



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DOUGLAS XAVIER DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE INDIVÍDUOS COM SÍNDROME  
METABÓLICA, ANTES E APÓS INGESTÃO DE LEITE  
FERMENTADO COM *LACTOBACILLUS PLANTARUM*-LP**

**115**

DOUGLAS XAVIER DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE INDIVÍDUOS COM SÍNDROME  
METABÓLICA, ANTES E APÓS INGESTÃO DE LEITE  
FERMENTADO COM *LACTOBACILLUS PLANTARUM*-LP**

**115**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lúcia Helena da Silva Miglioranza

Londrina  
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S237a Santos, Douglas Xavier dos  
Avaliação de indivíduos com síndrome metabólica, antes e após ingestão de leite fermentado com *Lactobacillus plantarum*-Lp 115/  
Douglas Xavier dos Santos – Londrina, 2012.  
104 f.: il.

Orientadora: Profª Drª Lúcia Helena da Silva Miglioranza.  
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2012.

1. *Lactobacillus plantarum* – Teses. 2. Síndrome metabólica – Teses. 3. Leite fermentado – Teses. 4. Bactérias produtoras de ácido láctico – Teses. 5. Bactérias produtoras de ácido láctico – Teses. 6. Alimentos fermentados – Teses. I. Miglioranza, Lúcia Helena da Silva. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 664: 637.1

DOUGLAS XAVIER DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE INDIVÍDUOS COM SÍNDROME METABÓLICA,  
ANTES E APÓS INGESTÃO DE LEITE FERMENTADO COM  
*LACTOBACILLUS PLANTARUM*-LP 115**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Sandra Garcia  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dra. Giselle Aparecida Nobre Costa  
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

---

Dra. Lúcia Helena da Silva Miglioranza  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 29 de março de 2012.

## **DEDICO**

À Deus pela oportunidade de realizar os meus sonhos com saúde, liberdade e paz de espírito, graças à vida que me foi concedida.

À minha mãe Nádia, tia Marilange (*in memoriam*) e à Tia Gecilene pelo amor, apoio, e paciência. À minha namorada, Letícia, pelo amor e paciência durante este período.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me conceder a oportunidade de viver com saúde, paz e liberdade e com o caminho sempre iluminado e protegido com a sua eterna bondade mesmo durante os momentos críticos.

À minha mãe Nádia pelo amor, apoio, compreensão, passando tranquilidade nos momentos que mais necessitava de paciência para a conclusão da fase experimental. Agradeço muito por investir em meus sonhos e sempre acreditando em minha superação nos momentos mais difíceis.

À minha família de São Paulo pelos momentos de descontração, pela forma calorosa que sempre me recebem, me proporcionando muita felicidade e saudade na despedida.

À minha namorada Letícia pelo amor e paciência, mesmo com a distância geográfica que nos separou, sempre me apoiando incondicionalmente, me ajudou nos momentos em que mais necessitei de ajuda.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Lúcia Helena da Silva Miglioranza pela amizade, apoio, orientação, dedicação, fornecendo seus conhecimentos científicos, valiosos para o crescimento científico-profissional.

Aos Professores doutores Isaias Dichi e Andréa Simão e ao doutorando Marcell Lozovoy do Hospital Universitário (HU) que foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

À minha amiga e estagiária Cristiane Menillo pela força, companheirismo e apoio.

Aos funcionários e docentes da Universidade Estadual de Londrina (UEL) que participaram da pesquisa, agradeço muito pela cooperação, receptividade e amizade.

Aos funcionários da Divisão de Assistência à Saúde da Comunidade (DASC) e a Enf.<sup>ª</sup> Helena do Serviço Especializado em Engenharia de Segurança e em Medicina do Trabalho (SESMT) pelo apoio que foram fundamentais para realização deste trabalho.

À minha amiga Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Giselle Nobre pelas dicas que me ajudaram muito no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Sr. Lorival, funcionário da segurança da universidade, pela atenção e indicação de possíveis voluntários para a realização da fase experimental desta pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA), em especial à Sandra Rezende e a Neusa Cassula pela atenção e educação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marta de Toledo Benassi pela atenção, apoio e incentivo durante o todo o período da pós-graduação.

Aos companheiros de laboratório, Rafael Mizubuti, Elisa Laurenti e Angélica Ishikawa que desprenderam seus preciosos tempo ao me ajudarem e pela amizade.

À minha amiga Tatiana Pimentel pelas dicas e conselhos no início das aulas da pós-graduação.

Aos meus amigos do programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, em especial a minha turma do mestrado e do doutorado de 2010 que me proporcionaram momentos de muita descontração.

Aos professores e amigos da Faculdade de Tecnologia do Estado de São Paulo/campus de Marília (FATEC/Marília), onde me formei, pelo quais tenho muito carinho. Gostaria de dizer um “obrigado” muito especial ao Professor doutor Paulo Jorge, ao Professor especialista Gustavo Lana e as Professoras doutoras Renata Pardo e Alda Ortoboni pela atenção e incentivo na pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Luiz Francisco Prata da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/FCAV), Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alice Tanaka da FATEC/Marília, e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rogéria Duarte do Colégio Esquema Único por serem minha grande referência profissional.

Ao CNPq pela colaboração deste trabalho (pelo apoio financeiro).

Às Professoras doutoras Sandra Garcia e Suely Obara pelo apoio e sugestões que enriqueceram este trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva pela oportunidade concedida na UNESP/IBILCE no período em que estive estudando como aluno especial em 2009.

À minha amiga Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ellen Lago da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela amizade e paciência.

Aos professores da Escola Senai “José Polizotto”, onde me formei como mecânico automotivo, pelo quais tenho muito carinho e onde está trajetória iniciou quando tinha 15 anos de idade.

Aos professores da Escola Estadual Antonio Reginato onde estudei o meu ensino médio, em especial as Professoras Lúcia Jerep e Rosana Amorim, pelo quais tenho muito carinho.

Aos professores e amigos do Colégio Criativo pela oportunidade, amizade e apoio.

À Ednéia Silva Santos Rocha pela orientação na adequação das normas e pela ficha catalográfica.

À minha amiga Lílian Muzzi Sant’Ana pelo incentivo, apoio e ajuda na semana do período de seleção até o dia da defesa.

A todos que participaram da trajetória meus sinceros agradecimentos.

SANTOS, Douglas Xavier dos. **Avaliação de indivíduos com síndrome metabólica, antes e após ingestão de leite fermentado com *Lactobacillus plantarum*-Lp 115**. 2012. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina. 2012.

## RESUMO

O *Lactobacillus plantarum* ainda não é considerado um micro-organismo probiótico pela legislação brasileira, e tampouco é encontrado comumente em produtos lácteos fermentados. Entretanto, na Europa e nos Estados Unidos essa alegação é consolidada e muitos trabalhos confirmam os benefícios promovidos por este micro-organismo. Atualmente o interesse tem sido focado sobre o impacto dessas bactérias ácido-lácticas sobre o metabolismo dos parâmetros clínicos relacionados com a síndrome metabólica. O objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de crescimento de *L. plantarum* -Lp 115 na produção de um leite fermentado e distribuí-lo para 37 pacientes voluntários com síndrome metabólica durante um período de 06 semanas de ingestão. Os metabólitos de interesse foram avaliados através de exames sanguíneos. O leite fermentado foi preparado com adição de inóculo (10% p/v), leite em pó desnatado reconstituído (10% p/v), açúcar refinado (8% p/v), esterilizado (121°C/15 minutos), incubado a 37°C por 40 horas. Os sujeitos foram divididos em grupo de suplementação (leite fermentado) e placebo (leite esterilizado). Foram realizadas aferições da pressão arterial e dos parâmetros antropométricos, além da coleta de amostras sanguíneas antes e após o período de intervenção com a bebida fermentada para medida dos marcadores bioquímicos e inflamatórios. Os resultados foram submetidos aos testes Qui-quadrado, Mann-Whitney e Wilcoxon ( $p < 0,05$ ). Observou-se que os níveis de ácido úrico, glicemia, homocisteína, colesterol-HDL, leucócitos, triacilglicerídeos, proteína c-reativa, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, além dos parâmetros antropométricos e pressão arterial não apresentaram diferença significativa. Por outro lado, a administração de leite fermentado influenciou significativamente a elevação do número de hemoglobina ( $p < 0,01$ ) e colesterol total. Entretanto, o leite esterilizado distribuído para o grupo placebo apresentou diferença significativa nas concentrações de colesterol total ( $p < 0,01$ ), colesterol-LDL ( $p < 0,01$ ), colesterol-HDL e insulina. Portanto, conclui-se que, a elevação dos níveis de hemoglobina foi o único efeito benéfico promovido pela porção diária de  $3,2 \times 10^{10}$  UFC/mL de *L. plantarum* -Lp 115 no período administrado. O período de 06 semanas de intervenção não foi suficiente para que o leite fermentado promovesse efeitos estatisticamente significativos sobre os outros parâmetros avaliados.

**Palavras-chaves:** Ácido úrico. Glicemia. Homocisteína. Colesterol-HDL. Leucócitos. Triacilglicerídeos. Proteína c-reativa. Aspartato aminotransferase. Alanina aminotransferase.

SANTOS, Douglas Xavier dos Santos. **Evaluation of patients with metabolic syndrome before and after ingestion of fermented milk with *Lactobacillus plantarum*-Lp 115**. 2012. 104 p. Dissertation (M.Sc Food Science)-University of Londrina. 2012.

## ABSTRACT

*Lactobacillus plantarum* is still not considered a probiotic micro-organism by Brazilian legislation, and it is not commonly found in fermented dairy products. However, in Europe and in the United States that claim is established and many studies confirm the benefits promoted by this species. Currently, interest has been focused on the impact of these lactic acid bacteria about the metabolism and influence in clinical parameters related to metabolic syndrome. The objective of this study was to evaluate the conditions for growth of *L. plantarum* – Lp 115 in the production of a fermented milk drink and distribute it to 37 volunteer patients with metabolic syndrome during a period of 06 weeks intake. The metabolites of interest were evaluated through blood tests. The fermented milk was prepared with addition of inoculum (10%w/v), reconstituted nonfat dry milk (10%w/v), refined sugar (8%w/v), sterilized (121°C/15 minutes), incubated at 37°C by 40 hours. The subjects were divided in groups of supplementation (fermented milk) and placebo (sterilized milk). Were performed measurements of blood pressure and anthropometric parameters, in addition to the collection of blood samples before and after the intervention period with the fermented beverage for measurement of biochemical inflammatory markers. The results were analyzed by Chi-square, Mann-Whitney and Wilcoxon ( $p < 0.05$ ). It was observed that the levels of uric acid, glycemia, homocysteine, HDL-cholesterol, leukocytes, triacylglycerides, C-reactive protein, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase, beyond anthropometric and blood pressure parameters showed no significant difference. On the other hand, administration of fermented milk significantly influenced the elevation the number of hemoglobin ( $p < 0.01$ ) and total cholesterol. However, sterilized milk distributed to the placebo group showed a significant difference in the concentrations of total cholesterol ( $p < 0.01$ ), LDL-cholesterol ( $p < 0.01$ ), HDL-cholesterol and insulin. Therefore, we conclude that, the increase of hemoglobin levels was the only effect beneficial promoted by the daily portion of  $3,2 \times 10^{10}$  UFC/mL of *L. plantarum* -Lp 115 administered in the period. The period of 06 weeks of intervention was not sufficient that fermented milk promote effects statistically significant on other parameters evaluated.

**KEYWORDS:** Uric acid. Glycemia. Homocysteine. HDL-cholesterol. Leukocytes. Triacylglycerides. C-reactive protein. Aspartate aminotransferase. Alanine aminotransferase.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Fluxograma da produção dos inóculos empregados na formulação do leite fermentado.....	35
<b>Figura 2</b> – Fluxograma da produção do leite esterilizado distribuído para o grupo placebo.....	35
<b>Figura 3</b> – Fluxograma da produção do leite fermentado distribuído para o grupo de suplementação.....	36
<b>Figura 4</b> – Fluxograma de envase e estocagem do leite fermentado e esterilizado .....	37
<b>Figura 5</b> – Crescimento do <i>L. plantarum</i> -Lp 115 durante a fase exponencial da produção do inóculo .....	42
<b>Figura 6</b> – Crescimento de <i>L. plantarum</i> -Lp 115 em LDR 10% a 37°C .....	45
<b>Figura 7</b> – Curva de desenvolvimento do <i>L. plantarum</i> -Lp 115 durante a produção do leite Fermentado.....	46
<b>Figura 8</b> – Síntese de ácido láctico e variação do pH resultante da fermentação do inóculo.....	47
<b>Figura 9</b> – Síntese de ácido láctico e variação do pH resultante da fermentação do leite fermentado.....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Equações da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e tempo de geração (tg) de <i>L. plantarum</i> -Lp 115 no inoculo.....	44
<b>Tabela 2</b> – Modelagem da curva de crescimento e os coeficientes de determinações do <i>L. plantarum</i> -Lp 115 no inóculo e leite fermentado .....	45
<b>Tabela 3</b> – Modelagem do pH, porcentagem de ácido láctico e os coeficiente de determinações do <i>L. plantarum</i> -Lp 115 no inoculo.....	48
<b>Tabela 4</b> – Modelagem do pH, porcentagem de ácido láctico e os coeficiente de determinações do <i>L. plantarum</i> -Lp 115 no leite fermentado .....	49
<b>Tabela 5</b> – Avaliação dos parâmetros clínicos e dos marcadores de lesão hepática em pacientes com Síndrome Metabólica submetidos ou não ao tratamento com <i>L. plantarum</i> Lp-115.....	50
<b>Tabela 6</b> – Avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e inflamatório em pacientes com Síndrome Metabólica submetidos ou não ao tratamento com <i>L. plantarum</i> Lp-115.....	51
<b>Tabela 7</b> – Avaliação do perfil lipídico em pacientes com Síndrome Metabólica submetidos ou não ao tratamento com <i>L. plantarum</i> -Lp 115 .....	56

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	16
2.1	Conceito de probióticos .....	16
2.2	Crterios de seleção de probióticos.....	17
2.3	<i>Lactobacillus</i> .....	17
2.4	Aplicações e viabilidade de probióticos em produtos lácteos .....	18
2.5	Efeitos dos probióticos na saúde e seus mecanismos de ação.....	20
2.5.1	Atividade antimicrobiana e controle de infecções intestinais .....	21
2.5.2	Prevenção de doença inflamatória intestinal .....	22
2.5.3	Prevenção e redução dos sintomas de diarreia.....	23
2.5.4	Efeito hipocolesterolêmico.....	24
2.6	Síndrome metabólica.....	25
2.6.1	Hiperglicemia.....	27
2.6.2	Circunferência abdominal .....	28
2.6.3	Pressão arterial .....	28
2.6.4	Colesterol-HDL .....	30
2.6.5	Hipertrigliceridemia.....	31
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	32
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS GERAIS</b> .....	33
4.1	Objetivos específicos.....	33
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	34
5.1	Material e métodos .....	34
5.1.1	Ativação da cultura de <i>L. plantarum</i> e produção dos inóculos.....	34
5.1.1.1	Cinética de crescimento .....	34
5.1.2	Produção das Bebidas lácteas .....	35
5.1.2.1	Produção do leite esterilizado para o Grupo Placebo.....	35
5.1.2.2	Produção do leite fermentado para o Grupo de Suplementação.....	36
5.1.3	Envase e armazenamento.....	36

5.1.4	Análises microbiológicas e físico-químicas.....	37
5.1.5	Distribuição das bebidas aos voluntários da pesquisa .....	38
5.2	Sujeitos e métodos .....	38
5.2.1	Seleção dos sujeitos da pesquisa .....	38
5.2.2	Delineamento experimental .....	40
5.2.3	Medidas antropométricas e de pressão arterial.....	40
5.2.4	Análises laboratoriais .....	41
5.3	Análise estatística.....	41
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
6.1	Monitoramento da produção da produção de leite fermentado .....	43
6.1.1	Tempo de geração do <i>L. plantarum</i> -Lp 115 no inoculo .....	43
6.1.2	Avaliação do crescimento do <i>L. plantarum</i> no inóculo e no leite fermentado .....	44
6.1.2.1	Crescimento do <i>L. plantarum</i> no inoculo .....	44
6.1.2.2	Crescimento do <i>L. plantarum</i> no leite fermentado .....	45
6.1.3	Síntese de ácido lático e variação do pH .....	47
6.2	Avaliação dos efeitos da ingestão de <i>L. plantarum</i> sobre as análises laboratoriais .....	49
6.2.1	Ácido úrico.....	49
6.2.2	Homocisteína.....	50
6.2.3	Proteína carbono-reativa .....	52
6.2.4	Glicemia.....	53
6.2.5	Insulina .....	54
6.2.6	Triacilglicerídeos, Colesterol –LDL, Colesterol-HDL e Colesterol Total.....	55
6.2.7	Hemoglobina .....	63
6.2.8	Leucócito .....	67
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>

<b>ANEXOS</b> .....	100
Anexo I.....	101
Anexo II.....	102
Anexo III.....	103
Anexo IV.....	104

## 1. INTRODUÇÃO

O fato de camponeses búlgaros em 1900 terem sua expectativa de vida prolongada foi considerado consequência do grande consumo de leite fermentado, incentivando a pesquisa de produtos com probióticos, uma classe importante de alimentos com micro-organismos benéficos. Os probióticos mais comumente estudados e utilizados como suplemento em alimentos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

Para a escolha de probióticos para a fabricação de um produto alimentício são necessários rigorosos critérios de seleção do micro-organismo e este não deve apresentar patogenicidade, deve ser Gram-positivo, produtor de ácido, ácido resistente, promoverem a exclusão competitiva, resistir à bile e ser viável/estável. As bactérias probióticas devem sobreviver a todas as condições estressantes durante o processo de digestão e chegarem vivas ao intestino delgado ou cólon, formando um complexo sistema ecológico que promoverá bem-estar e saúde ao hospedeiro.

Estudos apontam que esses micro-organismos utilizam metabólitos antimicrobianos como ácido láctico, acético e propiônico, sintetizados após a fermentação dos substratos, para interferirem no desenvolvimento dos micro-organismos putrefativos no trato gastrintestinal.

As culturas probióticas com boas propriedades tecnológicas devem apresentar boa multiplicação no alimento, promoverem propriedades sensoriais adequadas no produto e serem estáveis e viáveis durante armazenamento. Desta forma, podem ser manipuladas e incorporadas em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em produtos com textura e aroma adequados.

Dentre os micro-organismos probióticos, destacam-se as bactérias ácido-láticas do gênero *Lactobacillus*, que se caracterizam por serem Gram-positivas, não formadoras de esporos, anaeróbicas ou aeróbicas facultativas, cocos ou bastonetes, produtoras de ácido láctico como produto resultante da fermentação de carboidratos.

Alguns experimentos conduzidos com animais de laboratório têm demonstrado existir impacto dessas bactérias ácido-láticas sobre o metabolismo de

colesterol e sua posterior influência sobre os níveis de colesterol plasmático. Altos níveis desse colesterol são apontados como um dos fatores responsáveis pela formação de ateroma e associados à ocorrência de doenças coronárias. Pesquisas confirmam que os *Lactobacillus* possuem grande potencial hipocolesterolêmico em camundongos e suínos, após a suplementação com leite fermentado.

Os *L. plantarum* são bactérias presentes em alimentos fermentados como missô e em vários queijos. Algumas cepas desse micro-organismo apresentaram potencial em reduzir o colesterol *in vitro*, e pesquisas recentes apontam que estes são responsáveis pelo efeito hipocolesterolêmico e hepatoprotetor em ratos. Outros estudos relatam que a suplementação com células mortas de *L. plantarum* aumentou ligeiramente os níveis de colesterol HDL e não modificou os níveis dos outros lipídeos.

Assim, tornou-se relevante a realização de uma pesquisa sobre os possíveis efeitos benéficos da cultura probiótica de *L. plantarum*-Lp 115. O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios do DCTA (Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos) e do DPACT (Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), PR, e objetivou avaliar a influência do consumo de leite fermentado contendo *L. plantarum* – Lp 115 sobre a saúde de 37 pacientes voluntários, diagnosticados com síndrome metabólica (SM), divididos em dois grupos, suplementação e placebo, durante um período de 06 semanas de ingestão, através de exames sanguíneos. Os exames ocorreram antes e após o período de intervenção por meio da avaliação da pressão arterial, parâmetros antropométricos, marcadores bioquímicos e inflamatórios.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Conceito de probióticos

No início do século XX, o bacteriologista russo Ilya Metchnikoff, observou que os camponeses búlgaros tinham uma vida média de 87 anos. Diante deste fato, ele investigou os efeitos benéficos das bactérias lácticas presentes no leite fermentado e atribuiu esta longevidade ao uso habitual de leite fermentado na dieta (HUGHES; HOOVER, 1995; LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001).

Diante das observações realizadas por Metchnikoff, outros estudiosos sugeriram mais pesquisas sobre os benefícios das bactérias lácticas e assim foi demonstrada a influencia positiva de algumas espécies de lactobacilos sobre o trato gastrintestinal. Hoje, estes micro-organismos são classificados como probiótico (VASILJEVIC; SHAH, 2008). A palavra *probiótico* é um termo derivado da língua grega que significa “para a vida” (FULLER, 1992). Considerando essa idéia, a Organização Mundial da Saúde define os probióticos como micro-organismos vivos que, administrados em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Diante disso, inúmeros artigos científicos ressaltam sua importância na ciência e tecnologia de alimentos, devido a suas características funcionais, como Oliveira et al. (2002); Komatsu, Buriti e Saad, (2008); Coolbear et al. (2008).

A maior parte das pesquisas aponta que esses micro-organismos colonizam o trato gastrintestinal pela adesão nas células epiteliais da parede intestinal em quantidade suficiente para realizarem a colonização, após sobreviverem às condições estressantes derivadas dos sais biliares e enzimas específicas excretadas pelo processo digestivo (ARAGON-ALEGRO et al., 2007; SALMINEN; WHIGHT; OUWEHAND, 2004).

Dentre as funções atribuídas às bactérias ácido-lácticas pode-se citar: (i) acidificação do meio pela produção de ácido láctico, dando início a atividade antimicrobiana e preservação do produto; (ii) modificação das propriedades sensoriais pela produção de compostos voláteis e polissacarídeos extracelulares; (iii) liberação de aminoácidos e vitaminas, que elevam o valor nutricional do produto; (iv)

promovem redução dos níveis de colesterol sérico e propriedades profiláticas ao câncer (PARVEZ et al., 2006).

## **2.2 Critérios de seleção de probióticos**

Estudos apontam que os principais parâmetros influenciados pelos probióticos nos alimentos são o melhoramento ou manutenção das propriedades tecnológicas nos produtos, sem a perda da viabilidade e funcionalidade dos micro-organismos implementados (SAARELA et al., 2000).

As características destes micro-organismos devem diferenciá-los dos demais, tornando-os assim os únicos que executam funções específicas após a ingestão. Diante destes fatores, as principais características dos probióticos são: i) resistência às condições desfavoráveis durante e após sua colonização nas células epiteliais intestinais; ii) estimulação direta ou indireta do sistema imunológico iii) metabolismo do colesterol e lactose; iv) elevação da absorção de cálcio; v) síntese de vitaminas; vi) não devem apresentar patogenicidade; vii) produção de ácido orgânicos de cadeia curta; (viii) especificidade ao hospedeiro; ix) promover exclusão competitiva na microbiota intestinal; x) aderência e colonização da mucosa intestinal e xi) ser viável/estável (FULLER, 1992; BRIZUELA et al., 2001; PARVEZ et al., 2006).

Além disso, o desempenho tecnológico esperado para elaboração de produtos alimentícios com qualidade é um fator importante para a seleção e administração das culturas probióticas. As propriedades sensoriais apresentadas pelo produto são influenciadas diretamente pelo seu desenvolvimento e estabilidade durante o seu armazenamento. Desta forma, a aplicação dos probióticos, pode resultar em alimentos com boa textura e aroma, sem perder a viabilidade e a funcionalidade (OLIVEIRA et al., 2002).

## **2.3 *Lactobacillus***

No início do século passado, Ernst Moro isolou pela primeira vez os micro-organismos do gênero *Lactobacillus*, a partir das fezes de lactentes alimentados com leite materno. Após a realização desse experimento, esse pesquisador atribuiu-lhes

o nome de *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos lactobacilos intestinais (ITSARANUWAT; HAL-HADDAD; ROBINSON, 2003).

Segundo Lee e Salminen (2009), as bactérias do gênero *Lactobacillus* são definidas morfológicamente como Gram-positivas, não formadoras de esporos, anaeróbicas, acidodúricas, homofermentativas ou heterofermentativas, possuindo uma complexa necessidade nutricional (carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, sais, ácidos nucléicos e vitaminas).

Algumas revisões sobre este gênero são amplamente encontradas na literatura, com informações sobre a natureza e aplicação de muitas espécies em alimentos industriais processados. Estudos apontam que muitas linhagens dos *Lactobacillus* são tolerantes aos ácidos do processo digestivo, além de sintetizarem ácido láctico espontaneamente, através de fontes de carboidratos como silagem e vegetais (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004).

Dentre as principais características dos *Lactobacillus* estão a produção de  $\alpha$ -galactosidase (EC 3.2.1.22) e a  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) responsáveis pela hidrólise de oligossacarídeos e polissacarídeos que possuem grupos  $\alpha$ -galactosil ou  $\beta$ -D-galactopiranosídeos, respectivamente. A  $\alpha$ -galactosidase é sintetizada especialmente pelos *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* e *L. fermentum*, para hidrólise de oligossacarídeos como a rafinose e a amilose de leguminosas, reduzindo a sensação de desconforto intestinal e flatulência (ALAZZEH et al., 2009).

Estudos apontam que as bactérias do gênero *Lactobacillus* apresentam genes responsáveis pela resistência a antimicrobianos como o cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, tetraciclina e vancomicina conforme as observações de Bacha, Mehari e Ashenafi (2010). A transferência destes genes ocorre pela reprodução assexuada, por meio de troca de plasmídeos entre as células bacterianas.

## **2.4 Aplicações e viabilidade de probióticos em produtos lácteos**

O estilo de vida contemporâneo é considerado para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios. Dessa forma, a busca por produtos atrativos e mais

saudáveis, tornou-se um desafio para a indústria de alimentos (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). Assim, os investimentos em pesquisas resultam em novos ingredientes, em que as propriedades tecnológicas das macromoléculas alimentares são modificadas, objetivando a elaboração de produtos que promovam melhorias na qualidade de vida dos consumidores.

Vasiljevic e Shah (2008), destacam as condições específicas em que os probióticos devam se desenvolver, garantindo a viabilidade, de modo que exerçam suas propriedades funcionais. Em todas as etapas envolvidas no processamento, a viabilidade e atividade das culturas probióticas podem ser afetadas em função da disponibilidade de nutrientes, pelos promotores e inibidores de crescimento, pela concentração de açúcares, oxigênio dissolvido e permeação de oxigênio através de embalagens (especialmente para *Bifidobacterium spp.*), pelo nível de inoculação, e tempo de fermentação. Os *L. acidophilus* possui a capacidade de resistir a pH 3,72 – 7,74, que permite sobreviver às mudanças de pH e adquirir estabilidade em condições ácidas (SHAH, 2000).

A produção de leite fermentado com adição de *Bifidobacterium bifidum* BBI e *Lactobacillus acidophilus* LAI é um grande desafio técnico, uma vez que, o leite não é o melhor meio para a multiplicação dessas espécies (VINDEROLA et al., 2000; OSTLIE; TREIMO; NARVHUS, 2005). Diante disto, a incorporação de micronutrientes, como peptídeos, aminoácidos e outros fatores que influenciam a taxa de desenvolvimento, podem promover a viabilidade da cultura pela redução do tempo de fermentação (KLAVER, et al., 1993).

De acordo com Ong, Henrikssonb e Shah (2006), a concentração de ácido acético manteve-se elevada durante todo o período de maturação, enquanto a concentração de ácido láctico elevou-se apenas no primeiro mês, devido à presença de lactose residual. Entretanto, não foi observada diferença significativa na composição de sal, gordura, umidade e proteínas nos queijos. Estes pesquisadores sugerem ainda que a síntese de proteólises secundárias contribuiu para a elevação da concentração de aminoácidos livres.

A viabilidade de uma célula probiótica é fundamental para sua aplicação em qualquer processo industrial. Diversas pesquisas são realizadas para a garantia da integridade da cultura mantendo suas características morfológicas, e dentre as

técnicas mais empregadas atualmente encontra-se o processo de liofilização. Entretanto, a sobrevivência da célula pode ser comprometida pelas lesões estruturais e fisiológicas, influenciadas pela concentração inicial das células, reidratação, espécie e tamanho celular (ZÁRATE; NADER-MACIAS, 2006; OTERO; ESPECHE; NADER-MACÍAS, 2007). Diante disso, inúmeros artigos científicos ressaltam a importância da microencapsulações de células probióticas para a ciência e tecnologia de alimentos, devido a suas características desejáveis, como Komatsu; Buriti; Saad, (2008); Heidebach; Först; Kulozik, (2008); Tymczyszyn et al. (2011).

## 2.5 Efeitos dos probióticos na saúde e seus mecanismos de ação

Durante as últimas décadas, os probióticos estão atraindo a atenção especial pelas propriedades nutritivas e nutracêuticas. Várias pesquisas são desenvolvidas em todos os continentes visando esclarecer os mecanismos de ação dos probióticos no organismo humano (MIMURA et al., 2004; OLIVARES et al., 2006; SHAH, 2007; SENOK; ISMAEEL; BOTTA, 2005; VASILJEVIC; SHAH 2008). Atualmente, a literatura traz grandes progressos e considerável empenho na organização de estudos sobre a ação das bactérias probióticas, por meio de ensaios cuidadosamente planejados, aleatorizados e controlados por placebo. Assim, as possíveis suposições podem ser cientificamente comprovadas.

Os efeitos benéficos dos probióticos são conferidos por cepas-específicas, e não somente por espécies ou gêneros-específicos. Diante disso, as cepas de *L. rhamnosus* GG (Valio), *Saccharomyces cerevisiae* Boulardii (Biocodex), *L. casei* Shirota (Yakult), e *Bifidobacterium animalis* Bb-12 (Chr. Hansen) apresentam efeitos comprovados à saúde humana, estando relacionados ao combate à má absorção da lactose, diarreia associada ao uso de antibióticos, controle da colite induzida por rotavírus e por *Clostridium difficile* (PLAYNE; BENNET; SMITHERS, 2003; SHAH, 2007).

Os micro-organismos probióticos também utilizam outros mecanismos de ação. Dentre estes incluem a produção de compostos antimicrobianos, competição por nutrientes, exclusão competitiva e modulação do sistema imunológico (ZOUMPOPOULOU et al., 2008).

### 2.5.1 Atividade antimicrobiana e controle de infecções intestinais

As bactérias ácido-láticas tais como *Lactobacillus spp.* são produtoras de diversos agentes antimicrobianos (bacteriocinas) responsáveis pelo tratamento e prevenções de várias doenças infecciosas provocadas por micro-organismos patogênicos (SPINLER, 2008), além de exercerem funções fundamentais na produção de nutrientes, proteção contra micro-organismos patogênicos e degradação de compostos xenobióticos (compostos químicos estranhos ao sistema biológico) (CUEVA et al., 2010).

Evidências demonstram que a fermentação do glicerol em condições anaeróbicas, os *L. reuteri* promovem a síntese de um composto antimicrobiano conhecido como  $\beta$  – hidroxipropionaldeído (3-HPA). Este agente apresenta um amplo espectro contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e protozoários, devido ao seu grande potencial terapêutico (SPINLER, 2008).

Além disso, as culturas lácticas de *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *B. infantis* apresentam a maior atividade antimicrobiana (TIMMERMAN et al., 2007). Estes pesquisadores sugerem que os *L. salivarius* podem promover a inibição de bolores específicos como *Candida albicans* e *C. glabrata* quando atuam em conjunto com culturas probióticas.

As bacteriocinas agem na membrana plasmática e atuam permeabilizando as membranas de células sensíveis por meio da formação de poros, o que causa desbalanceamento iônico e fluxo de íons fosfato. A consequência da formação de poros é a dissipação da força protônica (FPM), que está envolvida diretamente com a síntese de ATP, fosforilação de proteínas, síntese e rotação dos flagelos, transporte de proteínas, entre outros. Com a dissipação da força protônica, 98,9% de ATP é hidrolisado, na tentativa de manutenção da mesma. O transporte ativo de aminoácidos cessa e os aminoácidos de reserva são liberados da célula pelos poros formados. Esse distúrbio primário talvez gere outras desordens como lise celular. No entanto, estudos mostram que as bacteriocinas adicionadas durante o processamento podem ser degradadas no estômago e intestino humano e, portanto, apresentam poucas possibilidades de atuarem benéficamente na saúde do

hospedeiro (BRUNO; MONTVILLE, 1993; GARCERÁ et al., 1993; REID; KIM; KÖHLER, 2006).

Pesquisadores afirmam que o mecanismo de “exclusão competitiva” é a principal forma de colonização da microbiota intestinal pelos probióticos. Dessa forma, estes micro-organismos alteram o meio onde estão fixados pela síntese de ácidos graxos de cadeia curta, reduzindo a aderência dos sítios epiteliais da mucosa intestinal. Assim, o desenvolvimento dos micro-organismos putrefativos será desfavorecido na mucosa intestinal, influenciando diretamente no controle do número das unidades formadoras de colônia durante a competição por nutrientes e/ou da produção de compostos antimicrobianos (KAUR; CHOPRA; SAINI, 2002; GUARNER; MALAGELADA, 2003).

A exclusão de patógenos pela resistência à colonização da mucosa intestinal e do aparelho geniturinário do hospedeiro é uma das propriedades mais desejadas para os micro-organismos benéficos e sua suplementação tornou-se uma terapia segura para a prevenção de diarreias e distúrbios gastrintestinais (LÄHTEINEN et al., 2010).

### **2.5.2 Prevenção de doença inflamatória intestinal**

As doenças inflamatórias intestinais são caracterizadas por um conjunto de sintomas característicos das doenças de origem alimentar, que incluem dores abdominais, diarreia e sangramento com muco, podendo promover ulceração e estreitamento anormal do trato gastrointestinal (HANAUER, 2006). Diante destes fatos, Kelly e Reiff (2010) sugerem que a etiologia envolve uma interação complexa entre o sistema imunológico, meio ambiente, genótipo do hospedeiro e principalmente a microbiota entérica.

Há evidências sobre os danos aos tecidos e inflamações crônicas promovidas pelas bactérias patogênicas presentes na região intestinal, entretanto, o fluxo intestinal e o tratamento com antibióticos são duas alternativas viáveis para redução das lesões (GEIER; BUTLER; HOWETH, 2007; HÖRMANNSPERGER; HALLER, 2010).

Os probióticos apresentam mecanismos de ação na prevenção das doenças inflamatórias intestinais resultantes da modulação do sistema imune. Estudos demonstram que os *L. rhamnosus* GG modulam o sistema imune por meio da redução da secreção de IL-8 induzida por TNF- $\alpha$  (ZHANG et al., 2005). Diante disso, os *L. reuteri* estimulam a elevação dos níveis de NGF (Fator de Crescimento do Neural) e inibem a secreção de IL-8 (MA; FORSYTHE; BIENENSTOCK, 2004).

### **2.5.3 Prevenção e redução dos sintomas de diarreia**

Segundo Pereg et al. (2005), existem poucos estudos que avaliam os benefícios do consumo dos probióticos aplicados na dieta de uma população adulta e saudável. Dentre estes estudos, destacam-se as pesquisas realizadas por Raizel et al. (2011); Vandenplas et al. (2011) e Kahn; Fuentes; Villarroel (2009). Entretanto, as condições gastrintestinais promovidas pelos probióticos, ainda continuam sendo um assunto digno de investigação científica, pois existem alguns relatórios abrangentes publicados em relação à eficiência desses micro-organismos sobre a constipação, gastroenterite e infecções do trato geniturinário (GIRALT et al., 2008).

Diversos estudos avaliaram a influência dos probióticos em ensaios clínicos, em que houve redução de risco de diarreias associadas aos antibióticos, diarreia dos viajantes e diarreia aguda. Em um estudo realizado por Sazawal et al. (2006), ocorreu uma queda de 57% do risco de diarreia aguda entre as crianças e 26% entre os adultos após a ingestão continuada de culturas de *Saccharomyces boulardii*, *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus* e *L. bulgaricus*. Estes pesquisadores demonstraram que as cepas avaliadas apresentaram efeitos similares quando empregadas individualmente e em conjunto. Szajewska, Ruszczynski e Radzikowski (2006), reforçaram estes argumentos após realizarem um experimento com administração de probióticos na dieta de um determinado grupo de crianças, em que após um período de 2 meses de suplementação, apenas 4,5% dos indivíduos desenvolveram os sintomas da doença.

Existem na literatura resultados em países em desenvolvimento que apontam reduções significativas dos índices de diarreia dos viajantes quando os indivíduos são suplementados diariamente com *L. rhamnosus* GG (HERBERT,

1999). Existem medicamentos (antibióticos) que abrandam os sintomas da diarreia, por meio do controle dos micro-organismos infectantes aderidos nas mucosas intestinais. Porém, esses agentes antimicrobianos também possuem efeitos colaterais, como a diarreia associada a antibiótico.

Apesar da existência de diversos trabalhos na literatura sobre as propriedades funcionais dos probióticos, os mecanismos de ação sobre a redução e alívio dos sintomas da diarreia permanecem sem elucidação completa.

#### **2.5.4 Efeito hipocolesterolêmico**

O colesterol - LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade) é um fator importante para elevação dos riscos de doença cardiovasculares (SIMONS; AMANSEC; CONWAY, 2006; NGUYEN; KANG; LEE, 2007). Segundo ATAIE-JAFARI (2009), a hipercolesterolemia foi relatado a mais de 15 anos na sociedade iraniana abrangendo cerca de 11,1% da população. A redução em 1% pode reduzir o risco do surgimento de doenças cardíacas coronárias em 2 e até 3% (ZHANG et al., 2007, JEUN et al., 2010).

Outras observações foram realizadas no estudo de Sridevi, Vishwe e Prabhune (2009), onde a ingestão de probióticos contribuiu para a assimilação do colesterol pela síntese de hidrolases de sais biliares. Estas enzimas específicas liberam as moléculas de colesterol em maior quantidade pela via fecal. O efeito é potencializado pela má solubilização dos lipídios que limitam a sua absorção no intestino (BEGLEY; HILL; GAHAN, 2006; NGUYEN; KANG; LEE, 2007).

Além disso, estes micro-organismos podem reduzir o colesterol através da síntese de ácidos graxos de cadeia curta como foi observado em uma pesquisa realizada por Liong e Shah (2006). Estes pesquisadores avaliaram a redução do nível de colesterol sérico como consequência da alteração do metabolismo lipídico em função da presença de ácidos graxos de cadeia curta.

Estudos realizados com voluntários de um grupo de pesquisa, envolvendo suplementação de dieta com *L. reuteri* CRL 1098, resultaram na queda de 40% dos

níveis de triacilglicerídeos e elevação de 20% na proporção de colesterol - LDL através da translocação bacteriana da microbiota nativa (TARANTO et al., 1998). Em contrapartida, Losada e Olleros (2002) administraram *Lactobacillus sp.* na dieta de indivíduos durante 03 meses e obtiveram como resultado uma significativa redução nas taxas de colesterol. Avaliou-se nesse experimento um ligeiro aumento do colesterol-HDL. Entretanto, não foi observado nenhuma variação nos índices de triacilglicerol.

## 2.6 Síndrome metabólica

A SM é um termo sugerido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1998 para relacionar de uma forma universal, os fatores que favorecem o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (FRANCO et al., 2009), como inflamações crônicas e disfunções endotelial (BAHIA et al., 2006). Estes fatores são mais acentuados com a elevação da expectativa de vida, justificando a grande preocupação do sistema de saúde pública (SIQUEIRA et al., 2006). Além disso, a SM tem sido tema de inúmeros debates e discussões na literatura, relacionando uma série de fatores como índices antropométricos, dislipidemias aterogênicas, hipertensão arterial e hiperglicemia (MANNA; DAMIANI; SETIAN, 2006; NABIPOUR et al., 2007).

Estudos apontam que a SM está relacionada com a predisposição genética para hipertensão arterial, e a vida sedentária com os problemas ambientais como estresse psico-social e má alimentação (LOPES, 2005). Além disso, este pesquisador concluiu que esta interação promove elevação da resistência à insulina nos indivíduos pré-dispostos geneticamente.

Segundo a Sociedade Brasileira de Hipertensão (2005), a elevação dos níveis de mortalidade resultante dos problemas cardiovasculares é uma realidade presente em diversos países desenvolvidos e, recentemente, em países em desenvolvimento. Evidências sugerem que a mortalidade ocasionada por doenças cardiovasculares se elevam quando os indivíduos pertencem ao grupo de pessoas com SM (ESPÓSITO; GIUGLIANO, 2004).

Diante disso, as funções fisiológicas importantes na regulação de anormalias e os mecanismos subjacentes à SM, ainda não foram completamente elucidados, mas a fisiopatologia da SM vem sendo estudada por pesquisadores que desenvolvem estratégias eficientes que identificam e contribuem para prevenção de futuros riscos, inerentes aos problemas cardíacos (LAFORTUNA et al., 2008).

Embora muitos países asiáticos estejam atravessando rápidas mudanças sócio-econômicas, existem poucas pesquisas que relacionam o impacto da repentina mudança do estilo de vida da população ao surgimento de doenças influenciadas pela SM, em um continente em franca expansão política (ZAHID; CLAUSSEN; HUSSAIN, 2008). Segundo Punzalan et al. (2004), a mudança do estilo de vida, ganho de peso, sedentarismos e péssima alimentação, já eram os principais responsáveis pela mortalidade entre os filipinos adultos por doenças cardiovasculares. Entretanto, a prevenção da SM desde a infância, por meio de uma dieta adequada e a prática regular de atividade física, pode melhorar a qualidade e aumentar a expectativa de vida da população (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2004). A SM vem sendo relacionada com a elevação dos níveis de outros parâmetros como insulina, resistência à insulina, citocinas, homocisteína, proteína c-reativa e ácido úrico (LOPES, 2005; PÉREZ, 2005; CARVALHEIRA; SAAD, 2006; SOUZA et al., 2008).

Os produtos lácteos promovem efeitos benéficos à saúde dos consumidores, afetando benéficamente a sensibilidade à insulina, reduzindo a pressão arterial e os níveis séricos de lipídeos (PFEUFFER; SCHREZENMEIR, 2007).

Estudos demonstram que a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo está relacionada com o desenvolvimento da aterosclerose e variações metabólicas (ESPÓSITO; GIUGLIANO, 2004). Já Ritchie e Connell (2007) associaram a modificação do equilíbrio normal das adipocinas com a elevação do acúmulo da gordura visceral que induzem um estado pró-inflamatório.

Além disso, em um estudo realizado por Fruchart et al. (2004), evidenciou que o nível de concentração de homocisteína pode ser um fator de risco adicional independente para o surgimento de doenças cardiovasculares.

Outros estudos revelam que os elevados níveis de insulina plasmática e/ou aumento da resistência à insulina em indivíduos não-diabéticos estão diretamente associados aos parâmetros clínicos envolvidos na SM e distúrbios hemodinâmicos (BONORA et al., 2008). Dessa forma, uma análise univariada relacionou os níveis de leucócitos com os parâmetros clínicos relacionados com a SM, resistência à insulina, tabagismos, alcoolismo e sedentarismo (TEMELKOVA-KURKTSCHIEV et al., 2000).

### **2.6.1 Hiperglicemia**

A hiperglicemia é um fator de risco independente para o surgimento de doença arterial coronariana (GRUNDY, 1998), estando incluído como um dos critérios da identificação de indivíduos com SM junto com a hipertensão arterial e parâmetros antropométricos (MISRA; VIKRAM, 2007). Além disso, a SM é apresentada em diversos estudos como um bom preditor do risco de diabetes tipo 2, independente da base genética (AMINI; JANGHORBANI, 2009). Segundo Cook et al. (2008), a Associação Americana de Diabetes (AAD) recomendou, em função da elevação dos riscos de desenvolvimento de diabetes melitus tipo 2 e doenças cardiovasculares, uma modificação do nível máximo da concentração de glicemia em jejum de 110mg/dL para 100mg/dL.

Estudos recentes demonstram que a suplementação de frutose é uma alternativa viável para a substituição da sacarose na dieta dos consumidores, pois este açúcar redutor não agravou os indicadores relacionados com SM (SUN et al., 2011). Assim, os probióticos tem se mostrado uma alternativa muito promissora em relação a redução dos níveis de glicemia entre os consumidores (MOROTI et al., 2009).

Dentre estes eventos, um experimento realizado com 499 voluntários nipo-estadunidenses não diabéticos, sugeriu que os mecanismos relacionados com a hiperglicemia e a hipertensão são independentes da adiposidade central ou resistência à insulina (BOYKO et al., 2010). Além disso, a glicemia e os parâmetros antropométricos foram utilizados em uma avaliação canadense com adolescentes

multiétnicos, como indicadores para uma possível detecção precoce da presença de SM, bem como o seu impacto ao longo dos anos neste grupo (VUKSAN et al., 2010).

### **2.6.2 Circunferência abdominal**

Evidências sugerem que a obesidade é uma doença crônica e epidêmica, que resultou em elevada taxa de morbidade e mortalidade nas últimas décadas em todos os países (OLIVEIRA et al., 2004). Dessa forma, este resultado demonstra a importância da redução da CA em relação ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas (RITCHIE; CONNELL, 2007).

Outro estudo realizado com indivíduos nipo-brasileiros apontou que o estilo de vida cotidiana no Brasil contribuiu para a elevação da CA entre os voluntários não obesos (LERARIO et al., 2002). Diante disso, estes pesquisadores concluíram que esta pesquisa foi um estudo prospectivo sobre a morbidade e mortalidade cardiovascular em uma comunidade estabelecida no país.

Evidências demonstram que a melhor avaliação da concentração de gordura na região abdominal é a aferição do ponto médio entre o último arco costal e a cristalíaca que apresentaram associação com as alterações metabólicas do que a relação cintura-quadril (OLIVEIRA et al., 2004).

Recente estudo realizado com a população residente em Fukuoka no Japão, pesquisadores locais investigaram a associação da circunferência abdominal e o IMC em relação com a concentração de hemoglobina (YOSHIDA et al., 2009). Os resultados apontaram um aumento significativo da circunferência abdominal e o IMC foi associado à elevação dos níveis de hemoglobina dos voluntários recrutados.

### **2.6.3 Pressão arterial**

A hipertensão arterial é um dos principais parâmetros da SM que está diretamente relacionada com a elevação da taxa de morbidade e mortalidade,

principalmente com a ocorrência de acidente vascular encefálico, entre a população obesa e diabética do tipo 2 (FRANCO et al., 2009). Além disso, a hipertensão arterial é a doença com maior prevalência entre a população adulta brasileira de ambos os sexos e frequentemente encontrada entre os indivíduos com SM, sendo considerada uma das principais causas de morbidade entre esta população adulta (SALAROLI et al., 2007).

Além disso, estudos evidenciam a importância da atividade física sobre a pressão arterial de indivíduos diabéticos tipo 2, através de exercícios aeróbicos e de resistência que conferem melhoria de outros parâmetros relacionados a SM (MORAIS et al., 2011).

Dados recentes encontrados na literatura apontaram que 51,8% dos voluntários selecionados para uma pesquisa apresentavam quadro de obesidade, sendo que aproximadamente 25% destes indivíduos possuíam uma pressão sistólica e diastólica em torno de 140 e 90 mmHg, respectivamente (BONORA et al., 2008). Além disso, um levantamento de dados ocorrido na região central da China com um grupo com SM, mostrou que 56,3% dos homens e 40,1% das mulheres deste grupo sofriam de hipertensão arterial (WANG et al., 2009).

Além disso, os desequilíbrios fisiológicos e as disfunções endoteliais são resultantes da obesidade visceral, que contribui para a elevação dos riscos cardiovasculares e metabólicos que podem ser agravados pela dislipidemia, hipertensão arterial e tabagismo (RITCHIE; CONNELL, 2007).

Estudos envolvendo micro-organismos probióticos têm sido conduzidos e os resultados são diversos. Uma pesquisa realizada com voluntários saudáveis que possuíam constipação e diarreia revelou que não houve diferença significativa entre as pressões sistólica e diastólica após o consumo diário de iogurtes contendo *L. plantarum* SN35N ou *L. plantarum* SN13T durante as 6 semanas de suplementação (HIGASHIKAWA et al., 2010). Resultados semelhantes foram encontrados por Burton et. (2011), quando avaliaram a influência do sachê *St. salivarius* K12 sobre a redução das pressões arteriais sistólica e diastólica de voluntários saudáveis durante 28 dias de pesquisa e concluíram que os efeitos promovidos pelo micro-organismo não se diferenciou significativamente em relação ao grupo placebo. Entretanto, em um estudo anterior realizado por Jauhiainen et al. (2005) com voluntários

hipertensos, relataram que os efeitos do consumo diário de leite fermentado contendo 17,5% de tripeptídeos bioativos e *L. helveticus* LBK-16H apresentaram redução da pressão arterial após 14 semanas.

Em contrapartida, outros pesquisadores concluíram que a ingestão por meio de uma bebida contendo *L. reuteri* SD2112 por indivíduos infectados por HIV (vírus da imunodeficiência humana) influenciou apenas redução da pressão arterial diastólica dentre os parâmetros avaliados durante as 3 semanas de experimento (WOLF et al., 1998).

#### **2.6.4 Colesterol-HDL**

O surgimento de uma doença cardiovascular mais aterogênica em indivíduos com SM se deve a um quadro de dislipidemia, caracterizada pela elevação dos níveis de triacilglicerídeos e redução do colesterol-HDL (SIQUEIRA et al., 2006). Estudos recentes demonstram que a prevalência da SM em uma população não caucasiana pode promover um maior risco de desenvolvimento de diabetes melitus tipo 2, enquanto que a aterosclerose é mais frequente em indivíduos caucasianos (LONGO-MBENZA et al., 2011).

Evidências surgem que níveis reduzidos de colesterol-HDL e a prevalência da pressão arterial sistólica estão constantemente diagnosticadas entre os indivíduos de ambos os sexos com SM (MENOTTI et al., 2011). Além disso, Punzalan et al. (2004) relataram que os filipinos apresentam menores níveis de colesterol-HDL em relação ao diagnosticado em outro estudo realizado entre 1998 e 1999, cuja média foi de 30mg/dL. Dados semelhantes foram encontrados em um estudo composto por indivíduos com SM que se recuperavam de uma doença arterial coronariana (YAMASHITA et al., 2004) e entre voluntários do sexo feminino que haviam sido selecionados em uma pesquisa sobre a prevalência da SM (SALAROLI et al., 2007).

Diante desses dados, a SM mostrou-se como um preditivo muito importante para a prevenção de doenças cardiovasculares, em uma pequena comunidade italiana (MORAIS et al., 2011). Porém, estes pesquisadores concluíram que somente

a concentração de colesterol-HDL e a aferição da pressão arterial não demonstraram nenhuma precisão no diagnóstico da SM.

Diante destes fatos, alguns pesquisadores enfatizam que a redução do colesterol-LDL e o aumento do colesterol-HDL estão diretamente associados com a redução do risco de uma doença cardiovascular, o que significa que a variação simultânea das frações pode ser utilizada para o tratamento de pessoas com SM (ZHAO et al., 2009).

### **2.6.5 Hipertrigliceridemia**

A hipertrigliceridemia é outro critério da SM que está diretamente relacionada com eventos coronarianos agudos (LOMBO et al., 2006). Esta alteração ocorre simultaneamente com a síntese hepática de colesterol-VLDL (lipoproteína de baixíssima densidade).

Uma pesquisa realizada por Cardona et al. (2008) evidenciou que dentre os principais parâmetros que influenciam o surgimento da hipertrigliceridemia, a sobrecarga de gordura contribui para que o estresse oxidativo elevesse ainda mais os níveis séricos de triacilglicerídeos entre os indivíduos com SM.

Além disso, inúmeras pesquisas ressaltam a influência dos probióticos em função da redução dos níveis de triacilglicerídeos, como Minelli et al. (2004); Ertanto et al. (2009); Larkin; Astheimer; Price (2009).

### 3. JUSTIFICATIVAS

Atualmente, muito se sabe sobre os benefícios de micro-organismos probióticos sobre o organismo humano e animal, entretanto, informações a respeito dos efeitos benéficos promovidos por estes micro-organismos sobre os parâmetros que caracterizam a síndrome metabólica ainda não foram totalmente esclarecidos. Não se tem até o momento, nenhum estudo avaliando o tempo e a dosagem necessária para que a ingestão de leite fermentado contendo *L. plantarum* possa promover efeitos benéficos sobre a saúde de indivíduos com síndrome metabólica. Portanto, a necessidade de um aprofundamento e conhecimento destes dados torna-se um alvo de investigação bastante atraente.

Um fator de interesse em se tratando de uma bactéria ácido-láctica está relacionado à melhora dos parâmetros metabólicos e inflamatórios que são exercidos sobre o organismo alvo. Uma série de efeitos benéficos tem sido atribuída aos *L. plantarum*, mas a maioria dos resultados ainda está restrita a experimentos com animais e poucos estudos foram realizados com humanos.

Desse modo, torna-se relevante à realização de uma pesquisa sobre os possíveis efeitos benéficos das culturas de *L. plantarum* sobre a saúde dos voluntários com SM. O que pode contribuir de maneira significativa ao entendimento do desempenho desde micro-organismos no organismo humano.

## 4. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação com *L. plantarum* – Lp 115 em vários parâmetros clínicos e laboratoriais em pacientes com síndrome metabólica no início e após 6 semanas de intervenção.

### 4.1. Objetivos específicos

- a) Realizar medidas de pressão arterial, antropométrica e avaliar os marcadores de lesão hepática: pressão arterial sistólica e diastólica, índice de massa corporal, circunferência abdominal, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase dos sujeitos da pesquisa;
- b) Avaliar as variações do perfil lipídico: colesterol total e frações, triacilgliceróis;
- c) Realizar análises dos parâmetros hematológicos: contagem total de leucócitos e concentração de hemoglobina;
- d) Avaliar as variações do perfil glicêmico: glicemia e insulina de jejum;
- e) Realizar análises sobre os parâmetros bioquímicos e inflamatórios: ácido úrico, homocisteína e proteína c-reativa;
- f) Todas as avaliações serão observadas no início e após 6 semanas de intervenção, além da comparação com um grupo placebo.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Material e métodos

#### 5.1.1 Ativação da cultura de *L. plantarum* e produção dos inóculos

##### 5.1.1.1 Cinética de crescimento

Para a determinação do período de incubação do *L. plantarum*, foi realizado um estudo preliminar, onde se investigou o comportamento da espécie, nas condições de incubação mais adequadas. A cinética de crescimento dos *L. plantarum* – Lp 115 foi calculada de acordo com os modelos propostos por MARTINEZ-VILLALUENG e GOMEZ (2007), em função da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e do tempo de geração (tg):

$$\text{Velocidade específica de crescimento } (\mu) = (\log_{10} X_2 - \log_{10} X_1) / (t_2 - t_1) \quad (1)$$

$$\text{Tempo de geração} = \ln(2/\mu) \quad (2)$$

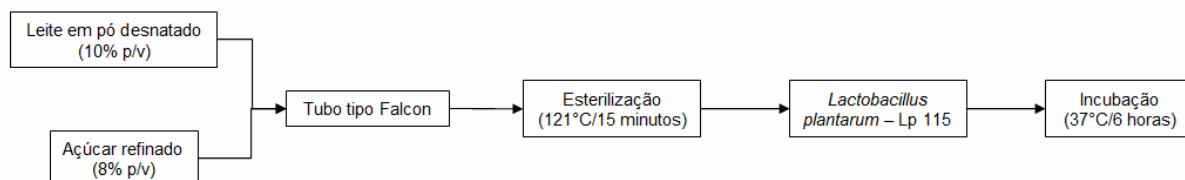
Onde:

$\log_{10} X_2$  e  $\log_{10} X_1$  = Contagem de células viáveis em UFC/mL (Logarítimo)

$t_2$  e  $t_1$  = Tempo de fermentação durante a fase exponencial (horas)

A linhagem de *L. plantarum* – Lp 115 foi fornecida pela empresa Danisco. Os micro-organismos foram ativados em leite desnatado reconstituído. Durante o preparo dos inóculos, adicionou-se açúcar refinado (União, 8% p/v) ao leite em pó desnatado (Molico, 10% p/v) em tubos tipo Falcons, volume de 50mL que foram

esterilizados a 121 °C/15 minutos (Figura 1). Em seguida, a cultura foi inoculada e incubada a 37 °C durante 6 horas.

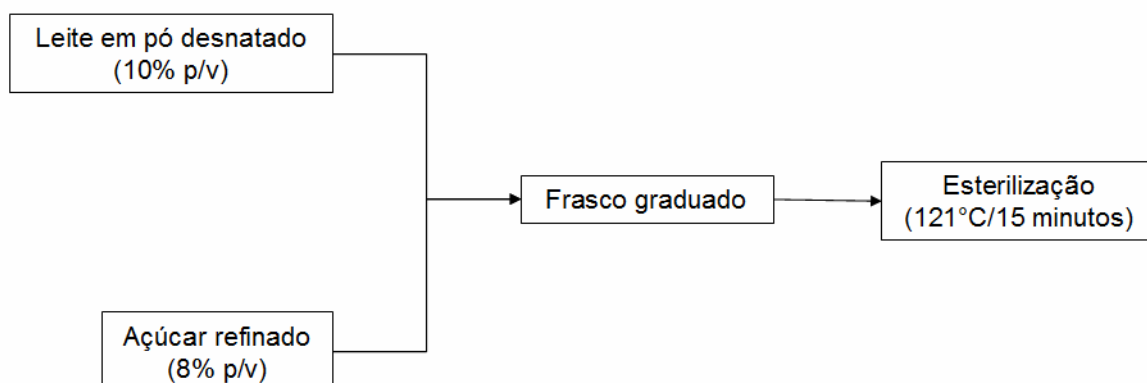


**Figura 1.** Fluxograma da produção dos inóculos empregados na formulação do leite fermentado.

## 5.1.2 Produção das Bebidas lácteas

### 5.1.2.1 Produção do leite esterilizado para o Grupo Placebo

O leite esterilizado foi produzido (Figura 2) com adição de leite em pó desnatado (Molico, Araçatuba, 10% p/v) e açúcar refinado (8% p/v) no frasco graduado (Boeco, Germany) esterilizado (121 °C/15 minutos).

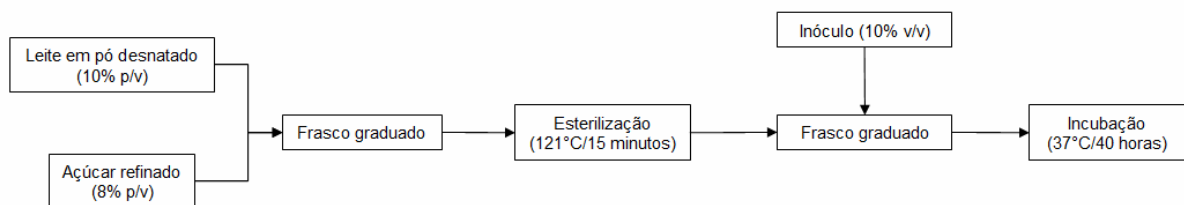


**Figura 2.** Fluxograma da produção do leite esterilizado distribuído para o grupo placebo.

### 5.1.2.2 Produção do leite fermentado para o Grupo de Suplementação

O leite fermentado foi produzido de acordo com as determinações da legislação vigente (Ministério da Agricultura e do Abastecimento, regulamento: N.º 36, de 31 de outubro de 2000 e Anvisa, Abril de 2008), contendo uma dosagem em torno de  $3,2 \times 10^{10}$  UFC/mL de *L. plantarum* - Lp 115.

Esta bebida foi elaborada com adição do leite em pó desnatado (Molico, 10% p/v) e açúcar refinado (Açúcar, 8% p/v) em um frasco graduado (Boeco), esterilizado (121 °C/15 minutos). O inóculo (10% v/v) foi adicionado e incubado a 37 °C por 40 horas (Figura 3).



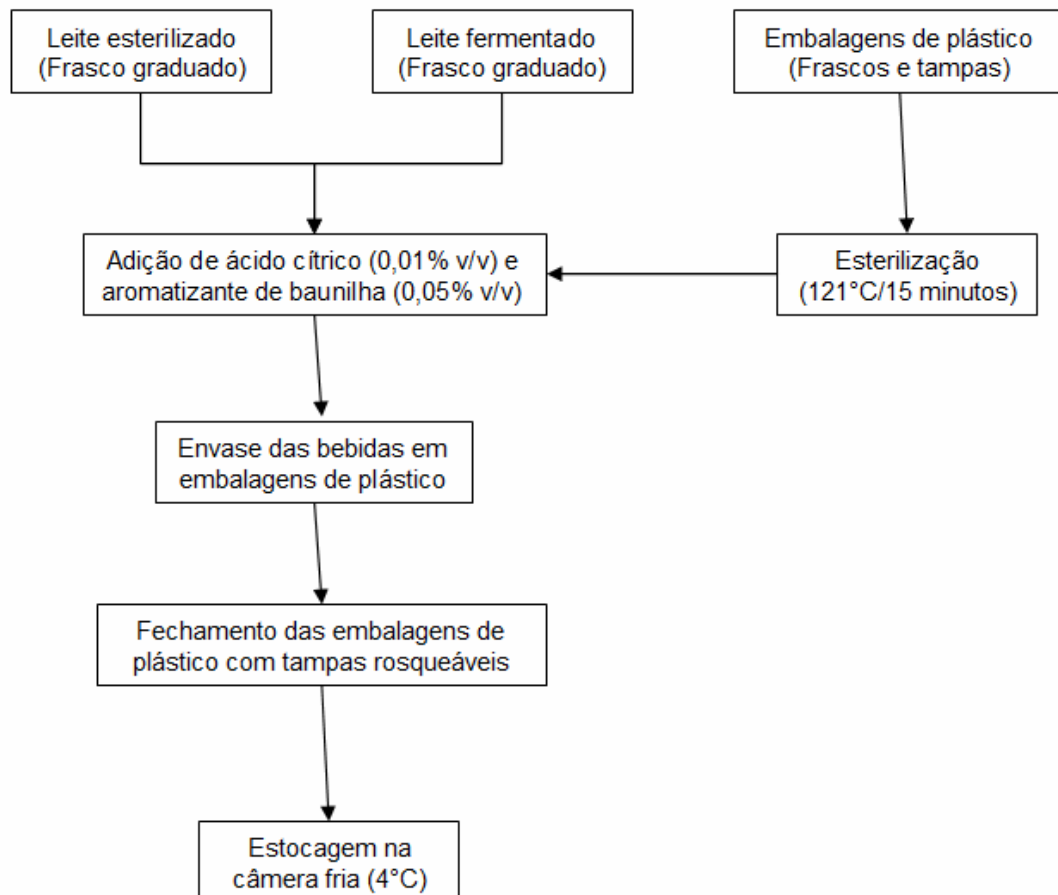
**Figura 3.** Fluxograma da produção do leite fermentado distribuído para o grupo de suplementação.

### 5.1.3 Envase e armazenamento

Envasou-se manualmente 80mL de ambas as bebidas em embalagem de plástico (109-SL, Inplavel, Joinville) previamente esterilizada (121 °C/15 minutos). As embalagens foram tampadas com tampas rosqueáveis (Pilfer 28, Inplável, Joinville), (Figura 4). E em seguida os lotes foram estocados em câmara fria a 4 °C, em caixas de plástico, devidamente codificadas, para distribuição junto aos grupos determinados para receber o leite fermentado ou leite esterilizado (placebo).

### 5.1.4 Análises microbiológicas e físico-químicas

A determinação da viabilidade de *L. plantarum* em UFC/mL no produto, ocorreu através de diluições seriadas em 0,1% (p/v) de água peptonada (Oxoid, Cambridge, UK) e plaquetas em ágar MRS (de Man Rogosa e Sharpe, Difco, Diadema, Brasil) *pour-plate* em jarra de anaerobiose (Probac. São Paulo) a 37°C por 48h. As contagens de bolores e leveduras (ágar batata dextrose, Himidia, Mumbai, Índia) e a determinação de coliformes a 35°C e 45°C (caldo verde brilhante, Himidia, Mumbai, Índia), foram realizados conforme determina a legislação (Ministério da agricultura e do abastecimento, regulamento: N.º 36, de 31 de outubro de 2000 e Anvisa, Abril de 2008), além de medidas de acidez (Hidróxido de sódio 0,1N, Nuclear) e pH (HI223, Hanna instruments, EUA) de acordo com a Association of Official Analytical Chemist – AOAC (1999).



**Figura 4.** Fluxograma de envase e estocagem do leite fermentado e esterilizado.

### **5.1.5 Distribuição das bebidas aos voluntários da pesquisa**

Medidas preventivas foram adotadas durante a distribuição dos produtos entre os voluntários, como a montagem de um kit contendo 7 embalagens de leite fermentado ou leite esterilizado durante o período de envase das bebidas. As embalagens foram acondicionadas em uma embalagem secundária (bobina para Freezer) e lacradas com o auxílio de uma gravata. Os nomes de cada voluntário foram fixados no kit através de uma etiqueta. Dessa forma, os kits foram acondicionados em uma caixa de isopor e entregues a cada voluntário em seus respectivos locais de trabalhos. Estes voluntários foram orientados a estocarem seus kits em um refrigerador que se encontrasse no local de trabalho até o fim do expediente.

Durante a coleta da primeira amostra sanguínea (antes do período ingestão das bebidas) foi entregue uma orientação para cada voluntário (Anexo I) sobre a forma como o produto deveria ser consumido e armazenado até a entrega do próximo kit, além informações adicionais.

## **5.2 Sujeitos e métodos**

### **5.2.1. Seleção dos sujeitos da pesquisa**

Essa parte da pesquisa foi conduzida nos laboratórios do Centro de Ciências da Saúde e após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, da Universidade Estadual de Londrina (Anexo II) (Protocolo CEP 209/2011). Foram convidados a participar da pesquisa todos os servidores da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil com indicação para síndrome metabólica (Anexo III). Dentre os convidados, quarenta e três funcionários (n=43) aceitaram participar da pesquisa e preencheram os requisitos de participação. Antes de iniciar o estudo, os pacientes foram aleatoriamente designados para o grupo

placebo (n=21) ou grupo de suplementação (n=22) após a estratificação por idade e índice de massa corporal (IMC). Porém, houve desistência de 5 voluntários durante o período de intervenção.

Critérios de inclusão adotados para a seleção dos participantes:

As medidas antropométricas e os parâmetros laboratoriais foram avaliados no início do estudo e após o período de intervenção, conforme os critérios definidos pelo Adult Treatment Panel III (ATP III). Segundo as diretrizes do ATP III, pelo menos três das cinco seguintes características devem ser confirmadas: 1) A obesidade abdominal: circunferência da cintura  $\geq 88$  cm para a mulher e  $\geq 102$  cm para o homem; 2) hipertrigliceridemia  $\geq 150$  mg/dL; 3) Os baixos níveis de colesterol HDL  $\leq 50$  mg/dL para a mulher e  $\leq 40$  mg/dL para o homem; 4) A pressão arterial elevada:  $\geq 130/85$  mmHg e 5) de glicose de jejum elevada  $\geq 100$  mg/dL (GRUNDY et al., 2004).

Todos os indivíduos participaram voluntariamente da pesquisa e a condução do estudo obedeceu às normas estabelecidas pelo Comitê de Ética. O termo de consentimento livre e esclarecido foi apresentado e assinado por todos os participantes.

A principal motivação estava relacionada com a ingestão de uma terapia não-farmacológica, agradável sensorialmente e que não possuía efeitos colaterais. A distribuição das mulheres pós-menopáusicas foi semelhante entre os grupos (dados não mostrados). Os funcionários portadores de doenças da tireóide, renais, hepáticas, gastrointestinais ou oncológicas, medicados com hipolipemiantes, hiperglicemiantes e em terapia de reposição de estrogênio não foram selecionados. Os pacientes que estavam sendo medicados com anti-hipertensivos não foram excluídos da seleção e foram autorizados a continuar a consumir a mesma dose da droga. Nenhum dos indivíduos seguiu uma dieta específica antes do início e durante a ingestão de leite fermentado.

Os participantes foram orientados a manterem suas dietas habituais, prevendo a possível ingestão de bebidas com teor alcoólico, mantendo os níveis de atividades físicas, ou outros estilos de vida durante todo o período de intervenção.

### 5.2.2 Delineamento experimental

Os pacientes do grupo placebo (n=20) e grupo de suplementação (n=17) foram avaliados no início do estudo e após o período de administração e foram submetidos à punção venosa para coleta de amostras sanguíneas. Tal procedimento aconteceu duas vezes, a primeira antes do início do período de ingestão do suplemento e a segunda, após as 06 semanas do experimento, e as coletas foram realizadas no Dasc (Divisão de Assistência à Saúde da Comunidade).

O grupo placebo consumiu leite esterilizado, enquanto que o grupo de suplementação consumiu uma dosagem de leite fermentado contendo aproximadamente  $3,2 \times 10^{10}$  UFC/mL de *L. plantarum*. Ambos os grupos consumiram 80mL diários durante 06 semanas de intervenção. As bebidas poderiam ser consumidas em qualquer período do dia. Entrevistas foram realizadas para garantir que nenhuma mudança no estilo de vida dos voluntários durante o estudo. A noção de placebo traz implícita a idéia de que é possível separar os mecanismos psicológicos sobre os biológicos, mesmo reconhecendo a influência destes mecanismos e associando-se ao conjunto de procedimentos que envolvem uma relação de orientação e prescrição com o voluntário de possíveis efeitos principais ou colaterais do composto avaliado (HERBERT; GAUDIANO, 2005; ROCHA; DEL PRETTE; DEL PRETTE, 2008).

### 5.2.3 Medidas antropométricas e de pressão arterial

As medidas antropométricas e a pressão arterial de cada voluntário foram anotadas em uma ficha de avaliação (Anexo IV) A CA foi medida com uma fita suave em pé no meio do caminho assentos entre costela e a crista ilíaca, e a média dessas medidas foi utilizada na análise, segundo Pickering et al. (2005). Os participantes permaneceram sentados por pelo menos 5 minutos em uma cadeira com apoio para as costas e com os pés no chão. A pressão arterial foi aferida por uma única pessoa, que foi devidamente treinada. Foram seguidas as Recomendações do Relatório do

Sétimo do Comitê Misto Nacional de Prevenção, Detecção, Avaliação e Tratamento da Hipertensão Arterial (CHOBANIAN et al. 2003).

#### **5.2.4 Análises laboratoriais**

Amostras de sangue foram coletadas após jejum de 12 horas, enviadas para análises laboratoriais: índice glicêmico, colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (colesterol-HDL), lipoproteína de baixa densidade (colesterol-LDL), triglicérides (TG), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), e ácido úrico. Empregou-se um auto-analisador bioquímico (Dade Dimension AR Dade Behring, Deerfield, IL, EUA), utilizando kits Dade Behring<sup>®</sup>. Os níveis de insulina plasmática foram determinados por quimioluminescência (ARCHITECT<sup>®</sup>, Abbott Laboratory, Abbot Park, IL, EUA). O coeficiente de variação (CV) inter e intra-ensaio para os exames foi <10%. O índice de resistência à insulina e homocisteína foram determinadas pelo HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment-Insulin resistance) e calculado de acordo com a fórmula:  $HOMA-IR = \text{insulina jejum } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicose jejum } (\text{mmol/L}) / 22,5$  (CHOBANIAN et al. 2003). A proteína c-reativa de alta sensibilidade (hs-PCR) foi determinada por nefelometria (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Marburg, Alemanha). A determinação da hemoglobina e a contagem total de leucócitos foi realizada utilizando o equipamento ADVIA<sup>®</sup> 120 Hematology System.

#### **5.3 Análise estatística**

A distribuição de gêneros, etnia e medicamentos de hipertensão foram analisados pelo teste qui-quadrado. O teste Mann-Whitney foi realizado para comparar as diferenças entre os parâmetros de grupo e as diferenças entre os grupos de tratamento (mudanças inter-grupo), enquanto que o Wilcoxon foi utilizado para verificar combinação de pares e alterações da linha de base (mudança intra-grupo). Os dados são apresentados como mediana (25%-75%) e o nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ . Para realização da estatística e plotagem

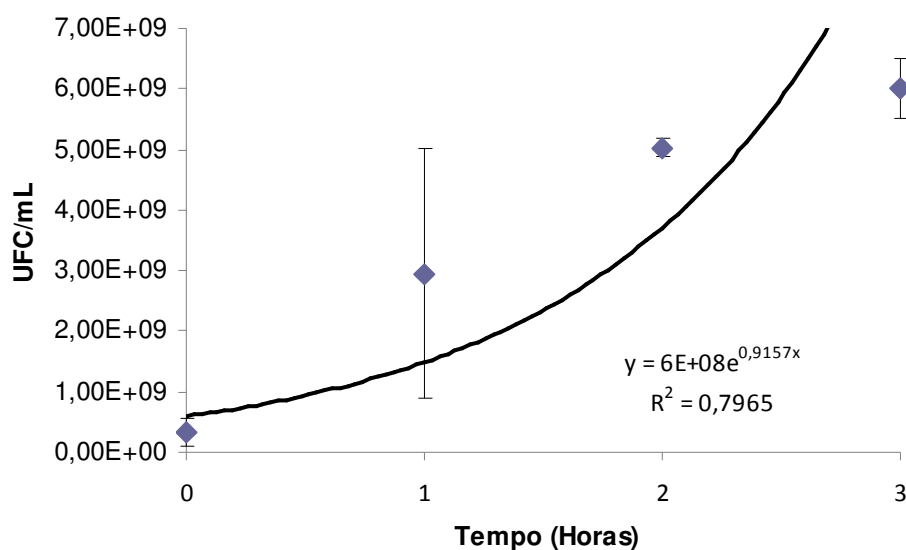
das figuras utilizou-se os programas Graph Pad Prism versão 3.0 e o Microsoft Office Excel 2003, respectivamente.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Monitoramento da produção do leite fermentado

#### 6.1.1 Tempo de geração do *L. plantarum* - Lp 115 no inóculo

O tempo de geração ( $t_g$ ) é o período em que uma célula necessita para se dividir durante a fase exponencial de seu ciclo de vida. Durante a fase exponencial da curva de desenvolvimento do *L. plantarum* - Lp 115, no inóculo, a velocidade específica de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e o  $t_g$  foram de  $4,74h^{-1}$  e  $0,42h$ , respectivamente. A curva do  $t_g$ , representada pela Figura 5, apresentou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 79,65%, indicando um bom ajuste dos dados e desenvolvimento da regressão.



**Figura 5.** Crescimento do *L. plantarum*-Lp 115 durante a fase exponencial da produção do inóculo.

**Tabela 1.** Equações da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e tempo de geração (tg) de *L. plantarum* - Lp 115 no inóculo.

Equações	
$\mu_{\text{inoculo}} = (\log_{10} 6.10^9 - \log_{10} 2,95.10^9)/(3-1) = 9,48/2 = 4,74h^{-1}$	(3)
$tg_{\text{inoculo}} = \ln (2/4,74) = 0,42h$	(4)

A sensibilidade aos ácidos orgânicos e a presença de oxigênio, na presença de lactose e rafinose, contribuiu para um tg do *B. bifidum* em torno de 3h (MARTINEZ-VILLALUENG; GOMEZ, 2007). Outro experimento realizado com iogurte evidenciou que a protocooperação entre o *St. thermophilus* e o *L. bulgaricus* contribuiu para que o tg do *Lactobacillus* atingisse 0,34h em 3 horas de bioprocessamento (TALON et al., 2002). O mesmo fenômeno foi reforçado por outros autores que evidenciaram a redução do tg do *L. acidophilus* de aproximadamente 1h para um valor em torno de 0,5h, pela presença do *St. thermophilus* durante a fermentação do iogurte (OLIVEIRA et al., 2011).

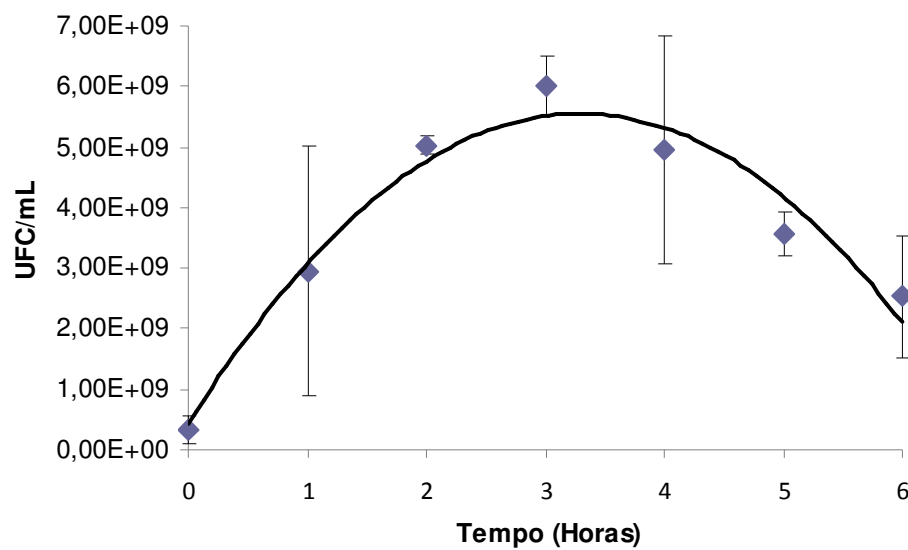
### 6.1.2 Avaliação do crescimento do *L. plantarum* no inóculo e no leite fermentado

#### 6.1.2.1 Crescimento do *L. plantarum* no inóculo

Durante o período de monitoramento do inóculo, a contagem inicial foi de  $3,39 \times 10^8$  UFC/mL para  $25,3 \times 10^8$  UFC/mL, após 6 horas de fermentação (Figura 6 e Tabela 2). O final da fase exponencial levou aproximadamente 3 horas de incubação para que os *L. plantarum* – Lp 115 alcançasse uma contagem de  $6 \times 10^8$  UFC/mL.

A contagem encontrada no inóculo foi superior à concentração celular obtida por Oliveira et al. (2002) encontraram contagem iniciais de  $35 \times 10^6$ ,  $15 \times 10^6$ ,  $60 \times 10^6$  e  $5 \times 10^6$  UFC/mL para inóculos fermentados por *St. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*, respectivamente.

Além dos fatores citados anteriormente, a fermentação do inóculo levou em média 3 horas para atingir a concentração celular máxima, enquanto que Viegas et al. (2010) observaram um tempo superior para alcançar o maior desenvolvimento dos *L. acidophilus*. Estudos demonstraram que a sacarose foi o substrato mais consumido pelo *L. plantarum*, em comparação a rafinose e estaquiose avaliados no experimento (OUNIS et al., 2008). Deste modo, alguns autores enfatizam que *L. plantarum* possui elevado número de genes que codificam a capacidade de adaptação às diversas condições e substratos (VRIES et al., 2006).



**Figura 6.** Crescimento de *L. plantarum* - Lp 115 em LDR 10% a 37°C.

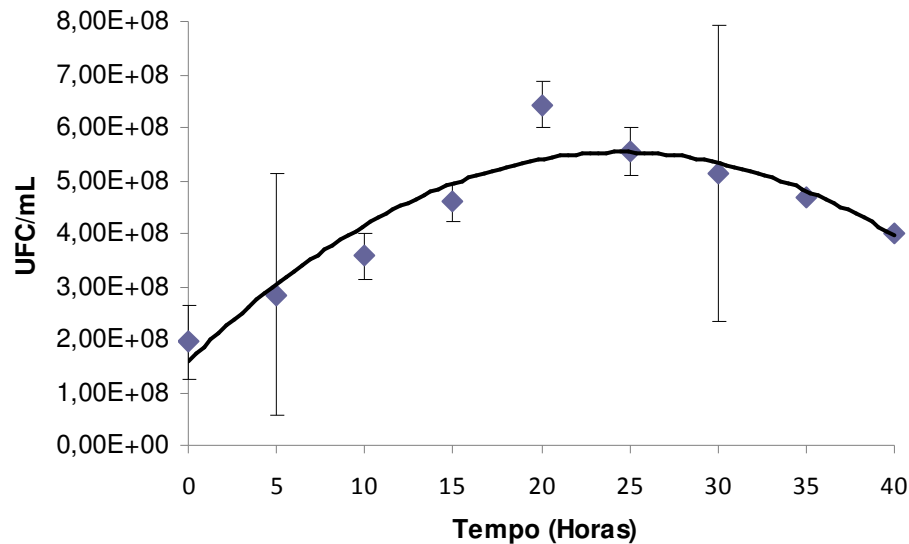
**Tabela 2.** Modelagem da curva de crescimento e os coeficientes de determinações do *L. plantarum*-Lp 115 no inóculo e leite fermentado.

Equações	
$UFC/mL_{in\acute{o}culo} = -5E+08x^2 + 3E+09x + 4E+08$	$R^2 = 0,9533$ (5)
$UFC/mL_{leite\ fermentado} = -655931x^2 + 3E+07x + 2E+08$	$R^2 = 0,8852$ (6)

#### 6.1.2.2. Crescimento do *L. plantarum* no leite fermentado

O período de monitoramento da produção do leite fermentado (Figura 7 e Tabela 2) apresentou uma variação da concentração celular de  $1,95 \times 10^8$  a  $4 \times 10^8$

UFC/mL em 40 horas de fermentação. Durante a fase exponencial os micro-organismos levaram aproximadamente 20 horas de fermentação para atingirem  $6,43 \times 10^8$  UFC/mL. Logo, a contagem de  $4 \times 10^8$  UFC/mL resultante do período de fermentação foi superior a contagem mínima recomendada de  $1 \times 10^6$  UFC/mL determinada pela legislação vigente (ANVISA, 2008).



**Figura 7.** Curva de desenvolvimento do *L. plantarum*-Lp 115 durante a produção do leite fermentado.

Entretanto, um experimento realizado por Talon et al. (2002) evidenciou uma variação de 1,5 ciclos logarítmicos, na fase exponencial, durante o desenvolvimento do *L. bulgaricus*, em 3 horas fermentação. A incorporação de micronutrientes, como peptídios e aminoácidos, e de outros fatores de crescimento pode ser necessária para reduzir o tempo de fermentação e propiciar viabilidade às bactérias probióticas (KLAVER; KINGMAN; WEERKAMP, 1993). Além disso, o desenvolvimento do *L. bulgaricus* foi 2,3 vezes superior quando a fermentação ocorreu em condições de anaerobiose (FU; MATHEWS, 1999).

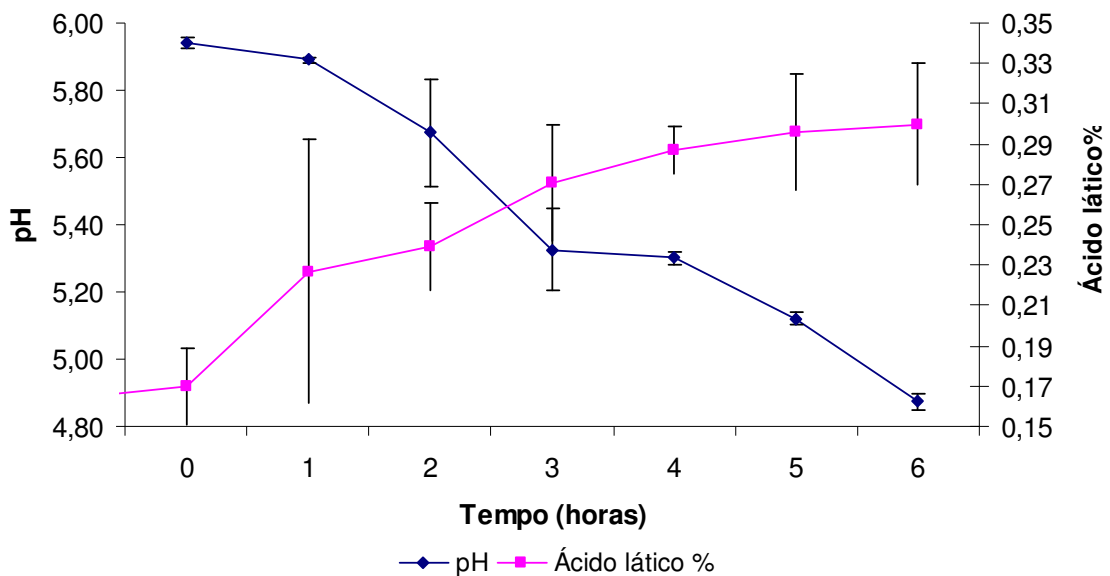
Além disso, é possível concluir que a temperatura e o tempo de fermentação influenciam na síntese de diferentes subprodutos durante o bioprocessamento (OSTLIE; TREIMO; NARVHUS, 2005).

O meio se torna desfavorável com o passar do tempo, devido ao excesso de metabólitos sintetizados durante o período de fermentação. Porém, a presença de

citratos e fosfatos induz a um efeito tampão que impedirá temporariamente a variação do pH. No entanto, a acidificação é um fenômeno independente da presença de prótons livres no meio (AQUARONE et al., 2001). Em um estudo realizado por Fu e Mathews (1999) relataram que a morte da celular probiótica no inóculo ocorre como consequência dos efeitos do pH e redução da concentração de lactose.

### 6.1.3. Síntese de ácido láctico e variação do pH

O comportamento da curva de síntese de ácido láctico no inóculo foi linear enquanto que no leite fermentado foi quadrática durante toda fase de produção (Tabela 3 e 4). Durante o preparo dos inóculos, os valores iniciais de pH e ácido láctico foram 5,94 e 0,16% (Figuras 8 e 9), respectivamente. Após o período de 6 horas de processo, a concentração de ácido láctico elevou-se para 0,30% e o pH reduziu para 4,87. Comportamento semelhante foi encontrado no monitoramento da produção da bebida fermentada. Os valores encontrados de pH variaram de 6,02 a 4,76 e a concentração de ácido láctico elevou de 0,35 para 0,71%.

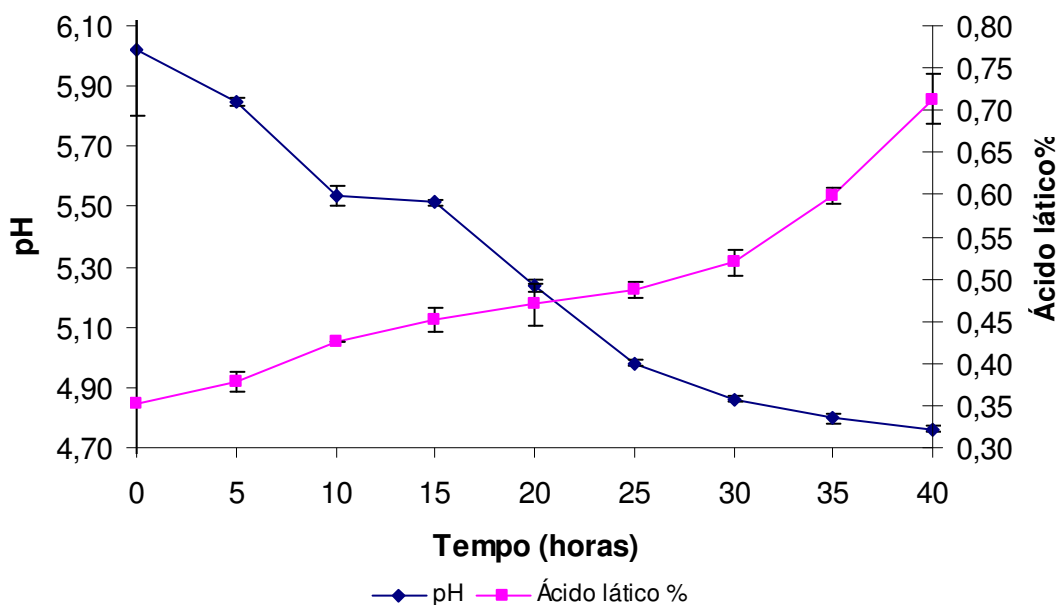


**Figura 8.** Síntese de ácido láctico e variação do pH resultante da fermentação do inóculo.

**Tabela 3.** Modelagem do pH, porcentagem de ácido lático e os coeficientes de determinações do *L. plantarum*-Lp 115 no inóculo.

Equações	
$\text{pH} = -0,1826x + 5,994$	$R^2=0,9704$ (7)
$\text{Ácido lático \%} = 0,0241x + 0,164$	$R^2=0,9522$ (8)

Estudos demonstraram que um período de fermentação de 9 horas foi suficiente para que a síntese de ácidos orgânicos, metabolizados pelo *L. plantarum*, influenciasse a redução do pH do caldo de cana de 6,6 para 3,9 (GUPTA et al., 2011). Estes pesquisadores ainda explanaram outros parâmetros importantes como o período de fermentação, a concentração de sacarose e a ausência de agitação durante o bioprocesso. Em um estudo *in vitro*, os *L. plantarum* demonstrou apresentar uma elevada tolerância à presença do ácido clorídrico (pH 2,0) (VRIES et al., 2006).



**Figura 9.** Síntese de ácido lático e variação do pH resultante da fermentação do leite fermentado.

Estudos também apontam que o *L. plantarum* ATCC 21028 possui um grande potencial de síntese de ácido lático, em um pH próximo a 5,5 durante um período de 36 a 40 horas de bioprocesso. Entretanto, a concentração de lactose no

meio não foi completamente esgotada após uma semana de fermentação (FU; MATHEWS, 1999).

**Tabela 4.** Modelagem do pH, porcentagem de ácido láctico e os coeficiente de determinações do *L. plantarum*-Lp 115 no leite fermentado.

Equações	
$\text{pH} = 0,0004x^2 - 0,0511x + 6,0585$	$R^2 = 0,9816$ (9)
$\text{Ácido láctico} = 0,0002x^2 + 0,0012x + 0,3716$	$R^2 = 0,9541$ (10)

## 6.2 Avaliação dos efeitos da ingestão de *L. plantarum* sobre as análises laboratoriais

### 6.2.1 Ácido úrico

A administração do leite fermentando contendo os *L. plantarum*-Lp 115 não foi suficiente para promover reduções ( $p > 0,05$ ) nos níveis de ácido úrico (Tabela 6) dos sujeitos participantes da pesquisa (Tabela 5) nos tempos avaliados. Os valores iniciais de ácido úrico encontrados no grupo de suplementação e placebo foram de 5,35 e 5,38 mg/dL, respectivamente. A diferença encontrada de 0,56% não apresenta diferença estatística ( $p = 0,7260$ ) entre os grupos avaliados. No final do período de suplementação, o desenvolvimento dos micro-organismos na microbiota dos indivíduos não foram suficiente ( $p > 0,05$ ) para influenciar os níveis de ácido úrico durante as 6 semanas de administração. Os níveis de ácido úrico do grupo de suplementação atingiu 5,82 mg/dL, enquanto que o grupo placebo reduziu para 5,26 mg/dL e a diferença de 10,16% ( $p = 0,1870$ ) dos efeitos individuais não foram suficiente para apresentar qualquer influência do *L. plantarum*-Lp 115 durante as seis semanas de ingestão.

Além disso, uma pesquisa avaliou a capacidade de colonização intestinal de 5 cepas de *L. casei* e os possíveis efeitos benéficos sobre a saúde de 25 ratos durante 10 dias de administração de leite fermentado. Após o período de

suplementação os micro-organismos avaliados não influenciaram os níveis de ácido úrico (MINELLI et al., 2004). Em outro estudo, evidências sugerem que a suplementação de leite fermentado por uma cultura binária (*L. GG* e *L. gasseri*) durante 10 semanas não foi suficiente para apresentarem qualquer efeito significativo sobre os níveis de ácido úrico entre os 40 voluntários selecionados na cidade japonesa de Kanagawa (KAWASE et al., 2009).

**Tabela 5.** Avaliação dos parâmetros clínicos e dos marcadores de lesão hepática em pacientes com Síndrome Metabólica submetidos ou não ao tratamento com *L. plantarum* Lp-115.

Parâmetros	Grupo placebo (n=20)	Grupo de suplementação (n=17)	p
Gênero (M/F) <sup>a</sup>	(13/7)	(10/7)	0,5206
Caucasiano/não Caucasiano <sup>a</sup>	(10/10)	(12/5)	0,3152
Medicamentos de hipertensão (%) <sup>a</sup>	3 (15,0)	4 (23,5)	0,6800
Idade (anos) <sup>b</sup>	49,0 (40,0-54,75)	49,0 (40,0-52,0)	0,6980
CA <sup>b</sup>	102,0 (96,0-106,0)	98,0 (91,0-118,0)	0,1947
IMC <sup>b</sup>	27,85 (26,38-30,34)	27,86 (25,49-30,80)	0,9062
PAS <sup>b</sup>	13,0 (11,0-14,0)	12,0 (11,0-13,0)	0,4307
PAD <sup>b</sup>	8,0 (7,0-9,0)	8,0 (7,0-8,0)	0,2192
*AST (U/L) <sup>b</sup>	25,5 (21,25-36,25)	24,0 (18,50-43,50)	0,5418
*ALT (U/L) <sup>b</sup>	38,0 (34,0-45,0)	29,0 (28,5-56,0)	0,4466

Teste qui-quadrado<sup>a</sup>. Teste Mann-Whitney<sup>b</sup>. Os dados são expressos como mediana (25%-75%). M/F: masculina/feminino; CA: Circunferencia abdominal; IMC: índice de massa corporal; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial distólica; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanino aminotransferase. \*Marcadores de lesão hepática.

## 6.2.2 Homocisteína

Os níveis iniciais de homocisteína do grupo de suplementação foram de 13,36  $\mu\text{mol/mL}$  e após um período de 6 semanas de suplementação a quantidade desta molécula chegou a 13,42  $\mu\text{mol/mL}$  (Tabela 6). Dessa forma, a variação de 0,44% ( $p=0,8129$ ) não representa nenhuma influência do consumo da bebida fermentada sobre os níveis de homocisteína. O nível inicial desta molécula no grupo placebo foi de 15,12  $\mu\text{mol/mL}$  e ao final do experimento a concentração reduziu para

14,92  $\mu\text{mol/mL}$ , ocorrendo uma queda de 1,34% ( $p=0,1978$ ). Diante destes fatos, não houve diferença estatística ( $p<0,05$ ) em relação aos níveis de homocisteína entre o grupo de suplementação e placebo.

Quando as concentrações de homocisteína de ambos os grupos avaliados são comparadas entre si no início do experimento, existia uma diferença de 11,64% ( $p=0,3686$ ) que indica que houve homogeneidade entre os grupos estudados, pois essa variação não apresentou diferença significativa ( $p>0,05$ ). Durante as seis semanas de ingestão do leite fermentado, não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre as variações ocorridas nos níveis de homocisteína de cada grupo experimental. Ambos os grupos de suplementação e placebo apresentaram uma pequena diferença de 3,63% ( $p=0,4280$ ), respectivamente. Durante o período de 6 semanas de intervenção com o leite fermentado os efeitos ocorridos nos níveis de homocisteína não foram estatisticamente significativos para apresentarem efeitos benéficos a saúde dos indivíduos participantes.

**Tabela 6.** Avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e inflamatório em pacientes com Síndrome Metabólica submetidos ou não ao tratamento com *L. plantarum* Lp-115.

Parâmetros	Grupo placebo (n=20)			Grupo de suplementação (n=17)		
	T0	T6	p	T0	T6	p
Glicose (mg/dL)	94,00 (85,75-97,75)	94,00 (96,0-99,75)	0,8679	91,00 (86,00-100,00)	93,00 (86,50-103,00)	0,1312
*Insulina <sup>b</sup> ( $\mu\text{U/mL}$ )	11,20 (6,30-16,82)	8,15 (6,225-13,48)	0,1165	9,10 (6,950-14,90)	10,50 (8,65-15,10)	0,1963
Ácido úrico (mg/dL)	5,38 (4,298-5,923)	5,26 (4,200-5,678)	0,4688	5,35 (4,070-6,855)	5,82 (4,140-7,030)	0,2763
PCR (mg/dL)	2,27 (0,830-4,293)	2,26 (0,953-5,470)	0,8092	2,57 (1,205-17,90)	1,63 (1,038-7,465)	0,8469
Homocisteína (mg/dL)	15,12 (11,98-16,82)	14,92 (12,69-18,12)	0,1978	13,36 (10,71-15,44)	13,42 (10,51-15,89)	0,8129
**Hemoglobina (g/dL) <sup>b</sup>	15,50 (13,83-16,95)	15,00 (14,0-16,68)	0,2178	14,70 (13,20-13,80)	15,30 (15,85-16,45)	*0,041
Leucócitos (leucócitos/mm <sup>3</sup> )	6400 (4.950-6.950)	6570 (5.550-8088)	0,0963	5.700 (5.200-7.615)	5.900 (5.450-7.600)	0,0798

O teste Wilcoxon foi realizada para verificar combinação de pares e alterações da linha de base (mudança intra-grupo). O teste Mann-Whitney<sup>b</sup> foi realizado para comparar as diferenças entre os parâmetros de grupo e as diferenças entre os grupos de tratamento (mudanças inter-grupo). Os dados são apresentados como a mediana (25% -75%). As diferenças significativas (\* $p<0,05$  e \*\* $p<0,01$ ). Não houve diferença entre grupos de tratamento ( $p> 0,05$ ). T0: 0 semana; T6: 6 semanas.

Apesar dos resultados obtidos não demonstrarem nenhuma influência dos *L. plantarum*-Lp 115 sobre os níveis de homocisteína, Hugenschmidt et al. (2010) avaliaram o potencial de produção de ácido fólico por 151 bactérias ácido-lácticas e 14 bactérias propiônicas. Dentre os micro-organismos envolvidos na pesquisa, os *L. plantarum* SM39 foram os maiores produtores de ácido fólico dentre as culturas empregadas nesta pesquisa *in vitro*, atingindo uma produção otimizada de 397,60 ng/mL. Eles concluíram que este micro-organismo apresentou um elevado potencial para futuras aplicações em processos fermentativos.

Estudos realizados nos últimos 10 anos demonstram que uma dieta deficiente em ácido fólico e ausência do gene responsável pela enzima metilenotetrahidrofolato redutase contribuem diretamente para elevação dos níveis séricos de homocisteína (PEREIRA et al., 2004; HAIDEMENOS et al., 2007).

### 6.2.3 Proteína carbono-reativa

Os exames laboratoriais iniciais (Tabela 6) do grupo de suplementação apresentaram um nível de PCR de 2,6 mg/dL, sendo que este valor sofreu uma redução de 38,46% chegando a 1,6 mg/dL ( $p=0,8469$ ). A redução resultante do período de 6 semanas de ingestão não foi influenciada pela bebida fermentada ( $p>0,05$ ). Além disso, o grupo de suplementação não apresentou diferença estatística em relação ao grupo placebo. Pois, os níveis de PCR do grupo placebo foram de 2,27 mg/dL e após as 6 semanas definidas pelo design experimental essa concentração reduziu para 2,26 mg/dL, ocorrendo uma queda de 0,44% ( $p=0,8092$ ).

Ao final da fase experimental, observa-se que não existiu nenhuma diferença estatística ( $p>0,05$ ) quando as variações ocorridas em ambos os grupos experimentais foram avaliadas. Os grupos apresentaram homogeneidade no início da pesquisa, pois a diferença de 13,21% ( $p=0,4929$ ) não apresentou diferença significativa. Logo, a diferença de 6,28% ( $p=0,3864$ ) demonstra que a ingestão de leite fermentado não foi suficiente para que o produto influenciasse uma redução significativa sobre essa resposta inflamatória hepática.

Segundo Saxelin et al. (2010), investigaram a sobrevivência e resistência de 4 probióticos administrados simultaneamente em 3 matrizes alimentares (cápsulas, queijos e iogurtes) contendo *P. freudenreichii subsp. shermanii* JS, *B. animalis*, *L. rhamnosus* GG e *L. rhamnosus* LC705 através de exames clínicos. Durante as 2

semanas de suplementação com a dosagem de  $10^{10}$ UFC/dia, a cultura mista não apresentou nenhum efeito significativo nos níveis de PCR dos 36 sujeitos avaliados.

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem que alguns micro-organismos não possam promover reduções nos níveis de PCR, alguns estudos demonstram que a suplementação diária de 40 indivíduos fumantes com uma dosagem de  $2,5 \times 10^9$  UFC/dia de *L. plantarum* 299v reduziram significativamente em 22% os níveis de PCR em 6 semanas de estudo, e este declínio também foi estatisticamente correlacionado com a concentração sanguínea de propionato resultante do metabolismo da cultura láctica (NARUSZEWICZ; BUKOWSKA; MILLO, 2003).

#### 6.2.4 Glicemia

Durante as 6 semanas de experimento, o leite fermentado não influenciou a uma redução significativa dos níveis de glicose ( $p > 0,05$ ) durante o período de intervenção (Tabela 6). Os resultados iniciais dos exames clínicos realizados antes da ingestão do *L. plantarum*-Lp 115 apresentou um nível glicêmico de 91mg/dL e após as 6 semanas de suplementação ocorreu um pequeno aumento de 93mg/dL. Dessa forma, essa elevação de 2,19% ( $p = 0,1312$ ) não representa nenhuma modificação no nível de glicemia no grupo de suplementação. Entretanto, o grupo placebo não apresentou variação nos valores obtidos após o mesmo período de tempo avaliado. Os níveis de glicemia permaneceram estáveis em 94 mg/dL ( $p = 0,8679$ ).

Os níveis de glicemia encontrados nos grupos de suplementação e placebo não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ), o que indica que os dados eram homogêneos no período inicial da pesquisa mesmo com uma diferença de 3,19% ( $p = 0,6817$ ). No final do experimento, a variação de 1,96% ( $p = 0,2964$ ) existente sobre o efeito ocorrido em cada grupo, indica que o leite fermentado não apresentou resultados que indiquem alguma influência positiva ou negativa sobre a glicemia dos sujeitos avaliados.

Em outra pesquisa realizada com ratos obesos e hiperinsulinêmicos, o consumo diário de pão a base de trigo contendo  $1 \times 10^9$ - $5 \times 10^9$  UFC/dose de *L. plantarum* 299v não apresentou nenhum efeito positivo sobre o metabolismo da glicose durante 14 dias de intervenção. No entanto, a dieta composta pelo mesmo

pão e ácido láctico foi o suficiente para promover reduções nos níveis da glicose sanguínea (ÖSTMANA et al., 2005).

Entretanto, uma pesquisa recente realizada por Ejtahed et al. (2011) relataram melhorias no metabolismo da concentração de glicose em 64 pacientes diabéticos através do consumo de 300g diárias de iogurte probiótico contendo  $1,79 \times 10^6$  UFC/g de *B. lactis* Bb12 e  $1,85 \times 10^6$  UFC/g de *L. acidophilus* La5 durante 6 semanas de suplementação.

### 6.2.5 Insulina

Os valores referentes à insulina (Tabela 6) encontrada inicialmente através dos exames foram homogêneos ( $p > 0,05$ ), sendo que o grupo de suplementação e placebo possuíam 9,10 e 11,20  $\mu\text{U/mL}$ , respectivamente. Ao final da fase experimental, os níveis de insulina do grupo de suplementação atingiram 10,50  $\mu\text{U/mL}$  e a do grupo placebo reduziu para 8,15  $\mu\text{U/mL}$ . Dessa forma, os *L. plantarum*-Lp 115 não promoveram nenhum efeito benéfico sobre a saúde dos voluntários do grupo de suplementação, pois a insulina elevou-se 15,38% ( $p = 0,4758$ ), enquanto que o leite esterilizado contribuiu para uma redução significativa de 27,23% ( $p = 0,0232$ ) durante o período de suplementação.

Quando comparamos as variações dos efeitos resultantes do período de administração entre os grupos experimentais após 6 semanas de intervenção, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre eles. O efeito promovido pelo consumo do produto lácteo esterilizado influenciou uma redução de 15,69% na concentração de insulina do grupo placebo, enquanto que o leite fermentado promoveu uma elevação de 8,33% no grupo de suplementação. Este resultado sugere que a diferença de 24,02% ( $p = 0,0232$ ) demonstra que o leite fermentado promoveu uma elevação dos níveis deste hormônio quando comparado aos efeitos originados pela ingestão de leite esterilizado no mesmo período de tempo.

Em contraste ao resultado encontrado nesta pesquisa, Angelakis et al. (2012) avaliaram o efeito promovido pelo desenvolvimento dos *L. ingluviei* CIP 102980 na microbiota intestinal de aproximadamente 30 camundongos saudáveis durante 90 dias de administração. Estes pesquisadores relataram que a dosagem diária de  $10^{10}$  UFC/mL deste micro-organismos influenciaram a redução da concentração de insulina nos animais em que foram administrados.

Em contrapartida, pesquisadores investigaram uma cultura probiótica composta por bactérias dos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* sobre o acúmulo de gordura nos tecidos hepáticos em camundongo durante 4 semanas (MA; HUA; LI, 2008). Os resultados apontaram que a suplementação diária com água estéril contendo  $1,5 \times 10^9$  UFC/dose destes micro-organismos influenciaram no processo inflamatório das células hepáticas NKT que, por consequência, aumentou os níveis de insulina.

#### **6.2.6 Triacilglicerídeos, Colesterol –LDL, Colesterol-HDL e Colesterol Total**

Os níveis de triacilglicerídeos (Tabela 7) analisado no grupo de suplementação apresentaram uma tendência à elevação durante o consumo de leite fermentado ao longo do experimento ( $p > 0,05$ ). Podemos observar que os resultados iniciais de triacilglicerídeos apresentaram 181 e 159,50 mg/dL nos grupos de suplementação e placebo, respectivamente. A variação de 13,48% ( $p = 0,2792$ ) demonstram homogeneidade dos dados antes da fase de ingestão inicial. Ao final do período de consumo do *L. plantarum*-Lp 115, os níveis de triacilglicerídeos aumentaram nos 2 grupos abordados, sendo que o grupo de suplementação foi o que apresentou a maior elevação e a diferença de 18% ( $p = 0,1816$ ) entre os grupos não foram significativo.

Ambos os grupos avaliados não apresentaram nenhuma mudança significativa no decorrer da fase experimental, mas o grupo de suplementação apresentou tendência à elevação dos níveis de triacilglicerídeos. Os níveis encontrados nos grupos de suplementação foram de 181 e 234mg/dL, que resultou em uma elevação de 29,28% ( $p = 0,0522$ ) e os níveis do grupo placebo variaram de 159,50 e 152,50 mg/dL com uma queda de 4,39% ( $p = 0,2549$ ). Estes resultados demonstram que o leite fermentado apresentou uma tendência para elevação dos níveis de triacilglicerídeos.

Entretanto, as concentrações de iniciais de colesterol total (Tabela 7) no grupo de suplementação apresentaram elevação ( $p < 0,05$ ) durante o consumo de leite fermentado durante 6 semanas de administração de leite fermentado. Os resultados iniciais de colesterol total foram de 196 e 225,50mg/dL nos grupos de suplementação e placebo, respectivamente. A diferença de 15,05% ( $p = 0,0293$ ) foi significativa, ou seja, não existiu homogeneidade entre os dados antes do início da

pesquisa. No final do período de consumo do *L. plantarum*-Lp 115, a concentração do colesterol total do grupo de suplementação atingiu 214mg/dL e o no grupo placebo reduziu para 204mg/dL. Dessa forma, os grupos avaliados apresentaram diferença significativa no decorrer da fase experimental. O grupo de suplementação apresentou uma elevação de 9,18% ( $p=0,0467$ ) dos níveis de colesterol total, enquanto que a redução de 9,53% ( $p=0,0066$ ) dos níveis encontrados nos grupos placebo no final do período de administração apresentou diferença significativa.

**Tabela 7.** Avaliação do perfil lipídico em pacientes com Síndrome Metabólica submetidos ou não ao tratamento com *L. plantarum*-Lp 115.

Parâmetros	Grupo placebo (n=20)			Grupo de suplementação (n=17)		
	T0	T6	p	T0	T6	p
Triacilglicerídeos (mg/dL)	159,50 (114,5-231,5)	152,50 (105,5-221,8)	0,255	181,00 (150,5-220,5)	234,00 (164,5-277,5)	0,052
**Colesterol total <sup>b</sup> (mg/dL)	225,50 (195,5-241,5)	204,00 (183,0-234,0)	0,007	196,00 (169,5-221,5)	214,00 (193,0-235,0)	0,047
**Colesterol LDL <sup>b</sup> (mg/dL)	153,00 (131,5-167,0)	137,00 (115,3-156,3)	0,025	129,00 (95-147,5)	131,00 (108,5-150,5)	0,108
Colesterol HDL (mg/dL)	43,50 (37,5-52,50)	39,50 (31,75-49,75)	0,046	35,00 (32,5-46,0)	38,00 (31,0-46,0)	0,568

O teste Wilcoxon foi realizada para verificar combinação de pares e alterações da linha de base (mudança intra-grupo). O teste Mann-Whitney<sup>b</sup> foi realizado para comparar as diferenças entre os parâmetros de grupo e as diferenças entre os grupos de tratamento (mudanças inter-grupo). Os dados são apresentados como a mediana (25% -75%). As diferenças significativas (\* $p<0,05$  e \*\* $p<0,01$ ). Não houve diferença entre grupos de tratamento ( $p>0,05$ ). T0: 0 semanas; T6: 6 semanas.

Os efeitos resultantes da bebida fermentada apresentaram diferença significativa ( $p<0,05$ ) em ambos os grupos. A concentração de colesterol total resultante da administração da bebida fermentada apresentou uma elevação de 5,16% ( $p=0,0467$ ), enquanto que os resultantes do grupo placebo reduziu para 6,15% ( $p=0,0066$ ). Estes resultados demonstram que o leite esterilizado influenciou a redução dos níveis de colesterol total.

A concentração de colesterol-HDL (Tabela 7) no grupo de suplementado com leite fermentado apresentou uma pequena elevação não significativa no decorrer das semanas de avaliação. Os níveis iniciais de colesterol-HDL nos grupos de suplementação e placebo foram de 35 e 43,50mg/dL, respectivamente. Dessa forma, os dados não apresentaram homogeneidade, pois a diferença de 24,28% ( $p=0,0493$ ) foi significativo. Durante o período de consumo da bebida fermentada, a concentração do colesterol-HDL dos indivíduos pertencentes ao grupo de

suplementação subiu para 38mg/dL, enquanto os níveis encontrados no grupo placebo reduziu para 39,50mg/dL. Assim, a elevação de 8,57% da concentração resultante do período de ingestão do grupo de suplementação não foi significativo ( $p=0,5683$ ). Entretanto, os voluntários do grupo placebo apresentaram uma redução significativa de 9,19% ( $p=0,0455$ ) dos níveis encontrados, o que indica que a queda dos níveis do colesterol total pode ter influenciado a variação desta lipoproteína no final do experimento.

Conseqüentemente, os efeitos ocorridos em cada grupo experimental apresentaram uma tendência estatística. Pois, a concentração de colesterol-HDL apresentou uma diferença de 2,09% ( $p=0,0733$ ) entre os grupos avaliados no final do experimento.

No início do experimento, as concentrações de colesterol-LDL (Tabela 7) não foram homogêneas e a diferença inicial de 15,68% ( $p=0,0100$ ) apresentou diferença significativa. O grupo de suplementação e placebo apresentaram os níveis de 129 e 153mg/dL, respectivamente. Durante o período de consumo do leite fermentado, os níveis de colesterol-LDL elevaram-se para 131mg/dL e a concentração do grupo placebo reduziu para 137mg/dL. A diferença de 1,55% ( $p=0,1084$ ) resultante do consumo de 6 semanas no grupo de suplementação não apresentou diferença significativa no decorrer da fase experimental, mas o grupo placebo apresentou uma redução de 10,45% ( $p=0,0066$ ) nos níveis de colesterol-LDL.

Dessa forma, os efeitos da ingestão do *L. plantarum* resultaram em uma diferença significativa ( $p<0,01$ ) entre os grupos avaliados. Os níveis de colesterol-LDL dos grupos de suplementação e placebo apresentaram reduções de 6,62 e 10,78%, respectivamente. A diferença de 3,51% ( $p=0,0032$ ) entre os efeitos demonstra que a ingestão de leite esterilizado contribuiu para a redução do colesterol-LDL durante as 6 semanas de intervenção.

Estes resultados demonstram que os *L. plantarum*-Lp 115 não demonstraram nenhuma influência sobre os níveis lipídicos dos voluntários durante as 6 semanas de experimento. A redução do colesterol total influenciou diretamente os efeitos ocorridos nos níveis de colesterol-HDL e colesterol-LDL. No entanto, o leite esterilizado apresentou um grande potencial hipocolesterolêmico conforme as condições experimentais estabelecidas conforme o design experimental.

Outra pesquisa realizada por Bukowska et al. (1997) demonstrou que a suplementação diária de 30 voluntários hipercolesterolêmicos com *L. plantarum* 299v influenciou na redução dos níveis de colesterol total e colesterol-LDL, enquanto que as concentrações de colesterol-HDL e triacilglicerídeos não apresentaram nenhuma variação durante o período de 6 semanas de avaliação. Dessa forma, os pesquisadores concluíram que a ingestão dessa cultura deveria ser recomendada na dieta de pacientes com níveis de colesterol moderadamente elevados.

Estudos demonstraram que a ingestão de 45g de soja combinada com uma dosagem de  $10^{10}$  UFC/dia iogurte probiótico (*L. acidophilus*, *B. bifidus* e *L. GG*) ou prebiótico (amido resistente) durante 14 semanas poderiam modificar o metabolismo dos 31 voluntários saudáveis (LARKIN; ASTHEIMER; PRICE, 2009). Pois, os resultados sugerem um sinergismo no período de suplementação entre a dieta regular a base de soja, probióticos e prebióticos, já que ambas as combinações reduziram os níveis de colesterol total.

Além disso, 2 estudos clínicos paralelos foram realizados com suplementação diária de leite fermentado contendo uma dosagem de  $2 \times 10^9$  UFC de *L. acidophilus* L1 e *L. acidophilus* ATCC 43121 demonstraram que ambos os micro-organismos apresentaram potencial hipocolesterolêmicos. No entanto, o colesterol-LDL reduziu em 3,9% nos 14 indivíduos suplementados com *L. acidophilus* L1 e 5,9% nos 15 voluntários alimentados com *L. acidophilus* ATCC 43121 na primeira pesquisa durante 3 semanas. No segundo estudo, não houve efeitos significativos ao 19 membros do grupo placebo durante o período de avaliação e os 21 voluntários pertencentes ao grupo de suplementado com *L. acidophilus* L1 apresentou uma redução média de 3,2% e 4,1% dos níveis de colesterol total e colesterol-LDL em 4 semanas de intervenção, respectivamente (ANDERSON; GILLILAND, 1999).

Outro trabalho analisou os efeitos da suplementação de 46 voluntários hipercolesterolêmicos com *L. fermentum* encapsulados contendo  $2 \times 10^9$  UFC/microcapsula durante 10 semanas. O consumo diário de duas cápsulas contendo o micro-organismo não apresentou efeitos significativos em relação às análises realizadas durante o período de experimento. Entretanto, esta bactéria não apresentou patogenicidade e sim uma boa tolerância por parte dos voluntários (SIMONS; AMANSEC; CONWAY, 2006).

Segundo Higashikawa et al. (2010), a administração diária de iogurte contendo  $2 \times 10^{10}$  UFC/dose de *L. plantarum* SN13T em um grupo de pesquisa

apresentou maior potencial hipocolesterolêmico, quando os resultados clínicos destes 24 voluntários saudáveis foram comparados aos níveis encontrados no final do mesmo período de consumo de outros grupos suplementados com iogurte contendo a mesma dosagem de *Lc. lactis* A6 e *St. thermophilus* 510 durante as 6 semanas de avaliação.

Um estudo realizado com 18 ratos induzidos a diabetes demonstrou que o consumo de um produto lácteo indiano fermentado uma cultura binária (*L. acidophilus* e *L. casei*) durante 8 semanas de suplementação, apresentou efeitos significativos sobre a redução das concentrações de triacilglicerídeos, colesterol total, colesterol-HDL e colesterol-LDL pelo sinergismo resultante do desenvolvimento entre as culturas (YADAV et al., 2007).

Segundo Minelli et al. (2004), avaliaram o potencial hipocolesterolêmico de 4 linhagens distintas de *L. casei* em um estudo com 25 ratos, suplementado diariamente com  $10^9$  UFC/dose durante 10 dias de experimento. Ambas as culturas avaliadas apresentaram efeitos significativos sobre a redução dos níveis de triacilglicerídeos e aumento do colesterol-HDL.

Estudos recentes relataram que o iogurte probiótico contendo  $10^{10}$  UFC/dose de *L. paracasei* LPC37 e enriquecido com cálcio promoveu efeitos benéficos à saúde dos 32 voluntários hipercolesterolêmicos. Esta dosagem diária foi suficiente para influenciar a queda dos níveis de colesterol total e colesterol-LDL. Porém, a concentração de triacilglicerídeos e do colesterol-HDL não apresentaram nenhuma mudança significativa e os pesquisadores concluíram que o sinergismo obtido pela bebida fermentada enriquecida modulou a concentração lipídica sanguínea (TRAUTVETTER et al., 2011).

Através de um estudo realizado com um grupo de 26 indivíduos portadores de dislipoproteinemia, Doncheva et al. (2002) relataram que a suplementação diária de leite fermentado contendo  $8 \times 10^{10}$  UFC/dose de *L. bulgaricus* GB N1 apresentou reduções nos níveis de triacilglicerídeos e nas frações de colesterol-LDL e colesterol-HDL através do consumo diário de uma bebida fermentada.

Um estudo investigou o impacto de um produto fermentado a base de aveia contendo *Pediococcus damnosus* 2.6 sobre a redução da concentração de lipídios plasmáticos durante 5 semanas em 56 indivíduos saudáveis (MÄRTENSSON et al., 2005). Além disso, os pesquisadores relataram que somente a redução da concentração de colesterol total e colesterol-LDL apresentaram diferença

significativa quando comparados aos níveis resultantes do consumo de iogurte probiótico contendo *L. acidophilus* La5 pelo outro grupo experimental.

Em contraste, Savard et al. (2011) não observaram diferença significativa entre os voluntários saudáveis que ingeriram iogurte probiótico comercial contendo  $10^9$ UFC/dose de *B. lactis* BB 12 e *L. acidophilus* LA-5, sobre os níveis das lipoproteínas avaliadas pelos exames clínicos realizados durante 4 semanas de intervenção.

A biodisponibilidade de minerais e outros elementos traços como zinco, magnésio, manganês, selênio e ferro se elevam em função da ingestão de proteínas e peptídeos originários do leite (VEGARUD; LANGSRUD; SVENNING, 2000).

Um experimento realizado por Trautvetter et al. (2011) relataram que a suplementação com uma combinação de *Lactobacillus paracasei* LPC37 e penta cálcio hidroxitrifosfato influenciou a redução dos níveis de colesterol-LDL em voluntários hipercolesterolêmicos. A ingestão de cálcio foi diretamente associada com a elevação da concentração de colesterol-HDL em mulheres (DROUILLET et al., 2007) e redução dos níveis colesterol total durante 2 semanas de administração oral (CARLSON et al., 1971).

Por outro lado, Ditscheid; Keller; Jahreis (2005) observaram que o metabolismo do colesterol é resultante da modulação do aumento da excreção de ácidos biliares originados do colesterol endógeno do fígado. Já Singh et al. (2007) evidenciaram que o aumento da retenção de cálcio no organismo depende do pH resultante da fortificação de sais de cálcio e da estabilidade térmica resultante do tratamento térmico empregado no produto.

Estudos demonstram que não existiu diferença entre os níveis de colesterol entre indivíduos suplementados com iogurte e cálcio (THAKUR; JHA, 1981). O resultado evidencia que a concentração de cálcio pode ser um fator responsável pela redução dos níveis de colesterol, porém outros agentes responsáveis pelo efeito hipocolesterolêmico podem ter influenciado o resultado da pesquisa.

Entretanto, outros pesquisadores relataram a redução de 33% na concentração de triacilglicerídeos após a ingestão de uma dieta composta de sais de cálcio, mas não houve diferença significativa quando o tratamento foi comparado com a ingestão de clorofibrato no final do experimento (LEHTONEN; VIKARI, 1979).

Este resultado foi semelhante ao encontrado por Mitchell; Fyfe; Smith (1968), em que os efeitos da ingestão de cálcio foram avaliados em um grupo de voluntários recrutados e os resultados demonstraram que os níveis de triacilglicerídeos apresentaram poucas alterações basais durante o período de intervenção.

O leite esterilizado influenciou a redução significativa dos níveis de colesterol total, colesterol-LDL e colesterol-HDL no grupo placebo, o que demonstra que o tratamento térmico poderia ter induzido à ocorrência de alterações tecnológicas das macromoléculas alimentares, disponibilizando frações de peptídeos biotivos que influenciaram um possível efeito hipocolesterolêmico.

Os peptídeos bioativos desempenham um papel importante na regulação do metabolismo durante o processamento de alimentos ou na digestão gastrintestinal, sugerindo a sua utilização em produtos funcionais ou nutracêuticos devido aos efeitos benéficos providos ao consumo (CÁNOVAS et al., 2011). Uma recente pesquisa *in vitro*, pesquisadores avaliaram o comportamento dos peptídeos bioativos e sugeriram que a toxicidade proveniente da atividade do pH pode influenciar diretamente as ações de muitos peptídeos bioativos como arginina e lisina (TU et al., 2009).

Nagaoka et al. (2001) realizaram um estudo *in vivo* cujo objetivo foi esclarecer os mecanismos responsáveis pelo efeito hipocolesterolêmico através da administração de  $\beta$ -sitosterol, Isoleucina-Isoleucina-Alanina-Glutamato-Lisina (IIAEK), peptídeos hidrolizados das  $\beta$ -lactoglobulinas e caseínas. Eles concluíram que a redução da absorção das micelas mistas de colesterol ocorreu mediante interação com os peptídeos resultantes dos HTL.

Estudos realizados por Chatterton et al. (2006), evidenciam que o fragmento 71-75 de um peptídeo bioativo derivado do  $\beta$ -lactoglobulina apresentou potencial hipocolesterolêmico em ensaios realizados com ratos. O mecanismo de ação está relacionado com a insolubilidade micelar da molécula de colesterol, reduzindo sua absorção intestinal pela interação com o peptídeo no epitélio jejunal.

Diante disso, o efeito hipocolesterolêmico dos peptídeos foi apresentado em uma pesquisa realizada com ratos, em que os pesquisadores também sugeriram que a redução da solubilidade micelar do colesterol pelo fragmento protéico foi o

principal responsável pela queda dos níveis de triacilglicerídeos e colesterol-LDL+colesterol-VLDL durante 30 dias de suplementação (ZHONG et al., 2007).

Evidências sugerem que a composição específica dos aminoácidos da dieta podem reduzir os níveis de colesterol plasmático, mas os mecanismos responsáveis pelo efeito hipocolesterolêmico ainda não foram totalmente identificados (ERDMANN et al., 2008).

As atividades e biodisponibilidade dos peptídeos bioativos sofrem reduções mediante as alterações promovidas dos tratamentos térmicos realizados no leite (KORHONEN et al., 1998). Estes pesquisadores relataram ainda que a esterilização e o tratamento térmico UHT (*ultra high temperature*) podem destruir cerca de 10 a 15% e menos de 2% da concentração de lisina disponíveis na matriz, respectivamente.

Outros estudos realizados por Erdmann et al. (2008), demonstram que a lactosstatina é uma enzima responsável pelo metabolismo e consequente efeito hipocolesterolêmico pela indução da transcrição dos genes humano conhecidos como 7 $\alpha$ -hidroxilase (CYP7A1).

Estudos demonstram que diferentes tratamentos térmicos podem alterar o padrão proteolítico das  $\beta$ -lactoglobulina pelo processo de hidrólise, originando sequências peptídicas como IRL e LQKW que se formam rapidamente pela elevação da temperatura do processo que promovem sítios de clivagem que não são acessíveis na proteína nativa (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2006).

Evidências sugerem que tripeptídeos composto de isoleucina-prolina-prolina (IPP) ou valina-prolina-prolina (VPP) derivados da caseína apresentaram atividade biológica na redução dos níveis lipídicos através do sinergismo resultante da adição de esteróis vegetais quando administrado na dieta de voluntários humanos por 10 semanas (TURPEINEN et al., 2009).

Outros pesquisadores extraíram aminoácidos assimilados entre as moléculas de ácidos biliares do processo digestivo para analisar os peptídeos com potencial hipocolesterolêmico. Dessa forma, as fontes de alimentos que possuem estes peptídeos funcionais foram identificadas e estão contribuindo para formulação de novos produtos (TAKESHITA et al., 2011).

Segundo Gibney (1983), as principais diferenças encontradas entre as proteínas da soja e caseína do leite é a concentração de glicina, alanina, lisina e arginina. Entretanto, os níveis de glicina-arginina e arginina isolada na dieta de coelhos não apresentam nenhuma influência significativa sobre o metabolismo lipídico.

### 6.2.7 Hemoglobina

Em nossa pesquisa, os níveis de hemoglobina (Tabela 6) elevaram-se durante o período avaliado. Na primeira avaliação clínica realizada no grupo de suplementação, o nível encontrado de hemoglobina foram de 14,70g/dL e este valor sofreu uma elevação durante o período de 6 semanas atingindo uma concentração de 15,30g/dL. O aumento do número inicial de hemoglobina neste grupo foi influenciado diretamente pela ingestão da bebida fermentada resultando em um aumento significativo de 4,08% ( $p=0,0041$ ). No entanto, a concentração inicial de hemoglobina presente no grupo placebo foi de 15,50g/dL, a concentração desta proteína sofreu uma pequena redução e chegou a 15g/dL, representando uma diferença não significativa de 3,33% ( $p=0,2178$ ).

A concentração de hemoglobina de ambos os grupos avaliados foram comparados entre si no período posterior as seis semanas de suplementação, a diferença inicial de 5,16% ( $p>0,05$ ) entre os níveis de hemoglobina dos grupos experimentais indicou homogeneidade dos dados avaliados ( $p=0,1308$ ). No final do período de administração, o leite fermentado apresentou uma elevação significativa de 1,95% ( $p=0,0033$ ). Estes resultados indicam que o consumo diário de 80mL de leite fermentado contendo  $10^8$  UFC/mL de *L. plantarum*-Lp 115 durante 6 semanas apresentou um efeito benéfico a saúde dos voluntários mediante as condições estabelecidas pelo design experimental.

Em um estudo recente e semelhante realizado com 53 voluntários saudáveis, os pesquisadores avaliaram a segurança e tolerabilidade dos *St. salivarius* K12 administrado diariamente com  $10^{10}$ UFC/dose através de exames clínicos. Durante 28 dias de suplementação com os sachês, os micro-organismos se desenvolveram na microbiota intestinal, mas não influenciou nenhuma variação dos níveis de hemoglobina e de outras análises hematológicas (BURTON et al. 2011).

A esse respeito, Silva et al. (2008) concluíram que houve uma correlação estatisticamente positiva entre a ingestão diária de uma bebida láctea enriquecida com ferro contendo  $8 \times 10^8$  UFC/dose de *St. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus* sobre o estado nutricional de 190 crianças após 101 dias de suplementação. As crianças que consumiram a bebida probiótica apresentaram um aumento nos níveis de hemoglobina. As evidências levaram aos pesquisadores a concluir que o desenvolvimento dos micro-organismos na microbiota influenciou a elevação da biodisponibilidade do ferro.

Segundo Rayes et al. (2002), a nutrição enteral composta de fibras e  $10^9$  UFC/dose de *L. plantarum* 299v não promoveu nenhuma variação nos níveis de leucócitos, PCR e hemoglobina entre os 30 indivíduos hospitalizados avaliados durante 10 dias de avaliações clínicas.

Outro estudo realizado com indivíduos diabéticos, os pesquisadores relataram que o iogurte consumido diariamente por 64 voluntários contendo  $10^8$  UFC/dose de *St. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *B. lactis* Bb12 e *L. acidophilus* La5 não promoveram nenhuma influência sobre as concentrações de hemoglobina, devido ao curto período de 6 semanas de ingestão (EJTAHED et al., 2011).

Estudos demonstram que a dieta diária de camundongos saudáveis com leite fermentado contendo  $4 \times 10^{12}$  UFC/dose contendo *St. thermophilus* RD 102 e RD 104 foi avaliada em um período experimental de 15 dias. Os dados posteriores à pesquisa demonstraram que os *St. thermophilus* RD 102 e RD 104 foram responsáveis pela elevação do número de hemoglobina em aproximadamente 15,7% e 14,8%, respectivamente (IYER; TOMAR, 2011). Estas bactérias ácido-láticas apresentaram uma grande produção de ácido fólico, conforme testes realizados antes do início da pesquisa. Além disso, uma pesquisa realizada por Jia et al. (2011), não encontrou diferença estatística entre o grupo de tratamento e controle em relação ao nível de hemoglobina entre 100 ratos saudáveis durante a ingestão de  $10^{10}$  UFC/peso de *L. paracasei* GM080 durante 90 dias. Diante desses fatos, resultados semelhantes também foram relatados por SHU et al. (1999), em que foram avaliados os efeitos do consumo diário de leite fermentado contendo *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* LC1 e *B. lactis* HN019 ( $5 \times 10^7$ ,  $10^9$  e  $5 \times 10^{10}$  UFC/dose, respectivamente) sobre o perfil hematológico de 156 camundongos saudáveis após a translocação bacteriana do trato gastrintestinal para o baço e rim. Ainda estes pesquisadores sugerem que esses micro-organismos não

influenciaram a concentração de hemoglobina e de outros parâmetros hematológicos e histológicos.

Em particular, Herías et al. (2005), induziram o surgimento de ulcera em 2 grupos compostos por 6 camundongos, em que os mesmos foram alimentados através de uma sonda intragástrica contendo  $10^8$ UFC/mL de *L. casei* Shirota YIT9029 e dextrina sulfato de sódio durante 10 dias. Os pesquisadores concluíram que ocorreu uma redução do nível de hemoglobina nos animais que faziam parte de ambos os grupos experimentais.

Segundo Pfeuffer e Schrezenmeir (2007), os produtos lácteos melhoraram a biodisponibilidade do ácido fólico em função a elevada afinidade com as proteínas do soro que formam uma proteção física contra os agentes do processo digestivo.

Alguns estudos demonstraram que as maiorias dos *Lc. lactis* possuem uma elevada capacidade de acumulo intracelular de folato, ao contrário dos *St. thermophilus* que apresentam extensa capacidade de excreção da mesma vitamina e o gênero *Lactobacillus* não possui condições metabólicas de síntese de ácido fólico, com exceção do *L. plantarum* (SYBESMA et al., 2003).

Outros autores como Hugenschmidt et al. (2010), reforçam estes argumentos quando compararam a síntese de ácido fólico entre bactérias lácticas e propiônicas. Dentre os micro-organismos selecionados, o *L. plantarum* SM39 foi único micro-organismo do gênero *Lactobacillus* que apresentou a maior capacidade de síntese de folato extracelular no caldo MRS, quando sua produção foi comparada a outras espécies avaliadas como *L. casei*, *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. fructivorans* e *L. reuteri*. Ainda estes pesquisadores relataram que o *L. plantarum* SM39 sintetizou em torno de 397ng/mL de ácido fólico, um volume considerado 8 vezes superior a quantidade produzida pelas 27 cepas de *L. plantarum* selecionadas para o experimento.

Diante disto, estes pesquisadores avaliaram o desenvolvimento dos *L. plantarum* SM39 em conjunto com o *Propionibacterium freudenreichii* DF13 formando uma cultura binária que sintetizaram simultaneamente um volume muito elevado de folato e vitamina B12 com uma produção de 8399 ng/mL e 751ng/mL, respectivamente. O processo ocorreu no caldo MRS enriquecido com proteínas do soro e otimizado em três dias fermentação anaeróbica seguida de quatro dias de aerobiose composta de proteínas do soro, cloreto de cobalto (II),

dimetilbenzimidazol e ácido parabenzóico (HUGENSCHMIDT; SCHWENNINGER; LACROIX, 2011).

Em uma pesquisa realizada com bactérias ácido-láticas produtoras de vitamina B6 em leite desnatado reconstituído, somente 8 micro-organismos apresentaram grande potencial de síntese de ácido fólico em 30 horas de fermentação. A *B. longum* B6 foi a bactéria estudada que mais sintetizou em caldo MRS. No entanto, o *St. thermophilus* 573 foi o menos eficiente dentro das condições experimentais avaliadas em caldo M17 (LIN; YOUNG, 2000).

Outros pesquisadores apontam o emprego de fontes vegetais como a beterraba como substrato para síntese de ácido fólico. Nestes experimentos, os pesquisadores utilizaram uma cultura mista composta por *L. plantarum*, *Lc. lactis* e *Leuconostoc* sp e obtiveram após 7 dias de fermentação aproximadamente 125mg de folato em caldo MRS e M17 (JÄGERSTADA; JASTREBOVAA; SVENSSON, 2004).

Evidências demonstram que o *St. thermophilus* foi o micro-organismo que mais sintetizou ácido fólico dentre as bactérias selecionadas e sua produção atingiu em torno de 50ng/g e quando combinado com uma *B. animalis* originando uma cultura binária a concentração de folato aumentou 6 vezes em leite fermentado (CRITTENDEN; MARTINEZ; PLAYNE, 2003). Ainda estes pesquisadores relataram que todas as espécies do gênero *Lactobacillus* selecionados para este experimento consumiram parte desta vitamina disponível no leite desnatado reconstituído durante a fermentação.

As bactérias ácido-láticas pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* se destacam na literatura pela grande capacidade de produção de folato. Segundo um experimento realizado com 76 espécies de *Bifidobacterium*, somente a *B. adolescentis* 239 MB foi único micro-organismo que não foi afetado por fatores externos como a presença da concentração de folato exógeno, para-aminobenzóico e fonte de carbono presente no meio durante a síntese de ácido fólico em aproximadamente 45 horas de fermentação em caldo MRS (POMPEI et al., 2007). Dessa forma, os pesquisadores concluíram que esse micro-organismo apresentou um grande potencial industrial para a elaboração de produtos probióticos e simbióticos.

Fatores ambientais e nutricionais são responsáveis pela presença de alguns genes específicos para a biosíntese de ácido fólico, sendo que estes não são encontrados em algumas espécies de bactérias lácticas, entretanto, a literatura relata que esses genes foram identificados em alguns micro-organismos pertencentes a este grupo como *Lc. latis*, *L. plantarum* e *L. bulgaricus* (IYER; TOMAR, 2009).

Os elevados níveis de ácido fólico são obtidos através de um fluxo equilibrado da fonte de carbono presente no meio, além de combinações entre os genes envolvidos na biosíntese de folato como o *pABA*. Este gene é responsável pela formação do ácido para-aminobenzóico (WEGKAMP et al., 2007). Na ausência de expressões gênicas como *PabA-PabB* e *PabC* envolvidos na síntese de para-aminobenzoato e folato, os *L. plantarum* realizam um processo de fermentação contínua para se desenvolverem (TEUSINK et al. 2005).

### 6.2.8 Leucócito

Avaliamos os níveis de leucócitos (Tabela 6) dos voluntários participantes e na primeira avaliação clínica realizada, os exames demonstraram que os níveis de leucócito do grupo de suplementação foram de 5700/mm<sup>3</sup> e após o período de suplementação o número de leucócitos atingiu 5900/mm<sup>3</sup>. Assim, o aumento de 3,50% ( $p=0,0798$ ) no nível de leucócitos deste grupo apontaram uma tendência estatística na elevação do número de leucócitos. O grupo placebo não apresentou nenhuma variação significativa em relação aos valores iniciais de leucócito foram de 6400/mm<sup>3</sup> e chegou a 6570/mm<sup>3</sup>, ocorrendo uma variação de 2,65% ( $p=0,0963$ ).

Em relação aos níveis de leucócitos, os dados não apresentaram nenhuma diferença significativa no início do experimento. Os valores foram comparados entre si e os dados eram homogêneos apresentando uma diferença de 10,94% ( $p=0,6150$ ) e após o término da ingestão de seis semanas, não ocorreu nenhuma diferença nos efeitos entre os grupos mesmo com uma variação de 1,73% ( $p=0,9065$ ). Os resultados evidenciam que o consumo do leite fermentado e o leite esterilizado apresentaram potencial para a elevação dos níveis de leucócitos dos voluntários.

Em um estudo realizado por Gill e Rutherford (2001) demonstraram que os níveis de leucócitos de 13 voluntários idosos saudáveis permaneceram estáveis durante 3 semanas de administração diária com  $5 \times 10^{10}$  UFC/dose de *L. rhamnosus*

HNN001 (DR20™). Apesar deste resultado, outra pesquisa realizada com o mesmo micro-organismo apresentou a elevação da concentração de leucócito em 40 camundongos durante 7 dias de intervenção (SHU, 2002). Assim, os pesquisadores concluíram que a elevação do sistema imune celular contribuiu para reduzir a gravidade da infecção promovida pela *E. coli* 0157:H7 durante o período avaliado.

Segundo Crittenden; Martinez; Playne (2003), relatam em seus estudos que a concentração de leucócitos e hemácias na corrente sanguínea estão diretamente associados com a necessidade nutricional de ácido fólico.

## 7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos durante um período de 06 semanas de administração de leite fermentado e esterilizado para os grupos de suplementação e placebo, respectivamente. Pode-se concluir que:

i) houve uma elevação da concentração de colesterol total e uma tendência de aumento dos níveis de triacilglicerídeos no grupo de suplementação. Os *L. plantarum*-Lp115 não apresentaram mecanismos que pudessem promover um efeito hipocolesterolêmico nas condições experimentais estabelecidas pelo design experimental;

ii) a dosagem diária de  $3,2 \times 10^{10}$  UFC/mL de *L. plantarum*-Lp 115 influenciou um aumento dos níveis de hemoglobina;

iii) esta bactéria ácido-lática promoveu uma tendência de elevação do número de leucócitos, o que indica a necessidade de um período de intervenção superior a 06 semanas e um número maior de participantes;

iv) os parâmetros bioquímicos e inflamatório avaliados não apresentaram nenhuma variação significativa durante o período de intervenção da pesquisa;

## 8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se que estudos futuros investiguem os possíveis mecanismos de ação dos *L. plantarum*-Lp 115 em relação aos níveis de hemoglobina e leucócito, através do prolongamento do período de estudo, enriquecimento do leite fermentado com ferro ou adicionando outra bactéria que possa cooperar para o seu desenvolvimento. Além disso, futuras pesquisas poderiam investigar a influência dos *L. plantarum*-Lp 115 sobre uma possível melhora dos marcadores inflamatórios de indivíduos com SM.

## 9. REFERÊNCIAS

AMINI, M.; JANGHORBANI, M. Comparison of metabolic syndrome with glucose measurement for prediction of type 2 diabetes: The Isfahan Diabetes Prevention Study. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v.3, p.84-89, 2009.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotechnologia Industrial – biotecnologia da produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blucher, p.544, 2001.

ALAZZEH, A. Y.; IBRAHIM, S. A.; SONG, D.; SHAHBAZI, A.; ABUGHAZALEH, A. A. Carbohydrate and protein sources influence the induction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidases in *Lactobacillus reuteri*. **Food Chemistry**, v.117, p.654–659, 2009.

ANDERSON, J. W.; GILLILAND, E. Effect of Fermented Milk (Yogurt) Containing *Lactobacillus Acidophilus* L1 on Serum Cholesterol in Hypercholesterolemic Humans. **Journal of the American College of Nutrition**, v.18, p.43–50, 1999.

ANGELAKIS, E.; BASTELICA, D.; AMARA, A. B.; FILALI, A. E.; DUTOUR, A.; MEGE, J-L.; ALESSI, M-C.; RAOULT, D . An evaluation of the effects of *Lactobacillus ingluviei* on body weight, the intestinal microbiome and metabolism in mice. **Microbial Pathogenesis**, v.52, p.61-68, 2012.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho, 2008. Disponível em: < [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm) >. Acesso em: 10/03/12.

ARAGON-ALEGRO, L. C.; ALEGRO, J. H. A.; CARDARELLI, H. R.; CHIU, M. C.; SAAD, S. M. I. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **Food Science and Technology**, v. 40, p.669–675, 2007.

ATAIE-JAFARI, A.; LARIJANI, B.; MAJD, H. A.; TAHBAZ, F. Cholesterol-Lowering Effect of Probiotic Yogurt in Comparison with Ordinary Yogurt in Mildly to Moderately Hypercholesterolemic Subjects. **Annals Nutrition Metabolism**, v.54, p.22–27, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16.ed. USA: AOAC International, 1999.

BACHA, K.; MEHARI, T.; ASHENAFI, M. Antimicrobial susceptibility patterns of lab isolated from wakalim, a traditional ethiopian fermented sausage. **Journal of Food Safety**, v.30, p.213–223, 2010.

BAHIA, L.; AGUIAR, L. G. K.; VILLELA, N. R.; BOTTINO, D.; BOUSKELA, E. O endotélio na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.50, p.291-303, 2006.

BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN; C. G. M. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1729-1738, 2006.

BONORA, E.; CAPALDO, B.; PERIN, P. C.; PRATO, S. D.; MATTIA, G.; FRITTITTA, L.; FRONTONI, S.; LEONETTI, F.; LUZI, L.; MARCHESINI, G.; MARINI, M. A.; NATALI, A.; PAOLISSO, G.; PIATTI, P. M.; PUJIA, A.; SOLINI, A.; VETTOR, R.; BONADONNA, R. C. Hyperinsulinemia and insulin resistance are independently associated with plasma lipids, uric acid and blood pressure in non-diabetic subjects. The GISIR database. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.18, p.624-631, 2008.

BUKOWSKA, H.; PIECZUL-MRÓZ, J.; CHELSTOWSKI, K.; NARUSZEWICZ, M. Effect of *Lactobacillus plantarum* (pro viva) on LDL-cholesterol and fibrinogen levels in subjects with moderately elevated cholesterol. **Atherosclerosis**, v.134, p.325, 1997.

BURTON, J. P.; COWLEY, S.; SIMON, R. R.; MCKINNEY, J.; WESCOMBE, P. A.; TAGG, J. R. Evaluation of safety and human tolerance of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.2356–2364, 2011.

BOYKO, E. J.; DOHENY, R. A.; MCNEELY, M. J.; KAHN, S. E.; LEONETTI, D. L.; FUJIMOTO, W. Y. Latent class analysis of the metabolic syndrome. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.89, p.88-93, 2010.

BRIZUELA, M. A.; SERRANO, P.; PEREZ, Y. Studies on probiotics properties of two *Lactobacillus* strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, p. 95-99, 2001.

BRUNO, M. E. C.; MONTVILLE, T. J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3003-3010, 1993.

CÁNOVAS, J. M.; RENTERO, P. Z.; MARTÍNEZA, A. M-C.; HERNÁNDEZ, M. L.; ALEMÁN, J. A. Péptidos bioactivos. **Clínica Investigación en Arteriosclerosis**, v.23, p.219-227, 2011.

CARDONA, F.; TUNEZ, I.; TASSET, I.; MURRI, M.; TINAHONES, F. J. Similar increase in oxidative stress after fat overload in persons with baseline hypertriglyceridemia with or without the metabolic syndrome. **Clinical Biochemistry**, v.41, p.701–705, 2008.

CARLSON, L. A.; OLSSON, A. G.; ORÖ, L.; RÖSSNER, S. Effects Of Oral Calcium Upon Serum Cholesterol And Triglycerides In Patients With Hyperlipidemia. **Atherosclerosis**, v.14, p.391-400, 1971.

CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Doenças associadas à resistência à insulina/hiperinsulinemia, não incluídas na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.50, p. 360-367, 2006.

CHATTERTON, D. E. W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKOR, A. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin—Technological implications for processing. **International Dairy Journal**, v.16, p.1229–1240, 2006.

CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. C.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; GREEN, L. A.; JUNIOR, I. J. T. Seventh Report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. **Hypertension**, v.42, p.1206-1252, 2003.

CRITTENDEN, R. G.; MARTINEZ, N. R.; PLAYNE, M. J. Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.80, p.217– 222, 2003.

COOLBEAR, T.; CROW, V.; HARNETT, J.; HARVEY, S.; HOLLAND, R.; MARTILEY, F. Developments in cheese microbiology in New Zealand - Use of starter and non-starter lactic acid bacteria and their enzymes in determining flavour. **International Dairy Journal**, v.18, p.705– 713, 2008.

COOK, S.; AUINGER, P.; LI, C. Y.; FORD, E. S. Metabolic Syndrome Rates in United States Adolescents, from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2002. **The Journal of Pediatrics**, v.152, p.165-170, 2008.

CUEVA, C.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; BILLS, G.; VICENTE, M. F.; BASILIO, A.; RIVAS, C. L.; REQUENA, T.; RODRÍGUEZ, J. M.; BARTOLOMÉ, B. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in Microbiology**, v.xx, p.1-11, 2010.

DITSCHIED, B.; KELLER, S.; JAHREIS, G. Cholesterol Metabolism Is Affected by Calcium Phosphate Supplementation in Humans. **The Journal of Nutrition**, v.135, 1678-1682, 2005.

DONCHEVAA, N. I.; ANTOVA, G. P.; SOFTOVA, E. B.; ANTOVA, G. P.; SOFTOVA, E. B.; NYAGOLOV, Y. P. Experimental and clinical study on the hypolipidemic and antisclerotic effect of *Lactobacillus bulgaricus* strain GB N 1 (48). **Nutrition Research**, v.22, p.393–403, 2002.

DROUILLET, P.; BALKAU, B.; CHARLES, M. A. ; VOL, S. ; BEDOUET, M.; DUCIMETIERE, P.; THE DESIR STUDY GROUP. Calcium consumption and insulin resistance syndrome parameters. Data from the Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.17, p.486-492, 2007.

ERDMANN, K.; CHEUNG, B. W. Y.; SCHRÖDER, H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.19, p.643–654, 2008.

ERTANTO, T.; WIDARSO, T. D.; FARADILLA, R. H. F.; EKAFITRI, R.; MUJIONO, M. Development of fermented coconut milk (Cocogurt) as the potential of functional probiotic product rich in medium chain triglycerides. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.108, p.146, 2009.

EJTAHED, H. S.; MOHTADI-NIA, J.; HOMAYOUNI-RAD, A.; NIAFAR, M.; ASGHARI-JAFARABADI, M.; MOFIID, V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. **Nutrition**, xxx, p.1–5, 2011.

ESPÓSITO, K.; GIUGLIANO, D. The metabolic syndrome and inflammation: association or causation?. **Nutrition Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.14, p.228-232, 2004.

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ont., Canadá. 2002.

FRANCO, G. P. P.; SCALA, L. C. N, ALVES, C. J.; FRANÇA, G. V. A.; CASSANELLI, T.; JARDIM, P. C. B. V. Síndrome metabólica em hipertensos de Cuiabá - MT: Prevalência e Fatores Associados. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.92, p.472-478, 2009.

FRUCHART, J. C.; NIERMAN, M. C.; STROES, E. S.; KASTELEI, J. J.; DURIEZ, P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. **Circulation**, v. 109, p.15-19, 2004.

FU, W.; MATHEWS, A. P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. **Biochemical Engineering Journal**, v.3, p.163-170, 1999.

FULLER, R. **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman & hall, p. 209-221, 1992.

GARCERÁ, M. J. G.; ELFERINK, M. G. L.; DRIESSEN, A. J. M.; KONINGS, W. N. In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin role of proton motive force and lipid composition. **European Journal of Biochemistry**, v. 212, p. 417-422, 1993.

GEIER, M. S.; BUTLER, R. N.; HOWRTH, G. S. Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.1-11, 2007.

GIBNEY, M. J. The Effect of Dietary Lysine to Arginine Ratio on Cholesterol Kinetics in Rabbits. **Atherosclerosis**, v.47, p.263-270, 1983.

GILL, H. S.; RUTHERFURD, K. J. Probiotic supplementation to enhance natural immunity in the elderly: effects of a newly characterized immunostimulatory strain *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20™) on leucocyte phagocytosis. **Nutrition Research**, v.21, p.183-189, 2001.

GIRALT, J.; REGADERA, J. P.; VERGES, R.; ROMERO, J.; FUENTE, I.; BIETE, A.; VILLORIA, J.; COBO, J. M.; GUARNER, F. Effects of probiotic *Lactobacillus casei* dn-114 001 in prevention of radiation-induced diarrhea: results from multicenter, randomized, placebo-controlled Nutritional trial. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 71, p. 1213–1219, 2008.

GRUNDY, S. M. Hypertriglyceridemia, Atherogenic Dyslipidemia, and the Metabolic Syndrome. **The American Journal of Cardiology**, v.81, p.18–25, 1998.

GRUNDY, S. M.; BREWER, H. B.; CLEEMAN, J. I.; SMITH, S. C.; LENFANT, C. Definition of metabolic syndrome. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. **Circulation**, v.109, p.433-438, 2004.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 361, p. 512-518, 2003.

GUPTA, S.; ABU-GHANNAM, N.; SCANNELL, A. G. M. Growth and kinetics of *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of edible Irish brown seaweeds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p.346–355, 2011.

HAIDEMENOS, A.; KONTIS, D.; GAZI, A.; KALLAI, E.; ALLIN, M.; LUCIA, B. Plasma homocysteine, folate and B12 in chronic schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.31, p.1289-1296, 2007.

HANAUER, S. B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflammatory bowel diseases**, v.12, p.3-9, 2006.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.1670-1677, 2009.

HERBERT, L. P. Prevention of diarrhea by the probiotic, *Lactobacillus* GG. **The Journal of Pediatric**, v.134, p.1-2, 1999.

HERBERT, J. D. ; GAUDIANO, B. A. Introduction to the special issue on the placebo concept in psychotherapy. **Journal of Clinical Psychology**, v.61, p.787-790, 2005.

HERÍAS, M. V.; KONINKX, J. F. J. G.; VOS, J. G.; VELDA, J. H. J. H.; DIJK, J. E. Probiotic effects of *Lactobacillus casei* on DSS-induced ulcerative colitis in mice. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, p.143-155, 2005.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RAMOS, M.; RECIO, I.; AMIGO, L. Effect of  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides. **Journal of Chromatography A**, v.1116, p.31-37, 2006.

HIGASHIKAWA, F.; NODA, M.; AWAYA, T.; NOMURA, B. S. K.; OKU, H.; SUGIYAMA, M. Improvement of constipation and liver function by plant-derived lactic acid bacteria: A double-blind, randomized trial. **Nutrition**, v.26, p.367–374, 2010.

HÖRMANNSPERGER, G.; HALLER, D. Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: Clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p.63–73, 2010.

HUGENSCHMIDT, S.; SCHWENNINGER, S. M.; GNEHM, N.; LACROIX, C. Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate. **International Dairy Journal**, v.20, p.852-857, 2010.

HUGENSCHMIDT, S.; SCHWENNINGER, S. M.; LACROIX, C. Concurrent high production of natural folate and vitamin B12 using a co-culture process with *Lactobacillus plantarum* SM39 and *Propionibacterium freudenreichii* DF13. **Process Biochemistry**, v.46, p.1063–1070, 2011.

HUGHES, D. B.; HOOVER, D. G. Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 268-276, 1995.

ITSARANUWAT, P.; HAL-HADDAD, K. S.; ROBINSON, R. K. The potential therapeutic benefits of consuming health promoting fermented dairy products: a brief update. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, p. 203-210, 2003

IYER, R.; TOMAR, S. K. Dietary effect of folate-rich fermented milk produced by *Streptococcus thermophilus* strains on hemoglobin level. **Nutrition**, v.27, p.994-997, 2011.

IYER, R.; TOMAR, S. K. Folate: A Functional Food Constituent. **Journal of Food Science**, v.74, p.114-122, 2009.

JÄGERSTADA, M. J.; JASTREBOVAA, J.; SVENSSON, U. Folates in fermented vegetables—a pilot study. **LWT - Food Science and Technology**, v.37, p.603–611, 2004.

JAUHAINEN, T.; VAPAATALO, H.; POUSSA, T.; KYRÖNPALO, S.; RASMUSSEN, M.; KORPELA, R. *Lactobacillus helveticus* Fermented Milk Lowers Blood Pressure in Hypertensive Subjects in 24-h Ambulatory Blood Pressure Measurement. **American Journal Hypertension**, v.18, p.1600-1605, 2005.

JEUN, J.; KIM, S.; CHO, S-Y, JUN, H-J.; PARK, H-J.; SEO, J-G.; CHUNG, M-J.; LEE, S-J. Hypocholesterolemic effects of *L. plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. **Nutrition**, v.26, p.321–330, 2010.

JIA, X.; WANG, W.; SONG, Y.; LI, N. A 90-day oral toxicity study on a new strain of *Lactobacillus paracasei* in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.1148–1151, 2011.

KAHN, M.; FUENTES, F.; VILLARROEL, G. Probióticos en diarrea aguda infecciosa. **Revista Chilena de Pediatría**, v.80, p.129-136, 2009.

KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.15, p.1–9, 2002.

KAWASE, M.; HE, F. KUBOTA, A.; HIRAMATSU, M.; SAITO, H.; ISHII, T.; YASUEDA, H.; AKIYAMA, K. Effect of fermented milk prepared with two probiotic strains on Japanese cedar pollinosis in a double-blind placebo-controlled clinical study. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.429-434, 2009.

KELLY, D.; REIFF, C. Inflammatory bowel disease, Gut bacteria and probiotic therapy. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p.25–33, 2010.

KLAVER, F. A. M.; KINGMAN, F.; WEERKAMP, A. H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. **Milk Dairy Journal**, v. 47, p.151-164, 1993.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p.329- 347, 2008.

KORHONEN, H.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; RANTAMÄKI, P.; TUPASELA, T. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, p.307-319, 1998.

LAFORTUNA, C. L.; ADORNI, F.; AGOSTI, F.; SARTORIO, A. Factor analysis of metabolic syndrome components in obese women. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.18, p.233-241, 2008.

LÄHTEINEN, T.; MALINEN, E.; KOORT, J. M. K.; MERTANIEMI-HANNUS, U.; HANKIMO, T.; KARIKOSKI, N.; PAKKANEN, S.; LAINE, H.; SILLANPÄÄ, H.; SÖDERHOLM, H.; PALVA, A. Probiotic properties of *Lactobacillus* isolates originating from porcine intestine and feces. **Anaerobe**, v.16, p.293-300, 2010.

LARKIN, T. A.; ASTHEIMER, L. B.; PRICE, W. E. Dietary combination of soy with a probiotic or prebiotic food significantly reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolaemic subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.63, p.238–245, 2009.

LEE, Y. K.; SALMINEN, S. **Handbook of probiotics and prebiotics**. New Jersey: Wiley, p.596, 2009.

LEHTONEN, A.; VIIKARI, J. Long-Term Effect Of The Combination Of Calcium Clofibrate And Calcium Carbonate On Serum Total Cholesterol, Triglyceride And High Density Lipoprotein-Cholesterol Concentrations In Hyperlipoproteinaemia. **Atherosclerosis**, v.33, p.49-58, 1979.

LERARIO, D. D. G.; GIMENO S. G.; FRANCO, L. J.; IUNES, M.; FERREIRA, S. R. G. Excesso de peso e gordura abdominal para a síndrome metabólica em nipo-brasileiros. **Revista de Saúde Pública**, v.36, p.4-11, 2002.

LIN, M. Y.; YOUNG, C. M. Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.10, p.409-413, 2000.

LIONG, M. T.; SHAH, N. P. Effects of *Lactobacillus casei* ATCC 292, fructooligosaccharide and maltodextrin on serum lipid profiles, intestinal microflora and organic acids concentration in rats. **Journal of Dairy Science**, v.89, p. 1390-1399, 2006.

LOMBO, B.; VILLALOBOS, C.; TIQUE, R. N. C.; SATIZÁBAL, C.; FRANCO, C. A. Prevalencia del síndrome metabólico entre los pacientes que asisten al servicio Clínica de Hipertensión de la Fundación Santa Fe de Bogotá. **Revista Colombiana de Cardiología**, v. 12, p.472-478, 2006.

LONGO-MBENZA, B.; ON'KIN, J. B. K. L.; OKWE, A. N.; KABANGU, K. The metabolic syndrome in a Congolese population and its implications for metabolic syndrome definitions. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v.5, p.17–24, 2011.

LOPES, H. F. Hipertensão, obesidade, resistência à insulina e síndrome metabólica. **Revista Brasileira Hipertensão**, v.12, p.154-158, 2005.

LOSADA, M. A.; OLLEROS, T. Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. **Nutrition Research**, v.22, p.71– 84, 2002.

LOURENS-HATTING, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v.11, p.1–17, 2001.

MA, D.; FORSYTHE, P.; BIENENSTOCK, J. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5308-5314, 2004.

MA, X.; HUA, J.; LI, Z. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. **Journal of Hepatology**, v.49, p.821-830, 2008.

MANNA, T. D.; DAMIANI, D.; SETIAN, N. Síndrome Metabólica: revisão. **Pediatria**, v.28, 272-277, 2006.

MÄRTENSSON, O.; BIÖRKLUND, M.; LAMBOC, A. M.; DUEÑAS-CHASCO, M.; IRASTORZA, A.; HOLST, O.; NORINF, E.; WELLING, G.; ÖSTE, R.; ÖNNING, G. Fermented, ropy, oat-based products reduce cholesterol levels and stimulate the bifidobacteria flora in humans. **Nutrition Research**, v.25, p.429–44, 2005.

MARTINEZ-VILLALUENG, C.; GOMEZ, R. Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic. **International Dairy Journal**, p.116-122, 2007.

MENOTTI, A.; LANTI, M.; ZANCHETTI, A.; BOTTA, G.; LAURENZI, M.; TERRADURA-VAGNARELLI, O.; MANCINI, M. The role of HDL cholesterol in metabolic syndrome predicting cardiovascular events. The Gubbio population study. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.21, p.315-322, 2011.

MIMURA, T.; RIZZELLO, F.; HELWIG, U.; POGGIOLI, G.; SCHREIBER, S.; TALBOT, I. C.; NICHOLLS, R. J.; GIONCHETTI, P.; CAMPIERI, M.; KAMM, M. A. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. **Gut**, v. 53, p. 108-114, 2004.

MINELLI, E. B.; BENINI, A.; MARZOTTO, M.; SBARBATI, A.; RUZZENENTE, O.; FERRARIOE, R.; HENDRIKS, H.; DELLAGLIO, F. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. **International Dairy Journal**, v.14, p.723–736, 2004.

MISRA, A.; VIKRAM, N. K. Metabolic syndrome in children and adolescents: Problems in definition, and ethnicity-related determinants. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v.1, p.121—126, 2007.

MITCHELL, W. D.; FYFE, T.; SMITH, A. D. The Effect Of Oral Calcium On Cholesterol Metabolism. **Journal of Atherosclerosis Research**, v.8, p.913-922, 1968.

MORAIS, P. K.; CAMPBELL, C. S. G.; SALES, M. M.; MOTTA, D. F.; MOREIRA, S. R.; CUNHA, V. N. C.; BENFORD, R. E.; SIMÕES, H. G. Acute resistance exercise is more effective than aerobic exercise for 24h blood pressure control in type 2 diabetics. **Diabetes & Metabolism**, v.37, p.112-117, 2011.

MOROTI, C.; MAGRI, L. F. S; SOUZA, J. C. B; MATOS, D. B. S; COSTA, M. R; SIVIERI, K. Potencial da Utilização de Alimentos Probióticos, Prebióticos e Simbióticos na Redução de Colesterol Sanguíneo e Glicemia. **Ciências biológicas e da saúde**, v.11, p.63-67, 2009.

NABIPOUR, I.; AMIRI, M.; IMAMI, S. R.; JAHFARI, S. M.; SHAFEIAE, E.; NOSRATI, A.; IRANPOUR, D.; SOLTANIAN, A. R. The metabolic syndrome and nonfatal ischemic heart disease; a population-based study. **International Journal of Cardiology**, v.118, p.48–53, 2007.

NAGAOKA, S.; FUTAMURA, Y.; MIWA, K.; AWANO, T.; YAMAUCHI, K.; KANAMARU, Y.; TADASHI, K.; KUWATA, T. Identification of Novel Hypocholesterolemic Peptides Derived from Bovine Milk  $\beta$ -Lactoglobulin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.281, p.11–17, 2001.

NARUSZEWICZ, M.; BUKOWSKA, H.; MILLO, B. Increase in plasma propionate after chronic supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* 299v effect on inflammatory markers and adhesion molecules. **Atherosclerosis Supplements**, v.4, p.317-318, 2003.

NGUYEN, T. D. T.; KANG, J. H.; LEE, M. S. Characterization of *L. plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.358–361, 2007.

OLIVARES, M.; DIAZ-ROPERO, M. P.; GOMEZ, N.; LARA-VILLOSLADA, F.; SIERRA, S.; MALDONADO, J. A.; MARTIN, R.; RODRIGUEZ, J. M.; XAUS, J. The consumption of two new probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, boosts the immune system of healthy humans. **International Microbiology**, v.9, p. 47-52, 2006.

OLIVEIRA, C. L.; MELLO, M. T. CINTRA, I. P.; FISBERG, M. Obesidade e síndrome metabólica na infância e adolescência. **Revista de Nutrição**, v.17, p.237-245, 2004.

OLIVEIRA, R. P. S.; PEREGO, P. OLIVEIRA, M. N.; CONVERTI, A. Effect of inulin as a prebiotic to improve growth and counts of a probiotic cocktail in fermented skim milk. **LWT - Food Science and Technology**, v.44, p.520-523, 2011.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 1-21, 2002.

ONG, L.; HENRIKSSONB, A.; SHAH, N. P. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v.16, p.446-456, 2006.

OSTLIE, H. M.; TREIMO, J.; NARVHUS, J. A. Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 989-997, 2005.

ÖSTMANA, E. M.; ELMSTAHL, H. G. M.; MOLINB, G.; LUNDQUIST, I.; I. M. E. BJÖRCK. A diet based on wheat bread baked with lactic acid improves glucose tolerance in hyperinsulinaemic Zucker (fa/fa) rats. **Journal of Cereal Science**, v.42, p.300–308, 2005.

OTERO, M. C.; ESPECHE, M. C.; NADER-MACÍAS, M. E. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp.*delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. **Process Biochemistry**, v.42, p.1406–1411, 2007.

OUNIS, W. B.; CHAMPAGNE, C. P. MAKHLOUF, J.; BAZINET, L. Utilization of tofu whey pre-treated by electromembrane process as a growth medium for *Lactobacillus plantarum* LB17. **Desalination**, v.229, p.192-203, 2008.

PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; KANG, S. A.; KIM, H.-Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p.1171–1185, 2006.

PEREIRA, A. C.; SCHETTERT, I. T.; FILHO, A. A. F. M.; GUERRA-SHINOHARA, E. M.; KRIEGER, J. E. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. **Clinica Chimica Acta**, v.340, p.99-105, 2004.

PEREG, D.; KIMHI, O.; TIROSH, A.; ORR, N.; KAYOUF, R.; LISHNER, M. The effect of fermented yogurt on the prevention of diarrhea in a healthy adult population. **American Journal of Infection Control**, v 33, p.122-125, 2005.

PÉREZ, A. E. Biología de la pared vascular y síndrome metabólico. **Nutrición hospitalaria**, v.20, p.5-17, 2005.

PFEUFFER, M.; SCHREZENMEIR, J. Milk and the metabolic syndrome. **Obesity reviews**, v.8, p.109-118, 2007.

PICKERING, T. G.; HALL, J. E.; APPEL, L. J.; FALKNER, B. E.; GRAVES, J.; HILL, M. N.; JONES, D. W.; KURTZ, T.; SHEPS, S. G.; ROCCELLA, E. J. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals. Part 1: blood pressure measurement in humans: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. **Hypertension**, v.45, p.142-161, 2005.

PLAYNE, M. J.; BENNET, L. E.; SMITHERS, G. W. Functional dairy foods and ingredients. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 242-264, 2003.

POMPEI, A.; CORDISCO, L.; AMARETTI, A.; ZANONI, S.; MATTEUZZI, D.; ROSSI, M. FOLATE Production by Bifidobacteria as a Potential Probiotic Property. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.179–185, 2007.

PUNZALAN, F. E. R.; SY, R. G.; TY-WILLING, T. Prevalence of metabolic syndrome among adult Filipinos. **International Congress Series**, v.1262, p.442-445, 2004.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A. M.; FILHO, A. D. R. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, v.4, p.66-74, 2011.

RAYES, N.; HANSEN, S.; SEEHOFER, D.; MÜLLER, A. R.; SERKE, S.; BENGMARK, S.; NEUHAUS, P. Early Enteral Supply of Fiber and Lactobacilli Versus Conventional Nutrition: A Controlled Trial in Patients With Major Abdominal Surgery. **Nutrition**, v.18, p.609–615, 2002.

REID, G.; KIM, S. O.; KÖHLER, G. Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. **Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology**, v. 46, p. 149-157, 2006.

RITCHIE, S. A.; CONNELL, J. M. C. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.17, p.319-326, 2007.

ROCHA, M. M.; DEL PRETTE, Z. A. P.; DEL PRETTE, A. Placebo na pesquisa psicológica: algumas questões conceituais, metodológicas e éticas. **Revista Brasileira de Terapias Cognitivas**, v.4, p.39-54, 2008.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; Mattila-Sandholm, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, p.197–215, 2000.

SALAROLI, L. B.; BARBOSA, G. C.; MILL, J. G.; MOLINA, M. C. B. Prevalência de Síndrome Metabólica em Estudo de Base Populacional, Vitória, ES-Brasil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.51, p.1143-1152, 2007.

SALMINEN, S.; WRIGHT, A. V.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: microbiological and functional aspects**. Marcel Dekker, 3.ed, p.610, 2004.

SAVARD, P.; LAMARCHE, B.; PARADIS, M-E.; THIBOUTOT, H.; LAURIN, E.; ROY, D. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p.50–57, 2011.

SAXELIN, M.; LASSIG, A.; KARJALAINEN, H.; TYNKKYNNEN, S.; SURAKKA, A.; VAPAATALO, H.; JÄRVENPÄÄ, S.; KORPELA, R.; MUTANEN, M.; HATAKKA, K. Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p.293–300, 2010.

SAZAWAL, S.; HIREMATH, G.; DHINGA, U.; MALIK, P.; DEB, S.; BLACK, R. E. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 374-382, 2006.

SENOK, A. C.; ISMAEEL, A. Y.; BOTTA, G. A. Probiotics: facts and myths. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 958-966, 2005.

SILVA, M. R.; DIAS, G.; FERREIRA, C. L. L. F.; FRANCESCHINI, S. C. C.; COSTA, N. M. B. Growth of preschool children was improved when fed an iron-fortified fermented milk beverage supplemented with *Lactobacillus acidophilus*. **Nutrition Research**, v.28, p.226-232, 2008.

SIMONS, L. A.; AMANSEC, S. G.; CONWAY, P. Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.16, p.531-535, 2006.

SINGH, G.; ARORA, S.; SHARMA, G. S.; SINDHU, J. S.; KANSAL, V. K.; SANGWAN, R. B. Heat stability and calcium bioavailability of calcium-fortified milk. **LWT - Food Science and Technology**, v.40, p.625-631, 2007.

SIQUEIRA, A. F. A.; ABDALLA, D. S. P.; FERREIRA, S. R. G. LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.50, p.334-343, 2006.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v.17, p. 1262-1277, 2007.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 894-907, 2000.

SHU, Q.; GILL, H. S. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR201™) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.34, p.59-64, 2002.

SHU, Q.; ZHOU, J. S.; RUTHERFURD, K. J.; BIRTLES, M. J.; PRASAD, J.; GOPAL, P. K.; GILL, H. S. Probiotic lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus* HN017, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bidobacterium lactis* HN019) have no adverse effects on the health of mice. **International Dairy Journal**, v.9, p.831-836, 1999.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. I Diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, p.2-28, 2005.

SOUZA, J. R. M.; OLIVEIRA, R. T.; BLOTTA, M. H. S. L.; COELHO, O. R. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína C-reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.90, p.94-99, 2008.

SPINLER, J. K.; TAWEECHOTIPATR, M.; ROGNERUD, C. L.; OU, C. N.; TUMWASORN, S.; VERSALOVIC, J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. **Anaerobe**, v.14, p.166-171, 2008.

SRIDEVI, N.; VISHWE. P.; PRABHUNE, A. Hypocholesteremic effect of bile salt hydrolase from *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005. **Food Research International**, v.42, p.516–520, 2006.

SUN, S. Z.; ANDERSON, G. H.; FLICKINGER, B. D.; WILLIAMSON-HUGHES, P. S.; EMPIE, M. W. Fructose and non-fructose sugar intakes in the US population and their associations with indicators of metabolic syndrome. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.2875–2882, 2011.

SYBESMA, W.; STARRENBURG, M.; TIJSSELING, L.; HOEFNAGEL, M. H. N.; HUGENHOLTZ, J. Effects of Cultivation Conditions on Folate Production by Lactic Acid Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.4542–4548, 2003.

SZAJEWSKA, H.; RUSZCZYNSKI, M.; RADZIKOWSKI, A. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. **The Journal of Pediatrics**, p.367-372, 2006.

TAKESHITA, T.; OKOCHI, M.; KATO, R.; KAGA, C.; TOMITA, Y.; NAGAOKA, S.; HONDA, H. Screening of peptides with a high affinity to bile acids using peptide arrays and a computational analysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.112, 92-97, 2011.

TALON, R.; WALTER, D.; VIALON, C.; BERDAGUE, J. L. Prediction of *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* populations in yoghurt by Curie point pyrolysis-mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v.48, p.271-279, 2002.

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

TEMELKOVA-KURKTSCHIEV, T.; HENKEL, E.; FISCHER, S.; SCHAPER, F.; HANEFELD, M. Leucocytes count and fibrinogen are level associated with carotid and femoral intima-media thickness. **Atherosclerosis**, v.51, p.5-6, 2000.

TEUSINK, B.; ENCKEVORT, F. H. J. VAN.; FRANCKE, C.; WIERSMA, A.; WEGKAMP, A.; SMID, E. J.; SIEZEN, R. J. In Silico Reconstruction of the Metabolic Pathways of *Lactobacillus plantarum*: Comparing Predictions of Nutrient Requirements with Those from Growth Experiments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.7253–7262, 2005.

THAKUR, C. P.; JHA, A. N. Influence Of Milk, Yoghurt And Calcium On Cholesterol-Induced Atherosclerosis In Rabbits. **Atherosclerosis**, v.39 p.211-215, 1981.

TIMMERMAN, H. M.; NIEERS, L. E. M.; RIDWAN, B. U.; KONING, C. J. M.; MULDER, L.; AKKERMANS, L. M. A.; ROMBOUTS, F. M.; RIJKERS, G. T. Design of a multispecies probiotic mixture to prevent infectious complications in critically ill patients. **Clinical Nutrition**, v.26, p.450–459, 2007.

TRAUTVETTER, U.; DITSCHIED, B.; KIEHNTOPF, M.; JAHREIS, G. A combination of calcium phosphate and probiotics beneficially influences intestinal lactobacilli and cholesterol metabolism in humans. **Clinical Nutrition**, v.xxx, p.1-8, 2011.

TU, Z.; VOLK, M.; SHAH, K.; CLERKIN, K. ; LIANG, J. F. Constructing bioactive peptides with pH-dependent activities. **Peptides**, v.30, p.1523–1528, 2009.

TURPEINEN, A. M.; KUMPU, M.; RÖNNBACK, M.; SEPPO, L.; KAUTIAINEN, H.; JAUHIAINEN, T.; VAPAATALO, H.; KORPELA, R. Antihypertensive and cholesterol-lowering effects of a spread containing bioactive peptides IPP and VPP and plant sterols. **Journal of Functional Foods**, v.1, p.260-265, 2009.

TYMCZYSZYN, E. E.; GERBINO, E.; ILLANES, A.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Galactooligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*. **Cryobiology**, v.62, p.123-129, 2011.

VANDENPLAS, Y.; VEEREMAN-WAUTERS, G.; GREEF, E.; PEETERS, S.; CASTEELS, A.; MAHLER, T.; DEVREKER, T.; HAUSER, B. Probiotics and prebiotics in prevention and treatment of diseases in infants and children. **Jornal de Pediatria**, v.87, p.292-300, 2011.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics: from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.

VEGARUD, G. E.; LANGSRUD, T.; SVENNING, C. Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. **British Journal of Nutrition**, v.84, p91-98, 2000.

VINDEROLA, C. G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J. A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during storage. **Food Research International**, v.33, p. 97–102, 2000.

VRIES, M. C.; VAUGHANB, E. E.; KLEEREBEZEMA, M.; VOS, W. M. *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**, v.16, p.1018-1028, 2006.

VUKSAN, V.; PEEVA, V.; ROGOVIK, A.; BELJAN-ZDRAVKOVIC, U.; STAVRO, M.; JENKINS, A.; DIAS, A. G.; DEVANESEN, S.; SIEVENPIPER, J.; HANNA, A. The metabolic syndrome in healthy, multiethnic adolescents in Toronto, Ontario: The use of fasting blood glucose as a simple indicator. **Canadian Journal of Cardiology**, v.26, p.128-132 2010.

WANG, F.; WU, S.; SONG, Y.; TANG, X.; MARSHALL, R.; LIANG, M.; WU, Y.; QIN, X.; CHE, D.; HU, Y. Waist circumference, body mass index and waist to hip ratio for prediction of the metabolic syndrome in Chinese. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.19, p.542-547, 2009.

WEGKAMP, A.; OORSCHOT, W. V.; VOS, W. M.; SMID, E. J. Characterization of the Role of para-Aminobenzoic Acid Biosynthesis in Folate Production by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.2673–2681, 2007.

WOLF, B. W.; WHEELER, K. B.; ATAYA, D. G.; GARLEB, K. A. Safety and Tolerance of *Lactobacillus reuteri* Supplementation to a Population Infected with the Human Immunodeficiency Virus. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p.1085-1094, 1998.

YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P. R. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. **Nutrition**, v.23, p.62–68, 2007.

YAMASHITA, S.; SAKAI, N.; TSUJII, K-I.; NAKAMURA, T.; MATSUZAWA, Y. Prevalence of low HDL-cholesterol and the metabolic syndrome. **International Congress Series**, v.1262, p.273-276, 2004.

YOSHIDA, D.; TOYOMURA, K.; FUKUMOTO, J.; UEDA, N.; OHNAKA, K.; ADACHI, M.; TAKAYANAGI, R.; SUMINORI KONO, S. Waist circumference, body mass index and glycated hemoglobin in Japanese men and women. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v.3, p.7–11, 2009.

ZAHID, N.; CLAUSSEN, B.; HUSSAIN, A. High prevalence of obesity, dyslipidemia and metabolic syndrome in a rural area in Pakistan. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v.2, p.13-19, 2008.

ZÁRATE, G.; NADER-MACIAS, M. E. Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. **Process Biochemistry**, v.41, p.1779-1785, 2006.

ZHANG, F.; HANG, X.; FAN, X.; LI, G.; YANG, H. Selection and optimization procedure of synbiotic for cholesterol removal. **Anaerobe**, v.13, p.185–192, 2007.

ZHANG, L.; LI, N.; CAICEDO, R.; NEU, J. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 1752-1756, 2005.

ZHAO, X-Q.; KRASUSKI, R. A.; BAER, J.; WHITNEY, E. J.; NERADILEK, B.; CHAIT, A.; MARCOVINA, S.; ALBERS, J. J.; BROWN, G. Effects of Combination Lipid Therapy on Coronary Stenosis Progression and Clinical Cardiovascular Events in Coronary Disease Patients With Metabolic Syndrome: A Combined Analysis of the Familial Atherosclerosis Treatment Study (FATS), the HDL-Atherosclerosis Treatment Study (HATS), and the Armed Forces Regression Study (AFREGS). **The American Journal of Cardiology**, v.104, p.1457-1464, 2009.

ZHONG, F.; LIU, J.; MA, J.; SHOEMAKER, C. F. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food Research International**, v.40, p.661–667, 2007.

ZOUMPOPOULOU, G.; FOLIGNE, B.; CHRISTODOULOU, K.; GRANGETTE, C.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and Salmonella infection in murine models. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.18-26, 2008.

# **ANEXOS**

## ANEXO I

ORIENTAÇÃO DISTRIBUÍDA PARA OS VOLUNTÁRIOS ANTES DO PERÍODO DE INTERVENÇÃO.



### POR QUE, VOU TOMAR LEITE FERMENTADO?

- O leite fermentado é produto resultante da fermentação láctea, cuja matéria-prima [leite] pode ser pasteurizado ou esterelizado
- Essa bebida [leite fermentado] contém uma cultura láctea [probiótico], cujo objetivo é promover benefícios à saúde dos consumidores quando suplementados regularmente
- Os probióticos estimulam o sistema imune do hospedeiro, por meio do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos
- Outros possíveis efeitos dos probióticos são a sua atuação na prevenção de câncer, na modulação de reações alérgicas, na melhoria da saúde urogenital de mulheres e nos níveis sanguíneos de lipídeos [gordura]
- Reduz os lipídeos sanguíneos como triglicerídeos e colesterol-LDL [colesterol ruim] e estimula a elevação do colesterol- HDL (colesterol bom)

### COMO TOMAR?

- Consuma apenas **1 EMBALAGEM** contendo 80 mL todos os dias
- **AGITE** antes de consumir o produto
- Se o consumo de **1 EMBALAGEM** não for possível por algum compromisso, não dia seguinte **NÃO BEBA 2 EMBALAGENS** para compensar o dia anterior. Um **ÚNICO DIA** sem a ingestão da bebida láctea não fará diferença durante a pesquisa

### QUANTO TEMPO IRÁ DURAR ESTA PESQUISA

- O período de ingestão do leite fermentado será de **6 SEMANAS**
- Após a **6ª SEMANA DE CONSUMO** do leite fermentado, iremos colher um novo exame de sangue para avaliar as possíveis benefícios promovido peã bebida

### OBSERVAÇÃO

- Para que se tenha os resultados esperados será necessário que se cumpra as orientações e consuma corretamente o leite fermentado

### QUALQUER DÚVIDA ENTRE EM CONTATO

Douglas Xavier dos Santos


Mestrando – Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos/CCA/UEL  
Cel - (43) 9989-0463

E-mail: tecnol.douglas@rocketmail.com ou douglaao@gmail.com

## ANEXO II



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
 Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná  
 Registro CONEP 268

<b>Parecer de Aprovação Nº 209/10</b> <b>CAAE Nº 0164.0.268.000-10</b> <b>FOLHA DE ROSTO Nº 362807</b>	Londrina, 21 de setembro de 2010.
<b>PESQUISADORA: LUCIA HELENA DA SILVA MIGLIORANZA</b> <b>CCA/DCTA – PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS</b>	
Prezada Senhora::  O “Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná” (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:  <p align="center"><b>“EFEITO DA INGESTÃO DE LACTOBACILLUS PLANTARUM SOBRE HIPERCOLESTEROLÊMICOS .”</b></p>	
Situação do Projeto: <b>APROVADO</b>  Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.	
<p align="center">Atenciosamente,</p>  <p align="center"><b>Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel</b>          Coordenadora          Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UEL</p>	

## ANEXO III

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_,

R.G. \_\_\_\_\_,

aceito participar do Projeto “Avaliação de indivíduos com síndrome metabólica, antes e após ingestão de leite fermentado com *Lactobacillus plantarum*”. Estou informado de que:

- Receberei uma dose por dia de um leite contendo uma bactéria probiótica;
- O microrganismo contido no produto é uma linhagem comercial, testada e aprovada como segura para consumo humano;
- O produto recebido é avaliado quanto à suas características físico-químicas e microbiológicas, e está adequado ao consumo humano, conforme a legislação vigente no país.

Além disso, estou informado de que:

- Serei solicitado a coletar amostras sanguíneas e, para tanto, deverei me deslocar até o Departamento PAT do CCS em período determinado, não inferior a 15 dias, durante 03 meses no máximo;
- A amostra de sangue será utilizada apenas para análise de hemograma;
- Minha identidade e dados, exceto o impacto da bebida láctea sobre o colesterol sanguíneo do grupo, será em nenhuma hipótese divulgado.

Entendo que, ao participar, estarei colaborando no desenvolvimento de uma Dissertação de Mestrado, e, portanto, no treinamento e formação de um profissional.

Londrina, 23 de agosto de 2011.

Assinatura do Participante

Assinatura dos Pesquisadores Responsáveis

Telefone/e-mail:

Profa. Dra. Lúcia Helena Miglioranza

Telefone: 3371-4984 e-mail [luciah@uel.br](mailto:luciah@uel.br)  
DCTA/CCA/UEL

Prof. Dr. José Wander Breganó

Telefone: 3371-2721 e-mail

[wbragan@onda.com.br](mailto:wbragan@onda.com.br) DPAT/CCS/UEL

## ANEXO IV




---

**FICHA DE AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E DE ACOMPANHAMENTO**

NOME:	PRONTUÁRIO:
IDADE:	CAUCASIANO ( ) NÃO CAUCASIANO ( )
TELEFONE:	
CELULAR:	
MEDICAMENTOS:	
DOENÇA: ( ) SIM ( ) NÃO	
QUAL:	

DATA:
FUMANTE: ( ) SIM ( ) NÃO
PESO:
ALTURA:
ÍNDICE DE MASSA CORPORAL:
PRESSÃO ARTERIAL:
CIRCUNFERÊNCIA ABDOMINAL:
ATIVIDADE FÍSICA: ( ) SIM ( ) NÃO
INFECÇÃO: ( ) SIM ( ) NÃO
QUAL: