

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CAMPUS DE ARARAQUARA**

**Gabriela Carrara Robi**

**Efeito da adição de inulina no crescimento, resistência gastrintestinal e capacidade de remoção de colesterol de *Lactobacillus helveticus* 416 e *Enterococcus faecium* CRL 183**

**Araraquara**

**2012**

**Gabriela Carrara Robi**

**Efeito da adição de inulina no crescimento, resistência gastrintestinal e capacidade de remoção de colesterol de *Lactobacillus helveticus* 416 e *Enterococcus faecium* CRL 183**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

**Araraquara**

**2012**

## SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Lista de Tabelas.....	iv
1. Introdução.....	7
2. Revisão Bibliográfica.....	9
2.1. Alimentos Funcionais.....	9
2.2. Probióticos.....	10
2.3. <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Lactobacillus helveticus</i> .....	13
2.4. Prebióticos e Simbióticos.....	16
2.5. Probióticos, Prebióticos e o Colesterol.....	17
3. Objetivos.....	21
4. Material e Métodos.....	22
4.1 Material.....	22
4.1.2 Preparação das Culturas e dos Inóculos.....	22
4.2 Métodos.....	22
4.2.1 Crescimento na presença de prebiótico.....	23
4.2.3 Tolerância ao fluido gástrico simulado.....	23
4.2.4 Tolerância ao fluido intestinal simulado.....	23
4.2.5 Capacidade de redução do colesterol <i>in vitro</i> .....	24
4.3 Análise Estatística dos Resultados.....	24
5. Resultados.....	25
5.1 Crescimento na presença de prebiótico.....	25
5.2 Tolerância ao fluido gástrico simulado.....	27

5.3 Tolerância ao fluido intestinal simulado.....	29
5.4 Capacidade de redução do colesterol <i>in vitro</i> .....	31
6. Discussão.....	33
7. Conclusões .....	38
8. Referências Bibliográficas.....	39

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da adição de um prebiótico nas características de crescimento, resistência às condições do trato gastrintestinal e remoção de colesterol *in vitro*, das cepas de *Enterococcus faecium* CRL183 e *Lactobacillus helveticus* 416. A fonte de prebiótico foi composta por Inulina GR – Orafiti, sendo testadas as seguintes concentrações: 1,0%, 2,0%, 3,0%; 4,0%; 5,0% e 6,0% p/v). Para a avaliação da resistência às condições do trato gastrintestinal, os microrganismos foram colocados em contato com um fluido gástrico simulado por 2 horas (9g/L de NaCl, 3g/L de pepsina, pH 1,8) e com um fluido intestinal simulado por 3 horas (0,9g/L de pancreatina, 12,5g/L de bicarbonato de sódio e 6,0 g/L de Oxgall). Após o período de contato com os fluidos, foram realizadas diluições seriadas e plaqueamento em meios específicos. No estudo de redução de colesterol, meios de cultura contendo inulina e colesterol (1%) foram inoculados com as cepas probióticas e incubados em anaerobiose a 37°C/24h. A capacidade de redução do colesterol foi determinada pela diferença entre a concentração de colesterol adicionada ao meio de cultura e a de colesterol residual. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de médias de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). A adição de inulina não resultou em alteração no ciclo logarítmico de crescimento dos microrganismos. Porém, quando os dados foram submetidos à análise estatística, constatou-se que a adição de 1% a 4% de inulina inibiu o crescimento de *Lactobacillus helveticus* 416, sendo que para as concentrações de 5% a 6% estas alterações não foram perceptíveis. A cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 apresentou crescimento superior na presença de 2% e 4% de inulina. Após o contato com o fluido gástrico simulado, observou-se redução de 1 ciclo logarítmico no crescimento da cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183. A suplementação com 4% e 6% de inulina melhorou a resistência de *Lactobacillus helveticus* 416 nesse ambiente, enquanto para *Enterococcus faecium* CRL 183, concentrações iguais ou superiores a 4% reduziram a resistência da cultura probiótica. A cepa de *Lactobacillus helveticus* 416 não apresentou variação na viabilidade celular após contato com o fluido intestinal simulado e a adição de inulina não influenciou os resultados obtidos. Por outro lado, para *Enterococcus faecium* CRL 183, a adição de 5% e 6% de inulina melhorou a viabilidade do microrganismo nesse fluido.

Observou-se redução de colesterol pela cultura de *Lactobacillus helveticus* 416 (12,30% a 17,23%), porém, a presença do prebiótico não influenciou os resultados obtidos. A cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 foi capaz de remover entre 58,56% e 66,33% do colesterol adicionado ao meio de cultura e a adição de inulina ( $\geq 1\%$ ) resultou em aumento nessa redução, sendo que os melhores resultados, em termos absolutos, foram obtidos com 5% do prebiótico. Em conclusão, a inulina GR pode ser utilizada em combinação com *Enterococcus faecium* CRL183 e *Lactobacillus helveticus* 416, pois não impediu o crescimento desses microrganismos nas condições do estudo. A associação simbiótica entre *Enterococcus faecium* CRL183 e inulina resultou em melhora na resistência intestinal e na capacidade de redução de colesterol pela cepa probiótica.

Palavras-chave: *Enterococcus faecium* CRL183; *Lactobacillus helveticus* 416; prebiótico; inulina; crescimento; resistência gastrintestinal, colesterol.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Crescimento da cepa de *Lactobacillus helveticus* 416 em função de diferentes concentrações de inulina.....25
- Tabela 2** - Crescimento da cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 em função de diferentes concentrações de inulina.....26
- Tabela 3** - Resistência da cepa de *Lactobacillus helveticus* 416 ao fluido gástrico simulado, em função de diferentes concentrações de inulina.....27
- Tabela 4** - Resistência da cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 ao fluido gástrico simulado, em função de diferentes concentrações de inulina.....28
- Tabela 5** - Resistência da cepa de *Lactobacillus helveticus* 416 ao fluido intestinal simulado, em função de diferentes concentrações de inulina.....29
- Tabela 6** - Resistência da cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 ao fluido Intestinal simulado, em função de diferentes concentrações de inulina.....30
- Tabela 7** - Remoção de colesterol *in vitro* pela cepa de *Lactobacillus helveticus* 416, em função de diferentes concentrações de inulina.....31
- Tabela 8** - Remoção de colesterol *in vitro* pela cepa de *Enterococcus faecium* CRL183, em função de diferentes concentrações de inulina.....32

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos contendo microrganismos probióticos tem sido relacionado à redução dos sintomas da má absorção da lactose, prevenção de diarreias, redução da incidência de tumores, modulação do sistema imune e melhora no perfil lipídico (ROSSI et al., 2000).

A associação de probióticos e prebióticos – ingredientes alimentares não digeríveis, que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e a atividade de um número limitado de bactérias residentes no cólon e assim melhorar a saúde do hospedeiro” (GIBSON; ROBERFROID, 1995), – conhecida como simbiótico, vem sendo relacionada a uma melhora na viabilidade celular, aumento na resistência aos sais biliares e potencialização das propriedades benéficas à saúde (LIONG; SHAH, 2005; LIONG; SHAH, 2006; ZHANG et al., 2007).

Estudos realizados previamente por nosso grupo de pesquisa mostraram que a cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 é capaz de reduzir em 53,85% o nível de colesterol adicionado ao meio de cultura. Outros estudos, utilizando modelos animais (ratos e coelhos) e humanos, evidenciaram que a ingestão diária de um produto obtido pela fermentação do extrato aquoso de soja com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416 promove uma melhora significativa no perfil lipídico (CAVALLINI et al., 2009a; 2009b; ROSSI et al., 1994; 1999; 2000; 2003; 2008). No entanto, o efeito da associação entre as culturas probióticas (*E. faecium* CRL183 e *L. helveticus* 416) e um ingrediente prebiótico ainda não foi estudado.

Baseado nessas informações mostra-se oportuno estudar o efeito da adição de inulina em parâmetros importantes de crescimento, resistência e capacidade de remoção de colesterol pelas cepas probióticas citadas acima.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Alimentos Funcionais**

A designação alimentos funcionais surgiu no Japão, na década de 80, após o governo japonês reconhecer que a alimentação tinha um papel importante na manutenção da saúde e redução do risco de doenças crônico-degenerativas (HASLER, 2002)

Alimentos funcionais são definidos como alimentos consumidos como parte da dieta usual, que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos ou possuem capacidade de reduzirem o risco de doenças crônico-degenerativas, além de cumprirem suas funções nutricionais básicas (HASLER, 2002).

A legislação brasileira define alimentos com alegações de propriedades funcionais (papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo) e alimentos com alegações de saúde (relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde), não sendo permitido relacionar o consumo de tais alimentos à cura ou prevenção de doenças (ANVISA, 1999).

Para atender a crescente preocupação da população em relação à manutenção da saúde, as indústrias alimentícias têm investido muitos recursos e apostado no desenvolvimento e aprimoramento dessa classe de alimentos. No entanto, os efeitos benéficos atribuídos aos alimentos funcionais devem ser baseados em evidências científicas, confirmadas por testes bioquímicos, nutricionais, fisiológicos e toxicológicos em animais de experimentação, estudos epidemiológicos e ensaios clínicos (BRASIL, 1999).

Entre as substâncias com alegações de propriedades funcionais aprovadas pela ANVISA encontram-se: ácidos graxos da família ômega 3, fibras alimentares, carotenóides, fitoesteróis, proteína da soja, substâncias prebióticas e microrganismos probióticos. As substâncias ou componentes com alegação de propriedades funcionais podem estar presentes naturalmente ou serem adicionados a produtos industrializados (BRASIL, 1999).

## **2.2. Probióticos**

O termo probióticos (pro= pró; biótico= vida) passou a ter destaque na comunidade científica com as observações do pesquisador russo Elie Metchnikoff, em 1905, que constatou os benefícios gastrintestinais promovidos pelas bactérias produtoras de ácido láctico, presentes no leite fermentado (RUTAVA et al., 2009).

Muitas definições têm sido propostas para microrganismos considerados probióticos. Em 1965, Lilly definiu probióticos como qualquer organismo ou substância que produza um efeito positivo no balanço microbiano intestinal. Já Fuller, em 1989, aprimorou o conceito ao descrever probióticos como “um suplemento alimentar constituído por microrganismos vivos, que afetam benéficamente o hospedeiro por melhorar o balanço da microbiota intestinal”. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), probióticos são definidos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ANVISA, 2008). Essa definição é muito semelhante à indicada pela FAO/WHO (2002), segundo a qual probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em doses apropriadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro.

Pesquisas recentes indicam que a ingestão de alimentos contendo microrganismos probióticos pode reduzir significativamente o risco de várias doenças crônico-degenerativas, como doenças inflamatórias intestinais, cânceres e doenças cardiovasculares (FAO/WHO, 2002; JARDINE, 2009; MANZONI et al., 2008)

Para que um microrganismo seja considerado probiótico, este deve, ao ser ingerido, ser capaz de atravessar a barreira gastrintestinal e colonizar, ao menos temporariamente, o cólon (MC FARLAND, 2000). Outros critérios que devem ser levados em consideração na seleção de uma cepa probiótica são: capacidade de produzir compostos antimicrobianos e segurança para o consumo humano, incluindo histórico de não patogenicidade, ausência de fatores de virulência e de resistência a antibióticos (FAO/WHO, 2002; SAARELA et al., 2000).

A concentração da cepa probiótica, necessária para que o efeito benéfico seja observado varia de  $10^8$  a  $10^9$  UFC (Unidades Formadoras de Colônias) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Caso este valor seja inferior, a empresa deve justificar a sua eficácia para a aprovação e comercialização (ANVISA, 2008).

O trato gastrintestinal humano e a microbiota intestinal estão envolvidos em muitas doenças como diarreias e doenças inflamatórias por ser o local do organismo com maior número de população bacteriana. Poucas colônias são encontradas no estômago devido ao baixo pH do meio (2,5 a 3,0). No intestino delgado a sobrevivência das bactérias é dificultada pela presença dos fluidos digestivos e peristaltismo, sendo que somente no cólon são encontradas condições favoráveis para o crescimento e proliferação de microrganismos. É, portanto, no intestino grosso que os probióticos devem exercer o seu principal efeito e, por isso, estudos

devem ser feitos para garantir que cheguem viáveis até este local. (TANNOCK, 1999; GUARNER, MALAGELADA, 2003).

Pode-se afirmar que a mucosa e a microbiota intestinal funcionam como barreiras que impedem que bactérias patogênicas, antígenos e outras substâncias se tornem prejudiciais à saúde. Alterações na composição da microbiota intestinal podem comprometer a saúde do indivíduo (GUARNER, MALAGELADA, 2003).

Os alimentos probióticos atuam justamente neste momento, equilibrando a microbiota intestinal e conseqüentemente diminuindo os riscos de certas doenças (DENDUKURI et al., 2005; MATTO et al., 2005; OSMAN et al., 2006). Uma vez que os microrganismos probióticos estão presentes no cólon, competem com as bactérias existentes, impedindo ou dificultando a ligação a receptores específicos, e levando à formação de uma barreira física. Com isso, os microrganismos patogênicos são impedidos de se multiplicar e conseqüentemente de produzir substâncias tóxicas. (FULLER, 1992; HAVENAAR; HUIS-INT`VELD, 1992; OUWERHAND et al., 1999; CROSS, 2002; LAVERMICOCCA et al., 2005; REID; HAMMOND, 2005).

Outros efeitos atribuídos aos probióticos incluem: modulação do sistema imunológico, evidenciando-se aumento da produção de anticorpos e macrófagos, redução na produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento das antiinflamatórias (MATSUMOTO et al., 2004; PELUSO et al., 2007; PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2002); auxílio na digestão e absorção de nutrientes; liberação de substâncias antagônicas como as bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (PIARD; DESMAZEUD, 1992) e controle dos níveis de colesterol (CAVALLINI et al., 2009; MANZONI et al., 2008; TESHIMA, 2003).

Atualmente muitos microrganismos são utilizados como probióticos, tendo destaque aqueles pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., em função de sua segurança e dos efeitos benéficos demonstrados em estudos *in vitro* e *in vivo*. Bactérias do gênero *Enterococcus* spp. também têm sido utilizadas como probióticos, porém, a sua aplicação em alimentos ainda é restrita e mais estudos sobre o assunto são necessários (WILLIAMS, 2010).

Segundo a ANVISA, produtos que contenham os microrganismos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei rhammosus*, *Lactobacillus casei defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* são considerados seguros para o consumo humano, sendo permitida a seguinte alegação —“Indicar a espécie do microrganismo probiótico) contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis” (ANVISA, 2008).

### **2.3. *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus***

O gênero *Enterococcus* é composto por espécies que produzem ácido láctico na forma L(+) e, portanto é considerado como parte do grupo das bactérias lácticas. *Enterococcus* spp. são bactérias Gram-positivas, não esporuladas, catalase e oxidase negativas e anaeróbicas facultativas (MORENO et al., 2006).

Microrganismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp. podem ser facilmente encontrados no trato gastrintestinal de mamíferos, incluindo humanos, e

podem ser utilizados como cultura iniciadora em produtos fermentados e ou adicionados a produtos não fermentados (KLEIN, 2003).

Outro aspecto importante é a capacidade que algumas cepas de *Enterococcus* spp. possuem de produzir bacteriocinas, chamadas de enterocinas, que são responsáveis pela inibição de vários microrganismos patogênicos como a *Listeria monocytogenes*. (ENNAHAR; DESCHAMPS, 2000; LASAGNO et al., 2002; FRANZ et al., 1999).

Algumas espécies de *Enterococcus* spp. são prejudiciais, sendo consideradas um indicador de condições sanitárias inadequadas ou estando relacionadas a infecções nosocomiais (FAO/WHO, 2002; FRANZ et al., 1999). Por outro lado, outras espécies de *Enterococcus* spp., como *Enterococcus faecium*, são utilizadas com segurança no processamento de alimentos, devido às suas propriedades tecnológicas e características probióticas.

Saavedra et al. (2003) estudaram a atividade antimicrobiana e determinantes de virulência em 11 diferentes cepas de *E. faecium* (CRL 6, CRL 35, CRL 47, CRL 183, CRL 210, CRL 301, CRL 397, CRL 485, CRL 588, CRL 988, CRL 1385). Apenas duas cepas produziram bacteriocinas (CRL 988 e CRL 1385), porém, não foram detectados fatores de virulência nas cepas avaliadas, garantindo a segurança de uso desses microrganismos como culturas iniciadoras.

O gênero *Lactobacillus* spp. é constituído por várias espécies que apresentam como características em comum serem Gram-positivas, microaerofílicas e em forma de bastonete. Estudos com *Lactobacillus* spp. têm sido realizados ao longo dos anos e, assim, seu uso como probiótico já vem sendo feito de forma segura e eficaz. Entre as espécies mais utilizadas na obtenção de alimentos merecem destaque: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei* (FISIOQUANTIC, 2012).

A espécie *Lactobacillus helveticus*, muito utilizada na obtenção de leites fermentados, apresenta efeitos benéficos relacionados à regularização do trânsito intestinal e modulação do sistema imune (MATTAR et al., 2001; SAITO et al., 2002)

A cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 foi isolada por pesquisadores do Centro de Referência para Lactobacilos (CERELA - Argentina), a partir de amostras de queijo Tafí (ROSSI et al., 1999 e 2003, BEDANI et al., 2003). Estudos conduzidos por Redondo (2008) demonstraram que *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti* 416 são resistentes às condições gástricas e ao ambiente intestinal simulado, em testes *in vitro*. O estudo comprovou também que as duas bactérias apresentam capacidade de aderir ao epitélio intestinal e inibir a adesão de patógenos (*Escherichia coli* 0157:H7) em até 60%, sendo que os melhores resultados foram obtidos quando simulou-se a colonização com a cultura mista de microrganismos probióticos antes do contato com o patógeno.

Em 1999, Rossi et al. desenvolveram um produto similar ao iogurte, à base de extrato aquoso de soja, utilizando as cepas *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416. Os efeitos benéficos decorrentes do consumo regular desse produto incluem: diminuição do risco de osteoporose (BEDANI et al., 2003, SHIGUEMOTO et al., 2007); modulação da microbiota intestinal, com aumento na população de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. e redução de enterobactérias (CAVALLINI et al., 2011); modulação do sistema imune (VENDRAMINI, 2002); redução no desenvolvimento de câncer de mama (KINOCHI, 2006) e de cólon (SIVIERI et al., 2008) e melhora nos parâmetros lipídicos em animais e humanos (CAVALLINI et al., 2009; ROSSI et al., 2000; 2003; 2008).

## 2.4. Prebióticos e Simbióticos

Prebióticos podem ser definidos como ingredientes alimentares não digeríveis que estimulam o crescimento e a atividade de um número limitado de bactérias presentes no cólon. Com isso, trazem benefícios à saúde do usuário, uma vez que melhoram o balanço da microbiota intestinal, por estimular o crescimento de bactérias benéficas, especialmente as pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* spp. (GIBSON, ROBERFROID, 1995).

Um simbiótico é definido como a combinação entre um probiótico e um prebiótico. Essa combinação *in vivo* pode resultar em vantagens competitivas para o probiótico uma vez que seus efeitos poderão ser potencializados com a escolha correta do prebiótico utilizado (HOLZAPFEL, SCHILLINGER, 2002; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; BIELECKA et al., 2002).

Dentre os prebióticos mais utilizados estão as fibras solúveis alimentares não digeríveis, como a inulina, sendo classificada desta maneira por não possuir a característica de ser digerida por enzimas digestivas humanas (CARABIN, FLAMM, 1999). A inulina possui a função de substrato fermentativo para o probiótico, levando a um maior crescimento e desenvolvimento dessas colônias e consequente aumento da biomassa celular.

A inulina é um carboidrato composto por uma glicose terminal e subunidades de frutose ligadas entre si, apresentando um grau de polimerização de 10 ou mais unidades. Este prebiótico está presente naturalmente em mais de 36 mil plantas, porém, sua extração mais comum se dá a partir das raízes de chicória. Possui como benefícios comprovados a melhoria do trânsito gastrointestinal, redução de compostos tóxicos, como a amônia, diminuição da incidência de câncer de cólon,

além de auxiliar na redução dos níveis de colesterol. A inulina está presente em vários alimentos funcionais, uma vez que apresenta, também, propriedades tecnológicas, podendo ser utilizada como substituto de gordura, em produtos de baixa caloria. (GONÇALVES, ROHR, 2009).

A ANVISA permite a seguinte alegação para a inulina presente ou adicionada ao alimento: —contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. Esta alegação pode ser utilizada desde que a porção do produto pronto para consumo forneça, no mínimo, 3g de inulina se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for líquido (ANVISA, 2008).

Atualmente a avaliação da eficácia do prebiótico pode ser quantificada utilizando-se o —índice prebiótico” (IP), definido como a modificação na composição de grupos de bactérias durante a fermentação do prebiótico e calculado através da seguinte equação:  $IP = (Bifidobactérias/Total) - (Bacteróides/Total) + (Lactobacilos/Total) - (Clostrídeos/ Total)$ . Essa equação assume que o aumento na população de bifidobactérias e lactobacilos seria benéfica, enquanto o aumento na de bacteróides e clostrídeos seria prejudicial (PALFRAMAN et al., 2003).

## **2.5. Probióticos, Prebióticos e Colesterol**

Os primeiros estudos que relacionaram a ingestão de probióticos à modulação dos níveis de colesterol sanguíneo se deram no ano de 1963 e evidenciaram que o consumo elevado de leite fermentado por colônias de *Lactobacillus* spp. resultou em diminuição do colesterol sérico em humanos (SHARPER, 1963). A partir desse estudo, vários outros foram conduzidos. Em 1974,

Mann e Spoerry demonstraram em estudos *in vivo* que o consumo diário de 4 a 5 litros de leite fermentado por *Lactobacillus* spp. poderia reduzir em 18% os níveis de colesterol total sanguíneo.

O efeito redutor de colesterol pode estar associado a uma desconjugação enzimática de ácidos biliares. Ácidos biliares desconjugados são menos solúveis e por isso sua reabsorção é menor, resultando em uma maior excreção deste componente. (DE RODAS et al, 1996; DE SMET et al, 1994). Outros mecanismos incluem: assimilação do colesterol pelas bactérias; incorporação do colesterol à parede celular bacteriana; e alteração do metabolismo lipídico pela ação dos ácidos graxos de cadeia curta (PEREIRA, GIBSON, 2002; ZHAO, YANG, 2005).

Pereira e Gibson (2002) demonstraram que em testes realizados *in vitro* os níveis de colesterol foram reduzidos na presença do microrganismo *Lactobacillus fermentum*. A produção de propionato (ácido graxo de cadeia curta) e a desconjugação de ácidos biliares podem ter causado esse efeito.

Um estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa analisou 18 cepas de *Lactobacillus acidophilus* e *Enterococcus faecium* quanto à habilidade de redução do colesterol *in vitro*. Os melhores resultados foram obtidos pelas cepas *E. faecium* CRL183 e *L. acidophilus* CRL 1014 que foram capazes de remover 53,85% e 54,0%, respectivamente, do colesterol adicionado ao meio de cultura (ROSSI et al., 1994). A partir desses resultados foi desenvolvida uma bebida fermentada de soja, utilizando como microrganismos iniciadores um cultivo misto de *E. faecium* CRL183 e *L. helveticus* 416 (ROSSI et al., 2000). O produto obtido exibiu efeito hipolipemiante em coelhos (colesterol total= - 18,4%; HDL-C= + 17,8%) e ratos (colesterol não-HDL= - 23,2%) e aumento de 10% na concentração de HDL-C de voluntários normocolesterolêmicos (ROSSI et al., 2000; ROSSI et al. 2003; ROSSI et al., 2008).

Recentemente, o mesmo produto, suplementado com isoflavonas, foi capaz e reduzir significativamente ( $p < 0,05$ ) os níveis basais de colesterol total (13,8%) e de colesterol não-HDL (14,7%) de voluntários com hipercolesterolemia moderada e de inibir a formação de lesões ateroscleróticas na aorta de coelhos com hipercolesterolemia induzida (CAVALLINI et al., 2009). A utilização da cepa de *Lactobacillus helveticus* 416 na fermentação do extrato aquoso de soja se justifica por razões tecnológicas, porém, a sua participação na modulação do perfil lipídico não foi avaliada até o presente momento.

A utilização simultânea de probióticos e prebióticos tem sido estudada como uma forma de melhorar a viabilidade de microrganismos probióticos e potencializar o efeito hipolipemiante individual atribuído aos probióticos e prebióticos (LIONG; SHAH, 2006).

O uso da inulina como um prebiótico também pode afetar de forma positiva a regulação dos lípides sanguíneos. Os mecanismos envolvidos no efeito hipolipemiante dos prebióticos, apesar de não serem completamente conhecidos, incluem: aumento na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (que potencialmente modulam a síntese de colesterol hepático); inibição de enzimas lipogênicas e redução nos níveis de insulina e glicose sérica (substâncias relacionadas à regulação da lipogênese) (PEREIRA; GIBSON, 2002).

Trabalhos recentes indicaram que o uso de inulina combinada ao *Lactobacillus* spp. foi capaz de reduzir os níveis de triglicérides e colesterol sanguíneos, demonstrando que mais estudos nessa área são necessários para a melhor compreensão dos resultados (PEREIRA; GIBSON, 2002).

Estudos conduzidos em ratos demonstraram o efeito hipolipemiante da inulina combinada à cepa de *Lactobacillus* spp. Ao final do trabalho foi possível concluir que esse simbiótico é capaz de reduzir o colesterol total por meio da inibição da expressão gênica de enzimas lipogênicas e através da produção de ácidos graxos de cadeia curta. Como consequência, há uma menor secreção de lipoproteínas de baixa densidade (ROBERFROID, 2002; KAUR, GUPTA, 2002; DELZENNE *et al.*, 2002).

### 3. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da adição de um prebiótico nas características de crescimento, resistência às condições do trato gastrointestinal e remoção de colesterol *in vitro*, das cepas de *Enterococcus faecium* CRL183 e *Lactobacillus helveticus* 416.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material

Foram utilizadas cepas de *Enterococcus faecium* CRL 183 (CERELA - Centro de Referência para Lactobacilos, Argentina) e *Lactobacillus helveticus* 416 (ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos, Brasil). A fonte de prebiótico foi composta por Inulina GR – Orafti.

#### 4.1.2. Preparação das Culturas e dos Inóculos

Cepas puras de *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416 foram mantidas congeladas (-80°C) em um meio composto por leite em pó desnatado reconstituído (10% p/v), suplementado com 1,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura e 1,0% de glicerol.

As culturas lácticas foram reativadas e propagadas nos meios M17 caldo (*Enterococcus faecium* CRL183) ou MRS caldo (Man Rogosa Sharpe – *Lactobacillus helveticus* 416), por 14-16 horas a 37°C, para determinação da capacidade de crescimento e resistência gastrintestinal. Para a determinação de remoção do colesterol, as cepas foram crescidas no meio LAPTg (peptona 15g/L; triptona 10g/L; extrato de levedura 10g/L; glicose 10g/L; Tween 80 0,1% v/v).

### 4.2 Métodos

As seguintes concentrações de inulina GR foram utilizadas: 1,0%, 2,0%, 3,0%; 4,0%; 5,0% e 6,0% (p/v). A escolha de tais concentrações foi baseada em estudos anteriores, que avaliaram a potencialização do efeito hipolipemiante de

microrganismos probióticos pela adição de um prebiótico (LIONG; SHAH, 2006; ZHANG et al. 2007).

#### **4.2.1 Crescimento na presença de prebiótico**

As cepas de *Enterococcus faecium* CRL183 e *Lactobacillus helveticus* 416 foram inoculadas em tubos contendo os caldos M17 e MRS, respectivamente, suplementados com inulina, nas diferentes concentrações testadas, e incubadas a 37°C por 14-16 horas. Após o período de crescimento foram realizadas diluições seriadas e as amostras foram plaqueadas em meios específicos para *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp. (agar MRS e M17, respectivamente).

#### **4.2.3 Tolerância ao fluido gástrico simulado**

O fluido gástrico simulado foi composto por 9g/L de cloreto de sódio, 3g/L de pepsina da mucosa estomacal de porco, com pH ajustado a 1,8 com ácido clorídrico. Culturas recentes de *E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus* 416 ( $10^9$  UFC/mL), crescidas na presença das diferentes concentrações de inulina, foram colocadas em contato com o fluido gástrico simulado (proporção de 1:10) e incubadas por 120 minutos a 37°C. Após esse período foram realizadas diluições seriadas e plaqueamento em meios específicos (GBASSI et al., 2009). Os resultados foram expressos em UFC/mL.

#### **4.2.4 Tolerância ao fluido intestinal simulado**

O fluido intestinal simulado foi composto por pancreatina (0,9g/L), bicarbonato de sódio (12,5g/L) e Oxgall (6,0g/L). Culturas recentes de *E. faecium* CRL 183 e *L.*

*helveticus* 416 ( $10^9$  UFC/mL), crescidas na presença das diferentes concentrações de inulina, foram colocadas em contato com o fluido intestinal simulado (proporção de 1:10) e incubadas por 180 minutos a 37°C. Após esse período foram realizadas diluições seriadas e plaqueamento em meios específicos (POSSEMIERS et al., 2010). Os resultados foram expressos em UFC/mL.

#### **4.2.5 Capacidade de redução do colesterol in vitro**

Os meios de cultura, LAPTg contendo diferentes concentrações de inulina, foram adicionados de 1% (p/v) de colesterol solúvel em água (Sigma 4646) e dispensados assepticamente em tubos teste de 10mL. Os tubos foram inoculados com 1% das culturas lácticas (*E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus* 416) e incubados a 37°C por 24 horas em anaerobiose. Tubos sem adição de inulina foram utilizados como controle. Após o período de incubação, amostras de 5mL de cada cultura foram centrifugadas (12,000 x g por 10 minutos) e a concentração de colesterol foi determinada no sobrenadante, pelo método colorimétrico do orto-ftalaldeído (RUDEL; MORRIS, 1973). A porcentagem de redução de colesterol foi determinada pela diferença entre a concentração de colesterol adicionado ao meio de cultura e a concentração de colesterol residual (ROSSI et al., 1999).

#### **4.3. Análise Estatística dos Resultados**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de médias de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa para análise estatística Biostat, sendo adotado o nível de 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Crescimento na presença de prebiótico

Os resultados do efeito da inulina no crescimento das cepas de *Lactobacillus helveticus* 416 e *Enterococcus faecium* CRL 183 são apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1.** Crescimento da cepa de *Lactobacillus helveticus* 416 em função de diferentes concentrações de inulina.

Concentração de inulina (%)	<i>Lactobacillus helveticus</i> 416 (UFC/mL)	<i>Lactobacillus helveticus</i> 416 (log UFC/mL)
0%	8,2x 10 <sup>8 a</sup>	8,92 ± 0,03 <sup>a</sup>
1%	6,6x 10 <sup>8 b</sup>	8,82± 0,01 <sup>b</sup>
2%	5,6x 10 <sup>8 b</sup>	8,74± 0,03 <sup>b</sup>
3%	5,6x 10 <sup>8 b</sup>	8,74± 0,03 <sup>b</sup>
4%	6,0x 10 <sup>8 b</sup>	8,78± 0,03 <sup>b</sup>
5%	8,4x 10 <sup>8 a</sup>	8,92± 0,02 <sup>a</sup>
6%	7,8x 10 <sup>8 ab</sup>	8,89± 0,06 <sup>ab</sup>

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 2.** Crescimento da cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 em função de diferentes concentrações de inulina.

<b>Concentração de inulina (%)</b>	<b><i>Enterococcus faecium</i> CRL183 (UFC/mL)</b>	<b><i>Enterococcus faecium</i> CRL183 (log UFC/mL)</b>
<b>0%</b>	4,7x 10 <sup>8b</sup>	8,68 ± 0,04 <sup>b</sup>
<b>1%</b>	6,1x 10 <sup>8b</sup>	8,79 ± 0,01 <sup>b</sup>
<b>2%</b>	9,2x 10 <sup>8a</sup>	8,96 ± 0,05 <sup>a</sup>
<b>3%</b>	7,0x 10 <sup>8ab</sup>	8,85 ± 0,01 <sup>ab</sup>
<b>4%</b>	8,9x 10 <sup>8a</sup>	8,95 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>5%</b>	7,0x 10 <sup>8ab</sup>	8,85 ± 0,03 <sup>ab</sup>
<b>6%</b>	4,6x 10 <sup>8b</sup>	8,66 ± 0,10 <sup>b</sup>

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

Para as duas cepas estudadas, a adição de inulina não resultou em alteração no ciclo logarítmico de crescimento dos microrganismos.

Por outro lado, a análise estatística evidenciou que para a cepa *Lactobacillus helveticus* 416 a adição de inulina nas concentrações de 1% a 4% resultou em redução do crescimento, sendo que para as concentrações de 5% a 6% estas alterações não foram perceptíveis ( $p \leq 0,05$ ). Em relação à cepa *Enterococcus faecium* CRL 183, observou-se que a suplementação com 2% e 4% de inulina resultou em melhora no crescimento ( $p \leq 0,05$ ).

## 5.2. Tolerância ao fluido gástrico simulado

Os resultados dos testes que avaliaram a tolerância das cepas *Lactobacillus helveticus* 416 e *Enterococcus faecium* CRL183 ao ambiente gástrico são apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

**Tabela 3.** Resistência da cepa de *Lactobacillus helveticus* 416 ao fluido gástrico simulado, em função de diferentes concentrações de inulina.

Concentração de inulina (%)	<i>Lactobacillus helveticus</i> 416 (UFC/mL)	<i>Lactobacillus helveticus</i> 416 (log UFC/mL)
Controle	$8,5 \times 10^8$ <sup>a</sup>	$8,93 \pm 0,05$ <sup>a</sup>
0%	$6,3 \times 10^8$ <sup>b</sup>	$8,80 \pm 0,01$ <sup>b</sup>
1%	$6,3 \times 10^8$ <sup>b</sup>	$8,80 \pm 0,01$ <sup>b</sup>
2%	$7,2 \times 10^8$ <sup>b</sup>	$8,86 \pm 0,02$ <sup>b</sup>
3%	$6,8 \times 10^8$ <sup>b</sup>	$8,83 \pm 0,00$ <sup>b</sup>
4%	$9,1 \times 10^8$ <sup>a</sup>	$8,96 \pm 0,04$ <sup>a</sup>
5%	$6,8 \times 10^8$ <sup>b</sup>	$8,83 \pm 0,01$ <sup>b</sup>
6%	$1,0 \times 10^9$ <sup>a</sup>	$9,00 \pm 0,01$ <sup>a</sup>

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 4.** Resistência da cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 ao fluido gástrico simulado, em função de diferentes concentrações de inulina.

Concentração de inulina (%)	<i>Enterococcus faecium</i> CRL183 (UFC/mL)	<i>Enterococcus faecium</i> CRL183 (log UFC/mL)
Controle	2,8x 10 <sup>9</sup> <sup>a</sup>	9,45 ± 0,02 <sup>a</sup>
0%	9,9x 10 <sup>8</sup> <sup>b</sup>	9,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
1%	1,1x 10 <sup>9</sup> <sup>b</sup>	9,03 ± 0,00 <sup>b</sup>
2%	8,6x 10 <sup>8</sup> <sup>b</sup>	8,94 ± 0,03 <sup>b</sup>
3%	9,1x 10 <sup>8</sup> <sup>bc</sup>	8,96 ± 0,03 <sup>bc</sup>
4%	5,2x 10 <sup>8</sup> <sup>d</sup>	8,72 ± 0,00 <sup>d</sup>
5%	6,4x 10 <sup>8</sup> <sup>d</sup>	8,81 ± 0,05 <sup>d</sup>
6%	7,1x 10 <sup>8</sup> <sup>cd</sup>	8,85 ± 0,08 <sup>cd</sup>

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p≤0,05).

Para o primeiro microrganismo avaliado (*Lactobacillus helveticus* 416), observou-se redução do crescimento após o contato com o fluido gástrico simulado (um ciclo logarítmico) e a adição de 4% e 6% de inulina foi capaz de prevenir esse efeito indesejável (p≤0,05).

Para *Enterococcus faecium* CRL 183 o ambiente gástrico simulado levou à redução de um ciclo logarítmico na população de microrganismos (exceto para a

cultura crescida na presença de 1% de inulina) e a adição do prebiótico em concentrações iguais ou superiores a 4% potencializou esse efeito ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.3. Tolerância ao fluido intestinal simulado

As duas cepas estudadas (*Lactobacillus helveticus* 416 e *Enterococcus faecium* CRL183) exibiram contagens de células viáveis superiores a  $10^8$  UFC/mL no final do experimento (Tabelas 5 e 6, respectivamente).

**Tabela 5.** Resistência da cepa de *Lactobacillus helveticus* 416 ao fluido intestinal simulado, em função de diferentes concentrações de inulina.

Concentração de inulina (%)	<i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i> 416 (UFC/mL)	<i>Lactobacillus</i> <i>helveticus</i> 416 (log UFC/mL)
Controle	$2,7 \times 10^9$ <sup>a</sup>	$9,38 \pm 0,07$ <sup>a</sup>
0%	$3,7 \times 10^9$ <sup>a</sup>	$9,57 \pm 0,02$ <sup>a</sup>
1%	$3,2 \times 10^9$ <sup>a</sup>	$9,50 \pm 0,06$ <sup>a</sup>
2%	$3,5 \times 10^9$ <sup>a</sup>	$9,54 \pm 0,10$ <sup>a</sup>
3%	$3,2 \times 10^9$ <sup>a</sup>	$9,50 \pm 0,05$ <sup>a</sup>
4%	$3,5 \times 10^9$ <sup>a</sup>	$9,54 \pm 0,04$ <sup>a</sup>
5%	$3,5 \times 10^9$ <sup>a</sup>	$9,53 \pm 0,11$ <sup>a</sup>
6%	$4,2 \times 10^9$ <sup>a</sup>	$9,62 \pm 0,03$ <sup>a</sup>

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

Especificamente em relação à cepa de *Lactobacillus helveticus* 416 não houve variação na viabilidade celular após o contato com o fluido intestinal e a adição de inulina não influenciou os resultados obtidos ( $p \leq 0,05$ ).

Por outro lado, para *Enterococcus faecium* CRL 183, observou-se redução de um ciclo logarítmico na contagem de células viáveis, após o contato com o fluido intestinal, e a adição de 5% e 6% de inulina melhorou a viabilidade do microrganismo nesse meio ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 6.** Resistência da cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 ao fluido intestinal simulado, em função de diferentes concentrações de inulina.

Concentração de inulina (%)	<i>Enterococcus faecium</i> CRL183 (UFC/mL)	<i>Enterococcus faecium</i> CRL183 (log UFC/mL)
Controle	$2,1 \times 10^9$ <sup>a</sup>	$9,32 \pm 0,04$ <sup>a</sup>
0%	$5,6 \times 10^8$ <sup>c</sup>	$8,75 \pm 0,06$ <sup>c</sup>
1%	$4,9 \times 10^8$ <sup>c</sup>	$8,68 \pm 0,08$ <sup>c</sup>
2%	$2,7 \times 10^8$ <sup>d</sup>	$8,43 \pm 0,03$ <sup>d</sup>
3%	$1,9 \times 10^8$ <sup>e</sup>	$8,27 \pm 0,06$ <sup>e</sup>
4%	$2,4 \times 10^8$ <sup>de</sup>	$8,38 \pm 0,04$ <sup>de</sup>
5%	$6,0 \times 10^8$ <sup>bc</sup>	$8,78 \pm 0,06$ <sup>bc</sup>
6%	$8,2 \times 10^8$ <sup>b</sup>	$8,91 \pm 0,02$ <sup>b</sup>

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

#### 5.4. Capacidade de redução do colesterol *in vitro*

Os resultados referentes ao efeito da adição de inulina na capacidade de redução do colesterol adicionado ao meio de cultura são apresentados nas Tabelas 7 e 8.

A redução de colesterol pela cepa de *Lactobacillus helveticus* 416 variou de 12,30% a 17,23%, porém, a adição de diferentes concentrações de inulina não influenciou significativamente os resultados obtidos ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 7.** Remoção de colesterol *in vitro* pela cepa de *Lactobacillus helveticus* 416, em função de diferentes concentrações de inulina.

Concentração de inulina (%)	Redução do colesterol (%)
	<i>Lactobacillus helveticus</i> 416
0%	15,35 ± 4,81 <sup>a</sup>
1%	17,10 ± 2,71 <sup>a</sup>
2%	16,31 ± 3,02 <sup>a</sup>
3%	14,33 ± 2,33 <sup>a</sup>
4%	14,00 ± 1,30 <sup>a</sup>
5%	17,23 ± 1,33 <sup>a</sup>
6%	12,30 ± 1,73 <sup>a</sup>

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

A cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 foi capaz de remover entre 58,56% e 66,33% do colesterol adicionado ao meio de cultura. Observa-se que a adição de prebiótico, em todas as concentrações avaliadas, resultou em aumento na redução de colesterol *in vitro* ( $p \leq 0,05$ ), sendo que os melhores resultados, em termos absolutos, foram obtidos com 5% de inulina.

**Tabela 8.** Remoção de colesterol *in vitro* pela cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183, em função de diferentes concentrações de inulina.

Concentração de inulina (%)	Redução do colesterol (%)
<b><i>Enterococcus faecium</i> CRL183</b>	
0%	58,56 ± 0,87 <sup>c</sup>
1%	61,62 ± 1,44 <sup>b</sup>
2%	64,60 ± 1,14 <sup>a</sup>
3%	65,76 ± 0,43 <sup>a</sup>
4%	65,18 ± 1,00 <sup>a</sup>
5%	66,33 ± 0,14 <sup>a</sup>
6%	66,09 ± 0,28 <sup>a</sup>

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Algumas substâncias prebióticas constituem fontes de carboidratos favoráveis ao crescimento de microrganismos probióticos, sendo esse efeito espécie e cepa dependente (GIBSON; ROBERFROID, 2008). Entretanto, os resultados de estudos que avaliaram o efeito do uso de prebióticos no crescimento de microrganismos probióticos são contraditórios.

Trabalho conduzido por Huebner et al. (2007) concluíram que *Lactobacillus paracasei* 1195 cresce melhor em meio contendo 1% de inulina e de FOS, em comparação com meio contendo somente glicose como fonte de carbono. Outro estudo verificou que cepas de *Lactobacillus* GG, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* não são capazes de utilizar FOS como fonte de carboidrato (KAPLAN; HUTKINS, 2000).

No presente estudo, não foi verificada alteração no ciclo logarítmico de crescimento dos microrganismos (*Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416 -  $10^8$  UFC) em função das diferentes concentrações de inulina testadas. No entanto, a análise estatística mostrou que para *Lactobacillus helveticus* 416, concentrações de inulina entre 1% e 4% não estimularam o crescimento do microrganismo, enquanto *Enterococcus faecium* CRL 183 cresceu melhor na presença de inulina (2% e 4%).

A estabilidade dos microrganismos *Lactobacillus helveticus* 416 e *Enterococcus faecium* CRL 183 frente ao fluido gástrico e intestinal simulados também foi analisada, uma vez que estes fluidos estão presentes naturalmente no organismo humano, sendo importantes para a digestão dos alimentos. Com isso, é

essencial que os microrganismos estudados resistam às condições do trato gastrointestinal e alcancem o cólon na forma íntegra.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que a inulina (4% e 6%) favoreceu a resistência do microrganismo *Lactobacillus helveticus* 416 ao fluido gástrico, prevenindo a redução do seu crescimento. Porém, a mesma substância prebiótica agiu de forma desfavorável para a cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183, quando foram utilizadas concentrações de inulina iguais ou superiores a 4%.

Redondo (2008) verificou que os microrganismos *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti* 416 resistiram aos valores de pH testados (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0, nos tempos 30; 60; 90 e 120 minutos), sendo que o segundo microrganismo obteve melhor crescimento em pH ácido se comparado ao pH neutro. Da mesma forma, Shinoda et al. (2001) verificaram que *Lactobacillus helveticus* CP53 obteve crescimento satisfatório em valores de pH iguais a 3,0; 4,0; 5,0 e 6,5.

O presente estudo demonstrou que os dois microrganismos analisados mantiveram-se viáveis ao final do teste em presença do fluido intestinal simulado e obtiveram crescimento satisfatório ( $10^8$ - $10^9$  UFC/mL). Para *Lactobacillus helveticus* 416 não houve variação na viabilidade celular e para *Enterococcus faecium* CRL 183 observou-se redução de 1 ciclo logarítmico, após o contato com o fluido intestinal. Esses resultados diferem dos obtidos por Redondo (2008), onde verificou-se redução no crescimento da cepa de *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti*, enquanto *Enterococcus faecium* CRL 183 não apresentou diferença significativa no crescimento frente ao fluido intestinal simulado. Uma possível explicação para a discrepância observada nos resultados seria a diferença na metodologia e na composição do fluido intestinal utilizados nos dois estudos.

Tompkins et al. (2011) demonstraram que diversos microrganismos são resistentes às condições gastrintestinais, entre eles o *Lactocacillus helveticus* R0052. Os testes foram feitos com a técnica *in vitro* Digestive System (IViDiS), sendo que o objetivo do estudo era examinar o impacto do tempo de uma refeição em relação a administração de um probiótico e sua capacidade de sobrevivência durante o transito gastrintestinal.

Charteris et al. (1998) realizaram testes de sobrevivência gástrica e intestinal para os microrganismos *Lactobacillus casei* 212.3, *Lactobacillus fermentum* KLD, *Bifidobacterium bifidum* 2715 e *Bifidobacterium bifidum* 1453. Ao final do estudo, a viabilidade gástrica alcançada foi superior a 70% e a viabilidade intestinal não apresentou queda significativa.

Zhang et al. (2007) estudaram o efeito da adição de prebióticos na resistência de diferentes microrganismos probióticos frente à bile. Os resultados mostraram que a estaquinose foi o único prebiótico que melhorou a tolerância à bile de todas as cepas avaliadas, enquanto a inulina foi capaz de melhorar a resistência somente da cepa de *Lactobacillus salivarius* La5.

A adição do prebiótico não alterou os resultados obtidos para *Lactobacillus helveticus* 416, porém, melhorou a resistência da cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183, quando concentrações mais elevadas de inulina foram avaliadas (5% e 6%).

Vale salientar que nos testes de resistência gástrica e intestinal os dois microrganismos avaliados apresentaram crescimento igual ou superior a  $10^8$ UFC/mL, quantidade considerada suficiente para que um microrganismo seja considerado probiótico.

Vários estudos indicam que a composição da microbiota intestinal e a ingestão de microrganismos probióticos podem influenciar o metabolismo do colesterol (GILLILAND et al., 1985).

Saavedra et al. (2003) obtiveram resultados positivos na redução de colesterol *in vitro* com diferentes cepas de *Enterococcus faecium*. Dentre as cepas analisadas, CRL 183, CRL 485 e CRL 588 obtiveram os melhores índices de redução de colesterol, sendo que *Enterococcus faecium* CRL 183 foi capaz de reduzir 51,2% do colesterol adicionado ao meio de cultura. Resultados semelhantes foram obtidos por Rossi et al. (1994), na avaliação da mesma cepa probiótica.

Redondo (2008) demonstrou que o *Enterococcus faecium* CRL 183 foi capaz de reduzir de forma significativa os sais biliares GDCA e TDCA. Já o *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti* 416 demonstrou capacidade de hidrólise do sal biliar TDCA. A hidrólise de sais biliares é realizada pela enzima HSB (hidrolase de sais biliares) produzida por alguns microrganismos probióticos, sendo este um mecanismo que tem se mostrado eficaz na redução do colesterol sanguíneo total (TARANTO et al, 1996; TANAKA et al, 2000; KIM et al, 2005)

Pereira et al. (2002) demonstraram que o *Lactobacillus fermentum* KC5b pode ser apontado como um possível probiótico que interfere no metabolismo do colesterol. O principal mecanismo que explicaria esse fenômeno seria a hidrólise de sais biliares através da atividade da enzima HSB. Algumas espécies de bactérias exibem atividade da enzima HSB, responsável pela desconjugação de sais biliares. Sais biliares desconjugados são menos solúveis, sendo mais excretados nas fezes. Nessa situação, o colesterol é utilizado para sintetizar novos sais biliares, levando a uma redução de colesterol sanguíneo (BEGLEY et al., 2006; PARK et al., 2008; ST-ONGE et al., 2000). Outro possível mecanismo sugere que alguns microrganismos

podem assimilar colesterol ou incorporá-lo na membrana celular (KIMOTO et al., 2002).

Liong e Shah (2005) demonstraram que o probiótico *Lactobacillus casei* ASCC 292 foi capaz de reduzir o colesterol no período de 24 horas, com o uso de diferentes prebióticos, principalmente a maltodextrina e FOS. Para o teste foram utilizadas diferentes concentrações do probiótico e prebiótico. As maiores reduções foram observadas para as combinações 1,71% de probiótico, 4,95% de FOS e 6,64% de maltodextrina e 1,70% de probiótico, 4,80% de FOS e 6,80% de maltodextrina.

O presente estudo evidenciou que o microrganismo *Lactobacillus helveticus* 416 foi capaz de reduzir o colesterol *in vitro* (12,30% a 17,23%), porém, a adição do prebiótico inulina em diferentes concentrações não influenciou os resultados. Em contraponto, a cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 foi capaz de reduzir entre 58,56% e 66,33% do colesterol adicionado ao meio de cultura, sendo que a adição de inulina favoreceu este efeito.

As cepas avaliadas (*Enterococcus faecium* CRL183 e *Lactobacillus helveticus* 416) são utilizadas como culturas iniciadoras em um produto à base de soja, cujas propriedades hipolipemiantes foram comprovadas em modelos *in vivo* (animais e humanos) (ROSSI et al., 2000; 2003; CAVALLINI, et al. 2009). Os resultados obtidos indicam que a combinação simbiótica entre os microrganismos em estudo e a inulina poderia potencializar o efeito desse produto, ressaltando a importância de estudos posteriores com o objetivo de otimizar a remoção de colesterol através combinação das cepas probióticas (*Enterococcus faecium* CRL183 e *Lactobacillus helveticus* 416), na presença de diferentes substâncias prebióticas.

## 7. CONCLUSÕES

O prebiótico inulina GR pode ser utilizado em combinação com *Enterococcus faecium* CRL183 e *Lactobacillus helveticus* 416, pois não impediu o crescimento desses microrganismos nas condições do estudo. A associação simbiótica entre *Enterococcus faecium* CRL183 e inulina resultou em melhora na resistência intestinal e potencialização da capacidade de redução de colesterol pela cepa probiótica, sendo que os melhores resultados foram obtidos com a adição de 5% e 6% de inulina.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. (Brasil). Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Julho. 2008. Acesso em 03/09/2012

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. (Brasil). Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 03 nov. 1999. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=109>>. Acesso em 03/09/2012

BEDANI, R.; ROSSI, E.A. Efeitos da ingestão de “iogurte” de soja suplementado com isoflavonas e cálcio no tecido ósseo de ratas adultas ovariectomizadas. Resumos do 5o Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, 3–6 de novembro, 2003.

BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 3, p. 1729–1738, 2006.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Res. Int.*, Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999: diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 maio 1999. Seção 2. p.11.

CARABIN, I.G.; FLAMM, W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regul. Toxicol.Pharmacol.*, New York, v.30, p.268-282, 1999.

CAVALLINI, D.C.U.; DULCINÉIA, A.C.P; VENDRAMINI, R.C.; BEDANI, R.; BOMDESPACHO, L.Q.; SILVEIRA, N.P.; VALDEZ, G.F.; ROSSI, E.A. Effects of isoflavone-supplemented soy yogurt on lipid parameters and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits: a randomized double-blind study. **Lipids in Health and Disease**. DOI: 10.1186/1476-511X-8-40, 8:40, 2009.

CAVALLINI, D.C.U.; SUZUKI, J.Y.; ABDALLA, D.S.P.; VENDRAMINI, R.C.; PAULY-SILVEIRA, N.D.; ROSELINO, M.N.; PINTO, R.A.; ROSSI, E.A. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. **Lipids in Health and Disease**. DOI:10.1186/1476-511X-10-126, 2011.

CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 34, n. 4, p. 245-253, 2002.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P.M.; MORELL, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **Int. J. Dairy Technol.**, v. 51, n.4, p. 123-136, 1998

DE RODAS, B. Z.; GILLILAND S. E.; MAXWELL, C. V. Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diet. **J. Dairy Sci.** 79:2121–2128, 1996

DE SMET, I., L. VAN HOORDE, N. DE SAEYER, M. VANDE WOESTYNE, AND W. VERSTRAETE. *In vitro* study of bile salt hydrolase (BSH) activity of BSH isogenic *Lactobacillus plantarum* 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity. **Microb. Ecol. Health Dis.** 7:315– 329, 1994

DELZENNE, N.M.; DAUBIOUL, C.; NEYRINCK, A.; LASA, M.; TAPER, H.S. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. *Br. J. Nutr.*, Wallingford, v.87, suppl.1, p.S255-S259, 2002.

DENDUKURI, N.; COSTA, V.; MCGREGOR, M.; BROPHY, J.M. Probiotic therapy for the prevention and treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 173, n. 2, p. 167-170, 2005.

ENNAHAR, S.; DESCHAMPS, S. Anti-listeria effect of enterocin produced by cheese-isolated from *Enterococcus faecium* EFM01 relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. A. Appl. Microbiol.* 2000.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Joint of FAO/WHO Working Group. **Report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, 2002. p.1-9.

FISIOQUANTIC.' Disponível em <http://fisioquantic.com.br/site/>. Acesso em: 19 ago. 2012.

FRANZ, C.M.A.P., HOLPZAPFEL, W.M., STILES, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety. **Intern. Food Microbiol.**, v.47, p.1-24, 1999.

FULLER, R. ed. History and development of probiotics. **Probiotics: The scientific basis**. London: Chapman & Hall, p. 1-8, 1992,.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl.Bacteriol.**, Oxford, v.66, n.5, p.365-378, 1989.

GBASSI, G.K.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey protein. **Int J Food Microbiol**. 2009

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

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Handbook of Probiotics. CRC Press Taylor & Francis Group. **Boca Raton, FL**. P.485, 2008

GILLILAND, S.E.; NELSON, C.R.; MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 49, p. 377-381, 1985.

GONÇALVES, A. A.; ROHR, M. Desenvolvimento de balas mastigáveis adicionadas de inulina. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 3, p. 471-478, 2009.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, v.361, p.512-9, 2003.

HASLER, C.M. Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the American Council on Science and Health. *J. Nutr.* 132: 3772–3781, 2002.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M. J.H. Probiotics: a general view. In: WOOD, B.J.B. **Lactic acid bacteria in health and disease 1**. Amsterdam : Elsevier Applied Science, 1992. p.151- 170.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res. Int.*, Amsterdam, v.35, n.2/3, p.109-116, 2002.

HUEBNER, J.; WEHLING, R.L.; HUTKINS, R.W. Functional activity of commercial prebiotics. **Int. Dairy J.** v.17, p. 770–775, 2007

JARDINE, S. Prebiotics and Probiotics. Wiley-Blackwell: United Kingdom, 2009, 152p.

KAPLAN, H.; HUTKINS, R.W. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 2000

KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J. Biosci.*, **Bangalore**, v.27, p.703-714, 2002.

KIM, G. B.; BROCHET, M.; LEE, B. H. Cloning and characterization of a bile salt hydrolase (*bsh*) from *Bifidobacterium adolescentis*. **Biotechnol. Lett.** v.27, p.817–822, 2005

KIMOTO, H.; OHMOMO, S.; OKAMOTO, T. Cholesterol removal from media by lactococci. **J. Dairy Sci.**, v.85, p.3182-3188, 2002.

KINOUCI, F.L. “logurte” de soja como coadjuvante no tratamento de câncer de mama. Teste de doutorado. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista**, Araraquara, 2006.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastro-intestinal tract. **Intern. J. Food Microbiol.**, v.88, p.123-131, 2003.

LASAGNO, M.; BEOLETTO, V.; SESMA, F.; RAYA, R.; FONT DE VALDEZ, G.; ERASO, A. Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from a dairy environment. **Microbiologia**. 2002.

LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; LONIGRO, S. L.; ANGELIS, M.; MORELLI, M.; CALLEGARI, M. L.; RIZZELLO, C. G.; VISCONTI, A. Study of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4233–4240, 2005.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science** (1965).

LIONG, M.T.; SHAH, N.P. Effects of a *Lactobacillus casei* Synbiotic on Serum Lipoprotein, Intestinal Microflora, and Organic Acids in Rats. **Journal of Dairy Science**. 2006.

LIONG, M.T.; SHAH, N.P. Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. **International Dairy Journal**. 2005

MANN, G.V.; SPOERRY, A. Studies of a surfactant and cholesterolemia in the Maasai. **Am J. Clin. Nutr.** v. 27, p. 464-469, 1974.

MANZONI, M.S.J.; CAVALLINI, D.C.U.; ROSSI, E.A. Efeitos do consumo de probióticos nos lípidos sanguíneos. **Alimentos e Nutrição**. v.19, n.3, p. 351-360, jul./set. 2008.

MATAR, C.; VALDEZ, J.C.; MEDINA, M.; RACHID, M.; PERDIGÓN, G. Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. **J. Dairy Res.**, v.68, p. 601-609, 2001.

MATSUMOTO, M.; OHISHI, H.; BENNO, Y. H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. **Int. J. Food Microbiol.** v.93, p.109–113, 2004.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G., FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.*, Amsterdam, v.12, p.173-182, 2002.

MATTO, J.; MAUNUKSELA, L.; KAJANDER, K.; PALVA, A.; KORPELA, R.; KASSINEM, S.; SAARELA, M. Composition and temporal stability of gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: a longitudinal study in IBS and control subject. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 213-222, 2005.

MC FARLAND, L.V. Beneficial microbes. Health or hazard? **Eur Gastroenterol. Hepatol.**, v.12, n.10, p.1069-71, 2000.

MORENO, M.R.F.; SARANTINOPOULOS,P.; TSAKALIDOU,E. The role and application of enterococci in food and health. **Intern. J. Food. Microbiol.** v.106, n.1, p.1-24, 2006.

OSMAN, N.; ADAWI, D.; MOLIN, G.; AHRNE, S.; BERGGREN, A.; JEPPSSON, B. *Bifidobacterium infantis* strains with and without a combination of Oligofructose and Inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 6, n. 31, p. 1-10, 2006

OUWERHAND, A. C.; KIRJAVAINENP. V.; SHORTT C.; SALMINENS. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 43-52, 1999.

PALFRAMAN, R.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. **Letters in Applied Microbiology** 2003, 37, 281–284.

PARK, Y.H.; KIM, J.G.; SHIN, Y.W.; KIM, H.S.; KIM, Y.J.; CHUN, T.; KIM, S.H.; WHANG, K.Y. Effects of *Lactobacillus acidophilus* 43121 and a mixture of *Lactobacillus casei* and *bifidobacterium longum* on the serum cholesterol level and fecal sterol excretion hypercholesterolemia induced pigs. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 72, p. 595–600, 2008.

PELUSO, I.; FINA, D.; CARUSO, R.; STOLFI, C.; CAPRIOLI, F.; FANTINI, M. C.; CASPANI, G.; GROSSI, E.; DI IORIO, L.; PAONE, F. M.; PALLONE, F.;

MONTELEONE, G. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. **Infection and immunity**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1730-1737, 2007.

PEREIRA, D. I.; GIBSON, G.R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** 37:259–281, 2002

PIARD, J.C.; DESMAZEUD, M. Inibiting factors producet by lact acid bacteria 2. Bacterioces and other antibacterial substances. **Lait.**, v.72, p.113-142, 1992.

POSSEMIERS, S. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. **Int. J. Food Microbiol.**,2010

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANCALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci. Technol.*, Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.

REDONDO, C.N. Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416. **Universidade Estadual Paulista.**, 2008

REID, G.; HAMMOND, J. Probiotics: some evidence of their effectiveness. **Canadian Family Physicians**, Mississauga, v. 51, p. 1487-1493, 2005.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. *Dig. Liver Dis.*, Rome, v.34, suppl.2, p.S105-S110, 2002.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; PEI, Y.C.; VALDEZ, G.F. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. **European Food Research and Technology**, v. 209, p.305-307, 1999.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, C.R.; CARLOS, I.Z.; OLIVEIRA, M.G.; VALDEZ, G.F. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. **Archivos of Latinoamericanos Nutrición**, v. 53, p.47-51, 2003.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; UEIJI, I.S.; SQUINZARI, M. M.; SILVA JÚNIOR, S. I.; VALDEZ, G.F. Effects of a Novel Fermented Soy Product on the Serum Lipids of Hypercholesterolemic Rabbits. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 74, p. 213-216, 2000

ROSSI, E.A.; GIORI, G.S.; HOLGADO, A.P.R.; VALDEZ, G.F. In vitro effect of *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus* on cholesterol. **Microbiologie-aliments-nutrition**, v.12, p. 267-270, 1994.

ROSSI, E.A.; CAVALLINI, D.C.U.; CARLOS, I.Z.; VENDRAMINI, R.C.; DÂMASO, A.R.; VALDEZ, G.F. Intake of isoflavone-supplemented soy yogurt fermented with *Enterococcus faecium* lowers serum total cholesterol and non-HDL cholesterol of

hypercholesterolemic rats. **European Food Research and Technology**. v.228, p.275-282, 2008.

RUDEL, L. L.; MORRIS, M. D. Determination of cholesterol using OPhthalaldehyde. **J. Lipid Res**. 1973

RUTAVA, S.; WALKER, W. In: Nutrition and Health: Probiotics in Pediatric Medicine (Michail S and Sherman PM, ed), pp41-52. **Humana Press**. 2009

SAARELA, M., MOGENSEN, G., FONDÉN, R., MÄTTÖ, J., MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria:safety, functional and technological properties. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v.84, p.197-215, 2000.

SAAVEDRA, L. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. **Inter. J. Food Microbiol**. v. 88, p.241-245, 2003.

SAITO, Y.; HAMANAKA, Y.; SAITO, K.; TAKIZAWA, S.; BENNO, Y. Stability of species composition of fecal bi dobacteria in human subjects during fermented milk administration. **Curr. Microbiol.**, v. 44, p.368-373, 2002.

SHARPER, A. G. et al. Serum lipids in three o-madic tribes of other Ke ya. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 13, p. 135-146, 1963.

SHIGUEMOTO, G.E.; ROSSI, E.A.; BALDISSERA, V.; GOUVEIA, C.H.; VALDEZ, G.M.F.; PEREZ SEA, A. Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with

resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats.

**Maturitas**. v. 57, p.261–270, 2007.

SHINODA, D.; KUSUDA, Y.; ISHIDA, N.; IKEDA, K.; KANEKO, O.; MASUDA, E.; YAMAMOTO, N. Survival of *Lactobacillus helveticus* strain CP53 in the human gastrointestinal tract **Lett. Appl. Microbiol.**, v.32, p.108-113, 2001.

SIVIERI, K.; SPINARDI-BARBISAN, A.L.T.; BARBISAN, L.F.; BEDANI, R.; PAULY, N.D.; CARLOS, I.Z.; BENZATTI, F.; VENDRAMINI, R.C.; ROSSI, E.A. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. **European Food Research and Technology**. v.228, p.231-237, 2008.

ST-ONGE, M-P.; FARNWORTH, E.R.; JONES, P.J.H. Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.71, p.674-681, 2000.

TANAKA, H.; HASHIBA, H.; KOK, J.; MIERAU, I. Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*: biochemical and genetic characterization. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.2502–2512, 2000

TANNOCK, G.W. The normal microflora: an introduction. In: TANNOCK, G.W (Ed.) Medical importance of normal microflora. Netherlands: 1999. p.1-23

TARANTO, M. P.; DE LLANO, D. G.; RODRIGUEZ, A. ; DE RUIZ HOLGADO, A. P.; FONT DE VALDEZ, G. Bile tolerance and cholesterol reduction by *Enterococcus*

*faecium*, a candidate microorganism for the use as a dietary adjunct in milk products.

**Milchwissenschaft**, v. 51, p.383–385, 1996.

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C. L. L. F. (Org.). *Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção*. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 2003

TOMPKINS, T.A.; HAGEN, K.E.; WALLACE, T.D.; FILLION-FORT,V. The impact of meals on a probiotic during transit through a model of the human upper gastrointestinal tract. **Wageningen Academic Publishers**. 2011

VENDRAMINI, A.P. Efeito da ingestão de um produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* na produção de citocinas, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas), **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP**, 2002.

WILLIAMS, N.T.; Probiotics. *Am J Health Syst Pharm*. Mar 15;67(6):449-58, 2010

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.

ZHAO, J.R.; YANG, H. Progress in the effect of probiotics on cholesterol and its mechanism. **Wei. Sheng. Wu. Xue. Bao.**, v. 45, n.2, p. 315-319, 2005.