

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

CYBELLE PEREIRA DE OLIVEIRA

**AÇÕES DE BACTÉRIAS LÁTICAS DE DUAS MARCAS COMERCIAIS DE  
LEITES FERMENTADOS SOBRE O GANHO DE PESO E PARÂMETROS  
HEMATOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS DE RATOS *WISTAR*  
FAZENDO USO DE INDOMETACINA.**

João Pessoa  
2009

CYBELLE PEREIRA DE OLIVEIRA

**AÇÕES DE BACTÉRIAS LÁTICAS DE DUAS MARCAS COMERCIAIS DE  
LEITES FERMENTADOS SOBRE O GANHO DE PESO E PARÂMETROS  
HEMATOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS DE RATOS *Wistar*  
FAZENDO USO DE INDOMETACINA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimentos às exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. João Andrade da Silva

João Pessoa  
2009

- O48a Oliveira, Cybelle Pereira de.  
Ações de bactérias lácticas de duas marcas comerciais de leites fermentados sobre o ganho de peso e parâmetros hematológicos e histopatológicos de ratos wistar fazendo uso de indometacina / Cybelle Pereira de Oliveira.- João Pessoa, 2009.  
78f. : il.  
Orientador: João Andrade da Silva  
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CT  
1. Tecnologia de Alimentos. 2. Leite fermentado. 3. Bactérias lácticas - avaliação. 4. Experimentação animal.

UFPB/BC

CDU: 664(043)


CYBELLE PEREIRA DE OLIVEIRA

**AÇÕES DE BACTÉRIAS LÁTICAS DE DUAS MARCAS COMERCIAIS DE  
LEITES FERMENTADOS SOBRE O GANHO DE PESO E PARÂMETROS  
HEMATOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS DE RATOS WISTAR  
FAZENDO USO DE INDOMETACINA.**

Dissertação aprovada em: 23/09/2009

BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Andrade da Silva  
Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª, Dr.ª. Maria José de Carvalho Costa  
Membro Examinador

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Hugo Enrique Méndez Garcia  
Membro Examinador

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior  
Membro Examinador Suplente

**A Deus**, por ter me segurado pela mão desde criança, sempre me sustentado, e por permitir encontrar neste caminho tantas pessoas maravilhosas, anjos mesmo, cuja ajuda facilitou a conclusão deste trabalho.

**Aos meus pais**, Adailton e Fátima, por toda educação, carinho, dedicação e muita oração ao longo dos anos.

**Aos meus irmãos**, Adailton Júnior e Andrey, por todo incentivo o qual me faz prosseguir na minha vida pessoal e profissional. Vocês me inspiram!

**Ao meu esposo**, Marcos, por toda paciência, generosidade, incentivo, dedicação e por todos os finais de semana doados à minha pesquisa. Você me completa e me faz imensamente feliz. Esta dissertação é nossa!

**A todos vocês dedico esta conquista!**

## AGRADECIMENTO

Ao meu orientador de mestrado professor Dr. João Andrade da Silva pela seriedade, paciência, orientações, confiança e apoio;

Ao querido professor Dr. José Pinto de Siqueira Júnior, LGM/UFPB, por ter acreditado e me iniciado na pesquisa científica durante a minha graduação, impulsionando-me a buscar a vida acadêmica;

Às professoras Dr<sup>a</sup> Maria José Carvalho Costa (UFPB) e Dr<sup>a</sup> Francisca Bion (UFPE) por toda atenção e presteza;

Ao professor Dr. Hugo Enrique Méndez Garcia do Laboratório de Bodiagnóstico da Escola Técnica de Saúde da UFPB pela dedicação, paciência, contribuição e processamento das lâminas histopatológicas;

À Mayara, Roberta, Elciane, Gabriela e Nilcimelly do Laboratório de Nutrição Experimental da UFPB e em especial às bolsistas e estagiárias “cinco estrelas” do mesmo laboratório, Dandara, Jéssica, Myrella, Raquel e Ynara, pela cumplicidade e colaboração durante todo o período experimental. Sem vocês eu não teria conseguido!

À Ana Hermínia, pelo carinho com o qual tratou estatisticamente os resultados deste trabalho;

A Edvaldo Vasconcelos pela presteza e auxílio na leitura dos resultados;

A José Crispim - Biotério do LTF/UFPB - pelos ensinamentos à nossa equipe no manejo dos animais e pela prontidão no sacrifício dos mesmos;

À Kardilândia Mendes – HU/UFPB - pela realização das análises hematológicas;

Ao Pró-reitor de Pós-graduação e Pesquisa da UFPB, professor Dr. Isac Almeida de Medeiros, por ter viabilizado a realização das análises histológicas no Laboratório de Bodiagnóstico/UFPB.

À minha companheira de pesquisa Rita Garcia, doutoranda no mesmo programa, por toda paciência, prontidão, ensinamentos e busca do conhecimento sobre bactérias lácticas, leite fermentado...muito obrigada!

A todos os colegas da turma de mestrado pela acolhida e partilha: Adriana, Elieidy, Gabrielle, Josilene, Julianne, June, Poliana, Ronaldo, Thaíse, Thiago, Zilmara...a vitória é nossa!

À Universidade Federal da Paraíba - onde me graduei e alcanço mais esta conquista-, ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos e ao CNPQ, por terem me proporcionado a realização deste trabalho.

## RESUMO

Pesquisas demonstram que o consumo de leite fermentado é benéfico à saúde devido à presença de bactérias lácticas e dos metabólitos produzidos por elas durante a fermentação do leite. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação das bactérias lácticas de duas marcas comerciais de leites fermentados, uma cultivada com *Lactobacillus paracasei* (L1) e outra com *Lactobacillus casei* (L2), sobre o ganho de peso e parâmetros hematológicos e histopatológicos de ratos *Wistar* fazendo o uso de indometacina. A escolha da droga baseou-se na hipótese da existência da proteção do trato digestivo e da histologia dos órgãos dos animais contra a possível agressão do antiinflamatório pela administração concomitante dos leites fermentados. Foram utilizados três lotes de cada leite fermentado, realizando-se a contagem da viabilidade das bactérias lácticas, coloração de gram, catalase e identificação morfológica. Simultaneamente, 60 ratos *Wistar* machos com 90 dias, consumindo ração comercial e água *ad libitum*, foram divididos em 6 grupos de 10, sendo o grupo LP adicionado de L1; LP + D de L1 + droga; C (controle) de água; D, de droga; LC, de L2; e LC + D, de L2 + droga. Os animais receberam os leites fermentados (5mL/Kg/dia) e/ou a droga indometacina (2mg/Kg/dia) por gavagem durante 40 dias, registrando-se os pesos semanais. Após o sacrifício, amostras sanguíneas foram coletadas para a realização de hemogramas e verificou-se o peso dos rins, baços e fígados, realizando-se a histopatologia destes órgãos e dos estômagos e intestinos. Os dados obtidos foram tratados com ANOVA, Tukey, Friedman, Duncan, Kruskal-wallis e Wilcoxon ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o pacote estatístico R. As cepas de L1 e L2 resultaram em catalase negativas, gram positivas e morfologia de bacilos, apresentando contagens finais de bactérias com valores superiores a  $10^6$  UFC/mL. Os leites fermentados adicionados às dietas de LP e LC e a adição da droga ao grupo D não influenciaram no ganho de peso semanal dos animais, mas LP+D e LC+D diferiram estatisticamente de C e D, sugerindo haver interação entre droga-alimento. Na diferença entre o peso inicial e final dos animais, os grupos que receberam leite fermentado assemelharam-se ao controle, exceto o grupo LP cujo ganho de peso foi inferior; D também apresentou déficit de ganho de peso em relação ao grupo C. As dietas não influenciaram nos pesos dos rins dos grupos experimentais, apenas LP apresentou diferença significativa em termos de peso de baço em relação aos demais grupos e os pesos dos fígados dos grupos LP, D e LC+D diferiram em relação ao grupo controle, onde D resultou em peso superior a C e LP e LC+D obtiveram pesos inferiores ao grupo controle. Nos parâmetros sanguíneos, os grupos não diferiram entre si nas séries vermelha e branca, nem na contagem diferencial dos leucócitos, não se constatando efeito imunoestimulador; já nas contagens das plaquetas, alguns grupos apresentaram diferença estatística, porém os resultados obtidos encontraram-se dentro da faixa permitida. As análises histopatológicas não evidenciaram alterações na histologia dos estômagos, fígados, rins e baços, apresentando discreto infiltrado de células linfóides na lâmina própria do intestino dos grupos experimentais.

**Palavras-chave:** leite fermentado, bactérias lácticas, experimentação animal, hematologia, histopatologia.

## ABSTRACT

Researches demonstrate that the consumption of fermented milk is beneficial to the health due to the presence of lactic acid bacteria and of the products of the metabolism produced by them during the fermentation of the milk. The objective of this work was to evaluate the action of the lactic bacterias of two commercial marks of fermented milks, one cultivated with *Lactobacillus paracasei* (L1) and other with *Lactobacillus casei* (L2), on the weight gain and hematologic and histopathologic parameters of rats *Wistar* making the indomethacin use. The choice of the drug based on the hypothesis of the existence of the protection of the digestive system and of the histology of the organs of the animals against the possible aggression of the nonsteroidal anti-inflammatory for the concomitant administration of the fermented milks. Three lots of each fermented milk were used, taking place the count of the viability of the lactic bacterias, gram coloration, catalase and morphologic identification. Simultaneously, 60 rats *Wistar* males with 90 days, consuming commercial ration and water *ad libitum*, were divided in 6 groups of 10, being the group LP added of L1; LP + D of L1 + drug; C (control) of water; D, of drug; LC, of L2; and LC + D, of L2 + drug. The animals received the fermented milks (5mL/Kg/day) and/or the drug indomethacin (2mg/Kg/day) for gavage for 40 days, enrolling the weekly weights. After the sacrifice, blood samples were collected for the accomplishment of hemograms and it was verified the weight of the kidneys, spleens and livers, taking place the histopathology of these organs and of the stomachs and intestines. The obtained results were treated with ANOVA, Tukey, Friedman, Duncan, Kruskal-wallis and Wilcoxon ( $p < 0,05$ ), being used the statistical package R. The strains of L1 and L2 resulted in catalase negative, gram positive and morphology of bacilli, presenting final counts of bacteria with superior values to  $10^6$  UFC. The fermented milks added to the diets of LP and LC and the addition of the drug to D didn't influence in the weekly weight gain of the animals, but LP+D and LC+D statistically differed of C and D, suggesting there to be interaction among drug-food. In the difference among the initial and final weight of the animals, the groups that received fermented milk resembled each other to the control, except the group LP whose weight gain was inferior; D also presented deficit of weight gain in relation to the group C. The diets didn't influence in the weights of the kidneys of the experimental groups, LP just presented significant difference in terms of spleen weight in relation to the other groups and the weights of the livers of the groups LP, D and LC+D differed in relation to the control group, where D resulted in superior weight of C and LP and LC+D obtained inferior weights to the control group. In the blood parameters, the groups didn't differ to each other in the red and white series, nor in the differential leucocyte count, if not verifying immunostimulatory effects; already in the counts of the platelets, some groups presented statistical difference, however the obtained results were inside of the allowed. The histopathological analysis had not evidenced histology alterations in the stomachs, livers, kidneys and spleens, meeting discreet infiltrated of lymphoid cells in the own sheet of the intestine of the experimental groups.

**Keywords:** fermented milk; lactic acid bacteria; animal experimentation; hematology; histopathology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Fluxograma da produção do leite fermentado.....	25
<b>Figura 2</b> Mecanismo de ação dos antiinflamatórios não esteroidais.....	36
<b>Figura 3</b> Delineamento das análises microbiológicas.....	42
<b>Figura 4</b> Animais em gaiolas individuais.....	45
<b>Figura 5</b> Gaiolas individuais com água e ração comercial <i>ad libitum</i> .....	45
<b>Figura 6</b> Pesagem semanal dos animais.....	45
<b>Figura 7</b> Agulha de gavagem para ratos.....	45
<b>Figura 8</b> Preparação da seringa.....	45
<b>Figura 9</b> Técnica de gavagem.....	45
<b>Figura 10</b> Delineamento experimental.....	48
<b>Figura 11</b> Bacilos curtos e gram positivos de <i>Lactobacillus paracasei</i> (L1).....	49
<b>Figura 12</b> Bacilos gram positivos de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota (L2).....	50
<b>Figura 13</b> Correlação estatística entre o ganho de peso semanal dos grupos experimentais.....	54
<b>Figura 14</b> Mucosa gástrica. Aumento de 10x.....	65
<b>Figura 15</b> Mucosa gástrica. Aumento de 10x.....	65
<b>Figura 16</b> Junção gastroesofágica. Aumento de 10x.....	66
<b>Figura 17</b> Mucosa gástrica. Aumento 40x.....	66
<b>Figura 18</b> Fígado. Aumento 10x.....	67
<b>Figura 19</b> Fígado. Aumento 40x.....	67
<b>Figura 20</b> Rim. Aumento 10x.....	68
<b>Figura 21</b> Rim. Aumento 40x.....	68
<b>Figura 22</b> Intestino. Aumento 10x.....	69
<b>Figura 23</b> Células linfóides do intestino. Aumento 40x.....	69
<b>Figura 24</b> Baço. Aumento 10x.....	70
<b>Figura 25</b> Baço. Aumento 40x.....	70

**LISTA DE GRÁFICOS**

<b>Gráfico 1</b> Ganho de peso semanal dos grupos experimentais.....	53
<b>Gráfico 2</b> Diferença entre o peso inicial e final dos grupos experimentais durante as seis semanas.....	56

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1</b> Tipos de leite fermentado e seu cultivo iniciador.....	27
<b>Quadro 2</b> Composição da dieta dos grupos experimentais.....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Viabilidade das bactérias lácticas das duas marcas comerciais de leites fermentados analisadas em ágar MRS e expressa em UFC/mL ..	51
<b>Tabela 2</b> Relação entre o ganho de peso final em gramas e a porcentagem de ganho de peso dos grupos experimentais.....	55
<b>Tabela 3</b> Estimativa do peso dos órgãos dos seis grupos experimentais: rim direito, rim esquerdo, baço e fígado.....	57
<b>Tabela 4</b> Série vermelha dos hemogramas dos grupos experimentais.....	60
<b>Tabela 5</b> Leucograma dos grupos experimentais.....	62
<b>Tabela 6</b> Contagem de plaquetas dos grupos experimentais.....	63

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 Objetivo Geral .....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	17
3.1 Leite fermentado.....	17
3.2 Fermentação.....	19
3.3 Bactérias láticas.....	20
3.3.1 Gênero <i>Lactobacillus</i> .....	23
3.3.2 Gênero <i>Bifidobacterium</i> .....	24
3.3.3 Gênero <i>Streptococcus</i> .....	24
3.4. Tecnologia da fabricação dos leites fermentados.....	25
3.5 Tipos de leites fermentados.....	26
3.6 Microrganismos probióticos.....	27
3.6.1 Ação dos probióticos sobre o trato digestório.....	29
3.6.2 Probióticos na intolerância a lactose.....	31
3.6.3 Ação dos probióticos na modulação da resposta imunológica.....	32
3.6.4 Ação dos probióticos sobre o câncer de cólon.....	34
3.7 Antiinflamatórios não-esteroidais.....	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
4.1 Escolha das amostras comerciais dos leites fermentados.....	40
4.2 Amostragem.....	40
4.3 Análises microbiológicas.....	41
4.3.1 Contagem das bactérias láticas nos leites fermentados .....	41
4.3.2 Coloração de Gram, reação de catalase e identificação morfológica das bactérias .....	41
4.4 Ensaio Biológico.....	43
4.4.1 Avaliação de ganho de peso semanal.....	44
4.4.2 Sacrifício dos animais.....	44
4.4.3 Peso dos órgãos.....	46

4.4.4 Análises hematológicas.....	46
4.5 Análises histopatológicas.....	46
4.5.1 Processamento das lâminas histopatológicas dos órgãos dos grupos experimentais.....	46
4.5.2 Leitura das lâminas histopatológicas dos grupos experimentais.....	47
4.6 Análise estatística.....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
5.1 Análises microbiológicas.....	49
5.1.1 Características morfológicas, reação de catalase e coloração de gram.....	49
5.1.2 Viabilidade das bactérias lácticas nos leites fermentados.....	50
5.2 Ensaio biológico.....	51
5.2.1 Avaliação do ganho de peso dos grupos experimentais.....	51
5.2.2 Peso dos órgãos.....	57
5.2.3 Análises hematológicas: hemograma.....	59
5.2.3.1 Série vermelha (eritrograma) e série branca (leucograma).....	60
5.2.3.2 Plaquetas.....	62
5.2.4 Análises histopatológicas.....	64
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Pesquisas realizadas nas últimas décadas demonstram que alguns alimentos possuem função metabólica e regulatória na fisiologia do organismo, fornecendo assim benefícios, além da nutrição básica. Esses alimentos, conhecidos como alimentos funcionais, constituem um segmento da indústria alimentícia com ampla expansão no mercado japonês, europeu e norte americano (BOTELHO, 2005).

Os alimentos funcionais fazem parte de uma nova concepção de alimentos lançada pelos japoneses na década de 80. Um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que pode afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no corpo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, de maneira que seja tanto relevante para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de doenças (MORAIS; COLLA, 2006).

A tendência do mercado consumidor em buscar produtos mais saudáveis tem aberto novos nichos de mercado para as indústrias de alimentos e de bebidas. Uma categoria que tem se mostrado bastante promissora no mercado brasileiro para os laticínios são os produtos lácteos frescos como leites fermentados, iogurtes, bebidas lácteas e queijos. Em muitas pesquisas tem sido demonstrado que o consumo de leites fermentados promove diversos benefícios à saúde resultantes da viabilidade dos microrganismos ingeridos - os quais induzem mudanças e influências positivas sobre o ambiente - e devido aos metabólitos produzidos pelas bactérias lácticas durante o processo de fermentação do leite (BOTELHO, 2005).

Dentre os benefícios que o leite fermentado pode proporcionar ao organismo, relacionados à presença de bactérias lácticas, podemos citar: controle da microbiota intestinal; diminuição da população de patógenos pela produção de ácidos acético e lático, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; viabilidade da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a este carboidrato; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; estimulação do sistema imune e alívio da constipação (CAO; FERNÁNDEZ, 2005; SAAD, 2006). Outros efeitos atribuídos a essas culturas

láticas são: a diminuição do risco de câncer de cólon (WOLLOWSHI, RECHKEMMER; ZOBEL, 2001); das doenças cardiovasculares; das concentrações plasmáticas de colesterol; dos efeitos anti-hipertensivos (SEPPO et al., 2003); bem como a redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori* e controle da colite (SAAD, 2006). Sendo assim, o leite fermentado é caracterizado como um alimento funcional, podendo chegar a ser classificado como um alimento probiótico devido suas potencialidades.

O termo alimento probiótico foi definido como um suplemento alimentar à base de microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal ou o homem que o consome para melhorar seu equilíbrio microbiano intestinal. É cada vez mais fácil encontrar no mercado leites fermentados que ofereçam uma série de características dietéticas e terapêuticas baseadas no aporte de microrganismos que são comuns ao nosso organismo. Os mais conhecidos são os *Lactobacillus acidophilus* e várias espécies do gênero *Bifidobacterium* (ORDÓÑEZ et al., 2005).

A legislação vigente exige que os leites fermentados apresentem uma contagem mínima de bactérias lácticas viáveis de  $10^6$  unidades formadoras de colônias (UFC/mL) no produto final, durante todo o prazo de validade e que as condições de conservação e comercialização dessas bebidas não ultrapasse  $10^{\circ}\text{C}$ , para garantir essa viabilidade celular (BRASIL, 2004).

Diante deste contexto, torna-se de extrema importância a verificação da viabilidade celular das bactérias lácticas em leites fermentados comerciais como forma de assegurar a contagem mínima dessas bactérias exigidas por lei, bem como a realização de ensaios com o objetivo de comprovar, *in vitro* e *in vivo*, os benefícios descritos por diversos autores em seus trabalhos a respeito da ação metabólica e regulatória positiva do leite fermentado com potencialidades probióticas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação das bactérias lácticas de duas marcas comerciais de leites fermentados sobre o ganho de peso e parâmetros hematológicos e histopatológicos de ratos *Wistar* machos, após a administração oral do antiinflamatório indometacina.

### 2.2 Objetivos Específicos

#### 2.2.1 Microbiológicos

- Analisar duas marcas comerciais de leite fermentado, contendo uma delas *Lactobacillus paracasei* e outra *Lactobacillus casei* Shirota, quanto às características morfológicas, reação de catalase e coloração de gram das cepas que as constituem.
- Avaliar se os leites fermentados em questão contêm a viabilidade celular exigida por lei, realizando-se a contagem de bactérias lácticas no dia inicial da administração dos lotes comerciais aos animais, bem como no último dia desta administração, sempre observando o prazo de validade dos produtos.

#### 2.2.2 Ensaio biológicos

- Ministrando os leites fermentados e o antiinflamatório indometacina em ratos *Wistar* machos por um período de quarenta dias, avaliando o ganho de peso semanal dos animais;
- Comparar os pesos dos órgãos dos grupos experimentais - baço, rins direito e esquerdo e fígado-, realizando análises histopatológicas destes órgãos e dos estômagos e intestinos.

- Verificar os parâmetros hematológicos, série vermelha, série branca e plaquetas, com a realização de hemogramas;
- Analisar se os resultados obtidos diferem entre si quanto à administração dos diferentes tipos de leites fermentados contendo bactérias distintas.
- Observar se há a proteção do trato digestivo e da histologia dos órgãos dos animais pelo leite fermentado contra a possível agressão do antiinflamatóri

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Leite Fermentado

A origem dos leites fermentados remota à antiguidade. Os povos nômades adquiriram a arte de conservar o leite que produziam mediante o armazenamento em odres e recipientes de cerâmicas ou de peles de animais, local onde o leite era fermentado pela flora láctica adquirida acidentalmente após a ordenha. Logo observaram que o leite transformava-se em um produto apetitoso cuja vida útil era mais prolongada do que a da matéria-prima. As bactérias lácticas iam sendo selecionadas nesses recipientes que receberiam mais leite à medida que o produto fermentado era consumido. Mais tarde, esses povos originaram iogurtes, queijos e diversos tipos de leites fermentados com tecnologias empíricas, servindo de base para o desenvolvimento da tecnologia industrial da atualidade (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O leite fermentado é definido como “um produto adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos. Estes microrganismos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade. São considerados leites fermentados: Iogurte, Yogur ou Yoghurt, Leites fermentados ou Cultivados, Kefir, Kumys e Coalhada ou Cuajada” (BRASIL, 2004).

Os diversos tipos de leites fermentados produzidos são resultantes das diferentes microbiotas responsáveis pelo processo de fermentação do leite. Em termos gerais, a sua elaboração pode ser considerada bastante simples. O leite é pasteurizado e em seguida semeia-se o cultivo iniciador selecionado, dependendo do produto em questão. Os microrganismos provocam a acidificação e em muitos casos, a coagulação do produto e o desenvolvimento de características organolépticas típicas. Após a fermentação, o alimento é refrigerado para comercialização. Nos últimos anos a produção e o consumo de leites fermentados, em que se incluem microrganismos com propriedades

probióticas, veem adquirindo maior relevância, embora o iogurte seja o tipo de leite fermentado mais conhecido e o de maior consumo em todos os níveis populacionais (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O termo alimento probiótico foi definido como um suplemento alimentar à base de microrganismos vivos que afeta beneficemente o animal ou o homem que o consome para melhorar seu equilíbrio microbiano intestinal. Tem se tornado cada vez mais fácil encontrar no mercado, leites fermentados que oferecem uma série de características dietéticas e terapêuticas baseadas no aporte de microrganismos que são comuns ao nosso organismo. Os mais comuns são os *Lactobacillus acidophilus* e várias espécies do gênero *Bifidobacterium*, como *Bf. bifidum*, *Bf. longum*, *Bf. adolescentis*, *Bf. breve*, *Bf. infantis* (ORDÓÑEZ et al., 2005). Fachin (2005) menciona que as bactérias cientificamente comprovadas como probióticas são: *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1478), *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus GG* (ATCC 53103), *Bifidobacterium animalis* Bb 12, *Lactobacillus johnsonii* Lj 1 e *Lactobacillus reuteri*. Dessa forma, o leite fermentado probiótico nada mais é que um leite fermentado inoculado com bactérias probióticas, possuindo, no entanto, características de um alimento funcional.

Em se tratando de leite fermentado, uma das formas de determinar quando o processo fermentativo deve ser finalizado é utilizar como parâmetro a porcentagem de ácido láctico produzido. Esse valor deve ser de no mínimo 0,60%, para que haja inibição do crescimento de bactérias patogênicas ou deterioradoras que eventualmente estejam presentes no produto (SANTOS et al., 2003).

Na produção de um alimento probiótico, é fundamental que a bactéria probiótica possa ser cultivada em escala industrial, sendo que o produto final deve ter vida média satisfatória, variando de 15 a 30 dias, e propriedades sensoriais – cor, aroma, sabor e textura – aceitáveis, com os microrganismos presentes viáveis no produto e em número elevado ( $>10^6$  UFC/mL) durante toda a sua vida de prateleira. A necessidade de manter um número elevado de microrganismos viáveis no produto final é decorrente da dose diária mínima recomendada, usualmente considerada de  $10^8$  a  $10^9$  células viáveis, obtidas pelo consumo de 100 g de produto com  $10^6$  a  $10^7$  células viáveis por mL. Estes

produtos devem ser consumidos regularmente para manter o efeito dos microrganismos na composição da microbiota intestinal (SANTOS et al., 2003).

Segundo Marasca et al. (2007), a ingestão semanal mínima de probióticos, para assegurar os benefícios funcionais a eles atribuídos, é de 300 a 500 g de produtos lácteos fermentados contendo entre  $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL, ou seja, entre 1 milhão e 10 milhões das células probióticas por mililitro de produto. A ingestão diária de 80mL de leite fermentado, apresentação usual comercializada no Brasil, totaliza um consumo semanal de 560mL. É preciso, no entanto, que estes produtos tenham sido fabricados adequadamente e estocados na temperatura de refrigeração correta para que de fato apresentem o número adequado de microrganismos probióticos viáveis (ANTUNES et al., 2007).

### **3.2 Fermentação**

A fermentação pode ser definida como um conjunto de trocas ou decomposições químicas produzidas pela atividade de microrganismos vivos em um substrato orgânico. É um processo que utiliza o crescimento controlado de microrganismos selecionados capazes de modificar a textura, o sabor, o aroma e as propriedades nutricionais de um alimento. Durante a fermentação, os microrganismos retiram do meio em que vive o material de que tanto necessitam para o seu metabolismo, ao passo que, sob a ação catalítica de suas próprias enzimas, elaboram substâncias como ácidos, álcool e outras substâncias (SILVA, 2000).

Na indústria, os processos de fermentação são controlados mediante a escolha dos microrganismos, dos substratos, da disponibilidade de oxigênio, dos teores de cloreto de sódio, da temperatura e de valores de pH adequados, de acordo com o produto que se deseja obter (SILVA, 2000). Bioquimicamente, a fermentação é um processo metabólico que libera energia de açúcares ou moléculas orgânicas (tais como aminoácidos, ácidos orgânicos, purinas e pirimidinas), não requer a presença de oxigênio e produz apenas duas moléculas de ATP (adenosina trifosfato) para cada molécula inicial de

carboidrato como substrato. A grande parte da energia original da glicose permanece nas ligações químicas dos produtos orgânicos finais da fermentação, tais como ácido láctico ou etanol (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Os alimentos fermentados são altamente nutritivos, uma vez que os seus principais constituintes estão parcialmente pré-digeridos devido ao processo fermentativo. Durante a fermentação, as proteínas, as gorduras e a lactose do leite sofrem hidrólise parcial, tornando o produto facilmente digerível, sendo considerado um agente regulador das funções digestivas. A acidez própria estimula as enzimas digestivas pelas glândulas salivares. Certas características são benéficas para indivíduos com intolerância à lactose e tendências à hiperglicemia pós-prandial. Outras propriedades também se relacionam aos leites fermentados, como os efeitos anticolesterolêmicos, anticarcinogênicos, inibitórios de agentes patogênicos, entre outros (RODAS et al., 2001). A fermentação láctica pode produzir uma série de produtos comerciais a partir do leite, fornecendo, além do ácido láctico, sabores e aromas característicos dos laticínios fermentados durante o processo de maturação (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Esse tipo de fermentação é obtido pela ação das bactérias lácticas sobre a lactose do leite como substrato, resultando na produção de ácido láctico como produto principal. Durante a fermentação láctica, o catabolismo microbiano da lactose libera compostos que participam do aroma e sabor. O principal deles é o ácido láctico, responsável pela acidez característica de todos os produtos lácteos fermentados, mas outros componentes também são importantes por conferirem aroma e sabor são aldeídos e cetonas, sendo o diacetil e o acetaldeído os mais destacados (ORDÓÑEZ et al., 2005).

### **3.3 Bactérias lácticas**

As bactérias lácticas são anaeróbias, anaeróbias facultativas ou microaerófilas, gram positivas, sem motilidade e podem ser cocos ou bacilos não esporulados. Obtém sua energia pela fermentação de carboidratos,

produzindo ácido láctico como produto principal da fermentação. Todas as bactérias lácticas fermentam a glicose, algumas utilizam sacarose e lactose e outras fermentam o amido. Além disso, a natureza acidófila e sua notável habilidade de adaptação a condições extremas, associadas às altas concentrações de ácido láctico produzido, têm favorecido o desenvolvimento destas bactérias em ambientes diversos. (BOTELHO, 2005; MASSAGUER, 2005; MATA et al., 2008).

As colônias pertencentes às bactérias do grupo láctico geralmente são brancas e pequenas quando observadas em placas. Brancas porque a produção de pigmentos não é uma característica marcante das bactérias ácido-láticas e pequenas, porque como a fermentação de carboidratos não libera alta energia, há a necessidade por parte desses microrganismos da degradação de grande quantidade de carboidratos e da produção de muitos produtos de fermentação para obter a energia necessária ao seu crescimento. Na maioria dos meios de cultura, elas esgotam os açúcares ou produzem muito ácido, o que inibe seu próprio crescimento antes que as colônias atinjam maiores dimensões. Para obtenção de colônias maiores de bactérias lácticas é necessário utilizar um meio muito bem tamponado ou com muito açúcar. Essas bactérias são muito exigentes nutricionalmente, requerendo nitrogênio, aminoácidos e fatores de crescimento para o seu desenvolvimento (FRANCO; LANDGRAF, 2003; BOTELHO, 2005; MASSANGUER, 2005; MATA et al., 2008).

As bactérias lácticas podem ser divididas em dois grupos bioquímicos, baseados na forma pela qual elas fermentam a glicose e os produtos formados. As homofermentativas utilizam a via glicolítica de Embden-Meyerhof e convertem a glicose quase que totalmente a ácido láctico (80%), onde dois moles de ácido láctico são formados para cada mol de glicose fermentado. As heterofermentativas produzem menos ácido láctico (50%), onde um mol de glicose é convertido a um mol de ácido láctico mais um mol de etanol e em alguns casos, ácido acético, fumárico e dióxido de carbono. Estas últimas não possuem uma enzima chave da via de Embden-Meyerhof, por este motivo, fermentam a glicose por um mecanismo diferente de fermentação, utilizando a via das pentoses ou a via das hexoses monofosfato (FRANCO; LANDGRAF, 2003; MASSANGUER, 2005).

A presença destes microrganismos pode ser desejada em processos fermentativos, como culturas “starter” na indústria de alimentos para produção de alimentos fermentados como iogurtes, leites fermentados, manteiga, nata fermentada, kefir, probióticos, queijos, salsichas, cereais e vegetais fermentativos; é indesejada quando agem como deteriorantes em produtos como carne, cerveja, vinho e açúcar. O leite é um bom meio de crescimento para bactérias ácido-láticas por conter proteínas, fatores de crescimento, açúcares fermentáveis e por serem bem tamponados por proteínas e fosfatos (MASSANGUER, 2005; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Por várias décadas, foram considerados como verdadeiros componentes do grupo de bactérias lácticas os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e os denominados *Lactococcus*. Levando-se em consideração as desagregações, as agregações, as reclassificações e o aparecimento de novos gêneros, atualmente são quinze os constituintes desse grupo (*Aerococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*) (BOTELHO, 2005).

Em se tratando de produtos lácteos fermentados, os *Streptococcus*, os *Lactobacillus* e os *Bifidobacterium* são os mais destacados. Estes são amplamente utilizados como fermentos lácticos devido a sua capacidade de conservar os alimentos e de fornecer uma proteção eficaz ao homem e animais contra infecções intestinais. Por terem sido inicialmente isoladas dos intestinos do homem e dos animais, constituem atualmente uma subdivisão do grupo de bactérias probióticas que, quando consumidas em quantidades adequadas, têm a propriedade de repor a microbiota intestinal desbalanceada pela dieta, por tratamentos com antibióticos/quimioterapia ou por estresse do hospedeiro (BOTELHO, 2005). Os *Lactobacillus acidophilus* estão relacionados principalmente com a colonização do estômago e da parte distal do intestino delgado. Já os *Lactobacillus casei* e os *Bifidobacterium* spp estão relacionados com a colonização do intestino grosso (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Estas culturas de bactérias lácticas são utilizadas na indústria de laticínios e de carnes por reduzirem o pH do meio a curtos prazos, produzirem um efeito gerador de aromas devido a seu metabolismo, preferencialmente as culturas heterofermentativas, pela produção de enzimas para processos catalíticos e/ou

hidrólises nos alimentos, destacando-se as proteases e as lipases que influenciam na maturação de alguns produtos, pela produção de metabólitos como bacteriocinas, ácidos, peróxido de hidrogênio e diacetil, criando um ambiente adverso à sobrevivência de microrganismos patogênicos (MASSANGUER, 2005; ORDÓÑEZ et al., 2005).

### 3.3.1 Gênero *Lactobacillus*

Os lactobacilos foram isolados pela primeira vez a partir das fezes de lactentes amamentados ao peito materno (MORO, 1900 *apud* BOTELHO, 2005). São largamente utilizados como culturas “starter” na preparação de uma grande variedade de alimentos como queijos e outros produtos lácteos. Possuem morfologia celular variando de bacilos longos e finos até, algumas vezes, a bacilos curvados e pequenos. São microaerófilos e quando em crescimento na superfície de meios sólidos, tem seu desenvolvimento favorecido em anaerobiose ou pressão de oxigênio reduzido e 5% a 10% de dióxido de carbono. Nos meios usuais de crescimento, os lactobacilos raramente produzem pigmentos, que quando presentes são amarelados, laranja-ferrugem ou vermelho-tijolo. Crescem em temperaturas que variam de 2°C a 53°C, com valores ótimos entre 30°C a 40°C. São acidúricos, com pH ótimo entre 5,5 e 6,2 (BOTELHO, 2005).

Esses microrganismos são encontrados em derivados do leite, grãos, produtos de carne e peixe, água, esgoto, cerveja, vinho, frutas e suco de frutas, conservas de vegetais, silagem, chucrute e massas fermentadas. Fazem parte da microbiota normal da boca, trato intestinal e vagina de alguns animais homotérmicos, incluindo o homem, sendo a patogenicidade rara. O gênero conta hoje com 56 espécies reconhecidas, das quais 5 contêm subespécies (*delbrueckii*, *aviarius*, *salivarius*, *coryniformis* e *paracasei*) e 18 delas presentes na microbiota intestinal de humanos e considerada de interesse como probióticos: *L. acidophilus*, *L. agilis*, *L. aviarius*, *L. amylovorus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. delbrueckii* subsp.*bulgaricus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L.*

*johnsonii*, *L. murinus*, *L. intestinalis*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. ruminis*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (BOTELHO, 2005).

As espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* compõem o chamado “Grupo *Lactobacillus casei*” e possuem importante valor comercial para a indústria de alimentos devido ao seu emprego na produção de leites fermentados e como culturas iniciadoras na fabricação de queijos. Estas espécies apresentam comportamento fisiológico e necessidades nutricionais muito similares, multiplicando-se em condições ambientais bastante semelhantes (BURITI; SAAD, 2007).

### **3.3.2 Gênero *Bifidobacterium***

As bifidobactérias foram isoladas pela primeira vez no final do século XIX em fezes de infantis. Atualmente, cinco espécies de *Bifidobacterium* de origem humana (*B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* e *B. adolescentis*) têm atraído a atenção da indústria para a produção de produtos lácteos fermentados com fins terapêuticos. Em sua morfologia, podem variar desde bacilos curtos e curvados a bacilos com forma de capacete ou bifurcados. A temperatura ótima de crescimento das bifidobactérias oscila entre 37°C e 41°C, ocorrendo máximos e mínimos de crescimento a 43-45°C e 25- 28°C respectivamente. Em relação ao pH, o ótimo verifica-se a valores de pH entre 6,0-7,0, não apresentando crescimento em valores de pH ácidos de 4,5-5,0 ou a valores de pH alcalinos de 8,0-8,5. São bactérias anaeróbias e gram-positivas (HER et al., 2004; BOTELHO, 2005).

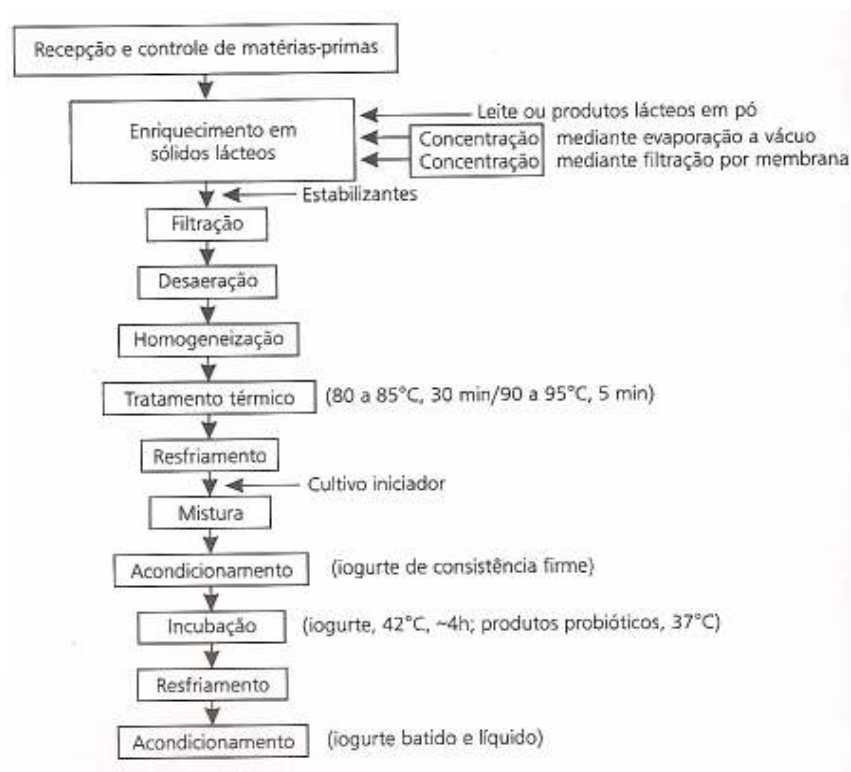
### **3.3.3 Gênero *Streptococcus***

São cocos que se dividem em um único plano, produzindo pares e cadeias. São homofermentativos e ligeiramente ovóides. Devido às alterações da sistemática bacteriana, várias espécies desse gênero foram reclassificadas

e as espécies remanescentes foram classificadas em dois grupos. Um deles é o *pyogenes*, onde as espécies patogênicas são englobadas, como o *S. pyogenes* (patógeno humano) e o *S. agalactiae* (patógeno animal), sendo encontrados no leite cru. O outro grupo é o *viridans*, onde se encontra a espécie *Salivares* subespécie *thermophilus*, que é empregada na produção de queijos e iogurtes (FRANCO; LANDGRAF, 2003; MASSANGUER, 2005).

### 3.4 Tecnologia da fabricação dos leites fermentados

A tecnologia da fabricação dos leites fermentados é demonstrada segundo o fluxograma abaixo e compreende basicamente quatro fases: tratamento prévio do leite, incubação, resfriamento e acondicionamento.



**Figura 1** Fluxograma da produção do leite fermentado

Fonte: Ordóñez et al (2005).

Segundo Ordóñez et al. (2005) a fase de enriquecimento em sólidos lácteos consiste em aumentar a porcentagem de sólidos não-gordurosos, mais concretamente a porcentagem de proteína, com a finalidade de potencializar a viscosidade do produto, como o iogurte e alguns leites fermentados. A filtração é efetuada para eliminar as possíveis partículas não-dissolvidas dos sólidos lácteos acrescentados durante o enriquecimento e os grumos procedentes do leite base. A eliminação do ar é recomendada, sobretudo quando o iniciador cresce mal em presença de tensões elevadas de oxigênio. As finalidades do tratamento térmico do leite são: eliminar a microbiota patogênica não esporulada, reduzir a carga microbiana para garantir que o cultivo iniciador encontrará substrato bastante livre de competidores e que crescerá velozmente, destruir enzimas endógenas do leite e reduzir a quantidade de oxigênio dissolvido, criando condições de microaerofilia favorável para o crescimento do cultivo iniciador.

O leite deve ser resfriado até a temperatura de incubação do cultivo iniciador antes de sua inoculação. Essa temperatura é diferenciada para cada tipo de leite fermentado. No caso de bactérias probióticas, a temperatura de incubação deve ser de 37 °C e o tempo necessário para obter a fermentação pode variar de horas até vários dias, dependendo da cepa empregada. Posteriormente, aplica-se o resfriamento com a finalidade de frear a atividade do iniciador e suas enzimas, evitando que a fermentação prossiga (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O acondicionando de cada leite fermentado tem suas peculiaridades, portanto o seu acondicionamento deve estar de acordo com essas particularidades (ORDÓÑEZ et al., 2005).

### **3.5 Tipos de leites fermentados**

Os diversos tipos de leites fermentados produzidos são resultantes das diferentes microbiotas responsáveis pelo processo de fermentação do leite. No

Quadro 1 estão relacionados os tipos de leite fermentado com os seus respectivos cultivos iniciadores.

**Quadro1** Tipos de leite fermentado e seu cultivo iniciador

<b>PRODUTO</b>	<b>CULTIVOS INICIADORES RELACIONADOS</b>
Iogurte	<i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>
Leite Fermentado ou Cultivado	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bifidobacterium sp</i> , <i>Streptococcus salivarius subsp thermophilus</i> , outras bactérias acidolática
Leite Acidófilo	<i>Lactobacillus acidophilus</i> .
Kefir	Grãos de Kefir (são constituídos por leveduras fermentadoras e/ou não fermentadoras de lactose), <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bifidobacterium sp</i> e <i>Streptococcus salivarius subsp thermophilus</i>

Fonte: Ordóñez, et al. (2005).

Um cultivo iniciador pode ser formado por um ou mais microrganismos, geralmente por várias cepas da mesma espécie. As bactérias são selecionadas por sua capacidade de produzir ácido láctico a partir da lactose e por outras aptidões metabólicas, que desempenham papel importante no aroma do produto final. O iniciador pode ser adicionado em pó, congelado concentrado ou em forma de suspensão líquida. A quantidade de inóculo pode variar dentro de certas margens, geralmente 2 a 3% do volume total do leite para o iogurte, 10% no caso de iniciadores probióticos e até 30% no *Kumys* (ORDÓÑEZ et al., 2005).

### 3.6 Microrganismos probióticos

Segundo Massaguer (2005), o conceito de probióticos foi definido como “microrganismos viáveis, incluindo bactérias e leveduras na forma de células

liofilizadas ou de produto fermentado, que exibem efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro”.

Os alimentos probióticos são comercializados de diferentes formas, sendo que a mais popular e acessível no Brasil é o leite fermentado. Os microrganismos considerados probióticos pertencem basicamente ao grupo das bactérias ácido-láticas (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus* com menor funcionalidade) e leveduras, pois fermentam o açúcar, produzindo ácido láctico como principal produto do metabolismo (OLIVEIRA; BATISTA, 2002).

Para que um microrganismo possa ser usado como probiótico, ele deve ser capaz de expressar suas atividades benéficas no corpo do hospedeiro, resistindo ao trato digestivo (aos ácidos clorídrico e biliar) e colonizando o intestino. A primeira consideração é que esta bactéria seja habitante normal da microflora intestinal, porém algumas cepas que não fazem parte da composição normal do trato intestinal podem vir a ser catalogadas como probióticos, como por exemplo, o *Lactobacillus bulgaricus* e o *Streptococcus thermophilus*, uma vez que estas bactérias não colonizam o trato gastrointestinal, apenas produzindo efeito benéfico sobre o balanço da microflora. Outra consideração é a disponibilidade em alimentos ou cápsulas e não ser enteropatogênica ou enteropatotóxica. (OLIVEIRA; BATISTA, 2002; ZHAO et al., 2008).

As principais características benéficas de cepas lácticas probióticas são: a promoção de um ambiente ácido pela produção de ácido láctico, promovendo assim a absorção de minerais e vitaminas, como também dificultando o desenvolvimento de microrganismos patogênicos no estômago e no intestino, a adesão e colonização do trato digestivo por esses microrganismos, que auxiliam na manutenção da integridade da parede intestinal, permitindo a absorção adequada de nutrientes, o aumento da disponibilidade de aminoácidos e ácidos graxos, o aumento da produção de vitaminas, principalmente as do complexo B, da absorção de íons cálcio e magnésio, a regularização do trânsito intestinal e a estimulação da resposta imunológica (OLIVEIRA; BATISTA, 2002; SAAD, 2006; ZHAO et al., 200

### 3.6.1 Ação dos probióticos sobre o trato digestório

Os animais, incluindo os seres humanos, geralmente são livres de microrganismos intra-útero. Entretanto, no momento do parto, a população microbiana normal e característica começa a se estabelecer. Logo antes de uma mulher dar a luz, os lactobacilos existentes em sua vagina multiplicam-se rapidamente. O primeiro contato do recém nascido com microrganismos geralmente é com esses lactobacilos, que se tornam os microrganismos predominantes do seu intestino. Outros microrganismos são introduzidos ao corpo do recém-nascido quando a respiração e a alimentação se iniciam e compõem a microbiota normal do corpo deste indivíduo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006)

O intestino grosso de um humano adulto contém o maior número de microrganismos residentes do corpo, devido a presença de elevado teor de umidade e aos nutrientes disponíveis. Bilhões de bactérias residem neste órgão e fazem parte de sua fisiologia. Os membros representativos da flora normal desta região são *Bacteriodes*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Shigella* e *Candida* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

A resistência da microbiota normal à colonização do intestino por bactérias patogênicas ocorre principalmente em duas regiões do intestino: no lúmen, por causa da produção de metabólitos tóxicos e na superfície da mucosa intestinal, em razão da ocupação dos sítios de associação pela microbiota normal. Quando se tem um ecossistema estável, não há multiplicação de microrganismos patogênicos devido à estabilização da microbiota bacteriana intestinal. Entretanto, essa flora permanece equilibrada até que um estímulo endógeno ou exógeno como o estresse, antibioticoterapia ou mudanças alimentares a perturbe e promova o desequilíbrio microbiano, podendo acarretar uma série de complicações ao organismo envolvido, favorecendo a colonização do trato digestório por patógenos. (OLIVEIRA; BATISTA, 2002; SANTOS et al., 2003; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; GASSULL,2006).

Uma microbiota intestinal desbalanceada causa alterações, como a diarreia associada a infecções ou ao tratamento por antibióticos, a alergia alimentar, o eczema atópico, doenças inflamatórias intestinais e artrite. Assim sendo, a correção das propriedades de uma microbiota autóctone em desequilíbrio constitui-se a base da terapia por probióticos (BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006; SAAD, 2006).

A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como os efeitos antagônicos, a competição contra microrganismos indesejáveis e os efeitos imunológicos. Brandt, Sampaio e Miuki (2006) e Saad (2006) reafirmam que diversos probióticos são capazes de modular algumas características da fisiologia digestiva, como a imunidade da mucosa e a permeabilidade intestinal. A ligação de bactérias probióticas aos receptores da superfície celular dos enterócitos também dá início às reações em cascata que resultam na síntese de citocinas. A modulação da microbiota intestinal pelos microrganismos probióticos ocorre por meio de um mecanismo denominado exclusão competitiva. Esse mecanismo impede a colonização dessa mucosa por microrganismos potencialmente patogênicos pela competição por sítios de adesão, pela competição por nutrientes e/ou por intermédio da produção de compostos antimicrobianos, como peróxido de hidrogênio, ácido láctico, ácido acético e bacteriocinas.

Quando indivíduos saudáveis consomem lactobacilos, eles se estabelecem na mucosa intestinal e a sua concentração tende a aumentar, enquanto que a de anaeróbios gram-negativos, como *Enterobacteriaceae*, e *Clostridium* sulfito redutores tende a diminuir. As bactérias gram-negativas são consideradas nocivas porque produzem endotoxinas e iniciam, mesmo em pequeno número, reações inflamatórias violentas. Além disso, também são responsáveis pela produção de substâncias carcinogênicas no intestino (MOLIN, 2001).

No caso específico de pacientes que sofrem da síndrome do intestino irritável, doença crônica inflamatória do trato digestivo que manifesta a colite ulcerativa ou a doença de Crohn, segundo Chagoyán, Maldonado e Gil (2005), há evidências de que a microbiota intestinal desses pacientes seja alterada, com elevação do número de coliformes e bacterióides e diminuição de bactérias ácido-láticas, promovendo fermentação anormal no cólon. Embora ainda não esteja claro se existe uma relação causal nesse sentido ou se a

microbiota alterada é consequência de uma disfunção intestinal, a restauração do equilíbrio desta microbiota, utilizando-se da administração de probióticos, pode resultar em benefícios terapêuticos (SAAD, 2006).

### **3.6.2 Probióticos na intolerância a lactose**

A lactose é o único glicídio livre que existe em quantidades importantes no leite, sendo também o componente mais abundante, o mais simples e o mais constante em proporção (45-50g/L). É o único carboidrato presente apenas nos mamíferos. É considerado o componente mais lábil diante da ação microbiana, pelo fato de ser um bom substrato para as bactérias que o transformam em ácido láctico. A hidrólise enzimática da lactose é um processo de grande interesse tecnológico, já que os compostos resultantes são facilmente fermentáveis e absorvidos pelo intestino humano. A  $\beta$ -galactosidase ou lactase é a principal enzima responsável por essa hidrólise. Trata-se de uma oxidase que hidrolisa a ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica e libera glicose e galactose, moléculas que o homem absorve com facilidade (ORDÓÑEZ et al., 2005; LOWER; PARKES; SANDERSON, 2008).

O interesse pela lactose como nutriente ainda é visto com reservas por causa dos problemas de intolerância (ORDÓÑEZ et al., 2005). Nos humanos, a intolerância à lactose é provocada pela perda ou diminuição da atividade da lactase (ADAM; TEIXEIRA; POLAINA, 2004). A origem desta intolerância encontra-se no déficit de  $\beta$ -galactosidase produzida pelas células da mucosa intestinal, mais precisamente nas bordas em escova do intestino delgado; nesses casos, a lactose comporta-se como um açúcar de absorção lenta e/ou nula (GASSULL, 2006; LOWER; PARKES; SANDERSON, 2008). Quando os carboidratos atingem o cólon sem serem previamente digeridos, servem de substratos para a microflora intestinal, sendo fermentados por bactérias anaeróbicas. O resultado desta fermentação é a produção de ácidos graxos de cadeia curta e dos gases carbônico e hidrogênio, culminando com os sintomas de flatulência, inflamação, náusea, dores abdominais, diarréia e desidratação nos casos de intolerância aguda (ADAM; TEIXEIRA; POLAINA, 2004;

ORDÓÑEZ et al., 2005). A severidade desses sintomas depende da quantidade de lactose que cada indivíduo pode tolerar (ADAM; TEIXEIRA; POLAINA, 2004). O excesso de volume de gás é diminuído por bactérias metanogênicas (pela produção de metano) e bactérias sulfito-redutoras (produzindo gás sulfídrico) (GASSULL, 2006; LOWER; PARKES; SANDERSON, 2008).

Uma função vital das bactérias lácticas na microbiota intestinal é produzir a enzima  $\beta$ -D-galactosidade, auxiliando na quebra da lactose no intestino. Assim, dá-se a importância de suplementar a alimentação de intolerantes com os probióticos. Essa enzima microbiana sobrevive ativamente à passagem pelo estômago após o consumo deste alimento, quebrando a lactose no intestino delgado e tornando-a digerível. De acordo com Saad (2006), diversas evidências têm demonstrado que o consumo de quantidades adequadas, de cepas apropriadas de bactérias lácticas (incluindo bactérias lácticas não-probióticas como *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) é capaz de aliviar os sintomas de intolerância à lactose. Desta maneira, consegue-se incorporar produtos lácteos e os nutrientes importantes que fazem parte desses produtos de volta à dieta de indivíduos intolerantes à lactose, anteriormente obrigados a restringir a ingestão desses produtos.

Além disso, conforme Gassull (2006) a fermentação de carboidratos pela flora anaeróbica produz, entre outras substâncias, ácido butírico, que está envolvido em numerosos processos metabólicos importantes no cólon, com ação sistêmica. Isto inclui a provisão de energia para o crescimento das colônias, o aumento da absorção de sódio e água e a síntese de muco na membrana celular.

### **3.6.3 Ação dos probióticos na modulação da resposta imunológica**

A superfície de mucosa da membrana intestinal é protegida por um adaptativo sistema imunológico. O tecido linfóide associado ao intestino representa a maior massa de tecido linfóide do corpo humano,

consequentemente, constitui um importante elemento da capacidade imunológica total do organismo (ISOLAURI et al., 2001).

De acordo com pesquisas mencionadas por Oliveira e Batista (2002), a microflora interage diretamente com o sistema imunológico da mucosa intestinal, que compreende agregados linfóides organizados - as placas de Peyer e folículos isolados-, estendendo-se pela mucosa e submucosa do intestino delgado formando o Tecido Linfóide Associado do Intestino (MALT), o qual permite a comunicação dos linfócitos T e B com as células de outros tecidos e a produção de imunoglobulina A (IgA). A primeira linha de defesa do organismo contra infecções e doenças causadas por microrganismos é a mucosa intestinal, juntamente com a resposta imunológica específica do organismo. A imaturidade da flora intestinal é responsável pela vulnerabilidade do indivíduo a infecções, inflamações e hipersensibilidades (alergias). O uso de probióticos pode melhorar a composição da microflora intestinal e desta forma aumentar e manter a barreira imunológica local, amenizando as respostas inflamatórias.

O efeito dos probióticos sobre a resposta imune tem sido bastante estudado. Coppola e Turnês (2004) mencionam que grande parte das pesquisas realizadas *in vitro* e de modelos com animais e humanos sugerem que os probióticos podem estimular tanto a resposta imune não-específica quanto a específica. Sugerem que este efeito pode estar relacionado à capacidade dos microrganismos probióticos de interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e a migração de células T do intestino, somando-se isto a capacidade das células probióticas de favorecerem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (citocinas, células destruidoras naturais NK e/ou imunoglobulinas).

Merece destaque o fato de que esses efeitos positivos dos probióticos sobre o sistema imunológico ocorrem sem o desencadeamento de uma resposta inflamatória prejudicial. Entretanto, nem todas as cepas de bactérias lácticas são igualmente efetivas. A resposta imune pode ser aumentada, quando um ou mais probióticos são consumidos concomitantemente e atuam sinergisticamente, como parece ser o caso dos *Lactobacillus* administrados em

conjunto com *Bifidobacterium* (OLIVEIRA; BATISTA, 2002; CAO; FERNÁNDEZ, 2005; SAAD, 2006).

Segundo Meydani e Ha (2000), as bactérias lácticas probióticas desempenham bem esta estimulação ao sistema imunológico porque as paredes celulares desses microrganismos possuem o principal componente imunomodulatório, por serem compostas principalmente por peptidoglicana, polissacarídeo e ácido teicóico. O peptidoglicana dessas células é sensível a digestão pela lisozima, sendo possivelmente liberado no intestino, induzindo a atividade adjuvante da superfície da mucosa, estimulando os macrófagos a liberarem interleucina-1 (IL-1), que é necessária para a ativação dos linfócitos T, e induzindo a produção de interferon-  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) pelos linfócitos. Além disso, tem-se discutido que o ácido teicóico estimula a produção de IL-1, de fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6) por monócitos *in vitro*. A característica imunogenética das bactérias ácido lácticas depende de sua sobrevivência ao trato gastrointestinal, sobrevivendo ao ácido gástrico e a bile, como também a habilidade de aderência à superfície da mucosa.

#### **3.6.4 Ação dos probióticos sobre o câncer de cólon**

Segundo Urdaneta et al. (2007), a flora intestinal e o sistema imunológico são importantes na modulação da carcinogênese, fato que pode explicar o uso de probióticos na prevenção do desenvolvimento de tumores. Estes autores citam em seus trabalhos que algumas pesquisas observaram a estimulação do sistema imune e a supressão do câncer por intermédio do consumo desses agentes e mencionaram que os probióticos diminuem as concentrações de enzimas fecais, as mutações e o aumento da bile, que estão envolvidos com a carcinogênese de cólon.

A atuação dos probióticos na redução do risco de aparecimento de câncer é possivelmente realizada pela neutralização dos efeitos genotóxicos e mutagênicos. Há a necessidade de que mais pesquisas sejam realizadas para identificar cepas específicas e as características de cada cepa responsáveis por efeitos antitumor específicos e os mecanismos por meio dos quais esses

efeitos são mediados, uma vez que é possível que diferentes cepas utilizem diferentes mecanismos de ação (WOLLOWSKI; RECHKEMMER, ZOBEL, 2001; SAAD, 2006).

Os mecanismos por meio dos quais os probióticos poderiam inibir o desenvolvimento do câncer de cólon ainda são desconhecidos. Entretanto, vários mecanismos de atuação são sugeridos, incluindo o estímulo da resposta imune do hospedeiro, a ligação e a degradação de compostos com potencial carcinogênico, alterações qualitativas e/ou quantitativas na microbiota intestinal envolvidas na produção de carcinógenos e de promotores (ex: degradação de ácidos biliares), produção de compostos antitumorígenos ou antimutagênicos no cólon, alteração da atividade metabólica da microbiota intestinal, alteração das condições físico-químicas do cólon e efeitos sobre a fisiologia do hospedeiro. As bifidobactérias, que colonizam o cólon em detrimento dos enteropatógenos, podem ligar-se ao carcinógeno final, promovendo sua remoção pelas fezes (WOLLOWSKI; RECHKEMMER, ZOBEL, 2001; SAAD, 2006).

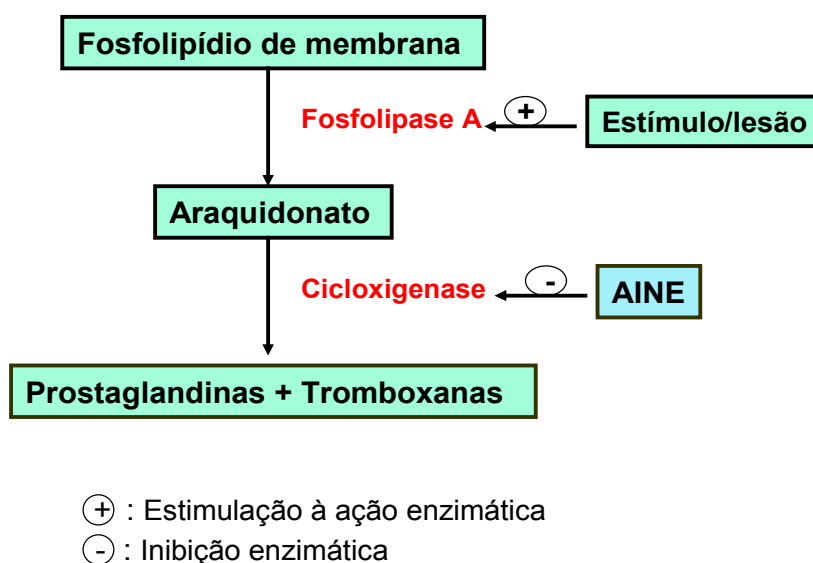
Gomes e Macalta (1999) relatam que a situação clínica associada a carcinogênese intestinal pode ser mediada por enzimas fecais, que transformam os compostos pró-carcinogênicos em compostos carcinogênicos. Os mesmos autores mencionam ensaios clínicos realizados por pesquisadores em modelos animais que evidenciaram que algumas estirpes de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* possuem a capacidade de reduzir os níveis daquelas enzimas, diminuindo assim o risco de desenvolvimento de tumores.

### **3.7 Antiinflamatórios não-esteroidais**

Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINE) estão entre os agentes terapêuticos mais amplamente utilizados no mundo inteiro, abrangendo uma variedade de fármacos que pertencem a diferentes classes químicas, sendo mais de cinquenta no mercado atual. São prescritos com frequência, em diferentes espécies animais, para o alívio da dor aguda e crônica, dores músculo-esqueléticas, reumáticas e estão entre os mais utilizados na prática da

automedicação de todo o mundo, inclusive no Brasil. (RANG et al., 2004; SILVA, 2004; RIBEIRO et al., 2005).

Os AINE formam um grupo de ácidos orgânicos que possuem propriedades analgésicas, antiinflamatórias e antipiréticas. Como analgésicos, diminuem a síntese de prostaglandinas (PG) que sensibilizam os nociceptores a mediadores da inflamação; como antiinflamatórios, reduzem principalmente os componentes da resposta inflamatória e imune em que os produtos da ação cicloxigenase-2 (COX-2) desempenham uma função significativa; como antipiréticos, inibem a prostaglandina E (PGE) no hipotálamo. Em geral, os efeitos dos AINE, descritos na figura 2, estão relacionados com a inibição da enzima cicloxigenase e conseqüentemente com a inibição das prostaglandinas e tromboxanos, embora possam ocorrer alguns aspectos da ação de cada fármaco por diferentes mecanismos. Além disso, outros fármacos exercem outras ações além de seus efeitos antiinflamatórios (RANG et al., 2004; SWEETMAN, 2006)



**Figura 2** Mecanismo de ação dos antiinflamatórios não esteroidais.

As cicloxigenases (COX) envolvidas no processo inflamatório são a COX-1 e COX-2 e estão relacionadas com processos patológicos e fisiológicos (RANG et al., 2004; BRICKS; SILVA, 2005). Os AINE tradicionais de uso corrente são, em sua maioria, inibidores das isoenzimas, apesar de variarem quanto ao grau de inibição destas (RANG et al., 2004).

A COX-1 é uma enzima constitutiva expressa na maioria dos tecidos, incluindo plaquetas circulantes, desempenha um importante papel de manutenção no corpo, estando envolvida na homeostase tecidual e na produção de prostaglandinas (RANG et al., 2004; SWEETMAN, 2006). Esta enzima faz parte da constituição do trato digestivo, sendo associada à produção de muco protetor e à inibição da secreção gástrica, pois a ação vasodilatadora fisiológica das PG, principalmente da PGE<sub>2</sub>, proporciona um sistema de tamponamento, pelo bicarbonato, que consegue atenuar a ação corrosiva do ácido clorídrico (HCL) presente no suco gástrico (SILVA, 2004; BRICKS; SILVA, 2005).

Assim, com a inibição da COX-1 pelos AINE há o enfraquecimento dos fatores defensivos da mucosa, pois haverá a inibição das prostaglandinas E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, I<sub>2</sub> e F<sub>2</sub>, que são amplamente sintetizadas pela mucosa gastroduodenal e são importantes no mecanismo de regulação do débito sanguíneo gastrointestinal, por sua ação vasodilatadora e favorecimento da irrigação da mucosa digestiva, sendo importantes na renovação das células epiteliais, na inibição da secreção ácida do estômago e no estímulo à produção de muco citoprotetor de íons bicarbonato (SILVA, 2004). Nas plaquetas, a COX-1 está associada à síntese do tromboxane A<sub>2</sub>, substância que favorece a agregação e adesão plaquetária, sendo a inibição desta enzima associada ao risco de sangramento cutâneo e gastrointestinal (BRICKS; SILVA, 2005).

A COX-2 é induzida nas células inflamatórias quando estas são ativadas, produzindo mediadores prostanóides da inflamação, além de desenvolver outras funções não relacionadas com a inflamação (RANG et al., 2004; SWEETMAN, 2006). Também está presente em diversos órgãos e tecidos normais, como cérebro, ossos, rins e endotélio vascular, mas não nas plaquetas. A síntese da COX-2 está aumentada nos processos inflamatórios, tanto nas articulações, como no endotélio vascular e tecido renal. Fármacos com ação seletiva sobre a COX-2 inibem a síntese da prostaglandina I<sub>2</sub>, que

tem ação vasodilatadora e impede a adesão de leucócitos ao endotélio vascular. Os inibidores específicos da COX-2 estão mais associados à ocorrência de problemas renais (hipertensão, edema e doenças tromboembólicas), doença coronariana e acidente vascular cerebral (BRICKS; SILVA, 2005).

Já está bem definido que a ação antiinflamatória dos AINE está principalmente relacionada à inibição da COX-2 e quando utilizados como agentes antiinflamatórios, seus efeitos indesejáveis, particularmente os que afetam o trato gastrointestinal, decorrem em grande parte, da inibição da COX-1. Compostos com ação seletiva sobre a COX-2 já estão em uso clínico, apresentando menos reações adversas que os não seletivos para COX. Estes últimos apresentam toxicidade gastrointestinal mínima, mas foram associados a alterações cardiovasculares pequenas, porém totalmente relevantes em alguns pacientes (RANG et al., 2004; SWEETMAN, 2006)

A toxicidade dos AINE depende, entre diversos fatores, da sua ação mais ou menos seletiva sobre as COX- 1 e COX-2. Como ambas as enzimas estão presentes no trato gastrointestinal e nos rins, todos os AINE podem causar, em maior ou menor grau, lesões nesses órgãos. Drogas que inibem predominantemente a COX-1 estão associadas a maior risco para sangramento, tanto pela inibição na síntese de tromboxana A<sub>2</sub>, como pela possibilidade de causarem lesões na mucosa gastrointestinal. Fármacos com ação seletiva sobre a COX-2 apresentam risco aumentado de efeito adverso cardiocirculatório, com hipertensão arterial, arritmia cardíaca e trombose cerebral (BRICKS; SILVA, 2005).

Bricks e Silva (2005) mencionam que os eventos adversos que mais se destacam com o uso dos AINE são os gastrointestinais, principalmente os de estômago e duodeno e em menor frequência os de intestino delgado e cólons, decorrentes predominantemente da inibição da COX-1. De acordo com esses autores, de 10 a 60% dos pacientes que utilizam AINE apresentam dispepsia e que de 5 a 10% interrompem o tratamento devido aos sintomas de dores abdominais, náuseas e vômitos. Além disso, as complicações gástricas podem evoluir até doenças pépticas graves com sangramento e/ou úlcera perfurada, com risco de morte do indivíduo.

O risco de sangramento gastrointestinal depende de vários fatores, como o tipo de droga administrada (menor com aceclofenaco e nimesulide), a dose (tanto maior quanto mais elevada a dose), uso de medicação concomitante e fatores individuais (antecedente de doença péptica). Os AINE com ação predominante sobre a COX-1 são: ácido acetilsalicílico (AAS), indometacina, ibuprofeno, fenoprofeno, cetoprofeno e piroxican (BRICKS; SILVA, 2005).

Quando se utilizam AINE clássicos em doenças articulares, que em geral exigem doses bastante elevadas e uso contínuo e prolongado, verifica-se uma alta incidência de efeitos colaterais, mais particularmente do trato digestivo, principalmente resultante da inibição da COX-1, mas também do rim, baço, sangue e medula óssea (RANG et al., 2004).

A indometacina é um antiinflamatório não-esteroidal, derivado do ácido indolacético, com ação predominante inibidora da COX-1. Na administração oral é absorvido de forma rápida e quase completa (90%), devendo ser administrada após as refeições ou com antiácidos para reduzir a irritação gastrointestinal. A presença do alimento retarda, mas não influencia na extensão da sua absorção. Sofre biotransformação hepática por desmetilação, desacetilação e conjugação. Cerca de 60% é eliminada pela urina e os demais pelas fezes. Apresenta uma maior incidência de efeitos adversos que a maioria dos AINE, sendo os mais habituais transtornos digestivos, cefaléia, podendo aparecer também hemorragias, ulcerações e perfurações gastrintestinais. Ocasionalmente há relatos de leucopenia, púrpura, trombocitopenia, anemia aplásica e hemolítica, hepatite, icterícia, insuficiência renal aguda, síndrome nefrótica e necrose papilar renal. É contra-indicada para menores de 14 anos (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2003; GENNARO, 2004; SWEETMAN, 2006).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

As análises microbiológicas e a administração da dieta aos animais foram realizadas de forma concomitante. Foram utilizados três lotes de cada um dos leites fermentados comerciais, os quais foram administrados aos animais no período experimental de 40 dias.

### **4.1 Escolha das amostras comerciais dos leites fermentados**

Foram submetidos aos ensaios dois tipos distintos de leites fermentados comerciais, contendo apenas um tipo de microrganismo mencionado no rótulo, sendo um cultivado com *Lactobacillus paracasei* (L1) e outro com *Lactobacillus casei* Shirota (L2). Apenas o leite fermentado cultivado com *Lactobacillus casei* Shirota mencionou alegações probióticas no rótulo do produto.

### **4.2 Amostragem**

As amostras comerciais das marcas de leites fermentados foram coletadas, de forma aleatória, em supermercados da cidade de João Pessoa e Recife. Ao serem adquiridas, foram transportadas em caixas isotérmicas até o Laboratório de Nutrição Experimental/CCS/UFPB, onde foram conservadas sob refrigeração ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) até a realização dos ensaios microbiológicos e experimentais.

### **4.3 Análises Microbiológicas**

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos/CT/UFPB.

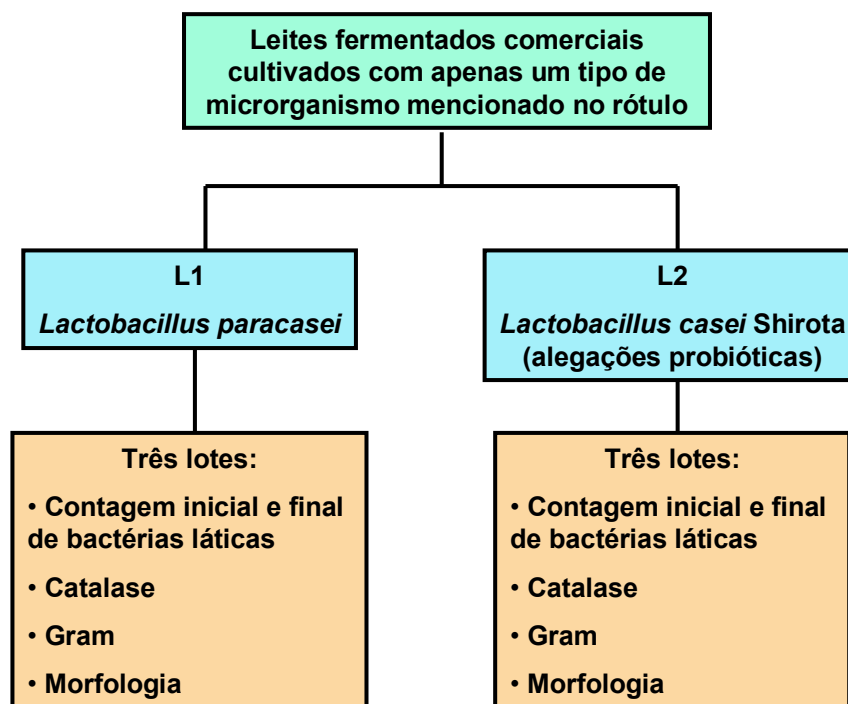
#### **4.3.1 Contagem das bactérias lácticas nos leites fermentados**

As contagens foram realizadas em duplicata, seguindo a metodologia descrita pelo APHA (1994). Para a preparação das diluições, tomou-se 225mL de diluente + 25mL da amostra asséptica para obtenção da primeira diluição. Retirou-se 1mL da diluição  $10^{-1}$ , adicionando-a em um tubo de 9mL de diluente para obter a diluição  $10^{-2}$  e assim sucessivamente até obter a diluição  $10^{-8}$ . Inoculou-se 1mL das diluições  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$  em placas de Petri estéreis vazias, adicionando-se em seguida, de 15 a 20mL do meio de cultura Ágar de Man, Rogosa & Sharpe (MRS), com aplicação de movimentos circulares, para promover a homogeneização do meio de cultura com o inóculo, até completa solidificação. Em seguida, adicionou-se uma sobrecamada de meio MRS sobre as placas e aguardou-se a solidificação. A incubação foi realizada em estufa a 37 °C/48hs-72hs. Foram contadas as placas contendo de 25 a 250 colônias e calculou-se o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), multiplicando-se o número médio de colônias (duplicata) pelo inverso de cada diluição correspondente.

#### **4.3.2 Coloração de Gram, reação de catalase e identificação morfológica das bactérias.**

Colônias crescidas nas placas de MRS no ensaio de contagem de bactérias lácticas foram submetidas às metodologias clássicas de coloração de Gram e ao teste de catalase, por distensão em lâminas de vidro.

Na coloração de Gram, as bactérias gram-positivas são identificadas por reterem o corante violeta de genciana e adquirirem cor púrpura; as gram-negativas não retêm o violeta de genciana e permanecem incolores até serem contracorados com safranina, quando adquirem a cor rosa. Posteriormente, as lâminas coradas são observadas ao microscópio óptico para verificação da morfologia das células. No teste de catalase, a atividade positiva desta enzima é detectada pela liberação de bolhas de ar quando uma gota de peróxido de hidrogênio é colocada sobre uma colônia bacteriana produzindo catalase. Caso não haja a formação de bolhas, o microrganismo é caracterizado como catalase-negativo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).



**Figura 3** Delineamento das análises microbiológicas

#### 4.4 Ensaio Biológico

O ensaio biológico foi realizado no Laboratório de Nutrição Experimental/CCS/UFPB.

Após a submissão do projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, parecer nº 0108/08, 60 ratos *Wistar* albinos, machos, provenientes do biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, foram distribuídos em seis grupos (n=10) e mantidos em gaiolas individuais com água e ração comercial *ad libitum*, temperatura  $22\pm 1$  °C e ciclo de claro escuro de 12h, até completarem 90 dias de idade, o que corresponde a um animal adulto (BUENO; BUENO JÚNIOR, 2007; OLIVEIRA et al., 2008), com peso em torno de  $371,19 \pm 5,3g$ , quando foram submetidos diariamente às dietas descritas na Tabela 1 por um período experimental de 40 dias e posteriormente foram sacrificados por deslocamento cervical.

Durante todo o período de experimentação, tanto os leites fermentados quanto a droga foram administrados aos animais pela técnica de gavagem.

**Quadro 2** Composição da dieta dos grupos experimentais.

GRUPO	REFERÊNCIA	DIETA
Grupo LP	Leite fermentado comercial cultivado com <i>Lactobacillus paracasei</i> (L1)	Ração comercial* e água <i>ad libitum</i> + L1
Grupo LP + D	Leite fermentado comercial cultivado com <i>Lactobacillus paracasei</i> + droga **	Ração comercial* e água <i>ad libitum</i> + L1 + droga
Grupo C	Controle	Ração comercial* e água <i>ad libitum</i> + água
Grupo D	Droga **	Ração comercial* e água <i>ad libitum</i> + droga
Grupo LC	Leite fermentado comercial cultivado com <i>Lactobacillus casei</i> Shirota (L2)	Ração comercial* e água <i>ad libitum</i> + L2
Grupo LC + D	Leite fermentado comercial cultivado com <i>Lactobacillus casei</i> Shirota + droga**	Ração comercial* e água <i>ad libitum</i> + L2 + droga

\*Ração Comercial: Labina ® / \*\* Antiinflamatório indometacina, fornecedor Deg.

A dosagem de 5mL/Kg/dia dos leites fermentados ministrados aos animais baseou-se nos trabalhos de Kuwabara et al. (1995) e Uchida e Kurakazu (2004). A droga em questão trata-se do antiinflamatório indometacina em solução aquosa, com dimetilsulfóxido (DMSO) 3%, adaptado de Leite et al. (2004), administrada aos animais dos grupos D, LP+D e LC+D na dosagem de 2mg/Kg/dia, sendo esta dose referente à terapêutica para humanos, de acordo com Charalambous, Farmer e O`brien (1996) e Levy et al. (2006). A escolha deste antiinflamatório baseou-se na acentuada agressão ao trato gastrointestinal de humanos, que dele fazem uso contínuo e prolongado e na hipótese da proteção desses efeitos adversos pela administração concomitante com leites fermentados potencialmente probióticos.

#### **4.4.1 Avaliação de ganho de peso semanal**

O peso corporal dos animais dos seis grupos experimentais (n=10) foi determinado semanalmente, utilizando-se balança eletrônica digital (Bioprecisa, modelo BS3000A), capacidade de 3Kg e sensibilidade de 0,1g, durante os 40 dias de experimento.

#### **4.4.2 Sacrifício dos animais**

Após os 40 dias de experimento, os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas e posteriormente sacrificados pela técnica de deslocamento cervical. As amostras de sangue foram coletadas pelo plexo braquial em tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)



**Figura 4** Animais em gaiolas individuais.



**Figura 5** Gaiolas individuais com água e ração comercial *ad libitum*.



**Figura 6** Pesagem semanal dos animais em ratos.



**Figura 7** Agulha para gavagem



**Figura 8** Preparação da seringa.



**Figura 9** Técnica de gavagem

Local: Laboratório de Nutrição Experimental da UFPB

Fonte: Cybelle Oliveira (2009)

#### **4.4.3 Peso dos órgãos**

As amostras dos órgãos de cada grupo experimental, n=5, foram coletadas de forma aleatória, após o sacrifício, para a determinação de seus pesos em balança analítica. A escolha dos órgãos envolvidos - rim direito, rim esquerdo, baço e fígado – baseou-se na propensão da indometacina em provocar efeitos colaterais nos rins e baço e pelo fígado ser o responsável pela metabolização desta droga, além da intenção de se verificar se os leites fermentados causariam alguma alteração.

#### **4.4.4 Análises hematológicas**

As amostras de sangue foram submetidas à realização de hemogramas (eritrograma, leucograma e plaquetas) para o monitoramento do padrão sanguíneo e avaliação do sistema imune em aparelho ABC-VET (Animal Blood Count). Os procedimentos analítico-laboratoriais foram realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e a contagem diferencial de leucócitos realizou-se no Hospital Universitário, ambos na UFPB. O número de amostras obtidas diferiu entre os grupos experimentais devido a coagulação sanguínea durante a punção na coleta, sendo: n=8, para LP; n=9, para LP+D; n=9, para C; n=7, para D; n=7 para LC; e n=9 para LC+D.

#### **4.5 Análises histopatológicas**

##### **4.5.1 Processamento histopatológico dos órgãos dos grupos experimentais**

Os rins, baços, fígados, estômagos e intestinos retirados dos seis grupos experimentais (n=5) foram processados no Laboratório de Biodiagnóstico da Escola Técnica de Saúde da UFPB. Os órgãos foram mergulhados em solução fixadora de líquido de Bouin a temperatura ambiente e tempo de fixação de 24 h, em seguida lavados em água corrente por 12h, para a retirada do excesso do fixador. Posteriormente, as peças foram submetidas ao processo de desidratação em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) e diafanização em xilol e então incluídos em parafina. Em seguida, as peças foram submetidas à cortes em micrótomo, sendo colhidas em lâminas histológicas, as quais foram levadas à estufa a 37°C por 24h para secagem e melhor adesão das amostras. Os cortes foram desparafinizadas em xilol, hidratados em soluções decrescentes de etanol, lavados com água e posteriormente coradas pela técnica de Hematoxilina de Harris - Eosina (HE) (BEÇAK; PAULTE, 1976) e montadas entre lâmina e lamínula com resina sintética (Entellan-Merck).

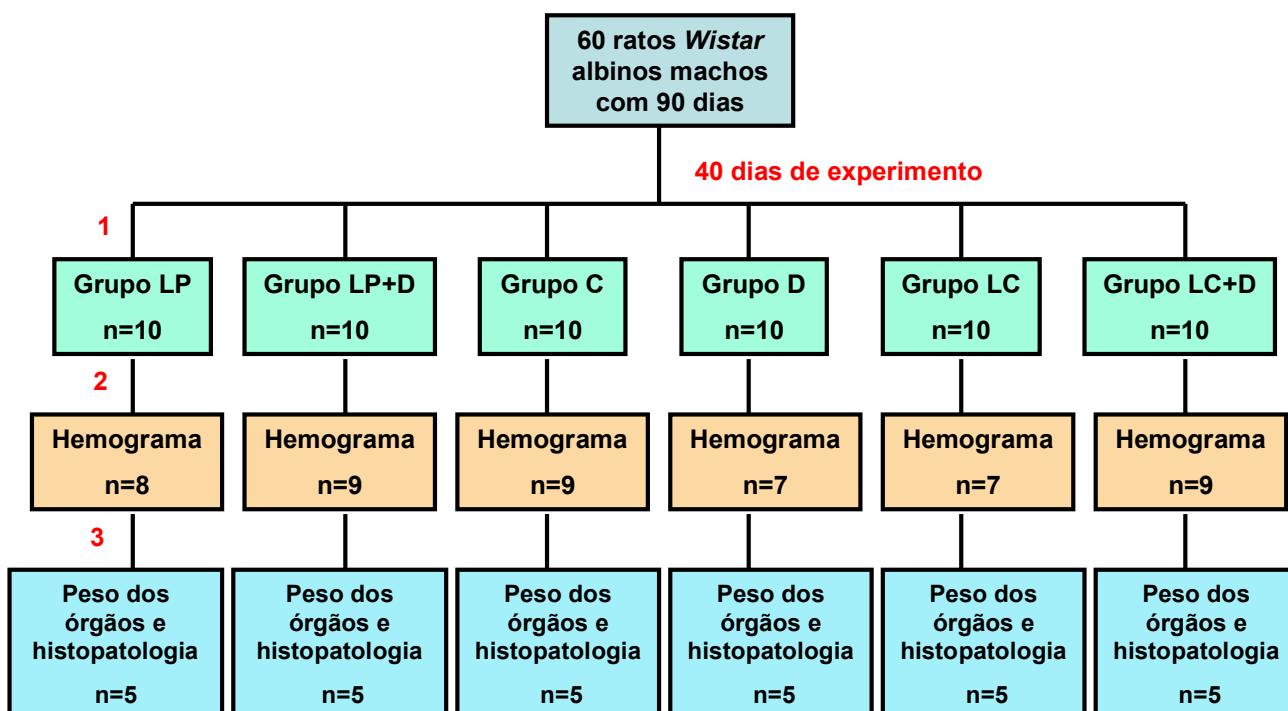
#### **4.5.2 Leitura das lâminas histopatológicas dos grupos experimentais**

As lâminas histopatológicas foram observadas ao microscópio óptico e efetuou-se uma análise descritiva dos resultados para cada material, comparando-se os resultados entre os grupos experimentais.

#### **4.6 Análise Estatística**

Utilizou-se análise de variância (ANOVA) para comparações entre os diversos parâmetros avaliados nos grupos experimentais. Constatando-se diferença significativa para ANOVA, utilizou-se o Teste de Tukey, para verificar se os grupos diferiam entre si. Quando não foi possível utilizar o teste paramétrico, utilizou-se o teste não-paramétrico de Friedman, Duncan e Kruskal-wallis, este último seguido de Wilcoxon. Todos os testes foram

realizados com significância estatística em nível de 5% ( $p < 0,05$ ) em todos os parâmetros avaliados. Para realização dos dados estatísticos utilizou-se o pacote estatístico R Foundation for Statistical Computing (2006).



**1. Peso semanal e alimentação diferenciada diária.**

**2. Após 40 dias de experimento, sacrifício por deslocamento cervical e coleta sanguínea pelo plexo braquial.**

**3. Retirada dos órgãos e preparação das lâminas histopatológicas.**

**Figura 10** Delineamento do ensaio biológico

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análises Microbiológicas

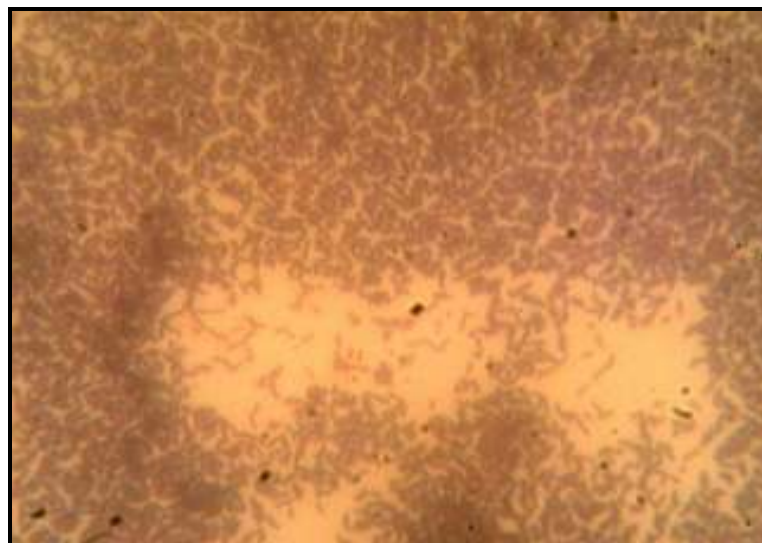
#### 5.1.1 Características morfológicas, reação de catalase e coloração de gram

As análises microbiológicas foram realizadas em três lotes diferentes de cada uma das marcas comerciais de leites fermentados estudadas. Macroscopicamente, tanto o L1 (cultivado com *Lactobacillus paracasei*) quanto o L2 (cultivado com *Lactobacillus casei*) apresentaram-se em meio ágar MRS como pequenas colônias de coloração branca, com reação negativa para catalase. A luz do microscópio, ambas as cepas referentes à L1 e L2 resultaram em reação positiva para gram e morfologia de bacilos, sendo o bacilo visualizado em L1 ligeiramente mais curto que aquele referente à L2. As características observadas sugerem que essas bactérias pertençam ao grupo láctico, como mencionado nos rótulos dos produtos (FRANCO; LANDGRAF, 2003; BOTELHO, 2005; MASSANGUER, 2005; MATA et al., 2008).



**Figura 11** Bacilos curtos e gram positivos de *Lactobacillus paracasei* (L1)

Fonte: Cybelle Oliveira (2009)



**Figura 12** Bacilos gram positivos de *Lactobacillus casei* Shirota (L2)

Fonte: Cybelle Oliveira (2009)

### 5.1.2 Viabilidade das bactérias lácticas nos leites fermentados

O número de bactérias lácticas viáveis nos leites fermentados comerciais cultivados tanto com o *Lactobacillus paracasei* (L1) quanto com o *Lactobacillus casei* Shirota (L2), nas três repetições, apresentou-se dentro das exigências estabelecidas pela legislação vigente (BRASIL, 2004), onde a quantidade mínima de bactérias lácticas viáveis não deve ser inferior a  $10^6$  UFC/mL durante o prazo de validade dos produtos. Todos os lotes ensaiados resultaram em contagens finais, nos últimos dias de sua validade, superiores aos valores  $10^6$  UFC/mL, sendo que a média dos valores iniciais e finais fora superior nas contagens do *Lactobacillus casei* Shirota em relação ao *Lactobacillus paracasei*. Esses dados podem ser observados na Tabela 1 a seguir.

Os resultados destes ensaios realizados com amostras coletadas em João Pessoa e Recife contrapõem àqueles obtidos por Tebaldi et al. (2007), onde a contagem das bactérias lácticas de bebidas fermentadas comercializadas no sul de Minas Gerais revelou-se insatisfatória, uma vez que

quatro das cinco amostras ensaiadas apresentaram contagem inferior ao mínimo exigido de  $10^6$  UFC/ mL.

**Tabela 1** Viabilidade das bactérias lácticas das duas marcas comerciais de leites fermentados analisadas em ágar MRS e expressa em UFC/mL e log<sub>10</sub>.

PRODUTO/LOTE	CONTAGEM INICIAL	CONTAGEM FINAL
L1 – a	$2,1 \times 10^7$	$9,1 \times 10^6$
L1 – b	$8,0 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$
L1 – c	$4,2 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$
L2 – a	$4,4 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
L2 – b	$4,6 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
L2 – c	$4,4 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$
MÉDIA EM LOG 10	CONTAGEM INICIAL	CONTAGEM FINAL
L1	7,380	6,778
L2	8,653	8,431

Barreto et al. (2003) avaliaram 15 marcas de produtos comerciais, que declaram a presença de fermentos lácticos, lactobacilos e/ou bifidobactérias, comercializados na região de Campinas (SP), na forma de iogurte, leite fermentado ou culturas liofilizadas. Em suas análises, concluíram que os produtos que incorporavam *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias, apresentaram contagem de *Lactobacillus acidophilus* abaixo de  $10^5$  UFC/mL em 52% das amostras e contagem de bifidobactérias abaixo de  $10^6$  UFC/mL em 64% das amostras. Porém os produtos que declaram a presença de culturas puras de *Lactobacillus casei* apresentaram excelentes condições de viabilidade das cepas, com contagem total média de 8,85 Log UFC/g, número bastante similar ao encontrado neste trabalho.

## 5.2 Ensaio Biológico

### 5.2.1 Avaliação do ganho de peso dos grupos experimentais

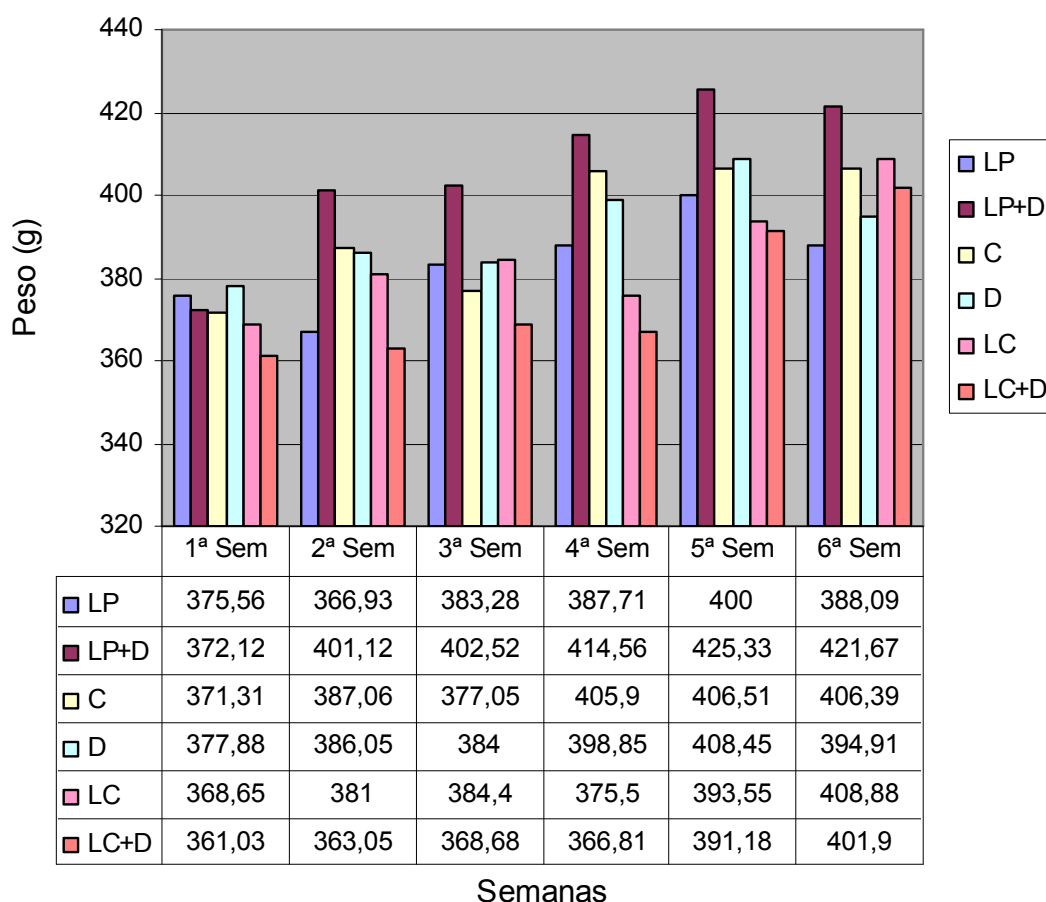
Os resultados de ganho de peso semanal, apresentados no Gráfico 1 e na Figura 13, demonstram que os grupos C e D comportaram-se de maneira

bastante semelhante em relação ao ganho de peso semanal dos seus animais. Assim, a administração diária do antiinflamatório indometacina aos ratos não influenciou no ganho de peso corpóreo durante os 40 dias do experimento ao compará-lo com o grupo controle. O grupo C também não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos LP, LC. Desta forma, o ganho de peso dos animais que tiveram a alimentação suplementada com os leites fermentados cultivados com *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus casei* Shirota assemelha-se àquele que encontramos nos animais alimentados apenas com ração comercial e água. Em contrapartida, o grupo C apresentou diferença significativa comparando-se com os grupos LP+D e LC+D, demonstrando desta forma haver alguma interação entre a droga e os leites fermentados em relação ao ganho de peso semanal corpóreo.

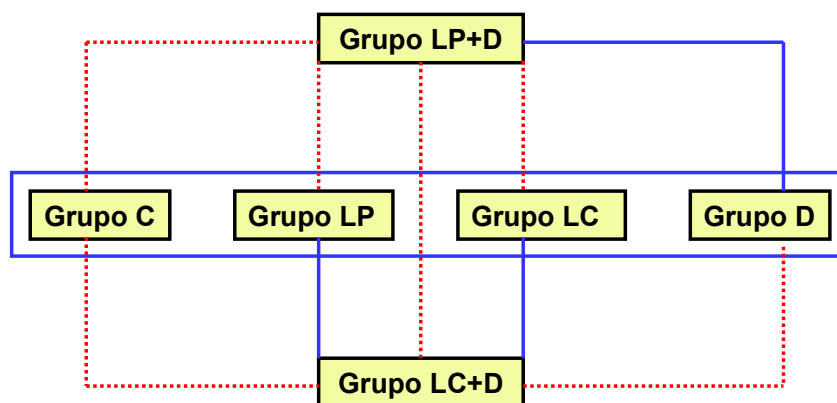
Carli (2006), trabalhando com experimentação em pintos, também não obteve diferença significativa entre o ganho de peso corpóreo do grupo controle e àquele ao qual adicionou *Lactobacillus paracasei* como probiótico à água dos animais. Urdaneta et al. (2007) ao trabalharem com grupos experimentais de ratos cuja alimentação recebeu a adição de kefir à dieta, também constataram que os animais do grupo controle e experimental apresentaram crescimento similar de peso corpóreo. França (2007) observou que a utilização de probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis* e *Sacharomyces cerevisiae*) não influenciou no ganho de peso, conversão alimentar e sobrevivência de girinos e imagos. Em contraposição, Aboderin e Oyetayo (2006), ensaiando *Lactobacillus plantarum* em ratos, observaram que houve aumento significativo de ganho de peso dos animais em comparação com o grupo controle.

O grupo D demonstrou o seu potencial de ganho de peso semelhante aos grupos C, LP, LC e LP+D, diferindo do grupo LC+D, apresentando um ganho de peso superior a este nas cinco primeiras semanas. Assim, uma vez que o grupo D não diferiu do grupo LC, mas diferiu de LC+D, sugere-se que a adição do leite fermentado cultivado com *Lactobacillus casei* Shirota e o antiinflamatório indometacina à dieta dos animais possa ter interagido de tal forma que resultou em diferença estatística significativa em relação ao grupo D e ao grupo C.

O grupo LC+D apenas não diferiu dos grupos LP e LC. Deste modo, pode-se supor que o comportamento de ganho de peso semanal do grupo LC+D assemelha-se ao dos grupos LP e LC, que receberam os leites fermentados. Os grupos LP e LC diferiram significativamente unicamente do grupo LP+D. Mais uma vez pode-se enfatizar a existência de interação entre o leite fermentado cultivado com *Lactobacillus paracasei* e o antiinflamatório em questão, já que os grupos LP e LC não diferiram em relação ao ganho de peso semanal dos grupos D e C. Em se tratando do grupo LP+D, este apenas não diferiu estatisticamente do grupo D, apresentando um comportamento de ganho de peso conforme este último.



**Gráfico 1** Ganho de peso semanal dos grupos experimentais. Os valores estão expressos em média. Os grupos seguidos de letras distintas, entre parênteses, diferem entre si (teste não-paramétrico de Friedman,  $p < 0,05$ ): LP (acde); LP+D (b); C (acd); D (abc); LC (acde); LC+D (e).



Os grupos C, LP, LC e D não diferem estatisticamente

..... : Os grupos diferem estatisticamente

— : Os grupos não diferem estatisticamente

**Figura 13** Correlação estatística entre o ganho de peso semanal dos grupos experimentais

Em se tratando do ganho de peso dos animais pela diferença entre o peso inicial e final do experimento, demonstra-se nos Gráficos 2 e na Tabela 2 que os grupos LP+D, LC+D, LC e C não diferiram estatisticamente em seus resultados. O único grupo que diferiu do controle foi o LP. Em relação ao grupo D, este não apresentou diferença estatística ao ser comparado aos grupos C e LP, mas diferiu dos demais grupos que tiveram leite fermentado adicionado à sua alimentação (LP+D, LC+D, LC).

Os grupos experimentais que receberam diariamente leite fermentado comportaram-se de maneira semelhante ao grupo controle, com exceção do grupo LP, onde se constatou um déficit de ganho de peso corpóreo em comparação ao grupo C. Estes resultados se contrapõem aos obtidos por Dock et al. (2004), onde observaram em seus ensaios que o grupo experimental de ratos que teve sua alimentação adicionada de probióticos resultou em um incremento de peso final superior ao grupo controle.

O grupo D também apresentou déficit de ganho de peso corpóreo em relação ao grupo controle. Uma vez que a droga indometacina utilizada no experimento é um AINE com ação predominante inibidora da COX-1, cujos efeitos adversos destacados são os gastrintestinais, principalmente os de

estômago e duodeno e em menor freqüência os de intestino delgado e cólons, principalmente com um uso contínuo e prolongado do fármaco (RANG et al, 2004; BRICKS; SILVA, 2005), a ação da droga pode ter dificultado a absorção de alguns nutrientes pelo trato digestivo, resultando em um peso corpóreo deste grupo de animais inferior ao obtido no grupo controle.

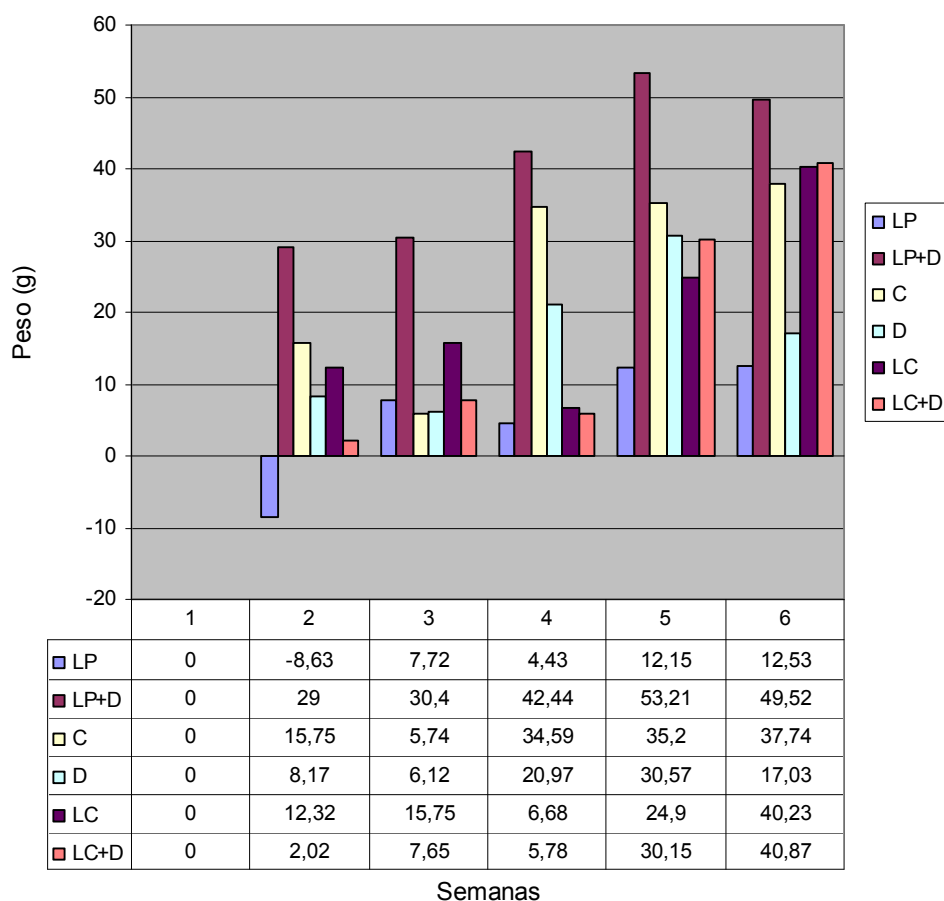
**Tabela 2** Relação entre ganho de peso final em gramas e porcentagem de ganho de peso dos grupos experimentais

<b>Grupo</b>	<b>Ganho de peso</b>	<b>Ganho de peso (%)</b>
<b>LP+D</b> (cd)	49,52g	13,32%
<b>LC+D</b> (cd)	40,87g	11,32%
<b>LC</b> (cd)	40,23g	10,91%
<b>C</b> (bd)	37,74g	9,45%
<b>D</b> (ab)	17,03g	4,51%
<b>LP</b> (a)	12,53g	3,34%

Os valores estão expressos em média. Os grupos seguidos de letras distintas, entre parênteses, diferem entre si (teste não-paramétrico de Kruskal-wallis, seguido de Wilcoxon,  $p < 0,05$ ).

Os maiores valores de ganho de peso final dos grupos experimentais foram de três (LP+D, LC+D, LC) dos quatro grupos que receberam adição de leite fermentado à sua dieta; e estes apresentaram um incremento de peso final médio estatisticamente superior ao grupo D. Isto pode estar relacionado com as características nutritivas dos alimentos fermentados, uma vez que os seus principais constituintes - proteínas, gordura, lactose - estão parcialmente pré-digeridos devido ao processo fermentativo, aumentando desta forma a disponibilidade de aminoácidos, ácidos graxos de cadeia curta e carboidratos simples. Além disso, as vitaminas K e do complexo B e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) também são produtos finais da fermentação. Os principais AGCC resultantes são o acetato, o propionato e o butirato. O acetato aumenta o efeito do butirato e do propionato no estímulo da absorção de cálcio e magnésio e outros cátions no cólon; tem sido demonstrado que o propionato aumenta a contração muscular do cólon, contribuindo para a promoção da laxação e alívio da constipação; o butirato está relacionado com a manutenção

da integridade da mucosa e sua infusão conduz a uma rápida remissão de colite ulcerativa distal. A absorção de minerais e vitaminas é favorecida pela promoção de um ambiente ácido resultante da produção de ácido láctico (OLIVEIRA; BATISTA, 2002; FERREIRA, 2003; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; SAAD, 2006; ZHAO et al., 2008).



**Gráfico 2** Diferença entre o peso inicial e final dos grupos experimentais durante as seis semanas.

A ingestão de leite fermentado cultivado com *Lactobacillus paracasei* resultou em uma menor indução de ganho de peso do grupo experimental LP em relação aos demais grupos e ao controle. Esse achado é de relevante importância, pois se trata de um alimento nutritivo devido ao processo fermentativo e ao mesmo tempo induz a perda de peso, como observado ao compará-lo ao grupo controle.

### 5.2.2 Peso dos órgãos

O peso dos órgãos está diretamente relacionado com a atividade metabólica exercida por eles bem como com o peso corpóreo do animal.

Os resultados obtidos dos pesos dos órgãos dos grupos experimentais estão representados na Tabela 3.

Não foram encontrados na literatura consultada trabalhos que correlacionassem o peso dos órgãos em animais que tiveram suas dietas acrescidas de leite fermentado para fins de comparação.

A avaliação do peso dos rins, tanto direito quanto esquerdo, dos seis grupos de animais não demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ), o que contribui para sugerir uma função renal sem alterações, independente da dieta submetida.

**Tabela 3** Estimativa do peso dos órgãos dos seis grupos experimentais: rim direito, rim esquerdo, baço e fígado.

Grupos	Rim D	Rim E	Baço	Fígado
LP	1,338 ± 0,098 a	1,293 ± 0,094 a	0,592 ± 0,144 b	10,717 ± 0,908 a
LP+D	1,449 ± 0,121 a	1,314 ± 0,141 a	0,835 ± 0,112 a	10,702 ± 0,940 ab
C	1,477 ± 0,088 a	1,393 ± 0,028 a	0,853 ± 0,087 a	11,153 ± 0,77 b
D	1,328 ± 0,140 a	1,346 ± 0,105 a	0,802 ± 0,077 a	12,912 ± 0,430 a
LC	1,346 ± 0,061 a	1,325 ± 0,067 a	0,845 ± 0,085 a	11,759 ± 0,570 ab
LC+D	1,309 ± 0,251 a	1,299 ± 0,215 a	0,802 ± 0,095 a	10,588 ± 2,099 a

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si (ANOVA, seguida de Tukey,  $p < 0,05$ ).

O rim desempenha suas funções mais importantes ao filtrar o plasma, devolvendo ao sangue as substâncias necessárias e excretando as substâncias indesejáveis na urina, como diversos resíduos do metabolismo e água, eletrólitos e não-eletrólitos em excesso no meio interno. Toxinas e outras substâncias estranhas que são produzidas pelo corpo ou que são ingeridas,

como fármacos e aditivos alimentares, também são eliminadas (GUYTON; HALL, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Em relação ao peso do baço, o grupo LP apresentou diferença estatística significativa em relação aos demais grupos. Pode-se admitir que esta diferença esteja relacionada com o menor peso corpóreo apresentado por este grupo em relação aos demais, uma vez que o mesmo possuiu um menor incremento de ganho de peso, seguido por uma menor média final de peso corpóreo.

O baço representa um importante órgão de defesa contra microrganismos que penetram no sangue circulante em virtude de sua riqueza em células fagocitárias e do contato íntimo entre o sangue e essas células. É um grande produtor de anticorpos e um importante filtro fagocitário e imunológico para o sangue, respondendo com rapidez aos antígenos que o invadem. Como os demais órgãos linfáticos, o baço origina linfócitos que passam para o sangue circulante (LORENZI et al., 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Analisando-se o peso do fígado, os grupos LP, D e LC+D diferiram significativamente do grupo controle (C). Os demais grupos não diferiram estatisticamente entre si de forma significativa. O grupo D apresentou um peso de fígado superior ao grupo controle, o que pode sugerir uma maior atividade metabólica deste órgão devido à presença do antiinflamatório indometacina, que, sofrendo biotransformação hepática por desmetilação, acetilação e conjugação (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2003), poderia induzir um aumento do retículo endoplasmático liso de células hepáticas. Já LP e LC+D demonstraram pesos inferiores ao grupo C, porém o peso do fígado não diferiu entre todos àqueles que receberam leite fermentado adicionado à sua alimentação.

O fígado é o segundo maior órgão do corpo e a maior glândula. É o órgão responsável pelo processamento e armazenamento dos nutrientes absorvidos no trato digestivo. Vários processos importantes ocorrem no interior de células encontradas no fígado - os hepatócitos - onde reações de oxidação, metilação e conjugação, requeridas para a inativação ou detoxificação de várias substâncias antes de sua excreção, acontecem no retículo endoplasmático liso dessas células, com o auxílio de enzimas. Drogas lipofílicas, capazes de atravessar a membrana das células intestinais, tornam-

se mais hidrofílicas por meio de processos oxidativos nos hepatócitos, gerando produtos solúveis em água; estes produtos são frequentemente conjugados a glucuronato, sulfato ou glutatona, sendo exportados para o plasma ou bile por meio de proteínas transportadoras localizadas na membrana dos hepatócitos. Sobre certas condições, drogas inativadas no fígado podem induzir um aumento no retículo endoplasmático liso do hepatócito, aumentando assim a capacidade de detoxificação do órgão. O fígado também está envolvido com o metabolismo de lipídios, carboidratos, aminoácidos, hormônios e com o armazenamento de vitaminas e de ferro (GUYTON; HALL, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

### **5.2.3 Análises hematológicas: hemograma**

O exame sanguíneo pode ser realizado como um procedimento para acessar a saúde geral do indivíduo. Assim, o hemograma avalia os diferentes elementos celulares do sangue, tanto quantitativa quanto qualitativamente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O sangue é um tecido fluido, formado por uma porção celular que circula em suspensão num meio líquido, o plasma. A porção celular é formada pelos glóbulos vermelhos - também chamados de hemácias ou eritrócitos - pelos diversos tipos de glóbulos brancos ou leucócitos e pelas plaquetas. Quando colhido, o sangue é tratado por anticoagulantes e em seguida centrifugado, separando-se em camadas heterogêneas. O resultado obtido por essa sedimentação chama-se hematócrito, onde o plasma corresponde ao sobrenadante e os glóbulos sedimentam-se em duas camadas. A camada inferior tem coloração vermelha, é composta por eritrócitos, a superior de cor acinzentada é representada pelos leucócitos. Sobre os leucócitos repousa uma delgada camada de plaquetas, não distinguíveis a olho nu. O hematócrito permite estimar o volume de sangue ocupado pelos eritrócitos em relação ao sangue total (LORENZI et al., 2003; ABODERIN; OYETAYO, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

### 5.2.3.1 Série vermelha (eritrograma) e série branca (leucograma)

As hemácias são responsáveis pelo transporte de oxigênio e gás carbônico pelo corpo por serem ricas em hemoglobina, uma proteína básica que dá a cor vermelha ao sangue (LORENZI et al., 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Na série vermelha do hemograma são avaliados o número de hemácias e a concentração de hemoglobina, parâmetros relacionados com as anemias.

Os resultados expressos na Tabela 4 demonstram não haver diferença significativa entre os valores dos eritogramas obtidos dos grupos experimentais ensaiados, ou seja, não houve alteração para série vermelha em relação ao grupo controle (C). Desta forma, a adição da droga indometacina e dos leites fermentados à alimentação dos animais não interferiram nestes parâmetros.

**Tabela 4** Série vermelha dos hemogramas dos grupos experimentais

GRUPOS	RCB 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	HGB g/dL	HCT %	MCV fm <sup>3</sup>	MCH pg	MCHC g/dL
LP	8,09±0,42a	15,31±0,74a	37,71±2,03a	46,63±0,92a	18,93±0,69a	40,61±1,08a
D	8,13±0,36a	15,29±0,47a	37,51±1,05a	46,29±0,09a	18,79±0,39a	40,70±0,75a
LP+D	8,37±0,56a	15,46±0,55a	39,18±2,09a	46,67±1,32a	18,52±0,76a	39,59±0,78a
C	8,35±0,47a	15,36±0,66a	38,84±2,19a	46,33±1,12a	18,40±0,54a	39,59±0,69a
LC	8,11±0,40a	15,33±0,73a	38,29±1,57a	47,14±0,37a	18,94±0,81a	40,06±1,34a
LC+D	8,18±0,51a	15,21±0,71a	37,50±2,50a	45,78±1,48a	18,64±0,73a	40,61±1,21a

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão. Letras iguais precedidas de valores não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos (ANOVA). RCB (hemácias totais), HGB (hemoglobina), HCT (hematócrito), MCV (volume corpuscular médio), MCH (hemoglobina corpuscular média), MCHC (concentração de hemoglobina corpuscular média).

A série branca do hemograma é constituída pelos leucócitos, avaliando o número total desses glóbulos brancos. Estas células têm como função proteger o organismo contra infecções. Dentre os leucócitos podemos citar os neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. Os neutrófilos estão relacionados com a fagocitose de microrganismos patogênicos nas primeiras quatro horas após sua entrada nos tecidos. Os eosinófilos estão envolvidos na defesa contra helmintos parasitas, na modulação do processo inflamatório e nas reações alérgicas. Os basófilos são responsáveis pela liberação de histamina e outros mediadores da inflamação, além de participarem de reações alérgicas. Os linfócitos são responsáveis pela defesa imunológica do organismo, reconhecendo moléculas estranhas presentes em diferentes agentes infecciosos. Os monócitos se diferenciam em macrófagos teciduais, que fagocitam, matam e digerem protozoários, certas bactérias, vírus e células senescentes, possuindo também a função de células apresentadoras de antígenos para linfócitos (LORENZI et al., 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Nos ensaios realizados, os valores obtidos para a série branca dos diferentes grupos experimentais não diferiram estatisticamente em si, tanto em relação à contagem global dos leucócitos quanto em termos de células diferenciadas em neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos. Desta forma, não foi observado efeito imunoestimulador por meio da realização dos leucogramas. Os valores obtidos estão representados na Tabela 5.

Os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados por França (2007), quando utilizou probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis* e *Sacharomyces cerevisiae*) em girinos e imagos de rã e as análises não demonstraram alterações hematológicas em termos de eritrograma e leucograma. Capcarova et al. (2008) também não obtiveram resultados com diferença estatística ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo controle ao avaliar os parâmetros sanguíneos das séries vermelha e branca de perus que ingeriram com *Enterococcus faecium* M-74. Budino et al. (2004) também não observaram alteração significativa nos parâmetros de eritrograma e leucograma em experimentação de probiótico constituído de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* em leitões.

**Tabela 5** Leucograma dos grupos experimentais

Grupos	Leucócitos totais 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Neutrófilo%	Eosinófilo%	Linfócito%	Monócito%
LP	4,60±1,35a	31,0±6,87a	1,38±0,52a	63,50±6,44a	4,13±1,73a
D	3,96±0,97a	25,86±4,95a	1,14±0,89a	69,71±6,26a	3,29±1,60a
LP+D	4,69±0,83a	26±5,937a	1,33±0,866a	68,00±5,87a	4,67±1,118a
C	5,14±0,88a	27,78±4,52a	1,22±0,97a	67,00±4,66a	4,00±2,39a
LC	5,87±2,19a	23,71±7,85a	0,86±1,07a	72,29±6,45a	3,14±1,21a
LC+D	5,17±1,31a	25,11±4,81a	2,44±1,13a	67,89±4,19a	4,56±1,33a

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão. Letras iguais precedidas de valores não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos. (Leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos, ANOVA. Eosinófilos, ANOVA seguida de Duncan,  $p < 0,05$ ).

Já os ensaios realizados por Aboderin e Oyetayo (2006), utilizando *Lactobacillus plantarum* em ratos, demonstraram aumento nos parâmetros de hemoglobina e no tamanho e contagem das hemácias ao comparar com o grupo controle, mas não relacionados a patologias. Além disso, observaram um aumento nos índices de linfócitos nos grupos que recebem a administração de 0,3 e 0,6mL de *Lactobacillus plantarum* em relação ao grupo controle, supondo efeito imunoestimulador. O que não ocorreu neste trabalho.

Desta forma, a administração oral da droga indometacina e dos leites fermentados cultivados com *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus casei* aos grupos de ratos ensaiados, durante os 40 dias experimentais, não provocou alterações nos parâmetros sanguíneos de eritograma e leucograma dos animais, revelando-se seguros à saúde.

### 5.2.3.2 Plaquetas

As plaquetas são ricas em mucopolissacarídeos e glicoproteínas que têm papel essencial nas funções de adesão e agregação plaquetária.

Promovem a coagulação sanguínea e auxiliam na manutenção da integridade vascular (LORENZI et al., 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os valores de contagem de plaquetas obtidos neste experimento e representados na Tabela 6 demonstram que apenas o grupo LC diferiu dos grupos controle e droga, com valores inferiores aos apresentados por estes. Os grupos C, LP, D e LP+D não diferiram estatisticamente entre si. O grupo LC+D apresentou diferença estatística em relação ao grupo LP. Apesar dos valores descritos diferirem estatisticamente entre alguns grupos, os resultados obtidos encontram-se dentro da faixa permitida para os animais ensaiados.

Aboderin e Oyetayo (2006), trabalhando com *Lactobacillus plantarum* em ratos, concluíram em seus trabalhos que os animais administrados com a dieta livre de bactérias e aqueles que receberam 0,3mL de bebida fermentada contendo o microrganismo supracitado apresentaram valores compatíveis com os encontrados no grupo controle. Já os animais que foram suplementados com 0,6 e 1,0mL diferiram do controle e apresentaram valores superiores de plaquetas. Budino et al. (2004) não observaram diferença na contagem de plaquetas em relação ao grupo controle em leitões desmamados administrados com probiótico constituído de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*.

**Tabela 6** Contagem de plaquetas dos grupos experimentais

<b>Grupos</b>	<b>Valores obtidos (H10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>
LP	1258,25±106,09 a
D	1204,89±105,73 ac
LP+D	1150,56±192,64 ac
C	1168,00±147,69 ac
LC	892,29±160,57 b
LC+D	1104,89±198,30 bc

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão. Valores seguidos de letras distintas diferem entre si (teste de tukey, p<0,05).

#### 5.2.4 Análises histopatológicas

As análises histopatológicas dos cortes dos estômagos, rins, fígados, baços e intestinos dos grupos experimentais não evidenciaram alterações histológicas importantes nestes órgãos, possuindo os seis grupos ensaiados as mesmas características histológicas.

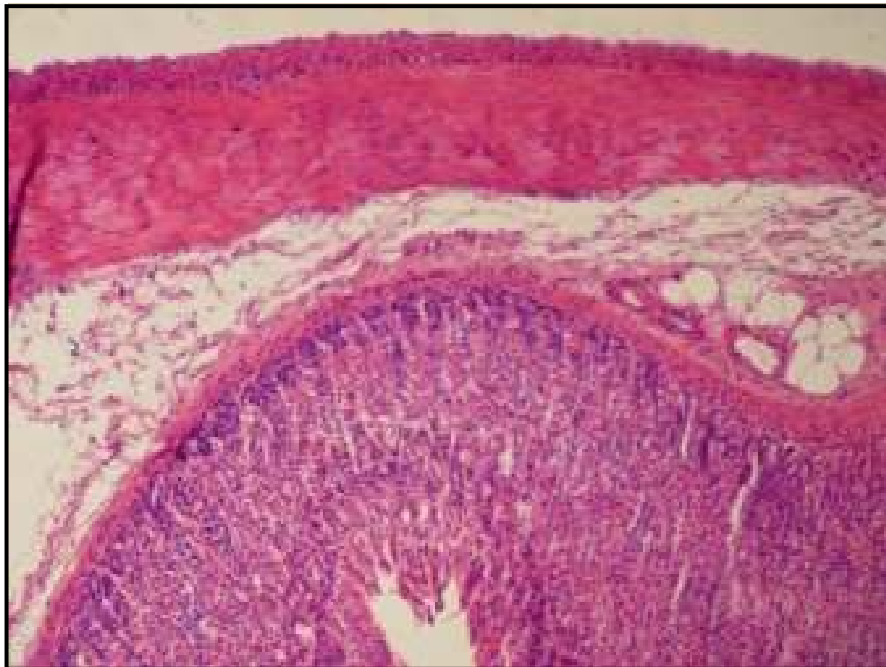
Evidenciou-se a preservação das camadas dos estômagos, bem como da junção esofagogástrica. Nos rins não foram observadas alterações relevantes nos glomérulos, sistema tubular, interstício e vasos. Os cortes histológicos dos fígados evidenciaram estrutura lobular preservada, não apresentando alterações degenerativas ou necróticas nos hepatócitos, nem se observando infiltrado inflamatório em espaço-porta ou no parênquima lobular nos grupos analisados. Nos baços, as polpas brancas e vermelhas não apresentaram alterações histológicas significativas. Nos intestinos dos grupos experimentais evidenciou-se, em cortes histológicos, um discreto infiltrado de células linfóides, comum aos grupos experimentais, na lâmina própria da mucosa.

Os resultados demonstram que a droga indometacina, na dosagem e período utilizados, não exerceu alterações prejudiciais na histologia dos órgãos analisados dos animais do grupo D. O mesmo foi observado nos demais grupos leite fermentados (LP e LC) e leite-droga (LP+D e LC+D).

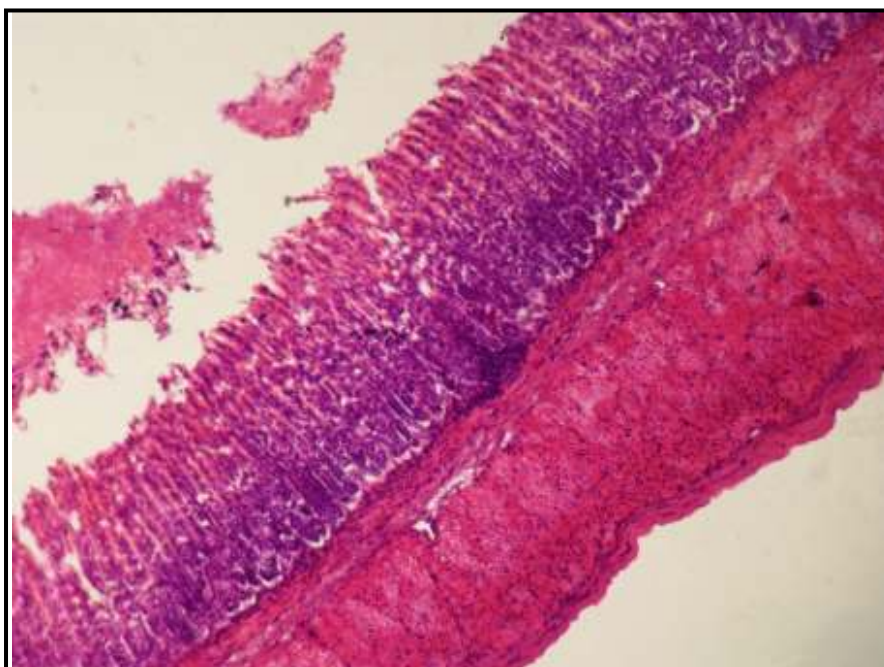
Mesquita (2008) também não evidenciou alterações histopatológicas importantes nos cortes de baço, rim, intestino e fígado de camundongos tratados por *Zymomonas mobilis* UFPEDA 3555 como microrganismo probiótico, mostrando o aspecto morfológico normal desses órgãos.

Barrenetxe et al. (2006), estudando a modulação da fisiologia gastrointestinal de ratos sadios mediante cepas probióticas, observaram que os grupos tratados com *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium bifidum* apresentaram infiltrados linfocitários em seus cólons. Associaram a presença desses infiltrados celulares a um possível efeito ativador do sistema imune intestinal exercido por ambas as cepas probióticas. Na literatura consultada, o efeito da modulação positiva do sistema imunológico da mucosa intestinal por

bactérias lácticas em ratos e camundongos é mais comumente observado em animais que foram previamente submetidos à indução de patologias como colites (DROUAULT-HOLLOWACZ ET al., 2006; SOUTHCOTT, et al., 2008) e úlceras gástricas (UCHIDA; KURAKAZU, 2006), que em animais saudáveis.

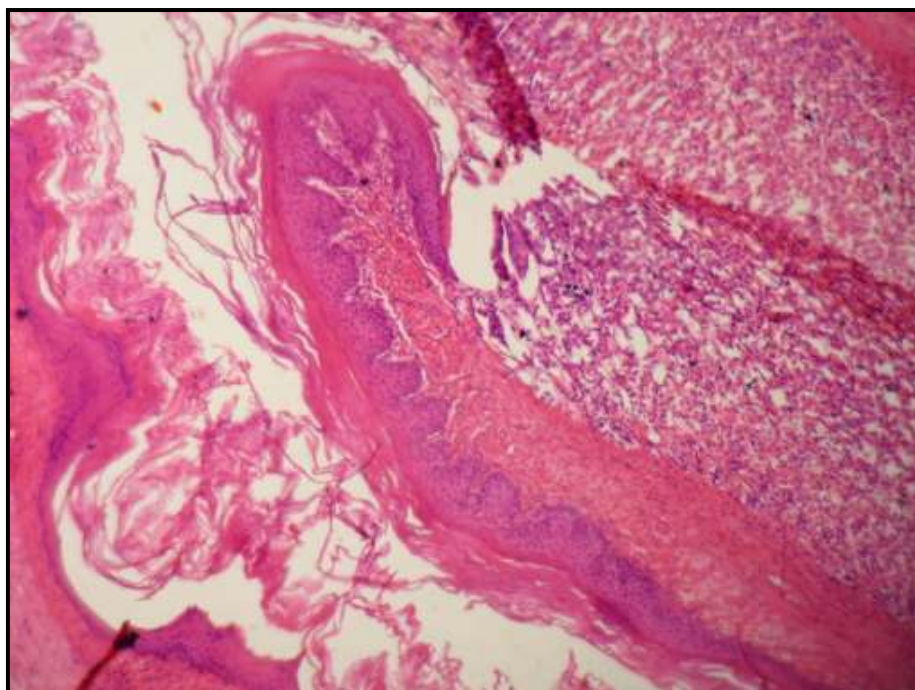


**Figura 14** Mucosa gástrica. Aumento de 10x

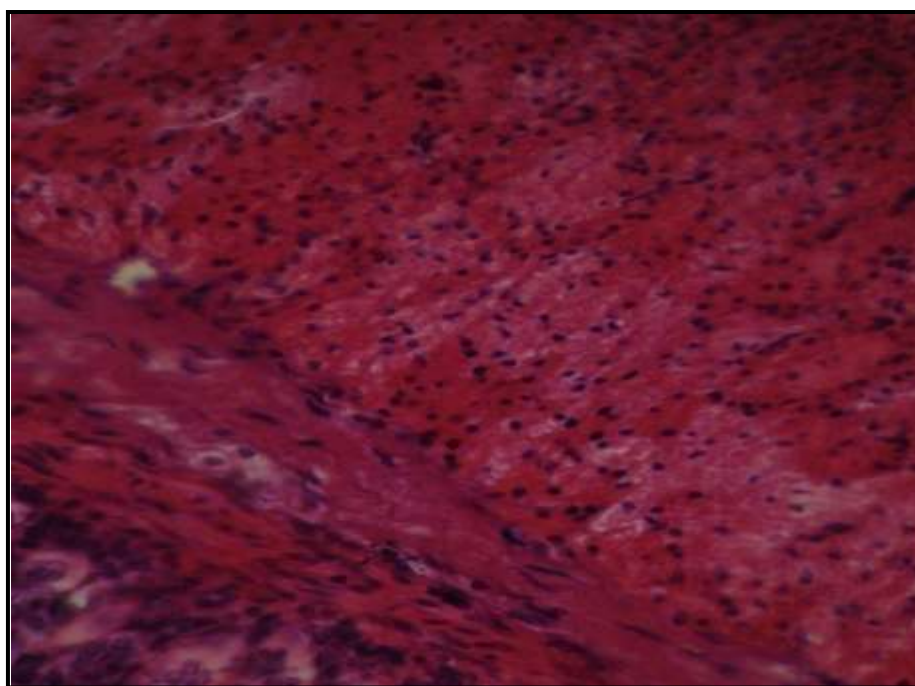


**Figura 15** Mucosa gástrica. Aumento de 10x

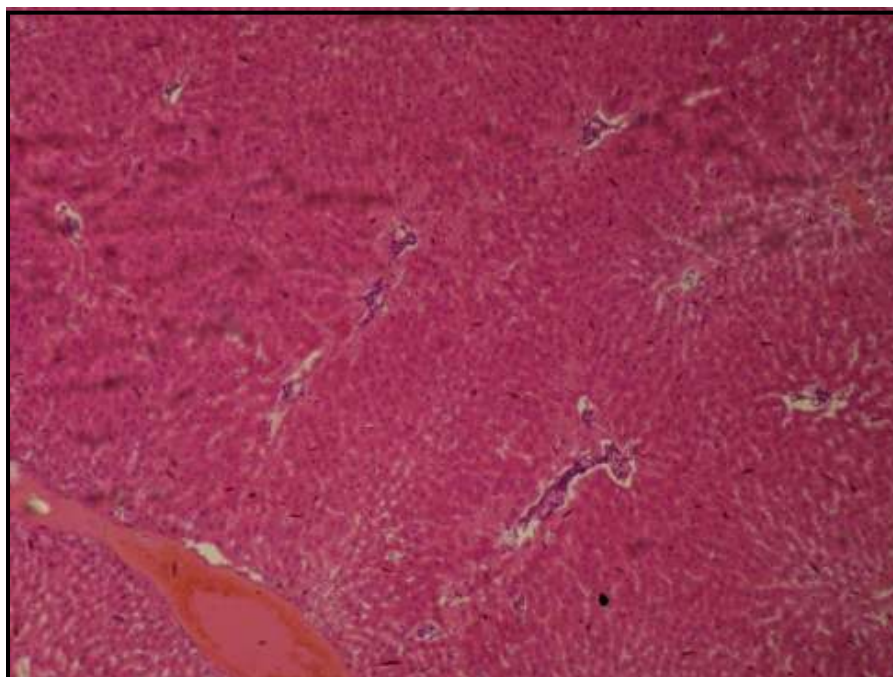
Local: Laboratório de BIODIAGNÓSTICO (UFPB) / Fonte: Cybelle Oliveira (2009).



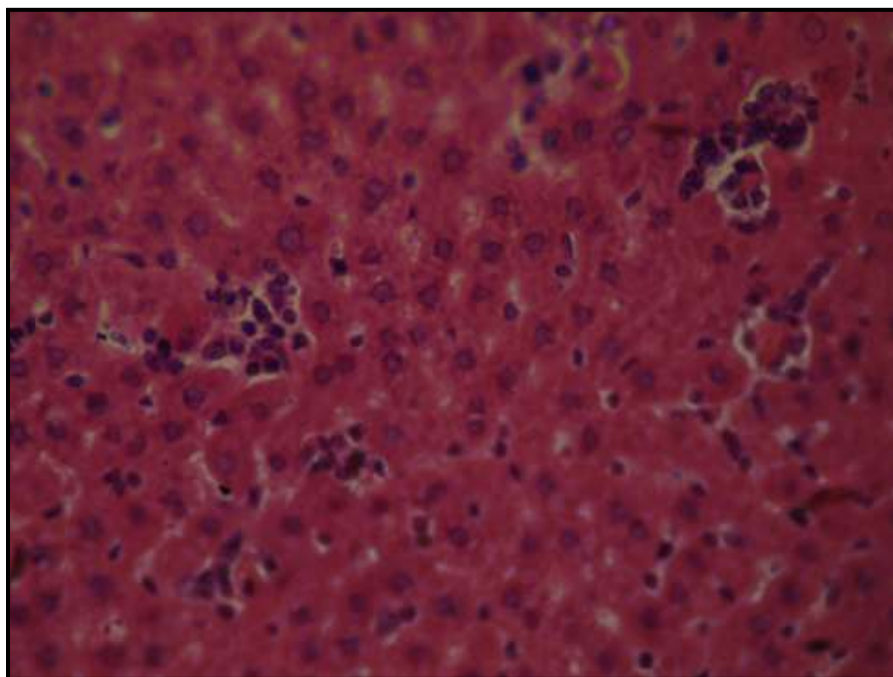
**Figura 16** Junção gastroesofágica. Aumento de 10x.



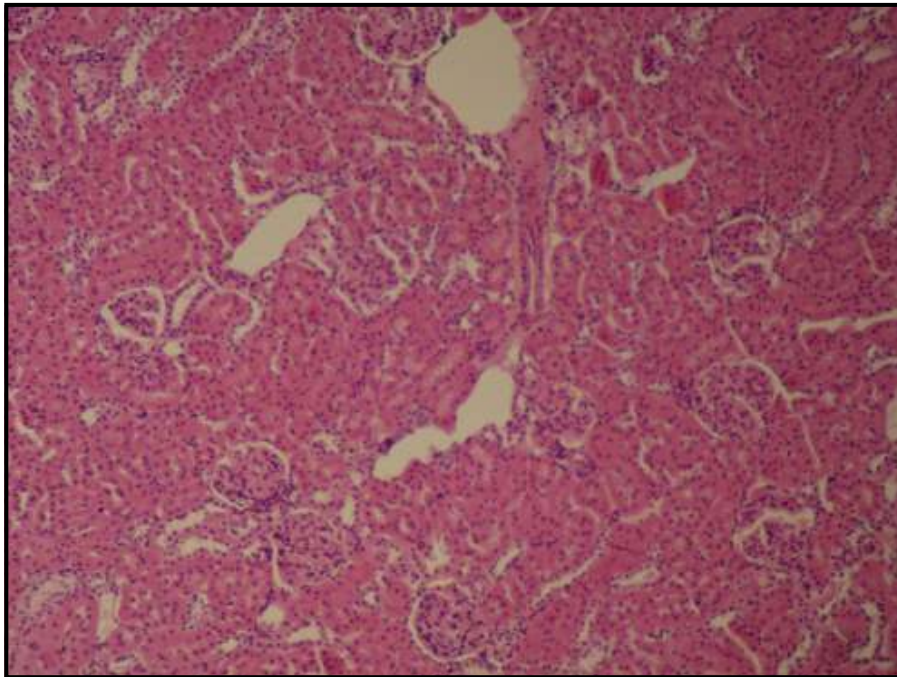
**Figura 17** Mucosa gástrica. Aumento de 40x.



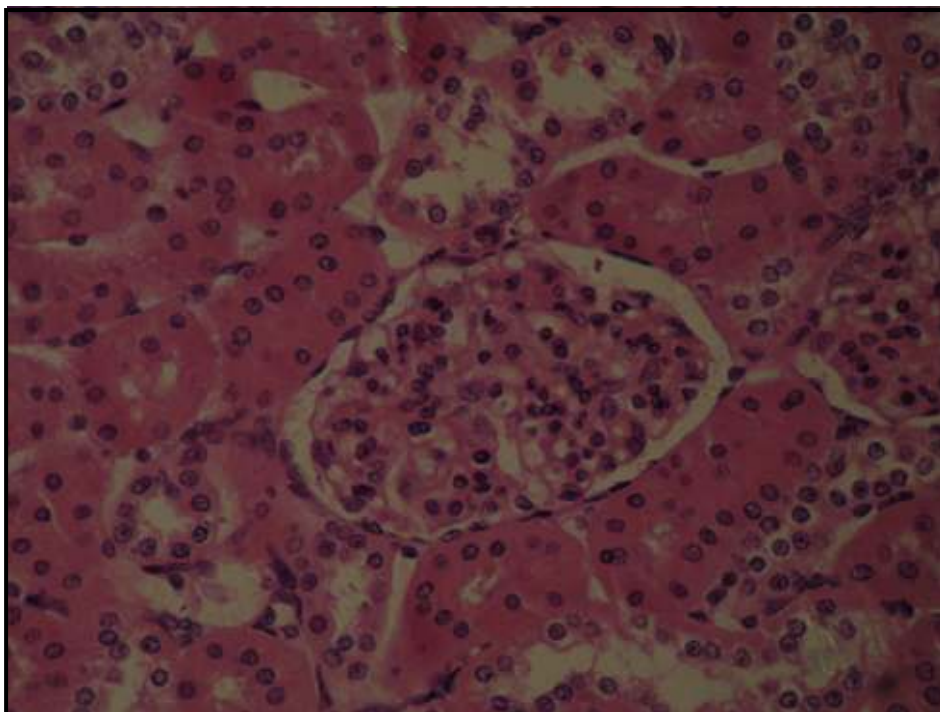
**Figura 18** Fígado. Aumento de 10X.



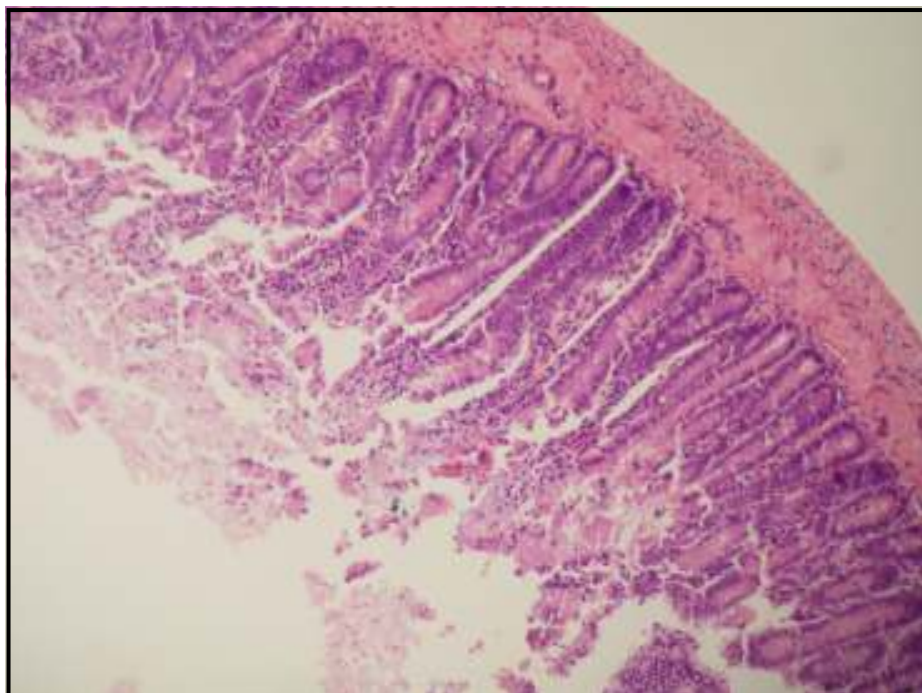
**Figura 19** Fígado. Aumento de 40x.



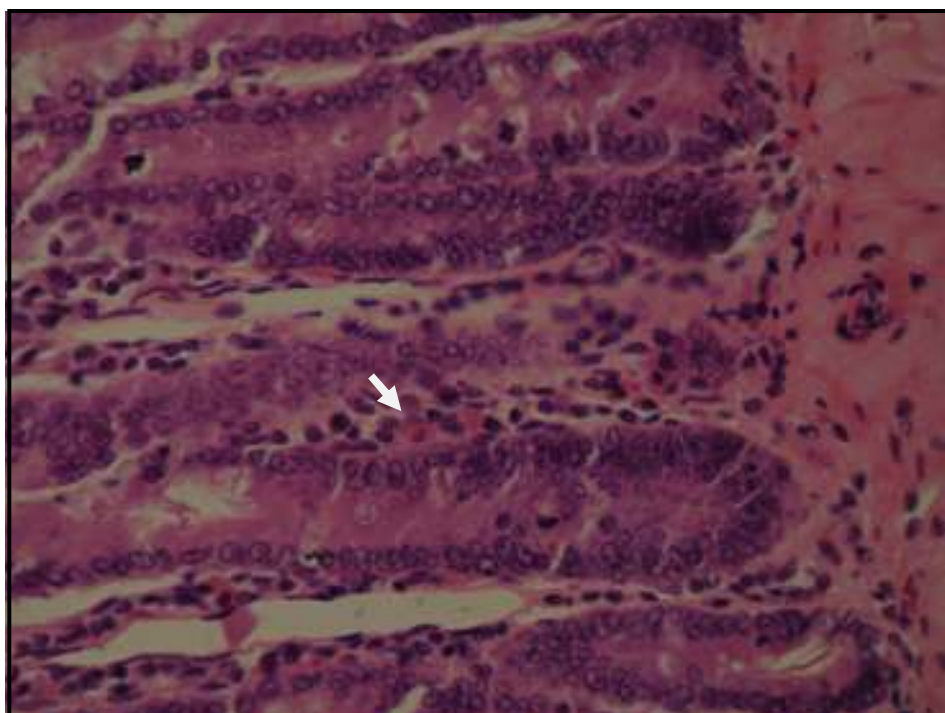
**Figura 20** Rim. Aumento de 10x.



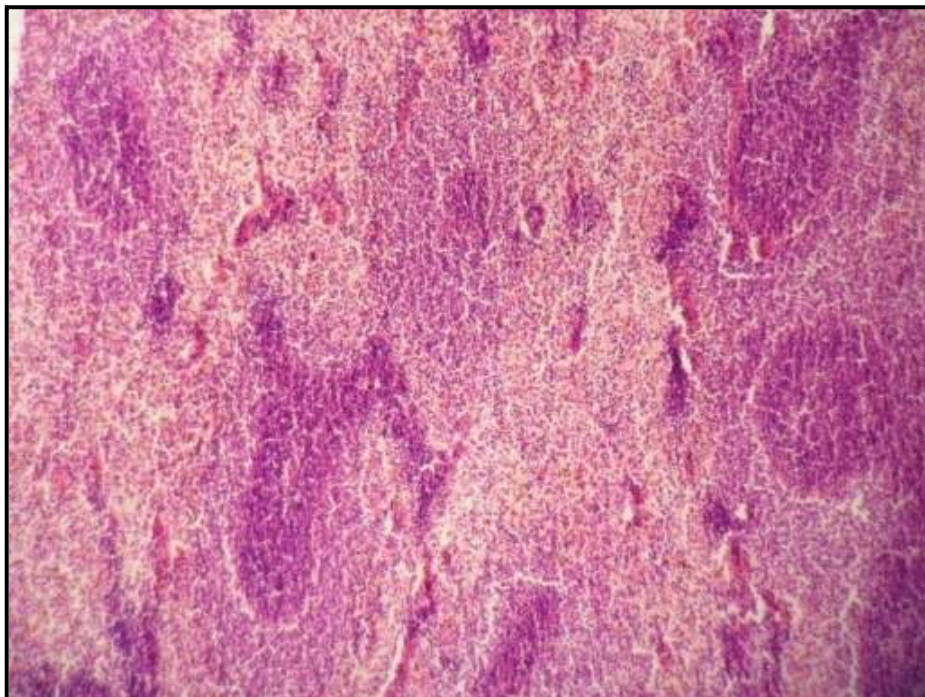
**Figura 21** Rim. Aumento de 40x.



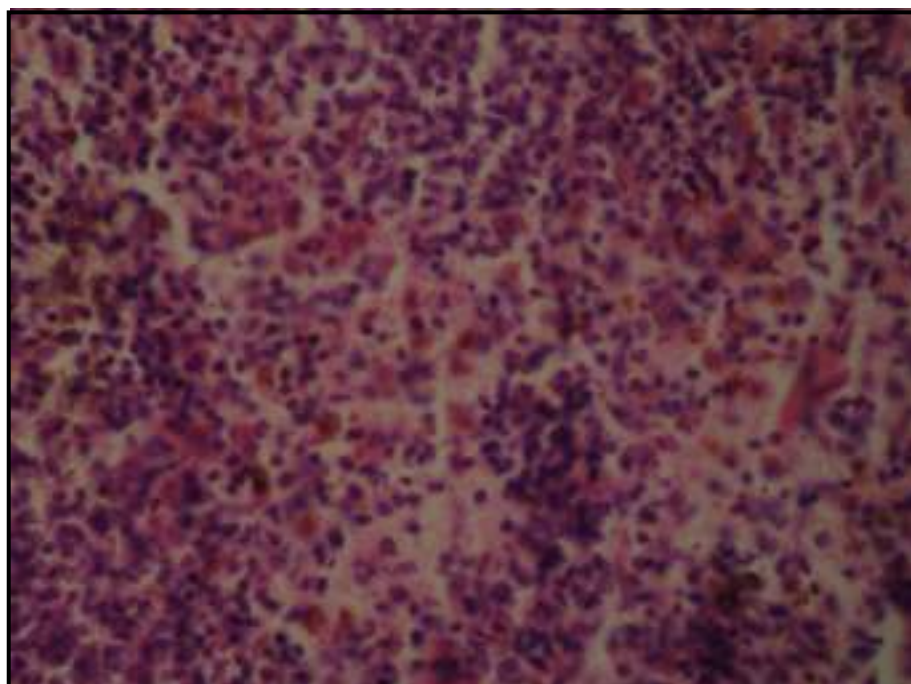
**Figura 22** Intestino. Aumento de 10x.



**Figura 23** Células linfóides do intestino. Aumento de 40x.



**Figura 24** Baço. Aumento de 10x.



**Figura 25** Baço. Aumento de 40x.

## 6. CONCLUSÃO

Comprovou-se que os leites fermentados L1 (*Lactobacillus paracasei*) e L2 (*Lactobacillus casei* Shirota) são produzidos com bactérias pertencentes ao grupo dos lactobacilos e estão dentro dos padrões de viabilidade celular exigido pela legislação vigente para o produto (BRASIL, 2004).

Na experimentação animal, a adição dos leites fermentados e da droga indometacina à dieta dos grupos experimentais (LP, LC e D) não influenciou no ganho de peso semanal dos animais em relação ao grupo controle. Já os grupos droga-leite (LP+D e LC+D) apresentaram diferença estatística significativa em relação aos grupos C e D, sugerindo haver certa interação entre a indometacina administrada e os leites fermentados. Em relação à diferença entre o peso inicial e final dos grupos experimentais, os animais que receberam leite fermentado comportaram-se de forma semelhante ao grupo controle, com exceção do grupo LP, cujo ganho de peso corpóreo demonstrou-se inferior. O grupo D também apresentou déficit de ganho de peso corpóreo em relação ao grupo controle.

Não houve alteração nos pesos dos rins. Apenas o baço do grupo LP apresentou diferença em relação aos demais grupos. O grupo D apresentou peso de fígado superior ao grupo controle; já LP e LC+D demonstraram pesos inferiores ao grupo C, porém os pesos dos fígados não diferiram entre todos àqueles que receberam leite fermentado adicionado à sua alimentação.

A adição da droga indometacina e dos leites fermentados à alimentação dos grupos experimentais não interferiu nos parâmetros sanguíneos das séries vermelha e branca dos hemogramas, nem na contagem diferencial dos leucócitos, revelando-se seguros à saúde em relação a estes parâmetros. Não foi observado efeito imunoestimulador. Na contagem de plaquetas, apesar de alguns grupos diferirem estatisticamente entre si, os resultados obtidos encontram-se dentro da faixa permitida para os animais ensaiados.

As análises histopatológicas não evidenciaram alterações na histologia dos estômagos, fígados, rins e baços, apresentando discreto infiltrado de células linfóides na lâmina própria dos intestinos dos grupos experimentais.

## REFERÊNCIAS

- ABODERIN, F.I.; OYETAYO, V.O. Haematological Studies of Rats Fed Different Doses of Probiotic, *Lactobacillus plantarum*, Isolated from Fermenting Corn Slurry. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.5, n.2, p.102-105, 2006.
- ADAM, A. C.; TEIXEIRA, M. R.; POLAINA, J. Lactose: The Milk Sugar from a Biotechnological Perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, p.553–557, 2004.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 15 ed. Washington: Editora APHA Press, 1994.
- ANTUNES, A. E. C.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; DOURADO, F.M.; RODRIGUES, L. G.; LERAYER, A. L. S. Desenvolvimento de buttermilk. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 27, n.1, p. 83-90, 2007.
- BARRENETXE, J.; ARANGUREN, P.; GRIJALBA, A.; MARTINEZ-PENUELA, J.M.; MARZO, F.; URDANETA, E. Modulación de la fisiología gastrointestinal mediante cepas probióticas de *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum*. **Anales Del Sistema Sanitario de Navarra**, v.29, n.3, p. 337-347, 2006.
- BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SIVA, E. N.; BOTELHO, L.; YIM, D. K.; ALMEIDA, C. G; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil, **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p.119-126, 2003.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1976. 305p.
- BOTELHO, L. **Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobactérias em alimentos probióticos disponíveis no mercado Brasileiro**. Campinas, 2005. 227f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.
- BRANDT, K. G.; SAMPAIO, M. M. S. C.; MIUKI, C. J. Importância da microflora intestinal. **Pediatria**. São Paulo, v.28, n.2, p.117-127, 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.71. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas**. São Paulo. Diário Oficial da União, São Paulo, 23 de setembro de 2004.

BRICKS, L. F.; SILVA, C.A.A. Toxicidade dos antiinflamatórios não-hormonais. **Pediatria**. São Paulo, v.27, n.3, p.181-193, 2005.

BUDINO, F.E.L.; THOMAZ, M.C.; KRONKA, R.N.; PIZAURO JÚNIOR, J.M.; SANTANA, A.E.; TUCCIL, F.M.; FRAGAL, A.L.; SCANDOLERAL, A.J.; HUAYNATEL, R.A.R. Influência da adição de probiótico e/ou prebiótico em dietas de leitões desmamados sobre as atividades das enzimas digestivas e parâmetros sanguíneos. **Acta Scientiarum**. Maringa, v. 26, n. 4, p. 529-536, 2004.

BUENO, J. L. O.; BUENO JÚNIOR, L. S. Estimação Temporal de Ratos com Lesão Hipocampal em Discriminação Condicional Operante. **Revista Interamericana de Psicología**, v.41, n.3, p. 329-340, 2007.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.57, n.4, p.373-380, 2007.

CAO, Y. C.; FERNÁNDEZ, A. F. Probióticos y reflexión necesaria. **Revista Cubana de Medicina General Integral**, v. 21, p.3-4, 2005.

CAPCAROVA, KOLESAROVA, A.; MASSANYI, P.; KORACIK, J. Selected blood biochemical and hematological parameters in turkeys after an experimental probiotic *Enterococcus faecium* M-74 strain administration. **International Journal of Poultry Science**, v.7, n.12, p.1194-1199, 2008.

CARLI, E. M. **Utilização de *Lactobacillus paracasei* como probiótico para o controle de *Salmonella* SPP em frangos de corte**. Santa Maria, 2006. 76f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria.

CHAGOYÁN, O. C. T.; MALDONADO, J.; GIL, A. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.24, n.3, p. 339-352, 2005.

CHARALAMBOUS, D.; FARMER, C.; O`BRIEN, P. E. Sulindac and indomethacin inhibit formation of aberrant crypt foci in the colons of dimethyl hydrazine treated rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n.1, p. 88-92, 1996.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n.4, p.1297-1303, 2004.

DOCK, D. B.; LATORRACA, M.Q.; NASCIMENTO, J. E. A.; SILVA, M. H.G.G. Probiotics Enhance Recovery From Malnutrition and Lessen Colonic Mucosal Atrophy After Short-term Fasting in Rats. **Nutrition**, v. 20, n.5, p. 473-476, 2004.

DROUAULT-HOLLOWACZ, S.; FOLIGNE, B.; DENNIN, V.; GOUDERCOURT, D.; TERPEND, K.; BURCKEL, A.; POT, B. Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tole´rance: In vitro and in vivo considerations. **Clinical Nutrition**, v.25, p.994-1003, 2006.

FACHIN, L. **Contagem de Bifidobacterium animalis Bb 12 e efeito da adição de freudenreichii PS-1 e do tratamento térmico do leite sobre o desenvolvimento do Bifidobacterium animalis Bb 12 em iogurte.** Campinas, 2005. 118f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

FERREIRA, C.L.L.F. Prebiticos e probiticos: atualizao e prospeco. Viscosa: Universidade Federal de Vicosa, p.35-54, 2003.

FRANCO, B.G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Ed. Atheneu, 2003.182p.

FRANA, F. M. **Efeito da utilizao de probiticos no desempenho, resposta imune e hematologia de girinos e imagos de r- touro (*Rana catesbeiana*).** São Paulo, 2007. 93f. Dissertao (Programa de Ps-graduao em Aqicultura e Pesca). Instituto de Pesca – APTA – SAA.

GASSULL, M. A. Review article: The intestinal lumen as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 24, n.3, p.90-95, 2006.

GENNARO, A.R. **Remington: a ciência e a prática da farmácia.** 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 2208p.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos e aplicações tecnológicas. **Boletim de Biotecnologia Alimentar**. São Paulo, v.64, p.12-22, 1999.

GUYTON, A. C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 613p.

HER, S. L.; DUAN, E.K.; SHEU, E. D. C; LIN, E. C. T. A repeated batch process for cultivation of *Bifidobacterium longum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 427–432, 2004.

ISOLAURI, E.; SUTAS, Y.; KANKAANPAA, P.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Probiotics: effects on immunity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.444-450, 2001.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia básica texto/atlas**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 523p.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A.C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. ed. 2003/2004. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

KUWABARA, Y.; NAGAI, S.; YOSHIMITSU, N.; NAKAGAWA, I.; WATANABE, Y.; TAMA, Y. Antihypertensive Effect of the Milk Fermented by Culturing with Various Lactic Acid Bacteria and a Yeast. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.80, n.3, p.294-295, 1995.

LEITE, A.Z.A.; SOPAHI, A.M.; DAMIÃO, A.O.M.C.; GARCEZ, A.T.; BUCHPIGUEL, C.A.; LOPASSO, F.P.; LORDELLO.M.L.L.; AGOSTINHO, C.L.O.LAUDANNA, A.A. Effect of a selective nonsteroidal anti-inflammatory inhibitor of cyclooxygenase-2 on the small bowel of rats. **Brazilian Journal of Medical and biological Research**, v.37, p. 333-336, 2004.

LEVY, A.S.A.; SIMON, O.; SHELLY, J.; GARDENER, M. 6-Shogaol reduced chronic inflammatory response in the knees of rats treated with complete Freund`s adjuvant. **BMC Pharmacology**, v. 6, n.12, 2006.

LORENZI, T.F.; D´AMICO, E.; DANIEL, M.M.; SILVEIRA, P.A.; BUCCHERI, V. **Manual de hematologia. Propedêutica e clínica**. 3 ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2003. 722p.

LOWER, C. E.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice – myths and realities. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.27, p.93-103, 2008.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Livraria Varela, 2005. 258p.

MATA, P. C.; ARLINDO, S.; BOEHME, K.; MIGUEL, T.; PASCOAL, A. VELAZQUEZ, J. B. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. **Food and Bioprocess Technology**, v.1, p.43–63, 2008.

MESQUITA, A.R.C. **Caracterização de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 355 como microrganismo probiótico**. Recife, 2008.77f. Dissertação de Mestrado. (Programa de Pós-graduação em Patologia). Universidade Federal de Pernambuco.

MEYDANI, S. N.; HA, W. Immunologic effects of yogurt. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p.861-872, 2000.

MOLIN, G. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p. 380-385, 2001.

MORAIS, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: Definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.109-122, 2006.

OLIVEIRA, L. T.; BATISTA, S.M.M. A atuação dos probióticos na resposta imunológica. **Revista Nutrição em Pauta**, 2002.

OLIVEIRA, R. C.; ZAMBUZZI, W. F.; ZAMBOLIN, A.; SILVA, T.L.; CESTARI, T.M.; TAGA, R.; GRANJEIRO, J.M. Marcadores bioquímicos e microscópicos como ferramentas investigativas da resposta tecidual envolvidas com a associação de osso cortical bovino/colágeno em subcutâneo de ratos. **Innovations Implant Journal**, v.3, n.6, p.17-22, 2008.

ORDÓÑEZ, J. A. O. RODRIGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, v. 2, 2005. 279p.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904p.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria.2005. Disponível em: <http://www.Rproject.org>. Acesso em: 16 de abril 2009.

RIBEIRO, A. Q.; SEVALHO, G.; CÉSAR, C. C. Prevalência e fatores associados ao uso de antiinflamatórios não esteróides por pacientes submetidos à endoscopia digestiva alta. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. Belo Horizonte, v. 8, n. 3, p. 306-315, 2005.

RODAS, M. A. B.; RODRIGUES, R. M. M. S.; SAKUMA, H.; TAVARES, L.Z.; SGARBI, C. R.; LOPES, W. C. C. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.21, n.3, p.304-309, 2001.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v.42, n.1, p. 1-16, 2006.

SANTOS, M. S.; FERREIRA, S. L. L. F.; GOMES, P. C.; SANTOS, J. L.; POZZA, P. C.; TESHIMA, E. Influência de Lactobacillus sp. sobre a microbiota intestinal de leitões. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.27, n.6, p.1395-1400, 2003.

SEPPO, L.; JAUHAINEM, T.; POUSSA, T.; KORPELA, R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p. 326–330, 2003.

SILVA, A. A. **Avaliação Clínica de Rattus norvegicus após terapia antiinflamatória com inibidor seletivo ou não para COX-2 por extrapolação alométrica**. Santa Maria, 2004. 93f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria.

SILVA, J. A. **Tópicos de Tecnologia de Alimentos**. 1 ed. São Paulo: Varela Editora e Livraria, 2000. 232p.

SOUTHCOTT, E.; TOOLEY, K.L.; HOWARD, G.S.; DAVIDSON, G.P.; BUTLER, R.N. Yoghurts Containing Probiotics Reduce Disruption of the Small Intestinal Barrier in Methotrexate-Treated Rats. **Digestive Diseases Sciences**, v.53, p.1837-1841, 2008.

SWEETMAN, S. C. **Martindale: Guia Completa de Consulta Fármaco-Terapêutica**. 2 ed. Barcelona: Pharma Editores, 2006.

TEBALDI, V. M. R.; RESENDE, J.G. O. S.; RAMALHO, G. C. A.; OLIVEIRA, T. L. C.; ABREU, L. R.; PICCOLI, R. H. Avaliação microbiológica de bebidas lácteas fermentadas adquiridas no comércio varejista do sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.31, n.4, p.1085-1088, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.

UCHIDA, M.; KURAKAZU, K. Yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL2716 exerts gastroprotective action against acute gastric lesion and antral ulcer in rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.96, p.84-90, 2004.

URDANETA, E.; BARRENETXE, J.; ARANGUREN, P.; IRIGOYEN, A.; MARZO, F.; IBÁÑEZ, F. C. Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. **Nutrition Research**, v.27, p.653-658, 2007.

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

ZHAO, R.; SUN, J.; TORLEY, P.; WANG, D.; NIU, S. Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.8, p.1349-1354, 2008.