.773-776, 1993.
- GRANNER, D. K. Membranas: Estrutura, arranjo e função. In: MURRAY, R. K., GRANNER, D. K. , MAYES, P. A. et al. (Eds). **Harper: bioquímica**. 6.ed. São Paulo: Atheneu, p. 454-472, 1990.
- GREENNE, J.D., KLAENHAMMER, T.R. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. **Appl. Environmental Microbiol.**, v.61, n.7, p.2577-2582, 1994.
- GRUNEWALD, K.K. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. **J. Food Sci.**, vol.47, p.2078-2079, 1982.

GUYTON, A C. **Fisiologia Humana**, 9. ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1013p, 1997.

HARRISON, V.C., PEAT, G. Serum Cholesterol and Bowel Flora in the Newborn. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.28, p.1351, 1975.

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

HEPNER, G., FRIED, R., ST JEOR S., FUSETTI, L., MORIN, R. Hypocholesterolaemic effect of yoghurt and milk. **Am. J. Nutr.**, v.32, p.19-24, 1979.

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. **J. Nutr.**, v.128, p.728-732, 1998.

HOPEWELL, R. D., YEARTER, R., ULLRICH, I. Soluble fiber: effect on carbohydrate and lipid metabolism. **Prog. Food Nutr. Sci.**, Oxford, v.17, p.159-182, 1993.

HULL, R.R., CONWAY, P.L., EVANS, A.J. Probiotics foods – a new opportunity. **Food Australia**, v.44, p.112-113, 1992.

JENKINS, D., JENKINS, A. A dieta na prevenção da enfermidade cardiovascular. **Dieta e Saúde**, v.3, p.2, 1994.

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

- KHEDKAR, C.D., GARGE, R.D., MANTRI, J.M., KULKARNI, S.A., KHEDKAR, G.D. Effect of feeding acidophilus milk on serum cholesterol in human volunteers of 50-60years. **J. Dairying Foods Home Sci.**, v.12, n.1, p.33-38, 1993.
- KLAVER, F.A.M., VAN DER MEER, R. The assumed assimilation of cholesterol by *lactobacilli* and *bifidobacterium bifidum* is due to their salt desconjugation activy. **Appl. Env. Microbiology**, v.59, p.1120-1124, 1993.
- LEITE, J.I.A. **Mecanismos de ação da goma guar sobre o metabolismo de colesterol**. Belo Horizonte:UFMG.1993. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 1993.
- LEHNINGER, A L., NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios da Bioquímica**. 2.ed. São Paulo:Savier, p.839, 1995.
- LIN, S.Y., AYRES, J.W., WINKLER, W.Jr., SANDINE, W.E. *Lactobacillus* effects on cholesterol: in vitro and in vivo results. **J. Dairy Sci.**, v.72, p.2885-2899, 1989.
- LOPES, L.M. SOARES, J.A.C., LOPES, I.E.L., PINTO, L.E.S.A., MARTINEZ, T.L.R. Metabolismo das lipoproteínas. In: MARTINEZ, T.L.R., LOURENÇO, D.M. (Eds.) **Avaliação e conduta nos riscos trombo e aterogênico**. São Paulo: Art Plus, p.61-69, 1996.
- MANN, G. V., SPOERRY, A. Studies of surfactant and cholesterolemia in the Maasai. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.27, p.464-469, 1974.
- MARINETTI, G.V. **Disorders of lipid metabolism**. New York: Plenum Press, 226p, 1990.
- MARTINEZ, T. L. R. Hiperlipidemias: definição. In: QUINTÃO, E. (Ed.). **Colesterol e aterosclerose**. Rio de Janeiro: Qualitymark, p.61-70, 1992.
- MAYES, P.A. Colesterol: Síntese, transporte e excreção. In: MURRAY, R. K., MAYES, P.A. (Eds.) **Harper : bioquímica**, 7 ed. São Paulo: Atheneu, p.262-274, 1994.

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

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

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

MONTEIRO, J. B. R., ROSADO, L.E.F.P.L., **NUTRIÇÃO E DOENÇAS CARDIOVASCULARES**. IMPRENSA UNIVERSITÁRIA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA, MINAS GERAIS. 50P, 1993.

MONTES, R.G., BAYLESS, T.M., SAAVEDRA, J.M., PERMAN, J.A. Efect of milks inoculated with lactobacillus acidophilus or a yogurt starter culture in lactose-maldigesting children. **J. Dairy Sci.**, v.78, p.1657-1664, 1995.

MOREHOUSE, J., SPECIAN, R., STEWART, J., BERG, R.D. Promotion of translocation of indigenous bacteria of mice from the GI tract by oral ricinoleic acid. **Gastroenterology**, v.91, p.637-82, 1986.

NADER de MACIÁS, M.E., ROMERO, N.C., APELLA, M.C., GONZÁLEZ, S.N. e OLIVER, G. Prevention of infections produced by *Escherichia coli* by feeding milk fermented with lactobacilli. **J. Food Prot.**, v.56, p.401-405, 1993.

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

NOH, D.O., GILLILAND, S.E. Influence of bile on cellular integrity and galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. **J. Dairy Sci.** v.76, p.1253, 1993.

NOVAZZI, J.P., MARTINEZ, T.L.R. Dislipidemias: critérios diagnósticos. In: LEITE, P.F., MARTINEZ, T.L.R., HALPERN, M.S.C., NOVAZZI, J.P., FONSECA, F.A.H.F., DIAS, J.C.A. (Eds) **Risco cardiovascular: fatores metabólicos e nutricionais – diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Loyola, p.51-60, 1994.

OUWEHAND, A.C., KIRJAVAINEN, V.P., SHORTT, C., SALMINEN, S., Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal** v.9, n.1, 43-52, 1999.

PERDIGÓN, G., NADER DE MACIAS, M.E., ALVAREZ, S., OLIVER, G., PESCE DE RUIZ HOLOGADO, A.A. PREVENTION OF GASTROINTESTINAL INFECTION USING IMMUNOBIOLOGICAL METHODS WITH MILK *LACTOBACILLUS CASEI* AND *L. ACIDOPHILUS*. **J. DAIRY RESEARCH**. V.57, N.2, P.255-264, 1990.

PITTA, A.M. HIPERCOLESTEROLEMIA. **NUTRIÇÃO EM PAUTA**. N.25 JUL/AGO, P.13-14, 1997.

PORTMAN, O.W., BRUNO, D. VARIOUS NATURAL AND MODIFIED BILE ACIDS IN CHOLESTEROL METABOLISM. **J. NUTR.**, V.73, N. 61, P.329-336, 1960.

PULUSANI, S.R. e RAO, D.R. Whole body, liver and plasma cholesterol levels in rats fed thermophilus, bulgaricus and acidophilus milks. **J. Food Sci** v.48, p.280, 1983.

QUINTÃO, E., NAKANDAKARE, E.R. **MANUAL DE REFERÊNCIAS EM DISLIPIDEMIAS**. [S.l.:S.N.], P.106, 1992.

RADCLIFFE, J.D. e LIEBSCH, K.S. DIETARY INDUCTION OF HYPERCHOLESTEROLEMIA AND ATHEROSCLEROSIS IN JAPANESE QUAIL OF STRAIN SEA. **J. NUTR.** V.115, P.1154-1161, 1985.

RASIC, J.L. and KURMANN, J.A. **Bifidobacteria and their role**. Basel: Birkhäuser Verlag, 295p, 1983.

REEVES, P.G., FORREST, H.N. e FAHEY, G.C.Jr., AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76 A Rodent Diet, **J. Nutr.**, v.123, p.1939-1951, 1993.

REVISTA SAÚDE – Especial, (s.a.) n.1, p.37, out. 1997.

- ROOS, N. M., SCHOUTEN, G., KATAN, M.B. Yogurt enriched with *Lactobacillus acidophilus* does not lower blood lipids in healthy men and women with normal to borderline high serum cholesterol levels. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.53, p.277-280, 1999.
- ROSA, C.O.B., COSTA, N.M.B., LEAL, P.F.G., OLIVEIRA, T.T. Efeito do feijão preto (*Phaseolus vulgaris*, L.)sem casca na redução do colesterol sanguíneo de ratos hipercolesterolêmicos. **Archivos Latino Americanos de Nutrition**, V. 48, n.4, p.299-305, 1998.
- 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.
- ROSSOUW, J.E., BURGER, E.M., VYVER, P.V.D., FERREIRA, J.J. The effect of skim milk, ioghurt, and full cream milk on human serum lipids. **Am. J. Clin. Nutr.** v.34, p.351-356, 1981.
- SABOYA, L.V., OETTERER, M., OLIVEIRA, A.J. Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados – uma revisão. **Bol. SBCTA**, v.31(2), p. 176-185, jul/dez, 1997.
- SANDERS, M.E. Effect of consumption of lactic cultures on health. **Adv. Food and Nutr. Research**. v. 37, p.92-98, 1993.
- SANDINE, W.E. ROLE OF *LACTOBACILLUS* IN THE INTESTINAL TRACT. **J. FOOD. PROT.** V.42, P.259, 1979.
- SAVAIANO, D. A, EL ANOUAR, A A, SMITH, D.E., LEVITT, M.D., LACTOSE MALABSORPTION FROM YOGURT, PASTEURIZED YOGURT, SWEET ACIDOPHILLUS MILK, AND CULTURED MILK IN LACTASE-DEFICIENT INDIVIDUALS. **AM. J. CLIN. NUTR.**, V.40, P. 1219, 1984.
- SELLARS, R. ACIDOPHILUS PRODUCTS. IN: ROBINSON, R.K. (ED). **THERAPEUTIC PROPERTIES OF FERMENTED MILKS**. LONDON: ELSEVIER APPLIED SCIENCE, P.81-116, 1991.
- SHAHANI, K. M., FRIEND, B. A, BAILEY, P.J. ANTITUMOR ACTIVITY OF FERMENTED COLOSTRUM AND MILK. **J. FOOD PROT.**, V.46, P.385, 1983.

SHAHANI, K.M., AYEBO, A.D. ROLE OF DIETARY LACTOBACILLI IN GASTRINTESTINAL MICROECOLOGY. **AM. J. CLIN. NUTR.**, V.33, P.2448-2457, 1980.

STEIN, O, DABACH, Y., HOLLANDER, G., HALPERIN, G., THIERY, J. STEIN, Y. RELATIVE RESISTENCE OF THE HAMSTER TO AORTIC ATHEROSCLEROSIS IN SPITE OF PROLONGED VITAMIN E DEFICIENCY AND DIETARY HYPERCHOLESTEROLEMIA. PUTATIVE EFFECT OF INCREASED HDL? **BIOCHM. BIOPHYS. ACTA**, V.1299, P.216-222, 1996.

STRYER, L. **BIOCHEMISTRY**. 4.ED. NEW YORK: W.H. FREEMAN AND COMPANY, 1064P, 1995.

TANNOCK, G.W. **Modern methods and perspectives to asses the influence of nutritional factors including live bacteria on the gut microflora of man and farm animals**. New Zeland:Departament of Microbiology, University of Otago, 10p, 1991.

TARANTO, M.P., MEDICI, M. PERDIGON, G., RUIZ HOLGADO, A P., VALDEZ, G.F. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.2336-2340, 1998.

TAYLOR, G.R.J., WILLIAMS, C.M. Effects of probiotics and prebiotics on blood lipids. **Br. J. Nutr.**, v.80, Suppl. 2, p.S225-S230, 1998.

VOET, D., VOET, J.G. **Biochemistry**, New York: Copyright, 1361p, 1995.

WILSON, J.D. The quantification of cholesterol excretion and degradation in the isotopic steady in the rat: the influence of dietary cholesterol. **J. Lip. Res.**, p.409-417, 1964.

WOLOCHOW, G., HILDEBRANT, G.J., LAMANNA, C. Translocation of microorganism across the intestinal wall of the rats: effect of microbial size and concentrations. **Journal of Infectious Diseases**, v.116, p.523-8, 1966.

ZHOU, J.S., SHU, Q., RUTHERFURD, K.J., PRASAD, J., GOPAL, P.K., GILL, H.S. Acute oral toxicity and bacterial translocation studies on potentially probiotics strains of lactic acid bacteria. **Food Chem. Toxicol.**, v.38, p.153-161, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Quadro 1A - Ganho de peso (GP), consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais experimentais do grupo Padrão

Repetição (nº do animal)	GP (g/semana)	Consumo alimentar (g/semana)	CEA
1	22.2	120.80	0.183775
2	23.0	121.56	0.189207
3	22.0	120.45	0.182648
4	22.5	125.20	0.179712
5	23.0	124.69	0.184457
6	22.1	127.56	0.173252
7	23.4	124.62	0.187771
8	23.2	125.78	0.184449
9	24.8	124.12	0.199807
10	24.7	125.98	0.196063
11	23.9	120.00	0.199167
12	23.0	125.36	0.183472
13	22.4	125.36	0.178685
14	22.8	124.23	0.183531
15	24.0	126.69	0.189439
16	24.2	126.00	0.192063
17	24.0	128.56	0.186683
18	23.4	131.00	0.178626
19	23.1	126.24	0.182985
20	23.0	120.36	0.191093
21	23.0	124.25	0.185111
22	21.0	123.69	0.169779
23	22.0	126.58	0.173803
24	24.0	125.45	0.191311
25	24.0	123.89	0.193720
26	23.5	125.24	0.187640
27	23.5	123.54	0.190222
28	24.1	124.56	0.193481
29	22.3	124.00	0.179839
30	24.0	123.00	0.194411
31	23.6	126.78	0.186149
32	24.5	126.45	0.193752
33	23.0	123.56	0.186144
34	23.2	124.00	0.187097
35	22.5	120.65	0.186490
36	22.0	124.65	0.176494
37	22.6	124.52	0.181497
38	24.0	126.25	0.190099
39	21.0	124.58	0.168566
40	22.4	124.54	0.179862
Média	23,12	124,62	0,1853
Desvio-Padrão	0,91	2,24	0,007

Quadro 2 A - Ganho de peso (GP), consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais experimentais do grupo Controle

Repetição (n ^o do animal)	GP (g/semana)	Consumo alimentar (g/semana)	CEA
1	22.0	124.23	0.177091
2	23.0	125.36	0.183472
3	24.0	124.70	0.192462
4	22.5	124.00	0.181452
5	22.0	123.65	0.177922
6	23.0	125.45	0.183340
7	24.0	123.00	0.195122
8	24.0	124.65	0.192539
9	21.9	124.78	0.175509
10	22.6	125.68	0.179822
11	22.5	123.56	0.182098
12	22.0	124.87	0.176183
13	24.0	124.00	0.193548
14	21.5	124.57	0.172594
15	24.0	124.36	0.192988
16	23.5	126.66	0.185536
17	24.0	123.90	0.193705
18	22.6	124.78	0.181119
19	22.0	124.85	0.176211
20	22.6	124.65	0.181308
21	22.8	125.69	0.181399
22	22.0	124.87	0.176183
23	23.0	124.00	0.185484
24	24.0	123.85	0.193783
25	24.2	124.00	0.195161
26	23.6	123.65	0.190861
27	23.0	125.55	0.183194
28	24.0	123.47	0.194379
29	24.0	123.00	0.195122
30	25.0	124.78	0.200353
31	22.5	124.23	0.181116
32	22.6	125.47	0.180123
33	24.0	123.00	0.195122
34	23.5	124.58	0.188634
35	21.4	121.00	0.176860
36	22.4	124.58	0.179804
37	22.6	124.00	0.182258
38	22.0	124.00	0.177419
39	23.1	124.58	0.185423
40	23.0	125.40	0.183413
Média	23,01	124,38	0,1853
Desvio-Padrão	0,88	0,97	0,007

Quadro 3 A - Ganho de peso (GP), consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais experimentais do grupo LDR

Repetição (n ^o do animal)	GP (g/semana)	Consumo alimentar (g/semana)	CEA
1	24.1	126.00	0.191270
2	23.4	124.45	0.188027
3	22.4	123.69	0.181098
4	22.0	124.78	0.176310
5	23.4	122.36	0.191239
6	22.8	120.96	0.188492
7	22.0	121.25	0.181443
8	22.4	124.85	0.179415
9	21.0	125.69	0.167078
10	21.0	126.25	0.166337
11	20.8	124.00	0.167742
12	22.6	124.25	0.181891
13	22.0	124.00	0.177419
14	21.9	123.69	0.177056
15	21.5	132.24	0.162583
16	24.0	130.00	0.184615
17	23.9	124.45	0.192045
18	24.0	125.23	0.191647
19	24.0	124.14	0.193330
20	23.5	120.12	0.195638
21	24.7	120.00	0.205833
22	24.0	121.12	0.198151
23	24.2	125.23	0.193244
24	25.0	125.25	0.199601
25	22.5	124.45	0.180796
26	23.0	124.00	0.185484
27	23.1	124.25	0.185915
28	23.5	120.89	0.194392
29	24.1	126.52	0.190484
30	24.0	125.32	0.191510
31	24.5	125.04	0.195937
32	23.8	125.00	0.190400
33	23.0	122.02	0.188494
34	22.0	121.00	0.181818
35	21.8	125.24	0.174066
36	22.6	124.85	0.181017
37	23.0	125.23	0.183662
38	22.1	125.45	0.176166
39	24.5	122.02	0.200787
40	29.0	121.36	0.238960
Média	22,52	124,16	0,1809
Desvio-Padrão	3,36	2,42	0,027

Quadro 4 A - Ganho de peso (GP), consumo alimentar e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais experimentais do grupo P

Repetição (n° do animal)	GP (g/semana)	Consumo alimentar (g/semana)	CEA
1	21.4	124.25	0.172233
2	24.0	124.89	0.192169
3	21.8	124.69	0.174834
4	24.2	124.00	0.195161
5	23.5	125.69	0.186968
6	23.0	125.78	0.182859
7	22.3	127.45	0.174971
8	24.1	124.47	0.193621
9	24.0	124.45	0.192849
10	22.4	124.00	0.180645
11	22.0	122.52	0.179563
12	23.9	122.32	0.195389
13	23.0	124.65	0.184517
14	25.0	121.00	0.206612
15	24.1	124.12	0.194167
16	24.9	124.03	0.200758
17	24.0	124.63	0.192570
18	23.6	124.56	0.189467
19	23.7	125.36	0.189056
20	23.0	124.78	0.184324
21	24.0	125.96	0.190537
22	25.0	125.69	0.198902
23	26.0	124.65	0.208584
24	25.0	124.00	0.201613
25	23.0	122.04	0.188463
26	21.4	122.00	0.175410
27	22.8	124.58	0.183015
28	24.0	123.25	0.194726
29	22.0	124.00	0.177419
30	23.5	125.78	0.186834
31	21.4	124.25	0.172233
32	22.7	126.58	0.179333
33	22.0	127.00	0.173228
34	22.3	125.36	0.177888
35	22.0	124.69	0.176438
36	22.8	123.36	0.184825
37	23.0	124.65	0.184517
38	24.2	124.58	0.194253
39	24.6	122.36	0.201046
40	24.0	125.60	0.191083
Média	23,34	124,45	0,1879
Desvio-Padrão	1,13	1,36	0,009

Quadro 5 A - Peso do fígado dos animais dos grupos experimentais após os 56 dias de experimentação

Repetição	Grupos			
	Padrão	Controle	LDR	LA
1	11,50	24,50	19,90	18,97
2	14,09	17,34	19,01	16,72
3	15,19	19,99	21,37	25,50
4	12,84	18,60	17,93	17,97
5	15,50	19,96	20,04	23,48
6	14,00	19,60	19,50	20,60
7	16,30	17,00	13,40	20,00
8	15,70	18,90	17,90	17,50
9	16,00	14,70	13,30	17,80
10	15,90	17,60	20,30	16,40
Média	14,70	18,81	18,26	19,49
Desvio - Padrão	1,56	2,57	2,79	2,98

Quadro 6 A - Colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol dos animais do grupo Padrão, no 1º dia de experimentação (basal)

Repetição (nº do animal)	Colesterol total (mg/dL)	LDL-colesterol (mg/dL)	HDL-colesterol (mg/dL)
1	98	46,4	44
2	78	31,0	40
3	97	39,8	45
4	101	46,0	46
5	114	60,0	47
6	97	52,0	35
7	95	39,0	39
8	94	39,0	36
9	104	47,0	43
10	76	32,0	33
Média	95,4	45	40,8
Desvio - Padrão	11,27	9,03	4,93

Quadro 7A - Colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol dos animais do grupo Padrão, na 1ª fase (indução da hipercolesterolemia)

Repetição (nº do animal)	Colesterol total (mg/dL)	LDL-colesterol (mg/dL)	HDL-colesterol (mg/dL)
11	84	38,0	38
12	90	38,0	40
13	92	38,2	42
14	108	51,6	44
15	125	66,0	49
16	85	34,0	37
17	70	47,0	36
18	94	58,0	40
19	94	37,0	34
20	98	37,0	34
Média	94	44,48	39,40
Desvio-Padrão	14,71	10,79	4,69

Quadro 8A - Colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol dos animais do grupo Controle, na 1ª fase (indução da hipercolesterolemia)

Repetição (nº do animal)	Colesterol total (mg/dL)	LDL-colesterol (mg/dL)	HDL-colesterol (mg/dL)
1	124	51,4	50
2	122	52,0	52
3	121	44,4	50
4	132	59,0	55
5	130	67,0	53
6	89	39,0	31
7	95	37,0	26
8	107	53,0	35
9	84	31,0	37
10	80	43,0	37
Média	108,4	47,68	42,60
Desvio-Padrão	19,91	10,86	10,49

Quadro 9A - Colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol dos animais do grupo Controle, na 2ª fase (logo após a administração do probiótico - tempo 0)

Repetição (nº do animal)	Colesterol total (mg/dL)	LDL-colesterol (mg/dL)	HDL-colesterol (mg/dL)
11	132	80	39
12	121	70	30
13	122	77	34
14	130	65	36
15	125	66	40
16	106	66	36
17	105	69	36
18	117	71	37
19	133	69	38
20	125	66	37
Média	121,6	69,9	36,3
Desvio-Padrão	9,84	4,99	2,79

Quadro 10A - Colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol dos animais do grupo Controle, na 3ª fase (14 dias após a administração do probiótico)

Repetição	Colesterol total	LDL-colesterol	HDL-colesterol
-----------	------------------	----------------	----------------

(n° do animal)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
21	120	79	33
22	120	75	35
23	118	63	38
24	136	70	35
25	134	70	35
26	107	74	38
27	89	70	40
28	120	72	41
29	127	60	38
30	123	73	35
Média	119,4	70,6	36,8
Desvio -Padrão	13,5	5,58	2,57

Quadro 11A - Colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol dos animais do grupo Controle, na 4ª fase (28 dias após a administração do probiótico)

Repetição (n° do animal)	Colesterol total (mg/dL)	LDL-colesterol (mg/dL)	HDL-colesterol (mg/dL)
31	124	65	40
32	130	63	46
33	120	71	36
34	136	69	37
35	134	74	39
36	119	70	38
37	123	75	35
38	101	68	34
39	98	78	34
40	89	73	32
Média	117,4	70,6	37,1
Desvio -Padrão	16,04	4,59	3,98

Quadro 12A - Colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol dos animais do grupo LDR, na 2ª fase (logo após a administração do probiótico tempo 0)

Repetição (n° do animal)	Colesterol total (mg/dL)	LDL-colesterol (mg/dL)	HDL-colesterol (mg/dL)
11	143	65	39
12	113	70	39
13	145	70	36
14	84	62	37
15	160	69	39
16	111	66	36
17	105	63	36
18	110	79	38
19	99	78	31
20	136	70	39
Média	120,6	69,2	37,0
Desvio -Padrão	24,03	5,71	2,49

Quadro 13A - Colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol dos animais do grupo LDR, na 3ª fase (14 dias após a administração do probiótico)

Repetição (nº do animal)	Colesterol total (mg/dL)	LDL-colesterol (mg/dL)	HDL-colesterol (mg/dL)
21	139	66	37
22	220	67	36
23	174	70	41
24	109	65	31
25	178	78	40
26	128	75	35
27	95	69	37
28	109	63	36
29	135	69	37
30	107	72	37
Média	139,4	69,4	36,7
Desvio -Padrão	39,72	4,36	2,71

Quadro 14A - Colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol dos animais do grupo LDR, na 4ª fase (28 dias após a administração do probiótico)

Repetição (nº do animal)	Colesterol total (mg/dL)	LDL-colesterol (mg/dL)	HDL-colesterol (mg/dL)
31	112	72	37
32	180	75	36
33	142	65	34
34	180	74	35
35	136	69	37
36	112	65	39
37	87	75	35
38	97	68	38
39	140	68	32
40	138	68	34
Média	132,4	69,9	35,7
Desvio -Padrão	31,39	3,84	2,11

Quadro 15 A - Colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol dos animais do grupo P, na 2ª fase (logo após a administração do probiótico tempo 0)

Repetição (nº do animal)	Colesterol total (mg/dL)	LDL-colesterol (mg/dL)	HDL-colesterol (mg/dL)
11	119	70	39
12	102	62	34
13	103	71	38
14	111	70	38
15	102	68	36
16	124	61	38
17	120	73	36
18	112	74	35
19	156	70	39
20	134	80	32
Média	118,3	69,9	36,5
Desvio -Padrão	16,87	5,52	2,32

Quadro 16A - Colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol dos animais do grupo P, na 3ª fase (14 dias após a administração do probiótico)

Repetição (nº do animal)	Colesterol total (mg/dL)	LDL-colesterol (mg/dL)	HDL-colesterol (mg/dL)
21	113	62	36
22	114	70	38
23	136	78	38
24	121	68	39
25	124	68	36
26	154	69	36
27	103	75	40
28	130	69	32
29	141	66	34
30	147	68	34
Média	128,3	69,3	36,3
Desvio -Padrão	16,27	4,44	2,49

Quadro 17A - Colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol dos animais do grupo P, na 4ª fase (28 dias após a administração do probiótico)

Repetição (nº do animal)	Colesterol total (mg/dL)	LDL-colesterol (mg/dL)	HDL-colesterol (mg/dL)
31	118	75	39
32	112	68	39
33	115	71	36
34	112	61	37
35	120	71	38
36	136	70	36
37	121	75	39
38	101	77	33
39	128	60	30
40	131	65	35
Média	119,4	69,3	36,2
Desvio -Padrão	10,30	5,83	2,93

Quadro 18A - Contagem de lactobacilos no coração do grupo P, na 2ª fase (logo após o término da administração do probiótico - tempo 0)

Repetição (nº animal)	Diluição 10 ⁻¹	UFC/g	Peso órgão(g)	UFC/ór gão
1	30(28/25/29/38)	300	1,50	450,0
2	35(32/35/36/37)	350	1,43	500,5
3	45(47/42/48/43)	450	1,69	760,5
4	25(20/30/25/25)	250	1,37	342,5
5	30(27/30/29/34)	300	1,41	423,0
6	65(60/66/62/72)	650	1,40	910,0
7	20(22/23/18/17)	200	1,40	280,0
8	35(30/35/35/40)	350	1,20	420,0
9	20(28/18/20/14)	200	1,30	260,0
10	45(45/47/42/46)	450	1,10	495,0
Média		3,5 x 10²		4,8 x 10²

Desvio - padrão	13,37	18,80
--------------------	-------	-------

Quadro 19A - Contagem de lactobacilos no coração do grupo P, na 3ª fase (14 dias após o término da administração do probiótico)

Repetição (nº animal)	Diluição	UFC/g	Peso órgão (g)	UFC/Ór gão
	10 ⁻¹			
1	20(22/25/20/13)	200	1,41	282,0
2	15(13/18/14/15)	150	1,33	199,5
3	25(28/20/24/28)	250	1,69	422,5
4	45(47/48/42/43)	450	1,49	670,5
5	10(11/8/8/13)	100	1,40	140,0
6	0	0	1,30	0
7	25(25/26/28/21)	250	1,30	325,0
8	30(31/28/25/36)	300	1,40	420,0
9	35(35/34/36/35)	350	1,30	455,0
10	10(9/8/9/14)	100	1,20	120,0
Média		2,1 x		3,0 x
		10²		10²
Desvio - padrão		13,98		20,45

Quadro 20A - Contagem de lactobacilos no coração do grupo P, na 4ª fase (28 dias após o término da administração do probiótico)

Repetição (nº animal)	Diluição	UFC/g	Peso órgão (g)	UFC/Ór gão
	10 ⁻¹			
1	15(20/15/10/15)	150	1,50	225,0
2	17(20/14/12/22)	170	1,50	255,0
3	12(11/9/16/12)	120	1,20	144,0
4	13(15/16/11/10)	130	1,20	156,0
5	14(14/12/14/13)	140	1,30	182,0
6	16(17/12/12/23)	160	1,20	192,0
7	19(20/17/15/24)	190	1,20	228,0
8	17(21/12/18/17)	170	1,10	187,0
9	17(25/21/16/6)	170	1,10	187,0
10	21(20/19/11/34)	210	0,80	168,0
Média		1,6 x		1,9 x
		10²		10²
Desvio - padrão		12,51		13,68

Quadro 21A - Contagem de lactobacilos nos rins do grupo P, na 2ª fase (logo após o término da administração do probiótico - tempo 0)

Repetição (nº animal)	Diluição	UFC/g	Peso órgão (g)	UFC/Ór gão
	10 ⁰			

1	35 (32/35/38/35)	35	3,40	119,00
2	80 (78/85/80/77)	80	3,26	260,80
3	20 (21/20/28/11)	20	3,50	70,00
4	25 (25/26/25/24)	25	2,84	71,00
5	30 (30/28/28/34)	30	3,40	102,00
6	35 (30/35/37/38)	35	2,60	91,00
7	75 (76/75/78/71)	75	3,90	292,50
8	80 (80/75/75/90)	80	2,30	184,00
9	55 (56/54/52/58)	55	2,50	137,50
10	20 (25/20/18/17)	20	2,40	48,00
Média		4,5 x		1,3 x
		10¹		10²
Desvio - padrão		24,77		83,09

Quadro 22A - Contagem de lactobacilos nos rins do grupo P, na 3ª fase (14 dias após o término da administração do probiótico)

Repetição (nº animal)	Diluição	UFC/ g	Peso órgão (g)	UFC/ór gão
	10 ⁰			
1	45 (44/43/48/45)	45	3,28	147,60
2	40 (40/32/35/53)	40	3,16	126,40
3	15 (17/15/14/14)	15	3,94	59,10
4	30 (29/30/32/29)	30	2,94	88,20
5	35 (34/35/32/39)	35	3,43	120,05
6	45 (45/45/44/46)	45	2,70	121,50
7	40 (40/38/37/45)	40	2,70	108,00
8	35 (35/37/32/36)	35	2,80	98,00
9	35 (30/40/35/35)	35	2,40	84,00
10	40 (38/38/38/46)	40	2,40	96,00
Média		3,6 x		1,0 x
		10 ¹		10 ²
Desvio - padrão		8,75		25,25

Quadro 23A - Contagem de lactobacilos nos rins do grupo P, na 4ª fase (28 dias após o término da administração do probiótico)

Repetição (nº animal)	Diluição	UFC/g	Peso órgão (g)	UFC/Ór gão
	10 ⁰			
1	25 (25/24/23/28)	25	3,70	92,50
2	35 (35/34/38/33)	35	3,80	133,00
3	20 (21/23/20/16)	20	3,00	60,00
4	30 (32/30/33/25)	30	3,10	93,00
5	10 (9/10/10/11)	10	3,60	36,00
6	55 (54/55/58/53)	55	2,70	148,50
7	25 (25/26/27/22)	25	2,90	72,50
8	35 (35/35/36/34)	35	2,60	91,00
9	25 (20/25/28/27)	25	2,90	72,50
10	10 (11/10/12/7)	10	2,60	26,00
Média		2,7 x		8,2 x
		10 ¹		10 ¹
Desvio - padrão		13,16		38,36

Quadro 24A - Contagem de lactobacilos no fígado do grupo P, na 2ª fase (logo após o término da administração do probiótico - tempo 0)

Repetição (nº animal)	Diluição 10 ⁰	UFC/ g	Peso/órgão (g)	UFC/Ór gão
1	26 (24/18/29/33)	26	18,97	493,22
2	30 (32/29/35/24)	30	16,72	501,60
3	28 (26/32/30/24)	28	25,50	714,00
4	24 (32/22/20/22)	24	17,97	431,28
5	32 (30/28/28/42)	32	23,48	751,36
6	17 (18/17/13/20)	17	20,60	350,20
7	28 (38/24/15/35)	28	20,00	560,00
8	26 (28/26/22/28)	26	17,50	455,00
9	24 (22/24/16/34)	24	17,80	427,20
10	25 (25/29/27/19)	25	16,40	410,00
Média		2,6 x		5,0 x
		10¹		10²
Desvio - padrão		4,08		130,94

Quadro 25A - Contagem de lactobacilos no fígado do grupo P, na 3ª fase (14 dias após o término da administração do probiótico)

Repetição (nº animal)	Diluição 10 ⁰	UFC/g	Peso órgão (g)	UFC/Ór gão
1	12 (10/11/14/13)	12	19,56	234,72
2	11 (11/19/8/6)	11	19,72	216,92
3	19 (25/20/12/19)	19	25,60	486,40
4	21 (25/21/13/25)	21	16,88	354,48
5	11 (9/13/14/8)	11	24,40	268,40
6	20 (21/20/14/25)	20	19,50	390,00
7	10 (9/8/12/11)	10	20,30	203,00
8	11 (14/12/8/10)	11	24,20	266,20
9	21 (28/16/20/20)	21	14,20	298,20
10	19 (18/17/21/20)	19	17,70	336,30
Média		1,5 x		3,0 x
		10¹		10²
Desvio - padrão		4,81		87,90

Quadro 26A - Contagem de lactobacilos no fígado do grupo P, na 4ª fase (28 dias após o término da administração do probiótico)

Repetição (nº animal)	Diluição 10 ⁰	UFC/ g	Peso órgão (g)	UFC/Ór gão
1	11 (10/9/11/14)	11	23,10	254,10
2	15 (19/14/17/10)	15	29,30	439,50
3	10 (9/8/12/11)	10	20,90	209,00
4	16 (18/17/12/170)	16	22,00	352,00
5	0	0	22,40	0
6	9 (8/5/9/14)	9	18,50	166,50

7	14 (13/11/9/23)	14	16,70	233,80
8	11 (10/9/12/13)	11	18,20	200,20
9	10 (10/9/8/13)	10	20,20	202,00
10	17 (16/20/12/20)	17	14,90	253,30
Média		1,1 x		2,3 x
		10¹		10²
Desvio - padrão		4,85		114,96

Quadro 27A - Contagem de lactobacilos no baço do grupo P, na 2ª fase (logo após o término da administração do probiótico - tempo 0)

Repetição (nº animal)	Diluição 10 ⁻¹	UFC/ g	Peso órgão (g)	UFC/Ór gão
1	65(64/68/66/62)	650	1,40	896,0
2	70(70/75/65/70)	700	1,15	805,0
3	65(65/68/61/66)	650	1,64	1066,0
4	45(43/42/48/47)	450	1,70	451,70
5	95(94/96/91/99)	950	1,37	1301,5
6	75(75/77/74/74)	750	1,10	825,0
7	65(60/68/70/62)	650	1,50	975,0
8	70(78/72/70/60)	700	0,80	560,0
9	75(75/75/76/74)	750	1,40	1050,0
10	60(58/55/65/62)	600	1,10	660,0
Média		6,8 x		8,5 x
		10²		10²
Desvio - padrão		13,49		19,32

Quadro 28A - Contagem de lactobacilos no baço do grupo P, na 3ª fase (14 dias após o término da administração do probiótico)

Repetição (nº animal)	Diluição 10 ⁻¹	UFC/ g	Peso órgão (g)	UFC/Ór gão
1	45(45/44/46/45)	450	1,31	589,5
2	80(78/75/80/87)	800	1,13	904,0
3	30(25/35/30/30)	300	1,60	480,0
4	45(42/48/46/44)	450	0,76	342,0
5	50(55/52/58/35)	500	1,28	640,0
6	55(54/55/58/53)	550	1,90	1045,0
7	40(40/38/39/43)	400	1,30	520,0
8	30(30/32/35/23)	300	1,60	480,0
9	25(26/22/25/27)	250	0,90	225,0
10	45(45/48/44/43)	450	1,10	495,0
Média		4,4 x		5,7 x
		10²		10²
Desvio - padrão		16,19		19,13

Quadro 29A - Contagem de lactobacilos no baço do grupo P, na 4ª fase (28 dias após o término da administração do probiótico)

Repetição (nº animal)	Diluição
--------------------------	----------

	10 ⁻¹	UFC/ g	Peso órgão (g)	UFC/Ór gão
1	25(25/24/23/28)	250	1,60	400,0
2	50(49/48/51/52)	500	1,00	500,0
3	10(11/12/8/9)	100	1,10	110,0
4	20(22/23/20/15)	200	1,30	260,0
5	35(35/33/38/34)	350	0,70	245,0
6	10(10/9/9/12)	100	1,30	130,0
7	15(15/18/16/11)	150	1,50	225,0
8	25(24/28/22/26)	250	1,30	325,0
9	20(22/28/20/10)	200	1,20	240,0
10	15(15/18/13/14)	150	0,80	120,0
Média		2,2 x		2,5 x
		10²		10²
Desvio - padrão		12,47		12,31

APÊNDICE B

Quadro 1B - Resumo da análise de variância do ganho de peso semanal dos animais durante a experimentação

Fonte Variação	GL	Quadrado médio	Significância
Grupo	3	21,82	n.s
Resíduo	156	1066	
Total	159		

n.s. = não-significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 2B - Resumo da análise de variância do consumo alimentar semanal durante a experimentação

Fonte Variação	GL	Quadrado médio	Significância
Grupo	3	194,33	n.s
Resíduo	156	399,92	
Total	159		

n.s. = não-significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 3B - Resumo da análise de variância do coeficiente de eficiência alimentar dos animais durante a experimentação

Fonte Variação	GL	Quadrado médio	Significância
Grupo	3	16,80	n.s.
Resíduo	156	6,57	
Total	159		

n.s. = não-significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 4B - Resumo da análise de variância do peso do fígado dos animais dos grupos experimentais, após os 56 dias de experimentação

Fonte Variação	GL	Quadrado médio	Significância
Grupo	3	45,73	*
Resíduo	36	6,44	
Total	39		

*significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 5B - Resumo da análise de variância do colesterol total, LDL- colesterol e HDL- colesterol no soro sanguíneo dos animais dos grupos Padrão e Controle, na 1ª fase (indução da hipercolesterolemia)

Variação	Fonte	GL	Quadrado médio		
			Colesterol total	LDL- colesterol	HDL- colesterol
	Grupos	1	1036,8 n.s.	51,20 n.s.	51,20 n.s.
	Resíduo	18	306,69	117,26	66,04
	Total	19			

n.s. não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 6B - Resumo da análise de variância do colesterol total no soro sanguíneo dos animais, na 2ª fase (logo após o término da administração do probiótico)

Fonte Variação	GL	Quadrado médio	Significância
Grupos (G)	2	1061,51	n.s.
Res(a)	27	789,05	
Parcela	29		
Tempo (T)	2	613,15	n.s.
G x T	4	317,25	n.s.
Res(b)	54	327,79	
Total	89		

n.s. não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 7B - Resumo da análise de variância de LDL-colesterol no soro sanguíneo dos animais, na 2ª fase (logo após o término da administração do probiótico)

Fonte Variação	GL	Quadrado médio	Significância
Grupos (G)	2	7,51	n.s.
Res(a)	27	16,89	
Parcela	29		
Tempo (T)	2	0,55	n.s.
G x T	4	1,80	n.s.
Res(b)	54	29,92	
Total	89		

n.s. não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 8B - Resumo da análise de variância de HDL-colesterol no soro sanguíneo dos animais, na 2ª fase (logo após o término da administração do probiótico)

Fonte Variação	GL	Quadrado médio	Significância
Grupos (G)	2	1,25	n.s.
Res(a)	27	6,86	
Parcela	29		
Tempo (T)	2	0,71	n.s.
G x T	4	2,90	n.s.
Res(b)	54	7,99	
Total	89		

n.s. não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 9B - Resumo da análise de variância da regressão e da falta de ajustamento para o coração

Fonte Variação	GL	Quadrado médio	Significância
Regressão	1	3385,20	*
Falta de ajuste	1	38,78	n.s.
Tempo	2		
Resíduo	27	319,74	
Total	29		
$R^2 = 0,9814$			
* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F			
n.s. não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F			

Quadro 10 B - Resumo da análise de variância da regressão e da falta de ajustamento para os rins

Fonte Variação	GL	Quadrado médio	Significância
Regressão	1	12340,51	*
Falta de ajuste	1	40,18	n.s.
Tempo	2		
Resíduo	27	2609,26	
Total	29		
$R^2 = 0,9960$			
* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F			
n.s. não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F			

Quadro 11B - Resumo da análise de variância da regressão e da falta de ajustamento para o fígado

Fonte Variação	GL	Quadrado médio	Significância
Regressão	1	387382,47	*
Falta de ajuste	1	27951,28	n.s.
Tempo	2		
Resíduo	27	12697,37	
Total	29		
$R^2 = 0,9370$			
* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F			
n.s. não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F			

Quadro 12B - Resumo da análise de variância da regressão e da falta de ajustamento para o baço

Fonte Variação	GL	Quadrado médio	Significância
Regressão	1	19606,32	*
Falta de ajuste	1	24,82	n.s.
Tempo	2		
Resíduo	27	297,08	
Total	29		
$R^2 = 0,9990$			
* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F			
n.s. não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F			

