



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ÁUREA MARCELA DE SOUZA PEREIRA FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E DA EFICÁCIA DE UM ALIMENTO
FUNCIONAL À BASE DE LEITE CAPRINO FERMENTADO EM MODELO
EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICA**

RECIFE

2022

ÁUREA MARCELA DE SOUZA PEREIRA FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E DA EFICÁCIA DE UM ALIMENTO
FUNCIONAL À BASE DE LEITE CAPRINO FERMENTADO EM MODELO
EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, na área de concentração fármacos e medicamentos, para a obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: fármacos e medicamentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Bernadete de Sousa Maia.

RECIFE

2022

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

F475a	<p>Figueiredo, Áurea Marcela de Souza Pereira Avaliação da segurança e da eficácia de um alimento funcional à base de leite caprino fermentado em um modelo experimental de síndrome metabólica/ Áurea Marcela de Souza Pereira Figueiredo. – 2022. 88 f. : il.</p> <p>Orientadora: Maria Bernadete de Sousa Maia. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2022. Inclui referências e anexos.</p> <p>1. Probióticos. 2. Leite caprino. 3. Limosilactobacillus mucosae. 4. Inulina. 5. Síndrome metabólica. I. Maia, Maria Bernadete de Sousa (orientadora). II. Título.</p>	
617.6	CDD (23.ed.)	UFPE (CCS 2023 - 006)

ÁUREA MARCELA DE SOUZA PEREIRA FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E DA EFICÁCIA DE UM ALIMENTO
FUNCIONAL À BASE DE LEITE CAPRINO FERMENTADO EM MODELO
EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, na área de concentração fármacos e medicamentos, para a obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: fármacos e medicamentos.

Aprovada em 25 de Agosto de 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete de Sousa Maia (Presidente – Avaliador interno)

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^a. Dr^a. Elizabeth do Nascimento (Avaliador externo)

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes (Avaliador interno)

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^a. Dr^a. Glória Duarte (Avaliador externo)

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Eryvelton de Souza Franco (Avaliador externo)

Centro Universitário Brasileiro-UNIBRA

**Dedico aos meus filhos queridos,
Lucas e Maria Luiza (na barriga), vocês me dão
forças para seguir.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar toda minha jornada e guiar-me sempre no caminho da luz, da verdade e da justiça. Por fortalecer-me como pessoa e pesquisadora e não me deixar desanimar nesse percurso.

À minha mãe, Maria Veronica de Souza, fonte de inspiração, dedicação e de garra, por nunca ter desistido de mim, por todos os esforços a mim dedicados para que eu conseguisse trilhar os caminhos dos estudos, por sempre me incentivar ora financeiramente, ora me dando apoio psicológico e em outros momentos assumindo sua dedicação à minha casa e minha família para que eu pudesse estar integralmente dedicada à conclusão de mais essa etapa, a realização desse sonho não seria possível sem sua ajuda.

Ao meu avô Inácio Monteiro de Souza *in memoriam*, com você aprendi valores que jamais encontrarei em academia alguma, você me inspirou com o exemplo a ser sempre o melhor, a fazer o bem sem olhar a quem, a perdoar, a ser honesta, etc. Você foi a pessoa a qual sempre busquei forças espirituais para não desandar e nem cair nos momentos difíceis.

Ao meu marido, Renan Figueiredo, onde me apoiei sempre em busca de um colo para descansar e de um bom conselho quando a frustração dos dias difíceis tomou conta da minha pessoa, obrigada pelo incentivo, carinho, apoio e amizade nessa difícil trajetória, por me entender tantas vezes quando me ausentei de nós para dedicar-me a esse projeto, sem a sua compreensão e sem seu companheirismo essa trajetória teria sido bem mais pesada.

Aos meus filhos Lucas Souza Figueiredo e Maria Luiza Souza Figueiredo (ainda na barriga), vocês são minha fonte diária de buscar melhorias como pessoa e profissional, é por vocês que eu sei que preciso seguir minhas batalhas, são vocês quem me mantêm de pé diariamente, todo meu esforço foi pensando num futuro melhor para vocês.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete de Sousa Maia, pelos ensinamentos acadêmicos, pelo apoio financeiro, por repassar todo seu conhecimento na construção dessa pesquisa e pela confiança de desenvolvermos esse trabalho juntas.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Flávia Carolina Alonso Buriti, pelos ensinamentos acadêmicos, por toda ajuda intelectual e psicológica para construção desse trabalho, por todas as vezes que precisei que você pegasse na minha mão para que eu conseguisse levantar e seguir em frente, aprendi muito de pesquisa com você, e aprendi algo muito importante também, o

exemplo do que é ser orientador e de como conseguir tirar o melhor do aluno de uma forma humanizada, levarei seu exemplo por toda minha jornada, e, se assim conseguir, o seguirei no futuro.

Ao Prof. Dr Eryvelton de Souza Franco, que tanto disponibilizou seu tempo em participar de cada etapa de manipulação dos animais, tratamento dos dados e contribuindo com toda a parte intelectual desse trabalho, sua ajuda foi de grande valia para o andamento dessa pesquisa.

A toda equipe do Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos por toda colaboração e companheirismo durante os experimentos.

Aos membros da banca examinadora, pelo gentil aceite e disponibilidade em contribuir intelectualmente com esse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, professores e funcionários, por contribuírem com minha jornada de crescimento pessoal e acadêmico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a pesquisa através de concessão da bolsa de estudos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ-PB) pelo auxílio financeiro ao trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos da Universidade Estadual da Paraíba (NUPEA-UEPB) pela parceria.

Às empresas Biotech Fermentos e Coagulantes, Orafti e Sweetmix, bem como à Fazenda Carnaúba (Taperoá-PB), pelo fornecimento de parte dos insumos utilizados na realização do presente trabalho.

Por fim, a todos que de alguma forma colaboraram para a conclusão deste trabalho, obrigada!

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação” (BEAUVOIR, 1958, p. 243).

RESUMO

Em virtude de uma alimentação não balanceada e outros componentes do estilo de vida, tem-se evidenciado um aumento na prevalência de doenças crônicas principalmente as associadas a distúrbios metabólicos como os presentes na síndrome metabólica. A síndrome metabólica caracteriza-se por um grupo de anormalidades metabólicas e fatores clínicos como resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão, obesidade, aumento da circunferência abdominal, que pode ser induzida através de uma dieta não saudável, por outro lado, os estudos avançam na investigação de potenciais nutrientes ou alimentos que evitem ou tratam tais distúrbios, nesse contexto pode-se citar o leite de cabra. A espécie *Limosilactobacillus mucosae* tem grande potencial para produção de alimentos probióticos, com efeitos comprovados frente a fatores de risco para as doenças acima citadas. A inulina é um dos prebióticos mais estudados enquanto que simbióticos incluem uma mistura de microrganismos vivos e substratos seletivamente utilizados por microrganismos habitantes do organismo que conferem benefício à saúde do hospedeiro. Nesse estudo avaliou-se o efeito de leite caprino fermentado com inulina, *Streptococcus thermophilus* e *L. mucosae* CNPC007 (cepa potencialmente probiótica, isolada de leite de cabra) em um modelo experimental de síndrome metabólica. Para toxicidade de dose única utilizou-se camundongos *Swiss Webster* fêmeas de acordo com método *up and down* OECD 425. Para a toxicidade de doses repetidas foram utilizados ratos *Wistar* machos e fêmeas, segundo o método OECD 407. Para a indução da síndrome metabólica, ratos *Wistar* machos foram alimentados com Dieta Ocidentalizada (DO), os demais com Dieta Presence® (DP) por 150 dias mais 30 de tratamento com o leite caprino fermentado. Os resultados obtidos demonstraram que o produto em estudo não apresentou sinais de toxicidade ou de mortalidade quando administrado por gavagem em dose única (20 mL/kg), nem em doses repetidas (3 mL/kg, 6 mL/kg ou 12 mL/kg). O NOAEL (maior nível de dose administrada onde não se observam efeitos adversos) sugerido foi superior a 20 mL/kg após administração por gavagem de dose única e superior a 12 mL/kg após administração por gavagem de doses repetidas (cada mL fornece 7,4 – 7,9 log UFC de *L. mucosae*) sendo, portanto, considerado de baixa toxicidade, seguro para uso em roedores e possibilitando o uso futuro em novos estudos. Observou-se que os animais alimentados com DO desenvolveram síndrome metabólica, visto que apresentaram peso corporal maior que os animais alimentados com DP, mesmo com consumo de ração menor, além de apresentarem pressão arterial sistólica, índice de massa corporal, circunferência abdominal, glicemia de jejum e perfil lipídico indesejável maiores que os animais alimentados

com DP. O tratamento com o leite fermentado pelo período de 30 dias, nas doses de 3 ou 6 mL/kg, promoveu redução dos níveis de pressão arterial sistólica, colesterol total, triglicerídeos, LDL-c e de glicemia de jejum, mesmo mantendo o uso da DO, resultados estes que não sofreram alteração em função da dose. Esses resultados fortalecem a hipótese de que o leite fermentado utilizado no estudo é um produto com potencial a ser usado frente ao tratamento de doenças que envolvem a síndrome metabólica, necessitando de estudos futuros com animais para que possam ser avaliados pontos que o candidatem como possível terapia não farmacológica.

Palavras-Chave: probiótico; leite caprino; *Limosilactobacillus mucosae*; inulina; síndrome metabólica.

ABSTRACT

Due to an unbalanced diet and other lifestyle components, there has been an increase in the prevalence of chronic diseases, especially those associated with metabolic disorders such as those present in metabolic syndrome. Metabolic syndrome is characterized by a group of metabolic abnormalities and clinical factors such as insulin resistance, dyslipidemia, hypertension, obesity, increased abdominal circumference, which can be induced by unhealthy diet. Goat milk plays an important role in human nutrition. The species *Limosilactobacillus mucosae* has high potential for the production of probiotic foods, with proven effects against risk factors for the aforementioned diseases. Inulin is one of the most studied prebiotics, while synbiotics include a mixture of live microorganisms and substrates selectively used by microorganisms inhabiting the organism that confer a benefit to the health of the host. In this study, the effect of goat milk fermented with inulin, *Streptococcus thermophilus* and *L. mucosae* CNPC007 (potentially probiotic, isolated from goat milk) was evaluated in an experimental model of metabolic syndrome. For single dose toxicity, female *Swiss Webster* mice used according to the up and down method OECD 425. For repeated dose toxicity, male and female *Wistar* rats were used, according to the OECD 407 method. For the induction of the metabolic syndrome, male *Wistar* rats were fed with Westernized Diet (OD), the others with Presence® Diet (DP) for 150 days plus 30 days of treatment with fermented goat milk. The results obtained demonstrated that the product under study did not show signs of toxicity or mortality when administered by gavage in a single dose (20 mL/kg), nor in repeated doses (3 mL/kg, 6 mL/kg or 12 mL/kg). The suggested NOAEL (highest level of administered dose where no adverse effects are observed) was higher than 20 mL/kg after gavage administration of a single dose and greater than 12 mL/kg after oral administration of repeated doses (with each mL provides 7.4 – 7.9 log CFU of *L. mucosae*), being therefore considered of low toxicity, safe for use in rodents and allowing future use in new studies. It was observed that the animals fed with DO developed metabolic syndrome, since they presented higher body weight than the animals fed with PD, even with lower feed intake, these also presented higher systolic blood pressure, body mass index, abdominal circumference, fasting glucose, and undesirable lipid profile levels than animals fed PD. Treatment with fermented milk for a period of 30 days, at doses of 3 or 6 mL/kg, promoted a reduction in blood pressure, total cholesterol, triglycerides, LDL-c and fasting glucose levels, even maintaining the use of OD, and these results did not change as a function of dose. These results strengthen the

hypothesis that the fermented milk studied is a product with potential to be used in the treatment of diseases involving the metabolic syndrome, requiring future studies with humans so that a possible non-pharmacological therapy can be evaluated for these patients.

Keywords: probiotic; goat milk; *Limosilactobacillus mucosae*; inulin; metabolic syndrome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Formação dos grupos experimentais	37
Figura 2 -	Delineamento experimental dos grupos a serem tratados, durante 30 dias por gavagem, com leite fermentado 3 ou 6mL/kg, metformina (500 mg/kg) ou água (10 mL/kg)	39
Figura 3 -	Peso corporal dos animais submetidos ao teste de toxicidade de dose única	44
Figura 4 -	Cortes histológicas (coloração de hematoxilina e eosina, 400 x) de órgãos dos animais submetidos ao teste de toxicidade de dose única	45
Figura 5 -	Peso corporal (g) de ratos <i>Wistar</i> machos e fêmeas dos grupos tratados com respectivas doses do leite fermentado para o teste toxicidade de doses repetidas	47
Figura 6 -	Cortes histológicas (coloração de hematoxilina e eosina, 400 x) de órgãos dos animais dos grupos tratados com respectivas doses do leite fermentado para o teste de toxicidade de doses repetidas	52
Figura 7 -	Evolução do peso corporal (gramas) semanal dos animais alimentados com Dieta Ocidentalizada ou Dieta Padrão de laboratório (Presence ®), do pós-desmame até a 20ª semana	53
Figura 8 -	Consumo alimentar semanal (gramas) dos animais alimentados com Dieta Ocidentalizada ou Dieta Padrão de laboratório (Presence ®), do pós-desmame até a 20ª semana	54
Figura 9 -	Efeito do tratamento por gavagem com o leite fermentado (3mL/kg ou 6mL/kg), metformina (500mg/kg) ou água (10mL/kg), durante o período de 30 dias de tratamento sobre o peso corporal	55
Figura 10 -	Efeito do tratamento por gavagem com o leite fermentado (3mL/kg ou 6mL/kg), metformina (500mg/kg) ou água (10mL/kg), durante o período de 30 dias de tratamento sobre o consumo alimentar	56

Figura 11 -	Pressão arterial sistólica (mmHg) dos animais alimentados com Dieta Ocidentalizada ou Dieta Padrão de laboratório (Presence ®), antes e após o tratamento	57
Figura 12 -	Frequência cardíaca (bpm) dos animais alimentados com Dieta Ocidentalizada ou Dieta Padrão de laboratório (Presence ®), antes e após o tratamento	58
Figura 13 -	Glicemia de jejum (mg/dL) dos animais alimentados com Dieta Ocidentalizada ou Dieta Padrão de laboratório (Presence ®), antes e após o tratamento	62
Figura 14 -	Peso relativo dos órgãos dos animais após 30 dias de tratamento	65

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Composição de macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) da dieta normocalórica para roedores (Presence®) e da Dieta Ocidentalizada	38
Tabela 2 -	Consumo médio de ração (g) de ratos <i>Wistar</i> machos e fêmeas dos grupos toxicidade dose repetida controle ou tratados com respectivas doses do leite fermentado para o teste toxicidade de doses repetidas	48
Tabela 3 -	Peso relativo (g/100g de peso corporal) do fígado e rins de ratos <i>Wistar</i> machos e fêmeas dos grupos tratados com respectivas doses do leite fermentado para o teste toxicidade de doses repetidas	49
Tabela 4 -	Perfil hematológico de ratos <i>Wistar</i> machos e fêmeas dos grupos tratados com respectivas doses do leite fermentado para o teste toxicidade de doses repetidas	50
Tabela 5 -	Perfil bioquímico de ratos <i>Wistar</i> machos e fêmeas dos grupos tratados com respectivas doses do leite fermentado para o teste toxicidade de doses repetidas	51
Tabela 6 -	Comprimento corporal, circunferência abdominal e índice de massa corpórea (IMC) de ratos <i>Wistar</i> antes e após o tratamento	59
Tabela 7 -	Perfil lipídico (mg/dL) de ratos <i>Wistar</i> antes e após o tratamento	61
Tabela 8 -	Perfil bioquímico (mg/dL) de ratos <i>Wistar</i> antes e após o tratamento	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAL	Bactérias láticas
°C	Grau celsius
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CT	Colesterol total
TDR	Toxicidade de doses repetidas
TDU	Toxicidade dose única
TG	Triglicerídeos
DCV	Doença cardiovascular
DL₅₀	Dose Letal 50
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DO	Dieta ocidentalizada
DP	Dieta padrão
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
FC	Frequência cardíaca
FOS	Fruto-oligossacarídeos
g	Gramas
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
GOS	Galacto-oligosacarídeos
GPRs	Receptores acoplados à proteína G
h	Hora
HbA1	Hemoglobina alfa 1
HDLc	<i>High density lipoprotein-cholesterol</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IMC	Índice de massa corporal
i.p	Intra peritoneal
kcal	Quilocaloria
kg	Quilograma

LDLc	<i>Low density lipoprotein-cholesterol</i>
LFPB	Laboratório de Farmacologia e Produtos Bioativos
Log	Logaritmo
mm³	Milímetro cubico
Min	Minuto
mL/kg	Mililitro/quilograma
MRS	Man Rogosa & Sharpe
mL	Mililitro
n^o	Número
NUPEA	Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	Pressão arterial sistólica
PC	Peso corporal
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
TDR	Toxicidade Dose Repetida
TDU	Toxicidade Dose Única
TGI	Trato Gastrointestinal
TGO/AST	Transaminase oxalacética/aspartato aminotransferase
TGP/ALT	Transaminase pirúvica/alanina aminotransferase
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
UFC/g	Unidades Formadoras de Colônias/grama
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
XOS	Xilo-oligossacarídeos
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo Geral	22
2.2	Objetivos Específicos	22
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
3.1	Alimentos Funcionais	23
3.2	Probióticos	24
3.3	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	26
3.4	Prebióticos	27
3.5	Frutanos Tipo Inulina Como Principais Prebióticos	28
3.6	Simbiótico	29
3.7	Síndrome Metabólica	29
3.8	Produtos Lácteos Probióticos e/ou Prebióticos e Seus Benefícios Para as DCNT (Redução dos Fatores de Risco Para a Síndrome Metabólica)	30
3.9	Leite de Cabra (Importância Nutricional de Desenvolvimento Social e Econômico para a Região Nordeste)	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	Local da Pesquisa	32
4.2	Obtenção das Culturas Lácticas	32
4.3	Processo de Ativação da Cepa Liofilizada de <i>Limosilactobacillus mucosae</i>	32
4.4	Produção do Leite de Cabra Fermentado	32
4.5	Modelos Animais e Princípios Bioéticos	33
4.6	Avaliação da Toxicidade Dose Única	33
4.7	Avaliação da Toxicidade de Doses Repetidas	34
4.8	Avaliação Comportamental, Evolução do Peso Corporal e Consumo de Água e Ração <i>In Vivo</i>	34
4.9	Avaliações <i>Ex Vivo</i>	35
4.9.1	Método de Eutanásia e Obtenção do Sangue	35
4.9.2	Determinação do Peso Relativo dos Órgãos	35
4.9.3	Determinação do Perfil Hematológico e Bioquímico	35

4.9.4	Avaliação Macroscópica e Histopatológica	36
4.10	Indução da Síndrome Metabólica	36
4.10.1	Modelo Experimental	36
4.10.2	Dieta e Tratamento	37
4.10.3	Avaliações <i>in vivo</i>	40
4.10.3.1	<i>Evolução do Peso Corporal e Consumo Alimentar</i>	40
4.10.3.2	<i>Medida de Pressão Arterial Sistólica e Frequência Cardíaca</i>	40
4.10.3.3	<i>Determinação das Medidas Murinométricas</i>	40
4.10.3.4	<i>Determinação do Perfil Lipídico, Glicemia de Jejum, Ureia e Creatinina</i>	40
4.10.4	Avaliações <i>ex vivo</i>	41
4.10.4.1	<i>Método de Eutanásia e Obtenção do Sangue</i>	41
4.10.4.2	<i>Determinação do Peso Relativo dos Órgãos</i>	41
4.11	Análises Estatísticas	41
5	RESULTADOS	43
5.1	Toxicidade Dose Única	43
5.1.1	Avaliação Comportamental, Peso Corporal e Consumo de Ração	43
5.1.2	Avaliação Macroscópica e Histopatológica	44
5.2	Toxicidade de Doses Repetidas	45
5.2.1	Avaliação Comportamental, Peso Corporal e Consumo de Ração	45
5.2.2	Determinação do Peso Relativo dos Órgãos	48
5.2.3	Determinação do Perfil Hematológico e Bioquímico	49
5.2.4	Avaliação Macroscópica e Histopatológica	52
5.3	Indução da Síndrome Metabólica e Pós-Tratamento	53
5.3.1	Evolução do Peso Corporal e Consumo Alimentar	53
5.3.2	Medidas de Pressão Arterial Sistólica e Frequência Cardíaca	56
5.3.3	Determinação de Medidas Murinométricas	58
5.3.4	Determinação do Perfil Lipídico, Glicemia de Jejum, Ureia e Creatinina	60
5.3.5	Determinação do Peso Relativo dos Órgãos	65
6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74

ANEXO A ARTIGO PUBLICADO COMO RESULTADO DA PESQUISA	87
ANEXO B PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	88

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas observou-se um aumento na prevalência de doenças cardiovasculares, obesidade, hipertensão, diabetes e alguns tipos de câncer, principalmente em virtude de uma alimentação não balanceada. Em decorrência desses fatores, apesar de uma parte da população estar ficando mais obesa, outra parte, a qual tem acesso a alimentos de boa qualidade nutricional, passou a ter uma maior preocupação e um olhar mais consciente relacionado ao conjunto boa alimentação e saúde. Nesse sentido, a indústria de alimentos funcionais, percebendo que esse nicho do mercado é bastante rentável economicamente, passaram a investir mais em tecnologias e estudos que visassem mostrar os benefícios à saúde através dos alimentos, já que são produtos de alto valor agregado podendo torna-los bastante lucrativos para as empresas (SILVA; ORLANDELLI, 2019).

Porém, a síndrome metabólica, que pode ser induzida através de uma dieta não saudável, ainda é considerada um dos principais desafios da saúde pública em todo o mundo e leva os indivíduos a sérios problemas de saúde (hipertensão, diabetes, obesidade, entre outros). Esta síndrome caracteriza-se por um grupo de anormalidades metabólicas e fatores clínicos como resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão, obesidade, aumento da circunferência abdominal. Cada critério da síndrome está relacionado a um risco aumentado de desenvolvimento de doença cardiovascular e diabetes mellitus tipo 2. Metabolicamente, vários fatores de risco tendem a se agrupar em adultos de meia idade (45-59 anos), e a presença de três ou mais desses fatores em um mesmo indivíduo aumenta o número de chances de desenvolverem doenças coronarianas (YANG *et al.*, 2020). Estilo de vida sedentário (falta de atividade física), tabagismo e dietas desequilibradas são fatores de risco modificáveis conhecidos por acarretarem no indivíduo o desenvolvimento da síndrome metabólica. Porém, intervenções no estilo de vida especialmente intervenções dietéticas podem melhorar essa condição (CASTRO-BARQUERO *et al.*, 2020).

Nesse sentido, os alimentos funcionais, através dos probióticos, chegaram com grande propósito de apresentarem, além de benefícios intestinais, resultados na redução do risco de doenças relacionadas à síndrome metabólica. Já é comprovado cientificamente que alguns desses alimentos ajudam na redução do risco de doenças tais como cardiovasculares, obesidade, diabetes e câncer, incluindo a redução dos níveis de lipídios no sangue, diminuição da formação de placas de ateroma, redução da oxidação das lipoproteínas, eliminação dos radicais livres e inibição da agregação plaquetária, os quais podem ser um adjuvante alternativo para

complementar o tratamento dessas doenças (GUL; SINGH; JABEEN, 2016; PEREIRA *et al.*, 2019; BOVOLINI, *et al.*, 2021).

Outro alimento que desempenha um papel importante na nutrição humana é o leite de cabra, podendo oferecer aos produtores um bom rendimento em termos de produto agropecuário e boa viabilidade econômica, com a possibilidade de utilização como ingrediente para elaborar produtos derivados como queijos, iogurtes e outros leites fermentados (NAYIK *et al.*, 2022), sem adentrar no mérito de minimamente processados e altamente processados. A exemplo dos alimentos funcionais, o leite de cabra apresenta algumas propriedades particulares, tais como maior digestibilidade, maior capacidade tamponante, menor teor de colesterol e elevado teor de cálcio, quando comparado ao leite de vaca. Seu valor funcional pode ser melhor explorado por meio de fermentação com microrganismos, empregando culturas puras ou em combinação (BURITI *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2019).

Dentre os microrganismos que podem ser utilizados para este fim, destacam-se os probióticos, os quais são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL *et al.*, 2014). Bactérias do gênero *Limosilactobacillus* (antes pertencente ao gênero *Lactobacillus*) (ZHENG *et al.*, 2020) têm sido utilizadas como probióticos. Segundo De Moraes *et al.* (2017), a espécie *Limosilactobacillus mucosae* tem grande potencial para produção de alimentos probióticos. Do mesmo modo, a eficácia desse gênero no tratamento de algumas doenças envolvidas na síndrome metabólica já tem sido relatada (JIANG *et al.*, 2020; RYAN, *et al.*, 2019). Complementarmente, os prebióticos são substratos utilizados seletivamente por microrganismos hospedeiros que conferem um benefício à saúde e, quando presentes, favorecem a multiplicação dos probióticos. A inulina é uma fibra alimentar que atua como prebiótico, sendo, portanto, eficaz ao estimular a multiplicação de microrganismos benéficos (GIBSON *et al.*, 2017).

Sabendo dos benefícios desses compostos para a saúde e redução de doenças, é interessante avaliar o efeito de um alimento produzido com leite de cabra, *L. mucosae* e o prebiótico inulina, além de uma cultura iniciadora de fermentação láctica, como *Streptococcus thermophilus*, em um modelo animal de doença crônica não transmissível, como a síndrome metabólica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a segurança e o efeito de leite caprino fermentado com prebiótico inulina, a cepa nativa *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007, potencialmente probiótica, e a cultura iniciadora *Streptococcus thermophilus* QGE sobre a reversão de fatores associados em um modelo experimental de síndrome metabólica.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- a) determinar a toxicidade dose única do leite fermentado em camundongos *Swiss Webster*;
- b) determinar a toxicidade de doses repetidas (28 dias) em ratos *Wistar*;
- c) analisar comportamento, peso corporal, consumo de ração, macroscopia e histologia dos órgãos para os animais nos testes de toxicidade dose única e toxicidade de doses repetidas, e peso dos órgãos, perfil hematológico e bioquímico para os animais do teste de toxicidade de doses repetidas;
- d) induzir síndrome metabólica em ratos *Wistar* utilizando Dieta Ocidentalizada (DO);
- e) avaliar a evolução do peso corporal, consumo alimentar, medidas murinométricas (circunferência abdominal, comprimento corporal e comprimento torácico) de ratos *Wistar* alimentados com DO, desde o início da indução da síndrome até o final dos tratamentos (180 dias) com o leite fermentado;
- f) aferir medidas de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca dos animais antes (150 dias) e após o tratamento (180 dias) com o leite fermentado;
- g) determinar a glicemia de jejum, perfil lipídico (colesterol total, triglicérides, HDLc e LDLc), e de proteínas séricas nos ratos *Wistar* com síndrome metabólica, antes (150 dias) e após o tratamento (180 dias) com o leite fermentado.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Alimentos Funcionais

A produção de alimentos funcionais vem ganhando destaque na indústria de alimentos nos últimos anos, pois a população vem adquirindo mais consciência entre boa alimentação e saúde e, por isso, as indústrias alimentícias percebendo que esse nicho do mercado é bastante rentável economicamente, passaram a investir mais em tecnologias e estudos que visassem mostrar os benefícios à saúde através dos alimentos, já que são produtos de alto valor agregado podendo torna-los bastante lucrativos para as empresas (SILVA; ORLANDELLI, 2019).

Todos os alimentos contendo componentes biologicamente ativos, quando consumidos regularmente, são considerados alimentos funcionais, desde que estejam associados a benefícios fisiológicos e relacionados à prevenção de doenças crônicas e à saúde do consumidor. Esses componentes exercem propriedades funcionais e os produtos que os contêm são semelhantes aos alimentos convencionais, sendo consumidos como parte de uma dieta usual, mas com o diferencial de serem capazes de exercer efeitos benéficos à saúde. Sendo assim, são conhecidos por, além de exercerem a função nutricional primária, serem capazes de melhorar o estado de saúde ou reduzir riscos de doenças no indivíduo, porém, o bioativo pode não ser um nutriente essencial. Diante disso, estudos científicos buscam comprovar o papel desses alimentos na promoção da saúde e na prevenção de doenças, em especial, o papel dos probióticos, devido às suas vantagens e aplicações disponíveis, especialmente em produtos lácteos (GUL; SINGH; JABEEN, 2016; ALKHATIB *et al.*, 2017; ALMEIDA NETA *et al.*, 2018).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em sua resolução de nº 18 de 30/04/1999, estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais, definindo que para utilização de propriedade funcional e/ou de saúde o alimento ou ingrediente deve conferir funções nutricionais básicas, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1999).

O crescente interesse de indústrias e consumidores em relação aos alimentos funcionais tem grande destaque para os probióticos, pois sabe-se atualmente que suas vantagens vão além da saúde intestinal, que quando ingeridos em quantidades adequadas podem ajudar na redução do risco de doenças tais como cardiovasculares, obesidade, diabetes e câncer, incluindo a redução dos níveis de lipídios no sangue, diminuição da formação de placas de aterosclerose, redução da

oxidação das lipoproteínas, eliminação dos radicais livres e inibição da agregação plaquetária. Essa busca pelos benefícios dos alimentos funcionais está relacionada às melhores escolhas para a alimentação, ou a um aumento na conscientização sobre o binômio dieta/saúde, principalmente porque a relação saúde/bem estar está estritamente ligada ao consumo de alimentos nutritivos, o que pode oferecer grande oportunidade para melhorar a saúde pública (GUL; SINGH; JABEEN, 2016; PEREIRA *et al.*, 2019). Foi estimado que para este ano de 2022 haja um crescimento de até 7% globalmente no mercado de probióticos, representando cerca de 64 bilhões de dólares na sua taxa de crescimento anual composta (FILBIDO; SIQUIERI; BACARII, 2019).

Há no mercado um nicho muito rentável de alimentos funcionais disponíveis e, apesar de haver produtos vegetais, incluindo azeites, cereais e chás, produtos animais como os de pescado, são os produtos lácteos e enriquecidos com probióticos e prebióticos, principalmente as bebidas, a categoria de alimentos funcionais mais atrativa. Isso ocorre devido à facilidade de dissolução dos componentes funcionais, além de estudos recentes acerca de otimização de ingredientes para a formulação de novas bebidas funcionais, exploração de microrganismos e ingredientes alimentares não digeríveis para aumentar os benefícios funcionais, uso de ingredientes funcionais, valorização de subprodutos, entre outros (BARROS, 2021; ADEDOKUN *et al.*, 2022; GRANATO *et al.*, 2020).

3.2 Probióticos

Hill *et al.* (2014) atualizaram a definição de probióticos anteriormente proposta pela Fundação das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Em tal definição, internacionalmente aceita pela comunidade científica até os dias atuais, os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Para que se tenha efeito, esses microrganismos devem sobreviver através das barreiras gastrointestinais em número suficiente, de modo a garantir que colonizem o intestino e exerçam seus benefícios sobre a saúde. Os probióticos podem ser disponibilizados incorporados em alimentos, devendo permanecer viáveis nos mesmos durante todo o tempo de armazenamento e, dessa forma, poder influenciar a microbiota intestinal quando ingeridos (DE MORAES *et al.*, 2017).

Uma grande variedade de produtos que contêm probiótico são consumidos diariamente por milhões de pessoas (KLEEREBEZEM *et al.*, 2019). Segundo Terpou *et al.* (2019), os alimentos probióticos devem conter uma quantidade de microrganismos vivos de pelo menos 10^6 UFC/g,

para que possa proporcionar benefícios à saúde do consumidor, sendo as bactérias da família *Lactobacillaceae* e do gênero *Bifidobacterium* as mais utilizadas para o consumo humano.

A *World Gastroenterology Organisation* (WGO) aponta que alterações na microbiota intestinal estão envolvidas no curso de diversas doenças, e os probióticos são capazes de promover a homeostase desse meio através de produção de mucinas, competição pela adesão de patógenos, controle da inflamação, alteração do pH, produção de citocinas, propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias, resultando em contribuições para condições saudáveis para o meio. (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION, 2017; KIM *et al.*, 2019)

Diversos são os benefícios já comprovados de que os probióticos exercem na saúde dos consumidores: modulação da microbiota intestinal (PELUZIO *et al.*, 2021); redução de acúmulo de gordura (YAVAROV-DAYLIEV *et al.*, 2022); redução do peso corporal, dos níveis de glicose de jejum, da resistência à insulina; aumento dos níveis de *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) (CABELLO-OLMO *et al.*, 2022), redução de colesterol LDL e triglicerídeos (ZAFAR *et al.*, 2022); reestabelecimento aos níveis normais da pressão arterial em animais hipertensos (ZHANG; KO; ZENG, 2022); entre outros.

O mecanismo de ação dos probióticos e/ou prebióticos no hospedeiro ainda não foi totalmente elucidado, porém, acredita-se que esses mecanismos são específicos da cepa, tempo de tratamento e quantidade de microrganismos utilizados. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são o principal metabólito produzido pela fermentação de fibras alimentares pelas bactérias intestinais (ZHANG; KO; ZENG, 2022). Com relação ao efeito hipocolesterolêmico, os probióticos têm capacidade de fixar o colesterol nas suas paredes celulares, que possuem aminoácidos responsáveis pela ligação entre o colesterol e a superfície celular das bactérias, de forma a reduzir a sua disponibilidade no meio intestinal e impedir sua absorção pela corrente sanguínea (DOS SANTOS *et al.*, 2019). Para a atividade anti-hipertensiva, por sua vez, há evidências de que alguns probióticos apresentam ação inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina (ECA) através da metabolização de proteínas da matriz alimentar, principalmente a proteína do leite, e consequente liberação de peptídeos bioativos com tal efeito, regulando assim a hipertensão (KIM *et al.*, 2021). Para efeitos de controle de glicemia, há a hipótese de que a modulação imunológica após a suplementação com cepas probióticas contribui para a melhora do controle glicêmico através da geração dos AGCC e o fato de seus metabólitos induzirem a produção de GLP-1 na microbiota intestinal, atuando também no controle da glicemia (KAASIAN *et al.*, 2018). Para o potencial antiobesidade, estima-se que os AGCC interagem com receptores específicos da proteína G, como *G-protein coupled receptor 41* (GPR41) e *G-protein coupled receptor 43* (GPR43), sendo esses receptores os responsáveis

pela secreção de hormônios intestinais, como o GLP-1, que prolonga a fase gástrica e o tempo de trânsito intestinal, e também a proteína YY (PYY), importante no controle da ingestão calórica e apetite, além de estar relacionada com a motilidade intestinal e esvaziamento gástrico (REMELY; HASLBERGER, 2017).

3.3 *Limosilactobacillus mucosae*

Microbiologistas de diversos países revisaram o gênero dos microrganismos *Lactobacillus*, o qual compreende 261 espécies diversas a nível fenotípico, ecológico e genotípico. Baseado nos estudos taxonômicos, sequência genômica, filogenia de genoma central, identidade de aminoácidos, critérios fisiológicos e ecologia, foi proposto uma reclassificação do gênero *Lactobacillus* em 25 gêneros, onde foi criado, em 2020, a partir dessa separação, o gênero *Limosilactobacillus* (ZENG *et al.*, 2020). Os microrganismos do gênero *Limosilactobacillus* são considerados integrantes das bactérias lácticas (BAL) benéficas, além de serem capazes de sobreviver em condições adversas do trato gastrointestinal (TGI). Os ácidos orgânicos produzidos por estas bactérias formam um ambiente ácido que pode inibir a viabilidade de bactérias patogênicas. Dessa forma, cepas bem caracterizadas de BAL têm sido utilizadas como probióticos para modular a composição da microbiota intestinal, melhorando a imunidade da mucosa e aumentando a impermeabilidade epitelial e função de barreira e, dessa forma, promovendo a saúde do intestino do hospedeiro. Dentre as espécies de BAL, *Limosilactobacillus mucosae* está bastante associada à mucosa intestinal animal e humana (DE MORAES *et al.*, 2017; ROYAN *et al.*, 2021; DROBNÁ *et al.*, 2017; PAJARILLO *et al.*, 2017).

Cepas autóctones de *L. mucosae*, isoladas de leite de cabra, foram avaliadas quanto ao seu potencial probiótico. Dentre as cepas analisadas, *L. mucosae* CNPC007 apresentou características que a candidatam como probiótica para uso em humanos, como: genes relacionados à adesão à mucosa intestinal, tolerância a sais biliares, alta taxa de sobrevivência às condições gástricas e entéricas pela simulação *in vitro* e susceptibilidade a antibióticos (DE MORAES *et al.*, 2017).

Recentemente alguns trabalhos têm demonstrado o potencial probiótico das cepas de *L. mucosae* como próspero no tratamento de algumas doenças envolvidas na síndrome metabólica, como redução e melhora de hiperlipidemia e aterosclerose (JIANG *et al.*, 2020) e possível efeito cardioprotetor (RYAN *et al.*, 2019).

3.4 Prebióticos

Prebiótico é um substrato utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros que conferem um benefício à saúde. Produtos que contêm probióticos e prebióticos são denominados simbióticos e, sendo assim, quando consumidos, o componente prebiótico favorece a multiplicação e atividade do componente probiótico (GIBSON *et al.*, 2017).

Estima-se que há uma perspectiva de crescimento industrial acerca de prebióticos de 12,7% nos próximos anos (MANO *et al.*, 2018) e tanto os probióticos quanto os prebióticos são cada vez mais incorporados a uma ampla gama de alimentos (CUNNINGHAM *et al.*, 2021).

Os efeitos prebióticos clássicos são mediados pelo consumo do substrato por grupos específicos dentro da microbiota, promovendo seu crescimento e atividade metabólica. Esses compostos apresentam como principais subprodutos do metabolismo microbiano os AGCC acetato, butirato e propionato, conhecidos por interagir com os hospedeiros e facilitar muitos efeitos dos probióticos. A produção dos principais AGCC, acetato, propionato e butirato, é influenciada pela fonte do substrato, composição da microbiota e tempo de trânsito intestinal, sendo o acetato encontrado em níveis mais altos nas fezes dos animais (ROUPAR *et al.*, 2022). As mudanças resultantes na composição microbiana e nas concentrações de metabólitos a partir da administração de prebióticos afetam a sinalização epitelial, imune, nervosa e endócrina do hospedeiro e mediam benefícios à saúde, como melhorias na função intestinal, metabolismo de glicose e lipídios, regulação de saciedade e apetite, além de serem reconhecidos por modulação na sinalização de células intestinais com efeitos na inflamação e função de barreira (GIBSON *et al.*, 2017; BLAAK *et al.*, 2020; BROSSEAU *et al.*, 2019).

Estudos mostraram que uma dieta rica em gordura e açúcares, a chamada dieta ocidental (DO) altera a função de barreira intestinal e que esse comprometimento está associado ao desenvolvimento de obesidade e síndrome metabólica, podendo causar disfunção dessa barreira e aumento da permeabilidade intestinal, facilitando a translocação de bactérias e componentes bacterianos para a corrente sanguínea, enquanto que a ingestão de prebióticos atua na melhora da integridade intestinal (BEISNER *et al.*, 2021).

Os prebióticos geralmente se referem a oligossacarídeos que não são digeridos por enzimas animais, mas podem estimular seletivamente espécies de bactérias intestinais importantes. Os principais oligossacarídeos comerciais são os fruto-oligossacarídeos (FOS), inulina, galacto-oligossacarídeos (GOS) e xilo-oligossacarídeos (XOS) (ZHU *et al.*, 2021).

3.5 Frutanos Tipo Inulina Como Principais Prebióticos

A inulina é uma fibra alimentar fermentável, solúvel em água, pertence ao grupo de carboidratos não digeríveis chamado frutanos, e está presente em vegetais como as raízes de chicória. Esse carboidrato é dependente da microbiota intestinal para sua decomposição em produtos como os AGCC, já que não pode ser absorvido diretamente no trato digestivo. A inulina atua como um prebiótico eficaz, estimulando o crescimento de populações de microrganismos benéficos, como os pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* e à família *Lactobacillaceae*, além de também poder ser extraída para uso como ingrediente alimentar. Estudos mostraram que algumas bactérias benéficas hidrolisaram a inulina de modo a produzir AGCC no cólon e reduzir a resposta inflamatória de baixo grau, facilitando o metabolismo da glicose. Esses AGCC interagem com receptores acoplados às proteínas G (GPRs), GPR41, GPR43 e GPR109A, sendo essa interação está ligada à atividade das células imunes, conferindo efeitos fisiológicos benéficos ao hospedeiro (HIEL *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2020).

Beisner *et al.* (2021) em estudo com camundongos alimentados com DO e tratados com uma dieta controle suplementada com inulina, observaram que a inulina e o butirato de sódio (produto da fermentação da inulina) reduziram o aumento de peso, a hepatoesteatite e o nível de triglicerídeos plasmático nos animais com obesidade induzida pela dieta, além de também terem contribuído para melhora da permeabilidade intestinal. Outro estudo, de Miao *et al.* (2022), sugeriu que camundongos alimentados com dieta rica em gordura por 4 semanas na gestação e tratados com inulina, apresentaram melhora dos parâmetros de distúrbios do metabolismo de glicose e lipídios, reduzindo o acúmulo de gordura e a intolerância à glicose, sendo esta melhora atribuída ao tratamento com inulina mediado pela microbiota intestinal. Além de outros benefícios já mostrados, evidenciou-se também melhora de alterações hepáticas em pacientes com transtorno de uso de álcool durante a abstinência (AMADIEU *et al.*, 2022), efeito restaurador da mucosa intestinal de camundongos imunossuprimidos (ZOU *et al.*, 2022) e redução da doença hepática gordurosa não alcoólica em camundongos (WANG *et al.*, 2022).

Considerando as últimas instruções publicadas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a quantidade mínima de inulina e oligofrutose adicionada à porção de produtos probióticos com alegação de saúde deve ser de no mínimo 5g, sem ultrapassar 30g (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016).

3.6 Simbiótico

É uma mistura que compreende microrganismos vivos e substratos seletivamente utilizados por microrganismos hospedeiros que conferem um benefício à saúde do hospedeiro. O simbiótico complementar é composto por um probiótico e um prebiótico que juntos conferem um ou mais benefícios à saúde, mas não requerem função co-dependentes, e o simbiótico sinérgico contém um substrato que é utilizado seletivamente pelo(s) microrganismo(s) vivo(s) coadministrado(s) (SWANSON *et al.*, 2020).

3.7 Síndrome Metabólica

Síndrome metabólica é um conjunto de fatores de risco cardiometabólico com alta prevalência na população adulta e com altos custos para os sistemas públicos de saúde em todo o mundo e caracteriza-se pela presença de fatores de risco metabólicos para diabetes tipo 2 e doença cardiovascular aterosclerótica (DCV), obesidade, aumento de circunferência abdominal, hipertensão, glicemia de jejum elevada e dislipidemia. O consenso é de que a presença de três das cinco doenças acima listadas constitui um diagnóstico da doença. Outros nomes aplicados incluem síndrome X, síndrome da resistência à insulina, quarteto mortal ou síndrome da dislipidemia da obesidade (LIMA *et al.*, 2021; TRAN *et al.*, 2020; BOVOLINI *et al.*, 2021). Pacientes acometidos com tais doenças estão associados a processos inflamatórios com intensidade exacerbada, resultando em mecanismos ativados por elevados níveis de marcadores de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), proteína C reativa, interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) (FARIA *et al.*, 2019). Tem sido sugerido que o sedentarismo, os padrões alimentares desequilibrados e inflamação crônica de baixo grau levam a progressão e complicações diabéticas, onde a DM2 é frequentemente acompanhada por outras doenças como hipertensão, dislipidemia, obesidade e aumento da circunferência abdominal, doenças estas que desempenham papel fundamental no desenvolvimento da síndrome metabólica (BOVOLINI *et al.*, 2021).

O Brasil é um país com uma das mais altas prevalências de diabetes no mundo (chegando a ocupar o 6º lugar), com 15,7 milhões de adultos (20-79 anos) diagnosticados com a doença em 2021, onde a diabetes tipo 2 (DM2) representa mais de 90% de todos os casos de diabetes, com um número de 5 milhões de adultos ainda não diagnosticados. A estimativa da incidência da doença é que em 2045 chegue a 23,2 milhões (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021).

Os principais mecanismos fisiopatológicos que caracterizam a DM2 são a resistência à insulina (mais atribuída a fatores ambientais relacionados a excessos, estilo de vida sedentário e obesidade) e secreção insuficiente desta pelo pâncreas (em grande parte resultado de influências genéticas, além de que a própria hiperglicemia pode prejudicar a função das células beta pancreáticas). Há evidências de que o risco de DM2 é influenciado também por fatores genéticos, sendo estes responsáveis por apenas uma pequena porção do risco (LANGENBERG; LOTTA, 2018).

O sobrepeso e a obesidade são determinantes para acometimento de síndrome metabólica. A medicina avalia cada fator contribuinte para tal doença de forma individualizada, porém o componente de circunferência abdominal elevada parece ter um peso maior, pois leva não apenas à resistência à insulina, mas também ao acúmulo de lipídios em outros locais como fígado e músculo, predispondo ainda mais à resistência à insulina e à dislipidemia. Esses fatores aliados à hipertensão tendem a manifestar-se comumente como estados pró-trombóticos e pró-inflamatórios, que são fatores de risco aumentados para doenças cardiovasculares (DCV), além de que a obesidade causa resistência periférica à captação de glicose mediada por insulina e também pode diminuir a sensibilidade das células beta à glicose (SHERLING; PERUMAREDDI; HENNEKENS, 2017).

3.8 Produtos Lácteos Probióticos e/ou Prebióticos e Seus Benefícios Para as DCNT (Redução dos Fatores de Risco Para a Síndrome Metabólica)

Alguns estudos já comprovam que diferentes produtos lácteos podem conferir benefícios à saúde através de redução de fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis.

Delgadillo-Puga *et al.* (2020) avaliaram o efeito do leite de cabra sobre alterações metabólicas em camundongos alimentados com dieta rica em gordura e chegaram à conclusão de que a incorporação desse leite à dieta desses animais acarretou em redução do peso corporal e da massa gorda, melhorou a tolerância à glicose, preveniu a hipertrofia do tecido adiposo e a esteatose hepática, associados a um aumento no gasto energético e redução dos marcadores inflamatórios, caracterizando-o como uma estratégia não farmacológica para melhorar as alterações metabólicas induzidas por dieta rica em gordura. Um potencial efeito benéfico foi identificado através da separação e identificação de um peptídeo inibidor da ECA de hidrolisados de caseína do leite de cabra, caracterizando como potencial efeito benéfico contra hipertensão arterial (QIAO *et al.*, 2022). O kefir de leite de cabra simbiótico, suplementado com glicomanana extraída do tubérculo porang (*Amorphophallus oncophyllus*), bactérias e

leveduras, apresentou melhora à saúde de ratos alimentados com dieta rica em gordura de forma que conseguiu reduzir os níveis de hemoglobina glicada (HbA1) e TNF- α plasmáticos (NURLIYANI; HARMAYANI; SUNARTI, 2022).

3.9 Leite de Cabra (Importância Nutricional, de Desenvolvimento Social e Econômico para a Região Nordeste)

Vem sendo demonstrado que o leite de cabra é uma ótima fonte alimentar, proporcionando benefícios na manutenção da saúde, no processo fisiológico e na nutrição da população, podendo ser consumido pela maioria da população que apresentam alergia ao leite de vaca, além de ser uma boa fonte de compostos bioativos (peptídeos, ácido linoleico conjugado, AGCC, entre outros). No entanto, a composição desse leite depende, entre outros, da alimentação, raça, período de vida e habitat do animal (DELGADILLO-PUGA *et al.*, 2020).

A partir do leite caprino podem ser fabricados diversos produtos lácteos, como iogurte, queijo, bebidas fermentadas e não fermentadas, sobremesas, manteiga, etc, além de que o mesmo apresenta uma alta quantidade de proteínas, ácidos graxos, minerais e um bom potencial terapêutico, o que o candidata como alimento funcional (NAYIK *et al.*, 2021).

Segundo censo agro do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2017), o rebanho de caprinos no Brasil é de 8.260.607, sendo 1.415.953 no estado de Pernambuco, o que corresponde a aproximadamente 17% do rebanho nacional. Visto que é uma atividade bem desenvolvida na região, a caprinocultura leiteira fortalece ainda mais a necessidade de diversificação e desenvolvimento de novos produtos, podendo se expandir através da agregação de valor e comercialização dos produtos lácteos finais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da Pesquisa

Os ensaios de toxicidade, confecção da DO, indução da SM, tratamento e análises pós-tratamento foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Produtos Bioativos da Universidade Federal de Pernambuco-LFPB-UFPE.

4.2 Obtenção das Culturas Láticas

A cepa de *L. mucosae* CNPC007, isolada por De Moraes (2017), foi proveniente, na forma liofilizada, da coleção de microrganismos nativos de interesse para a agroindústria da Embrapa Caprinos e Ovinos (Sobral, CE, Brasil).

4.3 Processo de Ativação da Cepa Liofilizada de *Limosilactobacillus mucosae*

O processo de ativação foi realizado no Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA) do Centro de Ciências e Tecnologia (CCT) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), segundo metodologia descrita por De Barcelos (2017), com modificações. A cepa liofilizada *L. mucosae* CNPC007 foi inoculada em tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo De Man, Rogosa & Sharpe – MRS. Em seguida os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C/24h (1ª ativação). Um novo cultivo foi realizado com transferência de 100 µL do conteúdo dos tubos incubados (1ª ativação) para tubos tipo Falcon contendo 10 mL de MRS caldo e foram incubados em estufa a 37° C/24h (2ª ativação). Posteriormente, o material foi centrifugado a 3.500 rpm/ 15min em centrífuga mod. CT – 0603 (Parsec Tecnologia Laboratorial, Itajaí, SC, Brasil). O *pellet* obtido foi lavado com 10 mL de solução salina a 0,85% e centrifugado sob as mesmas condições anteriores. Cada *pellet* obtido foi utilizado em 100 mL de formulação de leite de cabra fermentado.

4.4 Produção do Leite de cabra Fermentado

A fermentação do leite foi realizada no Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA) do Centro de Ciências e Tecnologia (CCT), da Universidade Estadual da Paraíba, segundo protocolo de Galdino *et al.* (2021) para o tratamento de número T35. Para tal, o leite

foi inoculado com a cultura iniciadora comercial de *Streptococcus thermophilus* QGE (Biotech Fermentos e Coagulantes Ltda., Alto Piqui, PR, Brasil, 0,004 g/100 mL) e com a cepa nativa *L. mucosae* CNPC007 como cultura adjuvante probiótica (*pellet* da segunda ativação, conforme descrito no item 4.3), e também adicionado de inulina (5g/100mL) (Orafti GR, Beneo, distribuído pela Sweetmix, São Paulo, SP, Brasil) como ingrediente prebiótico.

A fermentação foi conduzida em leite de cabra após seu tratamento térmico por 15 min a 90°C. A incubação foi realizada em temperatura de 42°C e em tempo necessário para se chegar à acidez mínima desejável de 0,6 g de ácido lático/ 100 mL para leites fermentados segundo a legislação vigente (BRASIL, 2007). Antes de oferecer o produto aos animais foram feitas análises previstas na referida legislação que garantiram a qualidade do mesmo e que indicaram a viabilidade média da cultura nativa *L. mucosae* entre 7,4 log UFC/mL e 8,2 log UFC/mL ao longo do período de estocagem.

4.5 Modelos Animais e Princípios Bioéticos

Para determinação da toxicidade de dose única do leite fermentado foram utilizados 10 camundongos fêmeas *Swiss Webster* (25-30 g), com idade de 45 dias de vida, não-isogênicas, nulíparas, provenientes do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE). Para a toxicidade de dose repetida, foram utilizados 40 ratos *Wistar*, sendo 20 machos e 20 fêmeas, com peso entre 188-220 g e 148-162 g (com idade de 5 semanas de vida), respectivamente, provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Todos os animais passaram por uma adaptação de 72 horas antes de cada ensaio e foram mantidos sob condições padrão (temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de 30-70%, com controle claro/escuro de 12h). Os animais tiveram acesso à ração comercial Presence® (Presence Nutrição Animal, Paulínia, SP, Brasil) e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, sob o nº 0062/2018. Os procedimentos adotados nos experimentos seguiram as normas da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) (ANEXO 2).

4.6 Avaliação da Toxicidade de Dose Única

A toxicidade de dose única (TDU) foi realizada em camundongos *Swiss webster* fêmeas (n=5 animais/grupo), de acordo com método *up and down* das diretrizes da OECD 425. Os animais foram divididos em dois grupos: Toxicidade dose única controle (TDUc) e Toxicidade dose única tratado (TDUt) (n=5 animais/grupo). Eles foram submetidos a jejum de 12 horas e pesados antes de receberem dose única de água ou leite fermentado. Os animais aos quais ingeriram o leite fermentado, receberam a dose de 20 mL/kg via gavagem, o grupo controle recebeu água em igual volume. Os animais foram submetidos aos respectivos tratamentos em dose única, via gavagem, no dia zero e foram analisados para possíveis sinais de toxicidade em intervalos de 24 horas pelo período de 14 dias e eutanasiados no 15º dia. Em caso de mortalidade, a dose mais baixa subsequente poderia ser administrada até possibilitar a estimativa de uma faixa de DL50%, conforme os padrões da *Globally Harmonised System* (GHS) (OECD-423/2001).

4.7 Avaliação da Toxicidade de Doses Repetidas

Para a toxicidade de doses repetidas (TDR) foram utilizados 40 ratos *Wistar* divididos em 4 grupos, com n=10 animais/grupo, sendo 5 de cada sexo por grupo, que recebiam diariamente via gavagem por 28 dias, 3 mL/kg (TDR3), 6 mL/kg (TDR6), 12 mL/kg (TDR12) de leite fermentado ou 12 mL/kg de água (TDRc). A avaliação seguiu as diretrizes da OECD 407, onde a menor dose do leite fermentado simula um consumo médio de uma xícara (200 mL)/dia por um adulto de 70 kg e duas doses subsequentes maiores. Os animais foram mantidos em jejum prévio de 12 horas e foram pesados antes de serem tratados, foram submetidos aos respectivos tratamentos diariamente, via gavagem, analisados para possíveis sinais de toxicidade em intervalos de 24 horas pelo período de 28 dias e eutanasiados no 29º dia.

4.8 Avaliação Comportamental, Peso Corporal e Consumo Ração *In Vivo*

Após a administração do leite fermentado, com as suas respectivas doses, de acordo com o teste em questão, os parâmetros de consumo de ração, avaliação comportamental (tremores, agressividade, aumento de frequência respiratória, convulsão, marcha, piloereção, hipnose, cianose, espasmos, resposta ao toque, fotofobia, etc), assim como a produção de excretas, foram avaliados durante 30 min, 1h, 2h, 4h e a cada 24 horas por 14 dias, para toxicidade de dose única e por 28 dias para toxicidade de doses repetidas. Para a evolução do peso na avaliação da toxicidade dose única, todos os animais foram pesados para obter as medidas de peso corporal

(PC) antes do início do teste (dia 0), e depois, periodicamente (5, 10 e 15 dias) até o dia da eutanásia. Para a toxicidade de doses repetidas, o mesmo procedimento foi adotado até o dia da eutanásia. Um procedimento semelhante e períodos de amostragem foram aplicados na avaliação do consumo alimentar. O estado de consciência, disposição geral, coordenação motora, tônus muscular, reflexos, atividade do sistema nervoso central e autônomo, e o número de óbitos também foram avaliados.

4.9 Avaliações *Ex Vivo*

4.9.1 Método de Eutanásia e Obtenção do Sangue

Ao final do experimento, no 15º dia para toxicidade de dose única e ao 29º dia para toxicidade de doses repetidas, os animais foram deixados em jejum por 10 horas, pesados, submetidos a anestesia via intraperitoneal com cloridrato de xilazina (10-15 mg/kg) e cloridrato de cetamina (100-150 mg/kg) e eutanasiados através de decapitação. No momento da decapitação, o sangue dos animais foi coletado (apenas para os animais de toxicidade de doses repetidas) em dois tubos diferentes: um com anticoagulante (EDTA) e outro em tubo vazio. Esse último foi imediatamente centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos e após, o sobrenadante foi separado, armazenado em tubo Eppendorf e refrigerado a 4°C até o momento da análise.

4.9.2 Determinação do Peso Relativo dos Órgãos

Os órgãos (fígado e rim) dos animais submetidos aos testes de toxicidade dose única e toxicidade de doses repetidas foram imediatamente retirados e pesados em balança digital com precisão de 0,005 g. Os valores foram expressos em peso relativo (grama de órgão ou tecido / cada 100 g de peso corporal total), obtidos através do seguinte cálculo: $(\text{peso do tecido ou órgão do animal} \times 100) / \text{peso corporal do animal no momento da eutanásia}$.

4.9.3 Determinação do Perfil Hematológico e Bioquímico.

As amostras de sangue coletadas em tubo com EDTA, dos grupos para toxicidade de doses repetidas, foram utilizadas para determinação do perfil hematológico. O hemograma foi realizado por automação em Hematoclin 5.4 (Bioclin, Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil).

As análises bioquímicas de TGO/AST (transaminase glutâmico-oxalacética/aspartato aminotransferase), TGP/ALT (transaminase glutâmico-pirúvica/alanina aminotransferase), ureia e creatinina foram realizadas mediante calibração dos parâmetros utilizando amostras de animais controle, sendo esses os animais que receberam água nas avaliações de toxicidade. Toda a análise bioquímica foi realizada por automação com o auxílio do analisador automático bioquímico (MH-Lab URIT 8021A, MH Equipamentos para Laboratório, São Paulo, SP, Brasil).

4.9.4 Avaliação Macroscópica e Histopatológica

Após a eutanásia, foram removidos de todos os animais (TDU e TDR) o fígado e os rins. Esses órgãos foram pesados, avaliados macroscopicamente e fixados por 24 horas em tampão formalina 10%, tamponado, pH 7.4 para realização de análises histopatológicas. Após o período de fixação as amostras foram acondicionadas em cápsulas histológicas e colocadas no autotécnico (Metalúrgica OMA, São Paulo, Brasil), para processamento *overnight*, sendo desidratadas em doses crescentes de álcool etílico a 70, 80 e 90%. Posteriormente, as amostras foram diafanizadas em xilol contendo misturas sequencialmente concentradas de parafina durante 12 horas e inclusas em parafinas quente. Os blocos foram microtomizados, obtendo cortes de 5µm dispostos em lâmina de vidro de 75 × 25 mm³, sendo coradas com hematoxilina-eosina para avaliação de alterações teciduais em microscopia óptica.

4.10 Indução da Síndrome Metabólica

4.10.1 Modelo Experimental

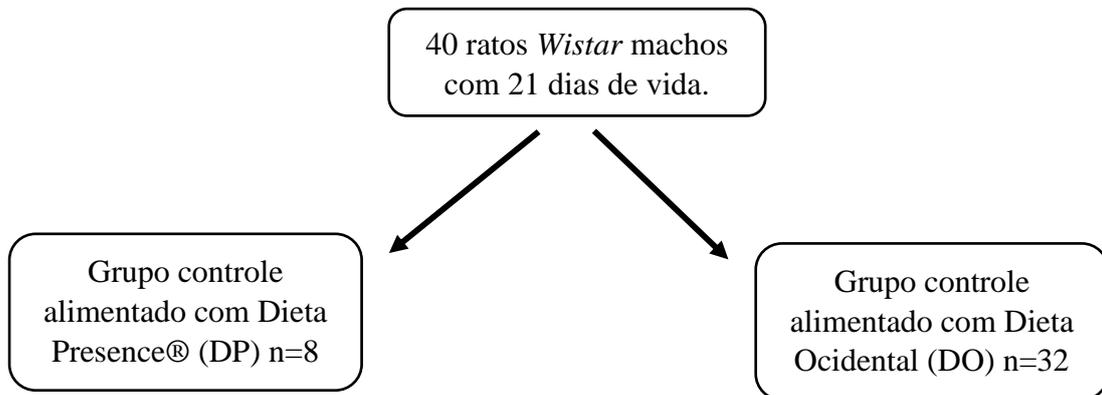
Foram utilizados 40 ratos *Wistar* machos aos 21 dias de vida, provenientes do biotério de criação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (n=4/caixa) sob condições constantes de temperatura (22 ± 2°C), umidade relativa de 55-60%, receberam água *ad libitum*.

Inicialmente, os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a dieta fornecida: 1) grupo dieta controle padrão de laboratório consumindo Dieta Presence® (DP), com n=8; e 2) Dieta Ocidentalizada (DO), com n=32, pois como mostrado na **Figura 1**, esses animais posteriormente foram subdivididos em outros 4 diferentes grupos. Ambos os grupos foram

alimentados pelas respectivas dietas durante o período de 150 dias. Os detalhes da dieta estão descritos no item 4.10.2.

Figura 1 – Formação dos grupos experimentais (n=40)



Fonte: O próprio autor.

4.10.2 Dieta e Tratamento

A Dieta Ocidentalizada (DO) experimental é caracterizada por apresentar um maior teor de lipídios saturados, quando comparada à dieta padrão para animais de laboratório. A dieta foi constituída de alimentos hiperenergéticos, triturados e misturados, formando *pellets* e ofertados aos animais. Os dados sobre a composição da dieta já foram publicados em trabalhos anteriores do grupo (FERRO-CAVALCANTE *et al.*, 2013, 2014).

Também foi utilizado o Mix de mineral AIN-93G-MX (Rhoster®) essencial para a etapa de crescimento, do desmame até os 60 dias de vida e, em seguida, alterado para o Mix de mineral AIN-93M – MX (Rhoster®), utilizado na manutenção dos animais adultos. A composição percentual centesimal dos macronutrientes das dietas em relação ao seu valor energético encontra-se apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Composição de macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) da dieta normocalórica para roedores (Presence®) e da Dieta Ocidentalizada

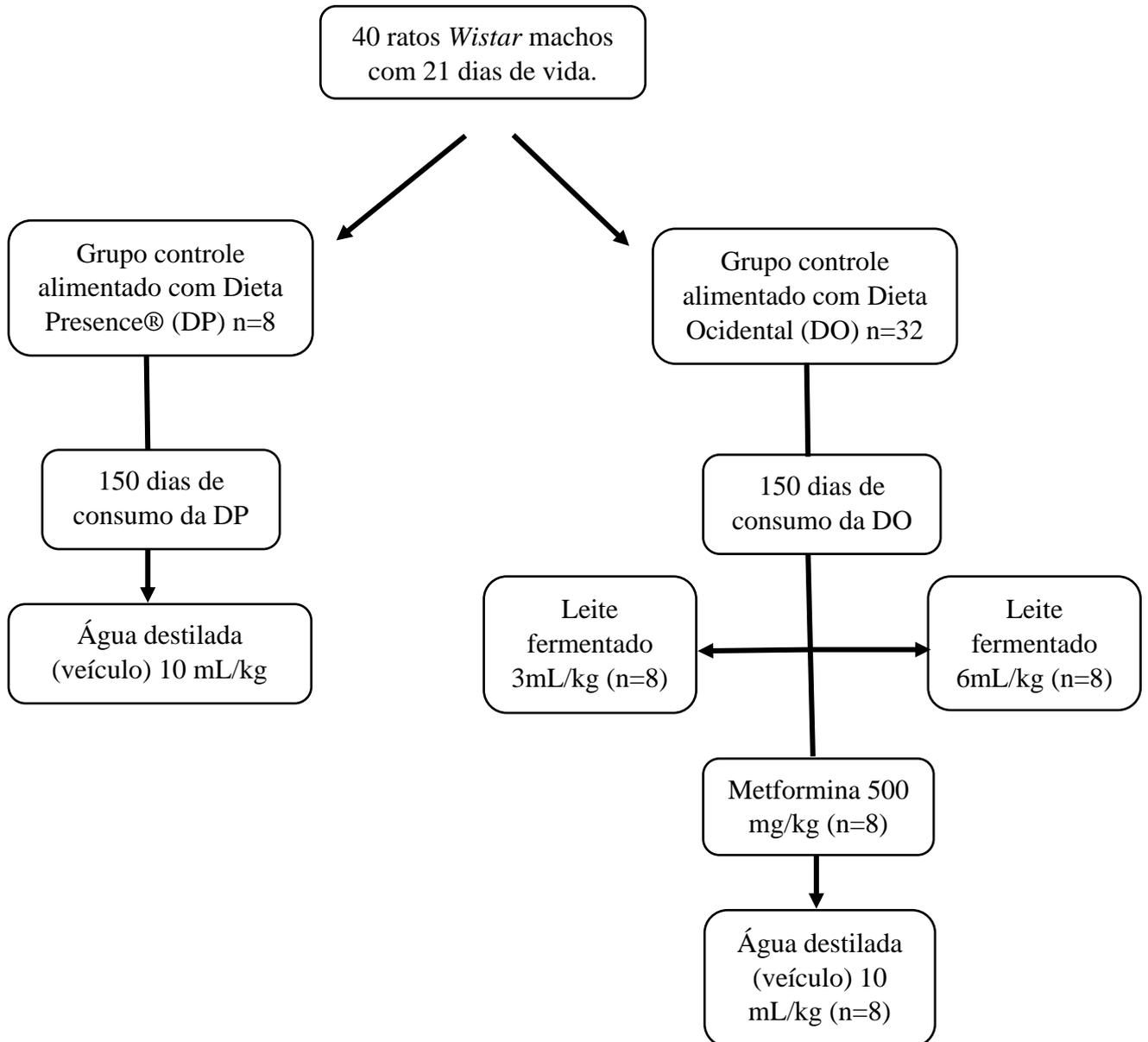
Dieta	Proteína (% kcal VET)	Carboidrato (% kcal VET)	Lipídio (% kcal VET)	VET (kcal/g)
Ocidentalizada crescimento	19	46	35	4,04
Ocidentalizada manutenção	15	51	34	4,08
Presence**	26	63	11	3,6

*Os cálculos da composição centesimal de macronutrientes foram baseados nas informações nutricionais enviadas pela empresa fornecedora dos produtos e na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO).

**Determinado pelo Instituto Adolfo Lutz, 1985.

Completados 150 dias de consumo da Dieta Ocidentalizada, os 32 animais (DO) foram aleatoriamente redistribuídos em 4 subgrupos: leite fermentado (nas doses de 3mL/kg ou 6mL/kg v.o); metformina (500 mg/kg; v.o) ou água (10 mL/kg). Esses animais continuaram com a mesma alimentação e, concomitantemente, receberam seus respectivos tratamentos diariamente, durante 30 dias. O grupo que foi alimentado com DP recebeu veículo (10 mL/kg) por igual período de tempo, conforme exposto na **Figura 2**.

Figura 2 – Delineamento experimental dos grupos a serem tratados, durante 30 dias por gavagem, com leite fermentado 3 ou 6mL/kg, metformina (500 mg/kg) ou água (10 mL/kg)



Fonte: O próprio autor.

4.10.3 Avaliações *in vivo*

4.10.3.1 *Evolução do Peso Corporal e Consumo Alimentar*

A determinação da evolução corporal foi realizada utilizando balança eletrônica digital Yihua SF-400 (Zhejiang, China), uma vez por semana, a partir do 21º dia até a instalação da síndrome metabólica, no 150º dia, e durante o tratamento que ocorreu do 150º ao 180º dia. O consumo alimentar dos animais foi avaliado no mesmo período. O cálculo baseia-se na subtração do peso inicial da alimentação fornecida pela sobra da gaiola nesse período.

4.10.3.2 *Medida de Pressão Arterial Sistólica e Frequência Cardíaca*

A medida da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) foi realizada de forma indireta, em animais acordados, através de pletismógrafo de cauda IITC Life Science B60-7/16”, Life Science Instruments (Woodland Hills, Califórnia). Para o procedimento, em sala livre de ruídos, não exposta a luz direta do sol e a temperatura de 22°C, os animais foram postos em um compartimento que limitava seus movimentos e permitia, assim, a colocação de um manguito acoplado a um sensor de pulso ao redor de sua cauda. Após o aquecimento dos animais até a temperatura de 34°C por um período de 15–25 minutos, cinco medidas da PAS e da FC foram captadas sequencialmente. Previamente a aquisição dos dados, os animais foram submetidos, por três dias consecutivos aos mesmos procedimentos experimentais para que ocorresse adaptação.

4.10.3.3 *Determinação das Medidas Murinométricas*

As medidas de comprimento corporal, circunferência torácica, circunferência abdominal e índice de massa corporal (IMC) foram determinadas aos 150 dias, quando detectado a instalação da síndrome metabólica e ao final do tratamento (180 dias).

4.10.3.4 *Determinação do Perfil Lipídico, Glicemia de jejum, Ureia e Creatinina*

Aos 150 dias de consumo da dieta DO (período necessário para indução da síndrome metabólica), todos os animais foram colocados em jejum por 10 horas e anestesiados com quetamina (50mg/kg; i.p.) para serem coletadas amostras de sangue através da punção do plexo

infra-orbital com o auxílio de tubo capilar (microhematócrito com heparina) e aos 180 dias (final do tratamento) após a eutanásia, para avaliação do perfil lipídico [colesterol total (CTO), triglicerídeos (TG) e *high-density lipoprotein cholesterol* – HDL-c], glicemia de jejum, ureia e creatinina. As amostras foram centrifugadas a 7500 rpm por 15 minutos para obtenção do soro, o qual foi utilizado para as referidas análises através de automatização em analisador automático bioquímico Urit-8021A (Guilin, China).

4.10.4 Avaliações *ex vivo*

4.10.4.1 Método de Eutanásia e Obtenção do Sangue

Ao final do experimento, os animais foram deixados em jejum por 10 horas, sendo posteriormente anestesiados com quetamina (50mg/kg; i.p.) e eutanasiados por decapitação. No momento da decapitação, o sangue dos animais foi coletado em dois tubos diferentes: um com anticoagulante (EDTA) e outro vazio. Esse último foi imediatamente centrifugado a 7500 rpm por 15 minutos, para obtenção do soro que foi utilizado nas análises de perfil lipídico, glicemia de jejum, ureia e creatinina. O sangue coletado em tubo com EDTA foi utilizado para determinar o perfil hematológico.

4.10.4.2 Determinação do Peso Relativo dos Órgãos

Após a eutanásia, os órgãos (coração, fígado e rim) dos animais foram imediatamente retirados e pesados em balança digital com precisão de 0,005 gramas. Os valores foram expressos em peso relativo (grama de órgão / cada 100 gramas de peso corporal total), obtidos através do seguinte cálculo: $\text{peso do tecido do animal} \times 100 / \text{peso corporal do animal no momento da eutanásia}$.

4.11 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos por média \pm erro padrão da média, sendo considerada a significância mínima de 5 % ($p < 0,05$). Primeiramente, a normalidade das medidas foi avaliada através do teste de *Kolmogorov Smirnov*. Sendo atendida essa premissa, os dados de toxicidade foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores com aplicação de pós-teste de *Tukey*, inclusive para o teste de toxicidade de dose única, em que foram comparados para a

evolução do peso corporal quatro períodos de amostragem (fator tempo) para os animais TDUC e TDUT (fator tratamento). Para os demais dados foram utilizados os testes paramétricos Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores, com aplicação do pós-teste de *Bonferroni*, ou ANOVA com a aplicação de pós-teste de *Tukey*. Os dados foram analisados estatisticamente com auxílio do Prism® 6.00 software (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, California, US).

5 RESULTADOS

5.1 Toxicidade Dose Única

5.1.1 Avaliação Comportamental, Peso Corporal e Consumo de Ração

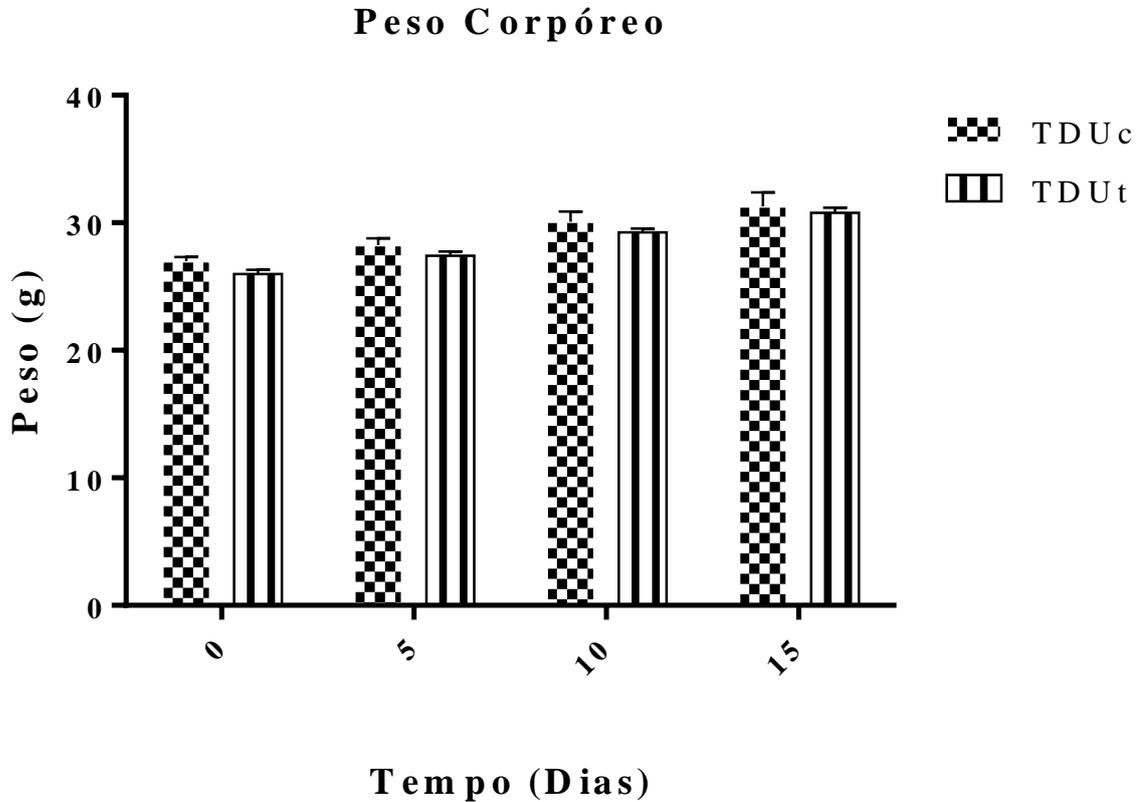
A análise de avaliação comportamental dos animais fornece uma estimativa geral da toxicidade da substância em relação às características apresentadas imediatamente após a administração do leite fermentado, nas horas seguintes, após 24 horas, e por 14 dias posteriores, a fim de avaliar os possíveis efeitos contra atividades estimulantes e depressoras do sistema nervoso central (SNC), atividades do sistema nervoso autônomo (SNA), outros comportamentos observáveis e mortes.

Os animais do grupo controle (TDUc) e do grupo tratado com leite de cabra fermentado contendo *L. mucosae* CNPC007 e inulina (TDUt) não apresentaram quadro clínico detectável, mudanças comportamentais e/ou mortalidade imediatamente após a administração, nas horas seguintes e nem mesmo após 14 dias, para ambos os grupos avaliados.

Para a evolução do peso corporal (**Figura 3**), observou-se que o grupo TDUt não apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao TDUc durante o período de análise para toxicidade de dose única e também que ambos os grupos apresentaram aumento de peso corporal ao longo do tempo.

O consumo médio de ração foi de 150g ($\pm 3,33$) (gaiola/5 dias, cada gaiola com n=5), para ambos os grupos TDUc e TDUt, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

Figura 3 – Evolução do peso corporal dos animais submetidos ao teste de toxicidade de dose única



Fonte: Dados da pesquisa.

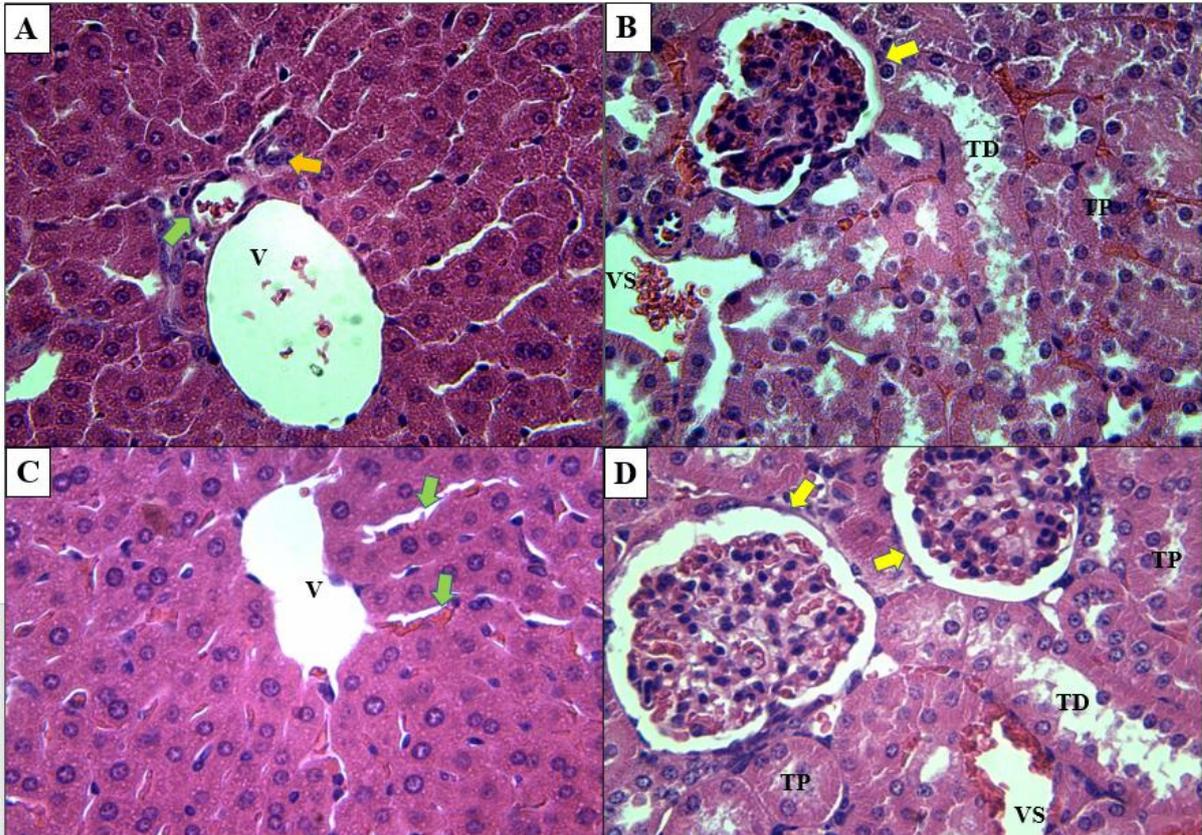
TDUC: controle (20 mL de água/kg/dia, sem consumo de leite fermentado);

TDUt: tratado com leite fermentado (20 mL de leite fermentado/kg/dia) (média $1,8 \times 10^9$ UFC *L. mucosae* e 1 g de inulina por kg/dia).

5.1.2 Avaliação Macroscópica e Histopatológica

No 15º dia, após a eutanásia, o fígado e o rim foram removidos para avaliação. Macroscopicamente, os órgãos apresentavam aspecto, cor, tamanho e consistência normais, sem qualquer alteração significativa, o que foi confirmado na histologia, que também não identificou nenhuma alteração (**Figura 4**).

Figura 4 – Cortes histológicas (coloração de hematoxilina e eosina, 400 ×) de órgãos dos animais submetidos ao teste de toxicidade de dose única



Fonte: O próprio autor.

Parênquima hepático morfologicamente normal, com a presença de tríade portal representada por uma vênula (V), ducto biliar (seta laranja), arteríola (seta verde) e cordões de hepatócitos uninucleado e binucleado em A e C. Rim apresentando túbulos proximal e distal (TP e TD, respectivamente) com debris celulares no lúmen, corpúsculos renais morfologicamente normais (seta amarela) e vasos sanguíneos (VS) para B e D.

TDUc: controle (A e B);

TDUt: tratado com leite fermentado (20 mL de leite fermentado/kg/dia) (C e D) (média $1,8 \times 10^9$ UFC *L. mucosae* e 1 g de inulina por kg/dia). Imagens analisadas por 2 analisadores diferentes (Carina Scanoni Maia e Bruno Mendes Tenório).

5.2 Toxicidade de Dose Repetida

5.2.1 Avaliação Comportamental, Peso Corporal e Consumo de Ração

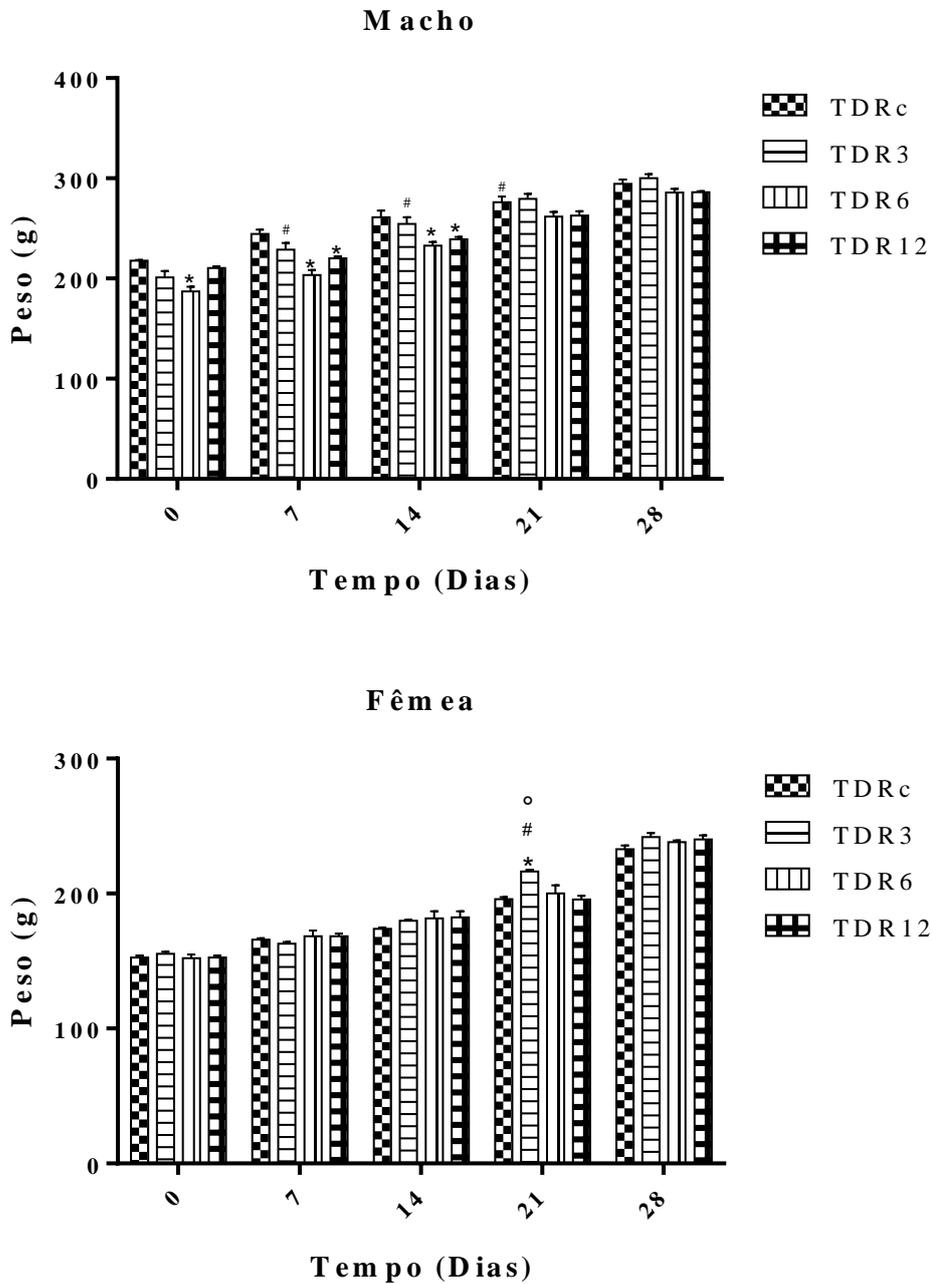
Durante a avaliação comportamental dos animais, uma estimativa da toxicidade da substância foi obtida em relação às características apresentadas imediatamente após a administração de leite fermentado, nas horas seguintes, após 24 h, e diariamente por 28 dias, a fim de avaliar os possíveis efeitos contra atividades estimulantes e depressoras do sistema nervoso (SNC), atividades do sistema nervoso autônomo (SNA), outros comportamentos e

óbitos. No fim de do experimento, verificou-se que nenhum dos animais dos grupos avaliados (TDRc, TDR3, TDR6 e TDR12) apresentaram alterações clínicas imediatamente ou após 28 dias de análise, bem como nenhuma mortalidade.

Para a análise de peso corporal, foi demonstrado que, para os machos (**Figura 5**) houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo TDRc e TDR6 no dia 0, entre TDR6 e TDR12 com TDRc e entre TDR3 com TDR6 no dia 7. No dia 14 TDR3 diferiu de TDR6 e de TDR12, assim como os grupos TDR6 e TDR12 diferiram de TDRc ($p < 0,05$), igualando o peso dos animais aos 28 dias, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre todos os grupos tratados quando comparados ao controle. Para as fêmeas (**Figura 5**), houve diferença significativa ($p < 0,05$) no peso aos 21 dias, no qual o grupo TDR3 diferiu dos grupos TDRc, TDR6 e TDR12, igualando o peso aos 28 dias, quando nenhum dos grupos tratados com leite fermentado diferiu do controle e nem entre si ($p > 0,05$). Aqui, pode-se notar que também houve aumento de peso dos animais dos animais ao longo dos 28 dias de análise, indicando que, assim como para os machos, a ingestão do leite fermentado por 28 dias não afetou no aumento de peso dos animais de ambos os sexos.

O consumo diário de ração é mostrado na **Tabela 2**. Na análise estatística, pode-se observar que não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos tratados comparados ao controle, indicando que o produto em questão não interfere no consumo de ração pelos animais.

Figura 5 – Evolução do peso corporal (g) de ratos *Wistar* machos e fêmeas dos grupos tratados com respectivas doses do leite fermentado para o teste toxicidade de doses repetidas



Fonte: Dados da pesquisa.

Análise estatística obtidos com o software GraphPad Prism®. Os valores são representados por média \pm desvio médio, submetido a ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey. Os símbolos acima das barras denotam diferenças ($p < 0,05$) em relação ao grupo TDRc (*), em relação ao grupo TDR6 (#), e em relação a TDR12 (°).

TDRc: controle (12 mL água filtrada/kg/dia, sem consumo de leite fermentado);

TDR3: 3 mL de leite fermentado/kg/dia (média $2,75 \times 10^8$ UFC *L. mucosae* e 0,15 g de inulina por kg/dia);

TDR6: 6 mL de leite fermentado/kg/dia (média $5,5 \times 10^8$ UFC *L. mucosae* e 0,3 g de inulina por kg/dia);

TDR12: 12 mL de leite fermentado/kg/dia (média $1,1 \times 10^9$ UFC *L. mucosae* e 0,6 g de inulina por kg/dia).

Tabela 2 – Consumo médio de ração (g) de ratos *Wistar* machos e fêmeas dos grupos toxicidade dose repetida controle ou tratados com respectivas doses do leite fermentado para o teste toxicidade de doses repetidas

Sexo	Consumo de ração (g) ± erro médio			
	Grupos			
	TDRc	TDR3	TDR6	TDR12
Machos	125,0 ± 13,2	132,5 ± 16,2	121,0 ± 11,0	125,0 ± 17,0
Fêmeas	124,5 ± 14,0	135,0 ± 13,2	127,5 ± 15,0	130,0 ± 12,5

Fonte: Dados da pesquisa.

Análise estatística obtida pelo software GraphPad Prism® 6. Valores são representados por média ± erro médio, submetidos à ANOVA. Os dados não diferiram significativamente entre os grupos ($p > 0,05$).

TDRc: controle (12 mL água filtrada/kg/dia, sem consumo de leite fermentado);

TDR3: 3 mL de leite fermentado/kg/dia (média $2,75 \times 10^8$ UFC *L. mucosae* e 0,15 g de inulina por kg/dia);

TDR6: 6 mL de leite fermentado/kg/dia (média $5,5 \times 10^8$ UFC *L. mucosae* e 0,3 g de inulina por kg/dia);

TDR12: 12 mL de leite fermentado/kg/dia (média $1,1 \times 10^9$ UFC *L. mucosae* e 0,6 g de inulina por kg/dia).

5.2.2 Determinação do Peso Relativo dos Órgãos

A **Tabela 3** mostra os valores de peso relativo do fígado e rins dos ratos *Wistar* machos e fêmeas, submetidos ao tratamento de 28 dias com leite fermentado, para os grupos TDR3 (3 mL/kg), TDR6 (6 mL/kg), TDR12 (12 mL/kg) e TDRc (12 mL água/kg). Pode-se observar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos tratados e o grupo controle.

Tabela 3 – Peso relativo (g/100g de peso corporal) do fígado e rins de ratos *Wistar* machos e fêmeas dos grupos tratados com respectivas doses do leite fermentado para o teste toxicidade de doses repetidas

Sexo	Órgão	Peso relativo dos órgãos (g) ± erro médio			
		Grupos			
		TDRc	TDR3	TDR6	TDR12
Machos	Fígado	3,33±0,11	3,23±0,24	3,67±0,16	3,44±0,05
	Rins	0,34±0,02	0,39±0,02	0,40±0,03	0,37±0,03
Fêmeas	Fígado	3,17±0,06	3,16±0,07	3,14±0,11	3,11±0,10
	Rins	0,35±0,03	0,38±0,01	0,31±0,04	0,39±0,04

Fonte: Dados da pesquisa.

Análise estatística obtida pelo software GraphPad Prism® 6. Valores são representados por média ± erro médio, submetidos à ANOVA. Os dados não diferiram significativamente entre os grupos para um mesmo órgão ($p > 0,05$).

TDRc: controle (12 mL água filtrada/kg/dia, sem consumo de leite fermentado);

TDR3: 3 mL de leite fermentado/kg/dia (média $2,75 \times 10^8$ UFC *L. mucosae* e 0,15 g de inulina por kg/dia);

TDR6: 6 mL de leite fermentado/kg/dia (média $5,5 \times 10^8$ UFC *L. mucosae* e 0,3 g de inulina por kg/dia);

TDR12: 12 mL de leite fermentado/kg/dia (média $1,1 \times 10^9$ UFC *L. mucosae* e 0,6 g de inulina por kg/dia).

5.2.3 Determinação do Perfil Hematológico e Bioquímico

Em relação ao perfil hematológico, pode-se observar na **Tabela 4** que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para nenhum dos parâmetros avaliados entre os grupos tratados ou em relação ao grupo controle. Além disso, os animais tratados de ambos os sexos obtiveram todos os parâmetros hematológicos com os valores dentro da faixa normal de variação de acordo com os valores de referência. Para os resultados dos parâmetros bioquímicos de atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase (TGO/AST e TGP/ALT) e dos níveis séricos de ureia e creatinina mostrados na **Tabela 5**, revelam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos níveis destas enzimas ou produtos do metabolismo, entre nenhum dos grupos analisados, para machos e fêmeas.

Tabela 4 – Perfil hematológico de ratos *Wistar* machos e fêmeas dos grupos tratados com respectivas doses do leite fermentado para o teste toxicidade de doses repetidas

Parâmetros hematológicos	TDRc	TDR3	TDR6	TDR12	Valores de referência*
Machos					
Células vermelhas (10 ⁶ /μL)	7,62±0,27	7,2±0,39	7,27±0,14	7,31±0,09	4,72-10,25
Hemoglobina (mg/dL)	12,80±0,34	12,50±0,74	12,90±0,20	13,30±0,25	10,20-17,80
Hematócrito (%)	50,60±0,52	50,00±3,28	49,80±3,01	50,70±2,22	23,80-51,90
Plaquetas (10 ³ / μL)	822,00±16,80	757,00±26,48	812,00±31,68	818,00±42,80	727-1351
Leucócitos (10 ³ / μL)	6,40±1,30	8,80±1,88	11,30±0,36	7,23±0,87	3,41-13,70
Linfócitos (%)	69,70±2,06	71,30±2,86	71,30±0,91	69,80±1,00	43,10-93,7
Fêmeas					
Células vermelhas (10 ⁶ /μL)	8,00±0,14	7,40±0,25	7,30±0,30	8,10±0,49	5,2-8,83
Hemoglobina (mg/dL)	12,80±0,25	13,10±0,22	12,50±0,39	11,90±0,40	11,10-17,10
Hematócrito (%)	43,10±0,81	40,10±0,84	40,90±1,56	40,30±0,92	27,20-48,50
Plaquetas (10 ³ / μL)	798,00±58,64	712,00±14,08	758,00±29,84	789,00±24,48	760-1313
Leucócitos (10 ³ / μL)	8,70±0,65	7,50±0,77	8,10±0,62	9,30±0,82	2,30-9,9
Linfócitos (%)	70,10±1,24	70,20±1,10	70,20±1,12	68,70±0,93	30,10-95,00

Fonte: Dados da pesquisa.

Análise estatística obtida pelo software GraphPad Prism® 6. Valores são representados por média ± erro médio, submetidos à ANOVA. Para os mesmos parâmetros, os dados não diferiram significativamente entre os grupos ($p > 0,05$).

TDRc: controle (12 mL água filtrada/kg/dia, sem consumo de leite fermentado);

TDR3: 3 mL de leite fermentado/kg/dia (média $2,75 \times 10^8$ UFC *L. mucosae* e 0,15 g de inulina por kg/dia);

TDR6: 6 mL de leite fermentado/kg/dia (média $5,5 \times 10^8$ UFC *L. mucosae* e 0,3 g de inulina por kg/dia);

TDR12: 12 mL de leite fermentado/kg/dia (média $1,1 \times 10^9$ UFC *L. mucosae* e 0,6 g de inulina por kg/dia).

*Os valores de referência são dados obtidos do biotério de origem do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco e correspondem a animais de mesmo peso, sexo, raça e idades.

Tabela 5 – Perfil bioquímico de ratos *Wistar* machos e fêmeas dos grupos tratados com respectivas doses do leite fermentado para o teste toxicidade de doses repetidas

Perfil bioquímico	TDRc	TDR3	TDR6	TDR12	Valores de referência*
Machos					
Ureia (mg/dL)	48,40±5,13	50,20±1,92	44,60±3,65	46,20±3,27	26-58
Creatinina (mg/dL)	0,46±0,03	0,48±0,03	0,51±0,07	0,46±0,04	0,24-1,20
TGO/AST (U/L)	91,80±6,89	85,80±6,10	86,60±5,03	90,80±11,52	61-210
TGP/ALT (U/L)	52,80±4,44	55,20±2,86	53,20±3,70	54,40±3,65	38-82
Fêmeas					
Ureia (mg/dL)	41,60±1,21	43,20±1,66	42,80±1,39	41,40±1,03	24-49
Creatinina (mg/dL)	0,46±0,01	0,48±0,01	0,49±0,01	0,49±0,02	0,28-1,10
TGO/AST (U/L)	85,60±1,91	86,80±2,13	85,20±2,38	89,200±1,16	51-211
TGP/ALT (U/L)	30,80±1,53	32,00±2,35	32,40±0,81	33,40±1,36	32-63

Fonte: Dados da pesquisa.

Análise estatística obtida pelo software GraphPad Prism® 6. Valores são representados por média ± erro médio, submetidos à ANOVA duas vias seguido de teste de Tukey. Para os mesmos parâmetros, os dados não diferiram significativamente entre os grupos ($p > 0,05$).

TDRc: controle (12 mL água filtrada/kg/dia, sem consumo de leite fermentado);

TDR3: 3 mL de leite fermentado/kg/dia (média $2,75 \times 10^8$ UFC *L. mucosae* e 0,15 g de inulina por kg/dia);

TDR6: 6 mL de leite fermentado/kg/dia (média $5,5 \times 10^8$ UFC *L. mucosae* e 0,3 g de inulina por kg/dia);

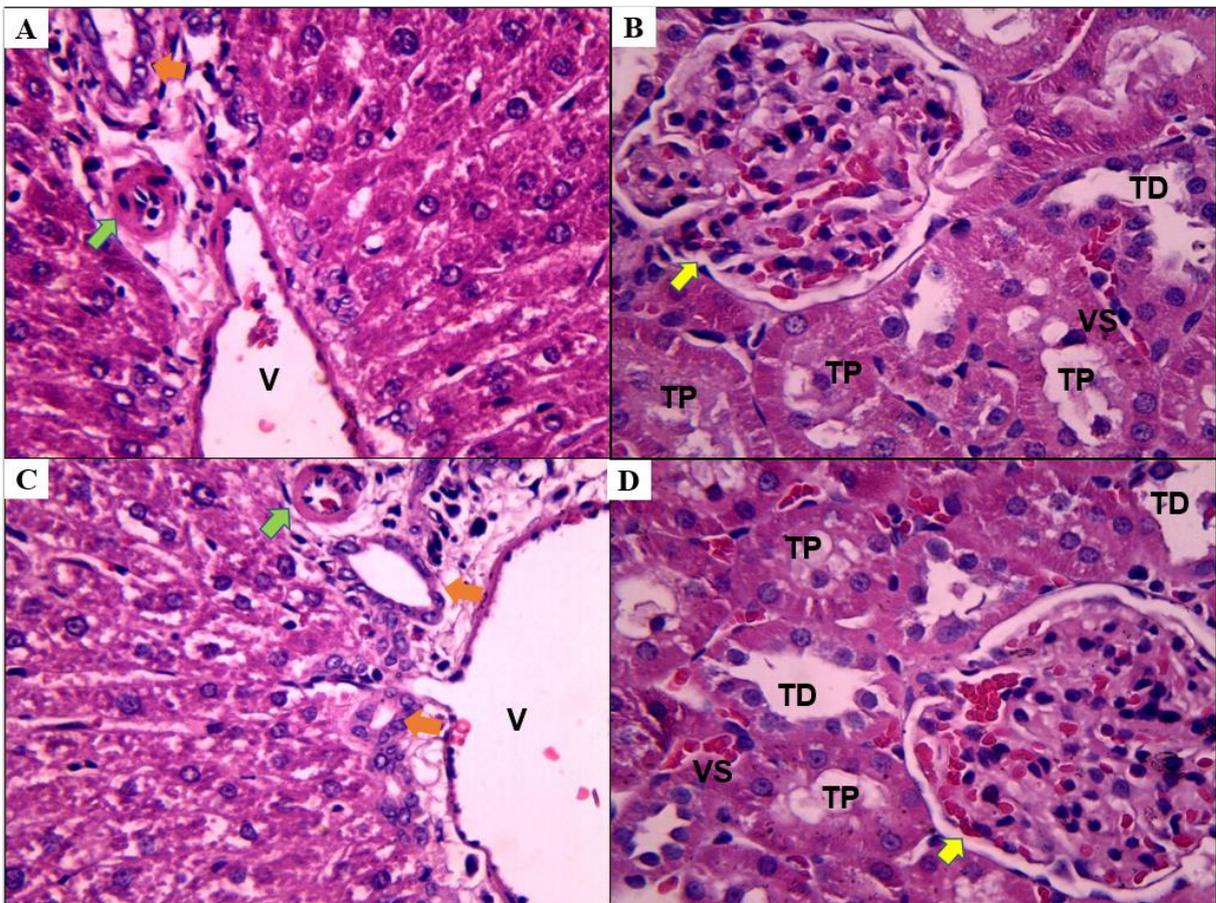
TDR12: 12 mL de leite fermentado/kg/dia (média $1,1 \times 10^9$ UFC *L. mucosae* e 0,6 g de inulina por kg/dia).

*Os valores de referência são dados obtidos do biotério de origem do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco e correspondem a animais de mesmo peso, sexo, raça e idades.

5.2.4 Avaliação Macroscópica e Histopatológica

Após a eutanásia, no 29º dia do experimento, as análises histopatológicas do fígado e rim foram realizadas. Macroscopicamente, os órgãos analisados não apresentaram qualquer alteração quanto aos parâmetros aparência, tamanho, cor e consistência nos grupos tratados, tanto para o sexo masculino quanto para o feminino. Da mesma forma, nenhuma alteração histológica anormal foi observada para todos os animais de cada grupo estudado (**Figura 6**).

Figura 6 – Cortes histológicas (coloração de hematoxilina e eosina, 400 ×) de órgãos dos animais dos grupos tratados com respectivas doses do leite fermentado para o teste de toxicidade de doses repetidas



Fonte: O próprio autor.

Parênquima hepático morfologicamente normal, com presença de tríade portal representada por vênula (V), ducto biliar (seta laranja), arteríola (seta verde), e cordões de hepatócitos uninucleados e binucleados (A e C). Rim (B e D) mostrando túbulos contorcido proximal e distal (TP e TD, respectivamente) com debris celulares no lúmen, corpúsculos renais (seta amarela) com todos os componentes apresentando características morfológicas normais e vasos sanguíneos (VS).

TDRc: controle (12 mL de água filtrada/kg/dia, sem consumo de leite fermentado), imagens A e B;

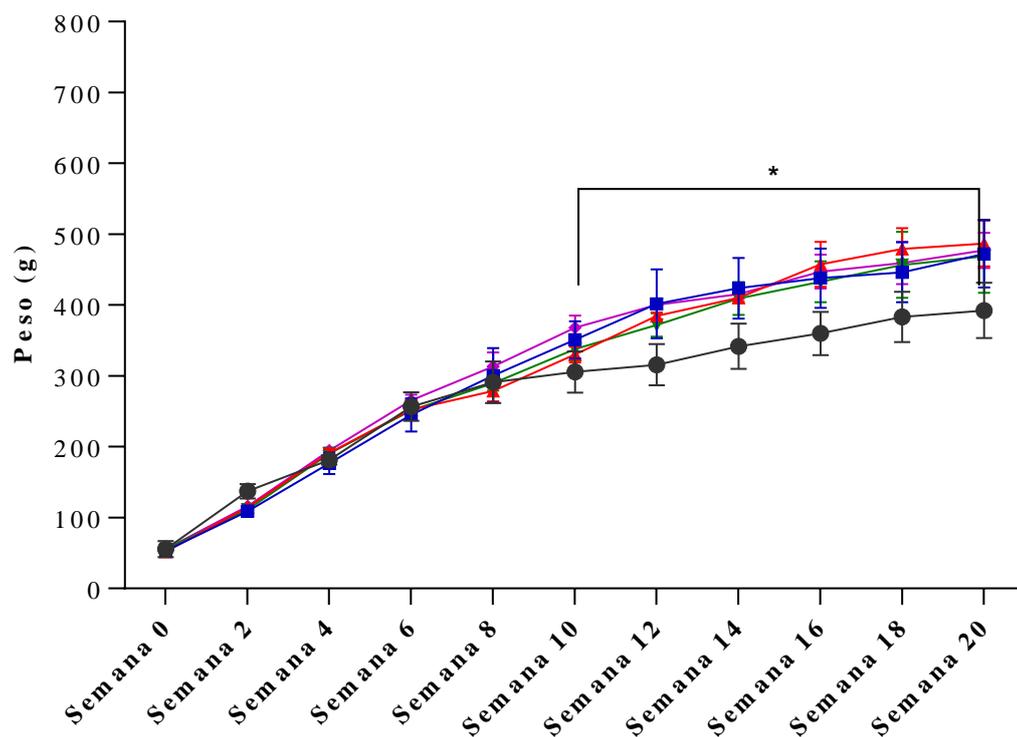
TDR12: 12 mL de leite fermentado/kg/dia (média $1,1 \times 10^9$ UFC *L. mucosae* e 0,6 g de inulina por kg/dia), imagens C e D. Imagens analisadas por 2 analisadores diferentes (Carina Scanoni Maia e Bruno Mendes Tenório).

5.3 Indução da Síndrome Metabólica e Pós-Tratamento

5.3.1 Evolução do Peso Corporal e Consumo Alimentar

A evolução do peso corporal dos animais alimentados com a Dieta Ocidentalizada (DO) durante a indução da síndrome (**Figura 7**) mostra que, a partir da décima semana de consumo, esses animais apresentaram um peso corporal significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparados aos animais dos grupos alimentados com a Dieta Presence[®] (DP) e assim se mantiveram até a semana 20. Esse aumento percentual variou de 14,56 % (semana 10) a 24,08 % (semana 20).

Figura 7 – Evolução do peso corporal (gramas) semanal dos animais alimentados com Dieta Ocidentalizada ou Dieta Padrão de laboratório (Presence[®]), do pós-desmame até a 20^a semana (pré-tratamento)



Fonte: Dados da pesquisa.

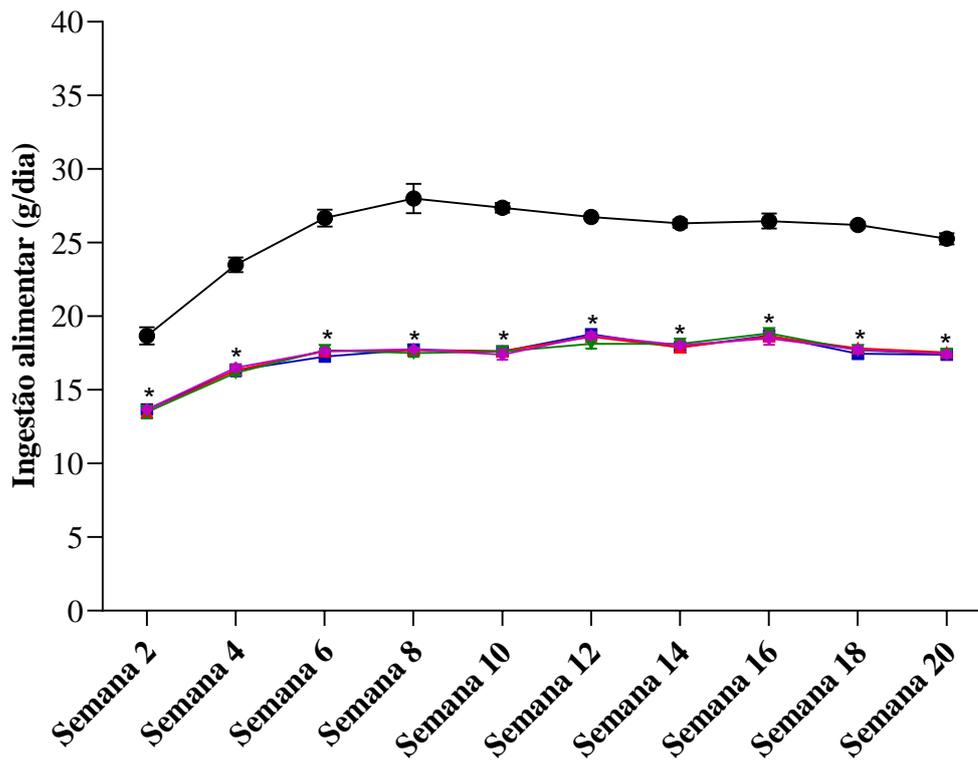
● Subgrupo 1: Dieta Presence[®] (pré-tratamento - água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 2: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento - água 10 mL/kg). ▲ Subgrupo 3: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento - leite fermentado 3 mL/kg). ▼ Subgrupo 4: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento - leite fermentado 6 mL/kg). ◆ Subgrupo 5: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento - Metformina 500 mg/kg).

Os dados estão representados pela média ± erro-médio (n = 8 animais/grupo), submetidos à ANOVA duas vias, com aplicação de pós-teste de *Bonferroni* ($p < 0,05$).

(*) quando comparado cada subgrupo ao grupo Dieta Presence[®].

O consumo alimentar (em gramas) do grupo alimentado com DP ou DO encontram-se representados na **Figura 8**. A análise estatística mostrou que os animais do grupo DO apresentaram significativa redução ($p < 0,05$) do consumo alimentar a partir da 2ª semana pós-desmame, mantendo-se com consumo significativamente menor ($p < 0,05$) até a semana 20, sendo que essa diferença variou entre 36,7%-45,4% (semana 2 e 20, respectivamente). No entanto, é curioso observar que, apesar dos animais alimentados com DO mostrarem um consumo de ração menor, este grupo apresentou peso corporal significativamente maior ($p < 0,05$) a partir da 10ª semana quando comparados aos animais que consumiram DP.

Figura 8 – Consumo alimentar semanal (gramas) dos animais alimentados com Dieta Ocidentalizada ou Dieta Padrão de laboratório (Presence®), do pós-desmame até a 20ª semana



Fonte: Dados da pesquisa.

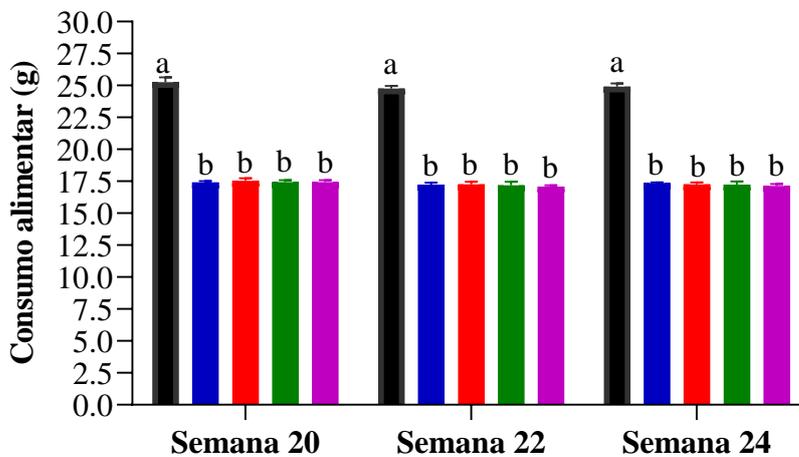
● Subgrupo 1: Dieta Presence® (pré-tratamento - água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 2: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento - água 10 mL/kg). ▲ Subgrupo 3: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento - leite fermentado 3 mL/kg). ▼ Subgrupo 4: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento - leite fermentado 6 mL/kg). ◆ Subgrupo 5: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento - Metformina 500 mg/kg).

Os dados estão representados pela média \pm desvio-médio ($n = 8$ animais/grupo), submetidos à ANOVA duas vias, com aplicação de pós-teste de *Bonferroni* ($p < 0,05$).

(* quando comparado cada subgrupo ao grupo Dieta Presence®).

Durante o período de 30 dias de tratamento, os animais alimentados com DO mantiveram um padrão e não apresentaram redução de peso corporal nem diferiram entre si, como podemos observar na **Figura 9**, e assim, continuaram a apresentarem peso significativamente maior ($p < 0,05$) que os animais alimentados com DP.

Figura 9 – Efeito do tratamento por gavagem com o leite fermentado (3mL/kg ou 6mL/kg), metformina (500mg/kg) ou água (10mL/kg), durante o período de 30 dias de tratamento sobre o peso corporal



Fonte: Dados da pesquisa.

■ Subgrupo 1: Dieta Presence® (água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 2: Dieta Ocidentalizada (água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 3: Dieta Ocidentalizada (leite fermentado 3 mL/kg) ■ Subgrupo 4: Dieta Ocidentalizada (leite fermentado 6 mL/kg). ■ Subgrupo 5: Dieta Ocidentalizada (Metformina 500 mg/kg).

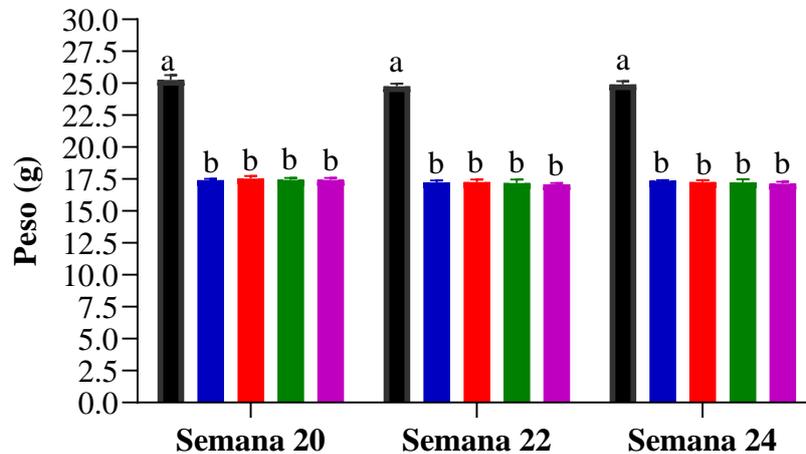
Os dados estão representados pela média \pm desvio médio ($n = 8$ animais/grupo), submetidos à ANOVA duas vias, com aplicação do pós-teste de *Bonferroni* ($p < 0,05$).

Letra minúscula igual não difere significativamente entre si $p > 0,05$.

Letra minúscula diferente difere significativamente entre si $p < 0,05$.

Para o consumo alimentar, durante o período de tratamento, os animais alimentados com DO e concomitantemente tratados com o leite de cabra fermentado, seja na dose de 3 ou 6 mL/kg, ou com metformina, continuaram com o consumo alimentar menor que os animais alimentados com DP ($p < 0,05$) (**Figura 10**).

Figura 10 – Efeito do tratamento por gavagem com o leite fermentado (3mL/kg ou 6mL/kg), metformina (500mg/kg) ou água (10mL/kg), durante o período de 30 dias de tratamento sobre o consumo alimentar



Fonte: Dados da pesquisa.

■ Subgrupo 1: Dieta Presence® (água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 2: Dieta Ocidentalizada (água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 3: Dieta Ocidentalizada (leite fermentado 3 mL/kg). ■ Subgrupo 4: Dieta Ocidentalizada (leite fermentado 6 mL/kg). ■ Subgrupo 5: Dieta Ocidentalizada (Metformina 500 mg/kg).

Os dados estão representados pela média \pm desvio-médio (n= 8 animais/grupo), submetidos à ANOVA duas vias, com aplicação de pós-teste de *Bonferroni* ($p < 0,05$).

Letra minúscula igual não difere significativamente entre si $p > 0,05$.

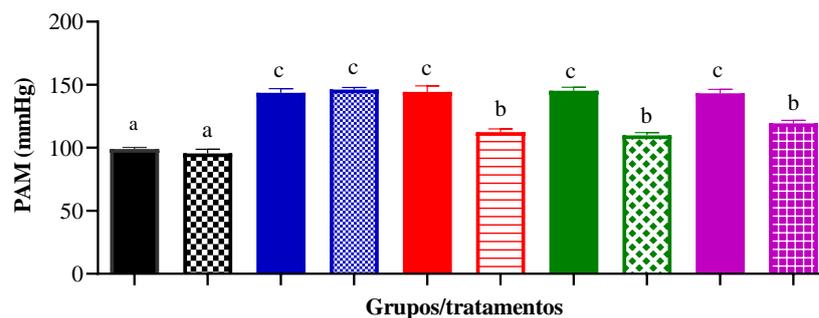
Letra minúscula diferente difere significativamente entre si $p < 0,05$.

5.3.2 Medidas de Pressão Arterial Sistólica e Frequência Cardíaca

Observa-se, na **Figura 11**, que todos os animais dos grupos DO apresentaram valores de pressão arterial sistólica (PAS) significativamente maiores ($\cong 150$ mmHg) ($p < 0,05$) que os animais dos grupos DP ($\cong 100$ mmHg). Esses animais do grupo DP não sofreram alteração alguma nesses valores comparando-se o período pré- com o pós-tratamento. Pode-se observar também que os animais do subgrupo 2 DO que receberam água entre os 150-180 dias não tiveram alteração nos níveis de PAS no pós-tratamento. Porém os animais DO que foram tratados durante o mesmo período com o leite fermentado, seja na dose de 3 ou 6 mL/kg, tiveram uma redução significativa ($p < 0,05$) dos valores de PAS de $\cong 21,67$ % ($\cong 117,5$ mmHg). Verifica-se também que os valores da PAS desses animais após o tratamento com o leite fermentado estão mais próximos dos valores dos animais DP, porém ainda com diferença significativa entre eles ($p < 0,05$). Os grupos tratados com o leite fermentado seja ele na dose de 3 ou 6 mL/kg (subgrupo 3, Dieta Ocidentalizada (pós-tratamento – Leite fermentado 3mL/kg

e subgrupo 4, Dieta Ocidentalizada (pós-tratamento – Leite fermentado 6mL/kg, respectivamente) não diferem entre si, bem como os animais do subgrupo 1 DP pré-tratamento e os animais subgrupo 1 DP que receberam água pelo período de 30 dias.

Figura 11 – Pressão arterial sistólica (mmHg) dos animais alimentados com Dieta Ocidentalizada ou Dieta Padrão de laboratório (Presence ®), antes e após o tratamento



Fonte: Dados da pesquisa.

■ Subgrupo 1: Dieta Presence® (pré-tratamento – água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 1: Dieta Presence® (pós-tratamento – água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 2: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento – água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 2: Dieta Ocidentalizada (pós-tratamento – água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 3: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento – leite fermentado 3 mL/kg). ■ Subgrupo 3: Dieta Ocidentalizada (pós-tratamento – leite fermentado 3 mL/kg). ■ Subgrupo 4: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento – leite fermentado 6 mL/kg). ■ Subgrupo 4: Dieta Ocidentalizada (pós-tratamento – leite fermentado 6 mL/kg). ■ Subgrupo 5: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento – Metformina 500 mg/kg). ■ Subgrupo 5: Dieta Ocidentalizada (pós-tratamento – Metformina 500 mg/kg).

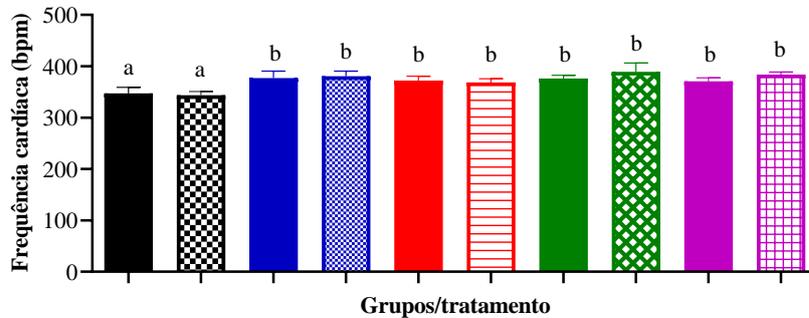
Os valores foram submetidos à ANOVA duas vias, seguido de pós-teste de Tukey e representados por média ± erro padrão da média.

Letra minúscula igual não difere significativamente entre si $p > 0,05$.

Letra minúscula diferente difere significativamente entre si $p < 0,05$.

Para as medidas de frequência cardíaca (FC) (**Figura 12**), pode-se observar que os animais do grupo DO não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$) comparando as medidas de pré e pós período de 30 dias de tratamento e que esses apresentaram valores significativamente maiores ($\cong 11,83\%$) que os animais do grupo DP ($p < 0,05$).

Figura 12 – Frequência cardíaca (bpm) dos animais alimentados com Dieta Ocidentalizada ou Dieta Padrão de laboratório (Presence®), antes e após o tratamento



Fonte: Dados da pesquisa.

■ Subgrupo 1: Dieta Presence® (pré-tratamento – água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 1: Dieta Presence® (pós-tratamento – água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 2: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento – água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 2: Dieta Ocidentalizada (pós-tratamento – água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 3: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento – leite fermentado 3 mL/kg). ■ Subgrupo 3: Dieta Ocidentalizada (pós-tratamento – leite fermentado 3 mL/kg). ■ Subgrupo 4: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento – leite fermentado 6 mL/kg). ■ Subgrupo 4: Dieta Ocidentalizada (pós-tratamento – leite fermentado 6 mL/kg). ■ Subgrupo 5: Dieta Ocidentalizada (pré-tratamento – Metformina 500 mg/kg). ■ Subgrupo 5: Dieta Ocidentalizada (pós-tratamento – Metformina 500 mg/kg).

Os valores foram submetidos à ANOVA duas vias, seguido de pós-teste de Tukey e representados por média ± erro padrão da média.

Letra minúscula igual não difere significativamente entre si $p > 0,05$.

Letra minúscula diferente difere significativamente entre si $p < 0,05$.

5.3.3 Determinação de Medidas Murinométricas

A **Tabela 6** apresenta os valores referentes ao comprimento corporal, circunferência torácica, circunferência abdominal e índice de massa corporal (IMC) dos animais alimentados com DP ou DO antes e após seus respectivos tratamentos. Conforme pode-se observar, tanto o comprimento corporal quanto a circunferência torácica dos animais, sejam eles do grupo DO ou DP não sofreram alterações ($p > 0,05$) quando comparado o tipo de alimentação ou em decorrência do tratamento de 30 dias. Para a circunferência abdominal e IMC, ambos os grupos (DP e DO), não diferem entre si quando se compara o período de 30 dias de tratamento, porém, os animais que foram alimentados com DO apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) dessas medidas (32,2 e 35,9 %, respectivamente) quando comparados aos animais alimentados com DP.

Tabela 6 – Comprimento corporal, circunferência abdominal e índice de massa corpórea (IMC) de ratos *Wistar* antes e após o tratamento

Medidas murinométricas	SUBGRUPO 1 DIETA PRESENCE®		SUBGRUPO 2 DIETA OCIDENTALIZADA		SUBGRUPO 3 DIETA OCIDENTALIZADA		SUBGRUPO 4 DIETA OCIDENTALIZADA		SUBGRUPO 5 DIETA OCIDENTALIZADA	
	Pré- tratamento	Pós- tratamento Água (10mL/kg)	Pré- tratamento	Pós- tratamento água (10mL/kg)	Pré- tratamento	Pós- tratamento Leite fermentado (3mL/kg)	Pré- tratamento	Pós- tratamento Leite fermentado (6mL/kg)	Pré- tratamento	Pós- tratamento Metformina (500mg/kg)
Comprimento corporal (cm)	40,83±0,40 ^a	41,50±0,43 ^a	40,50±0,62 ^a	41,00±0,52 ^a	40,17±0,60 ^a	40,33±0,61 ^a	39,83±0,48 ^a	40,33±0,49 ^a	39,83±0,31 ^a	40,00±0,26 ^a
Circunferência torácica (cm)	16,43±0,22 ^a	17,00±0,11 ^a	17,42±0,17 ^a	17,73±0,21 ^a	17,65±0,11 ^a	17,83±0,10 ^a	17,28±0,13 ^a	17,60±0,14 ^a	17,18±0,10 ^a	17,47±0,08 ^a
Circunferência abdominal (cm)	18,00±0,26 ^b	18,48±0,25 ^b	23,48±0,19 ^a	23,73±0,18 ^a	23,38±0,32 ^a	23,72±0,18 ^a	23,32±0,30 ^a	23,62±0,20 ^a	23,83±0,17 ^a	23,50±0,15 ^a
IMC (g/cm²)	23,60±1,19 ^b	23,73±1,03 ^b	28,74±0,60 ^a	32,76±0,80 ^a	29,00±0,90 ^a	31,91±0,87 ^a	30,10±,62 ^a	31,99±0,28 ^a	30,68±0,79 ^a	32,10±0,32 ^a

Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores foram submetidos à ANOVA duas vias, seguido de pós-teste de Tukey e representados por média ± erro padrão da média.

Letra minúscula igual em uma mesma linha não difere significativamente entre si $p>0,05$.

Letra minúscula diferente em uma mesma linha difere significativamente entre si $p<0,05$.

5.3.4 Determinação do Perfil Lipídico, Glicemia de Jejum, Ureia e Creatinina

Para todos os parâmetros do perfil lipídico (**Tabela 7**), os animais do subgrupo 1, alimentados com DP, não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$) em função do tratamento de 30 dias. Para os animais dos subgrupos DO pré-tratamento, podemos observar que eles apresentam um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e LDL-c ($\cong 36,8\%$, $80,15\%$, $47,4\%$, respectivamente), quando comparados aos animais alimentados com DP no mesmo período antes do tratamento. Para esse período pré-tratamento, os subgrupos 2, 3, 4 e 5 (alimentados com DO) não apresentam diferenças entre si ($p > 0,05$). Quando se compara o período de 30 dias de tratamento (pós-tratamento) dos animais dos subgrupos 3, 4 e 5 alimentados com DO e que receberam seus tratamentos (tratados com leite fermentado 3mL/kg, tratados com leite fermentado 6 mL/kg e tratados com metformina 500mg/kg, respectivamente), pode-se observar que os subgrupos tratados com o leite fermentado nas doses 3 ou 6 mL/kg e tratados com metformina 500mg/kg apresentam redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de colesterol total, triglicerídeos e LDL-c de $\cong 20,79$, $38,97\%$ e $24,08\%$ respectivamente, quando comparados ao período antes do tratamento para seus respectivos grupos, chegando a igualar aos níveis dos animais controle que foram alimentados com a DP, e que esses mesmos subgrupos para esse mesmo período (pós-tratamento de 30 dias) não apresentam diferença entre si ($p > 0,05$), nem diferem com relação ao aumento da dose do leite fermentado (3 ou 6 ml/kg) ($p > 0,05$). Pode-se observar também que os animais dos subgrupos 2 DO os quais receberam água, não diferem entre si quando compara o pré- e pós-tratamento (150 e 180 dias).

Tabela 7 – Perfil lipídico (mg/dL) de ratos *Wistar* antes e após o tratamento

Perfil lipídico	SUBGRUPO 1 DIETA PRESENCE®		SUBGRUPO 2 DIETA OCIDENTALIZADA		SUBGRUPO 3 DIETA OCIDENTALIZADA		SUBGRUPO 4 DIETA OCIDENTALIZADA		SUBGRUPO 5 DIETA OCIDENTALIZADA	
	Pré-tratamento	Pós-tratamento Água (10mL/kg)	Pré-tratamento	Pós-tratamento água (10mL/kg)	Pré-tratamento	Pós-tratamento Leite fermentado (3mL/kg)	Pré-tratamento	Pós-tratamento Leite fermentado (6mL/kg)	Pré-tratamento	Pós-tratamento Metformina (500mg/kg)
Colesterol total	64,67±1,16 ^a	67,33±0,92 ^a	88,67±1,33 ^b	92,00±0,73 ^b	91,00±1,57 ^b	69,83±1,30 ^a	86,50±1,15 ^b	71,50±2,51 ^a	87,67±2,16 ^b	67,67±1,09 ^a
Triglicerídeos	75,00±4,01 ^a	77,83±1,82 ^a	135,50±2,79 ^b	141,17±1,14 ^b	135,67±2,09 ^b	89,50±1,06 ^a	135,75±2,46 ^b	82,33±1,99 ^a	133,50±1,82 ^b	75,33±2,36 ^a
HDL-c	26,15±0,54 ^a	26,67±1,02 ^a	27,57±0,72 ^a	26,33±0,62 ^a	26,67±0,84 ^a	26,50±0,43 ^a	26,00±0,66 ^a	26,33±0,42 ^a	26,00±0,68 ^a	26,83±0,48 ^a
LDL-c	23,67±1,88 ^a	25,08±0,87 ^a	34,07±1,24 ^b	37,77±1,45 ^b	37,20±2,05 ^b	25,43±1,50 ^a	33,35±1,12 ^b	28,60±2,76 ^a	34,97±2,36 ^b	25,77±1,27 ^a

Fonte: Dados da pesquisa.

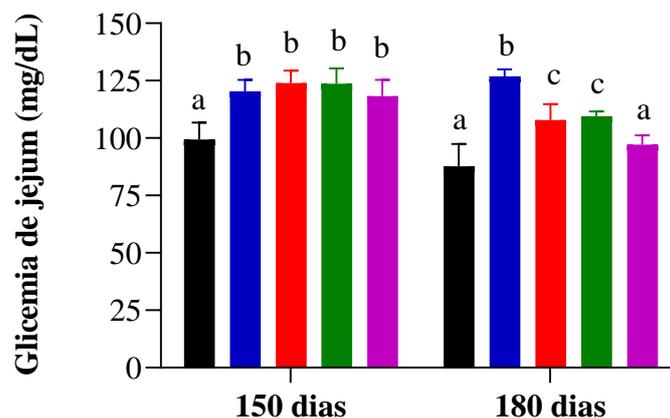
Os valores foram submetidos à ANOVA duas vias, seguido de pós-teste de Tukey e representados por média ± erro padrão da média.

Letra minúscula igual em uma mesma linha não difere significativamente entre si $p > 0,05$.

Letra minúscula diferente em uma mesma linha difere significativamente entre si $p < 0,05$.

Os valores de glicemia de jejum (mg/dL) dos animais pré e pós encontram-se expostos na **Figura 13**. No pré-tratamento (aos 150 dias), os animais dos subgrupos 2, 3, 4 e 5 (DO) apresentam níveis de glicemia de jejum significativamente maiores ($\cong 24\%$) ($p < 0,05$) que os animais do subgrupo 1 (DP), para o pós-tratamento, pode-se observar que os animais alimentados com DO e que receberam água (subgrupo 2) não apresenta diferença significativa ($p > 0,05$) com o seu respectivo grupo quando comparado o período pré-tratamento. Observa-se também que os animais tratados com o leite fermentado nas doses 3 ou 6 ml/kg e os tratados com Metformina 500 mg/kg (subgrupos 3, 4 e 5 pós-tratamento) apresentam uma redução significativa ($p < 0,05$) dos níveis de glicose quando comparados aos mesmos subgrupos no período antes do tratamento, chegando o subgrupo 5 pós-tratamento (tratados com Metformina 500 mg/kg) a níveis de glicemia de jejum equivalentes aos animais dos subgrupos 1 (DP). Nota-se que não há diferença em função da dose de leite fermentado oferecida, já que os subgrupos tratados com 3 ou 6 ml/kg não diferem entre si. Destaca-se que a redução nos níveis de glicose de jejum que esses subgrupos (3 e 4) tratados com o leite fermentado nas diferentes doses tiveram em comparação aos animais que receberam água no mesmo período foi de $\cong 13\%$.

Figura 13 – Glicemia de jejum (mg/dL) dos animais alimentados com Dieta Ocidentalizada ou Dieta Padrão de laboratório (Presence®), antes e após o tratamento



Fonte: Dados da pesquisa.

■ Subgrupo 1: Dieta Presence® (água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 2: Dieta Ocidentalizada (água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 3: Dieta Ocidentalizada (leite fermentado 3 mL/kg). ■ Subgrupo 4: Dieta Ocidentalizada (leite fermentado 6 mL/kg). ■ Subgrupo 5: Dieta Ocidentalizada (Metformina 500 mg/kg).

Os valores foram submetidos à ANOVA duas vias, seguido de pós-teste de Tukey e representados por média \pm erro padrão da média.

Letra minúscula igual não difere significativamente entre si $p > 0,05$.

Letra minúscula diferente difere significativamente entre si $p < 0,05$.

Para os níveis bioquímicos de ureia e creatinina (**Tabela 8**), não apresentam diferenças significativas em função do tratamento ou quando se comparou animais que receberam DP com DO.

Tabela 8 - Perfil bioquímico (mg/dL) de ratos *Wistar* antes e após o tratamento

Bioquímica	SUBGRUPO 1 DIETA PRESENCE®		SUBGRUPO 2 DIETA OCIDENTALIZADA		SUBGRUPO 3 DIETA OCIDENTALIZADA		SUBGRUPO 4 DIETA OCIDENTALIZADA		SUBGRUPO 5 DIETA OCIDENTALIZADA	
	Pré-tratamento	Pós-tratamento Água (10mL/kg)	Pré-tratamento	Pós-tratamento água (10mL/kg)	Pré-tratamento	Pós-tratamento Leite fermentado (3mL/kg)	Pré-tratamento	Pós-tratamento Leite fermentado (6mL/kg)	Pré-tratamento	Pós-tratamento Metformina (500mg/kg)
Uréia	38,33±0,99 ^a	38,00±0,86 ^a	38,17±1,25 ^a	38,50±0,67 ^a	38,67±0,76 ^a	38,33±1,05 ^a	39,17±1,62 ^a	38,00±0,73 ^a	36,67±1,26 ^a	39,33±0,21 ^a
Creatinina	0,72±0,05 ^a	0,58±0,04 ^a	0,55±0,03 ^a	0,57±0,03 ^a	0,53±0,02 ^a	0,60±0,04 ^a	0,58±0,05 ^a	0,50±0,04 ^a	0,60±0,05 ^a	0,60±0,04 ^a

Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores foram submetidos à ANOVA duas vias, seguido de pós-teste de Tukey e representados por média ± erro padrão da média.

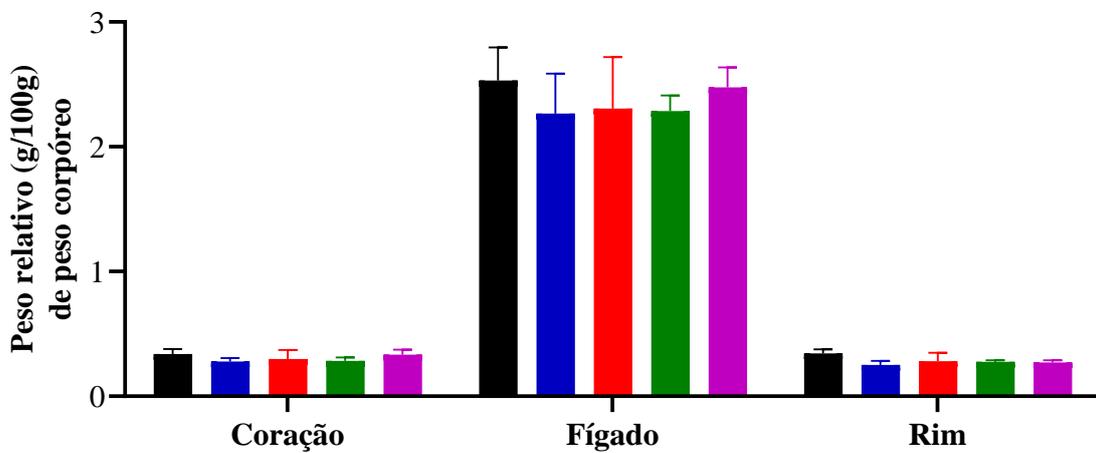
Letra minúscula igual não difere significativamente entre si $p > 0,05$.

Letra minúscula diferente difere significativamente entre si $p < 0,05$.

5.3.5 Determinação do Peso Relativo dos Órgãos

Após os 30 dias de tratamento, observou-se que para o peso relativo dos órgãos, coração, fígado e rim (**Figura 14**) não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos, seja em comparação aos animais que receberam DP ou em comparação aos animais que receberam DO e diferentes tratamentos.

Figura 14 – Peso relativo dos órgãos dos animais após 30 dias de tratamento



Fonte: Dados da pesquisa.

■ Subgrupo 1: Dieta Presence® (água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 2: Dieta Ocidentalizada (água 10 mL/kg). ■ Subgrupo 3: Dieta Ocidentalizada (leite fermentado 3 mL/kg). ■ Subgrupo 4: Dieta Ocidentalizada (leite fermentado 6 mL/kg). ■ Subgrupo 5: Dieta Ocidentalizada (Metformina 500 mg/kg).

Análise estatística obtida pelo software GraphPad Prism® 6. Valores são representados por média \pm desvio médio, submetidos à ANOVA. Os dados não diferiram significativamente entre os grupos para um mesmo órgão ($p > 0,05$).

6 DISCUSSÃO

De acordo com o Guia ANVISA nº 21/2019 (ANVISA, 2019), para provar a segurança de uma cepa probiótica, alguns testes *in vitro* são exigidos antes dos testes em animais, estes últimos envolvendo estudos de toxicidade subcrônica. Os testes *in vitro* devem demonstrar que os microrganismos não possuem resistência a antibióticos, genes capazes de serem transferíveis horizontalmente ou qualquer fator de virulência que possa prejudicar a saúde do consumidor. Como a cepa em estudo é nova e não tem histórico de uso, é necessário e essencial realizar uma avaliação de segurança, uma vez que será destinado ao consumo humano. Dentro o primeiro estudo realizado com a cepa *L. mucosae* CNPC007, após seu isolamento de produtos lácteos caprinos e seleção juntamente com outras bactérias lácticas autóctones com potencial probiótico, testes de suscetibilidade antimicrobiana foram realizados (TONUCCI *et al.*, 2017). Os resultados provaram que esta cepa foi sensível à ampicilina e, portanto, a cepa é adequada para testes em animais.

Considerando os microrganismos autorizados para uso como probióticos no Brasil pela ANVISA (ANVISA, 2017), os produtos em que são adicionados permitem um consumo diário de 8 a 9 log UFC/dia. Em um estudo anterior, *L. mucosae* CNPC007 provou ser viável quando co-cultivado com *S. thermophilus* QGE em leite de cabra fermentado adicionado de inulina, atingindo 8,24 log UFC/mL após a fermentação, permanecendo no intervalo de 6,50-7,60 log UFC/mL após ser submetido as condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro* ao longo de 6 h (GALDINO *et al.*, 2021). A administração de leite fermentado em doses maiores, a qual permite que a quantidade recomendada de probiótico seja ingerido, foi bem tolerado nos animais tanto na dose única (20 mL/kg) quanto no teste de toxicidade de dose repetida (3 mL/kg, 6 mL/kg e 12 mL/kg).

No presente estudo, pode-se identificar que o tratamento ocorreu sem efeitos toxicológicos significativos sobre o crescimento ou a saúde dos animais, que não mudaram de comportamento, alimentação, consumo, ingestão de água ou peso corporal de qualquer um dos animais em qualquer um dos grupos tratados quando relacionados aos respectivos controles, seja para toxicidade de dose única ou para toxicidade de dose repetida. Aumento do consumo de ração em todos os grupos de toxicidade de dose repetida também foi observado ao longo dos 28 dias, quando comparado ao dia 7 (dados não mostrados), e conseqüentemente, houve uma necessidade ainda maior de consumo de água em todos os grupos. Em relação ao peso corporal, os animais não apresentaram sinal de toxicidade relacionado a esse parâmetro. A diferença apresentada no teste TDR para os machos no primeiro dia de tratamento (Figura 6A), sugere-

se, que foi proveniente do biotério de origem e ao final do tratamento esta diferença de peso corporal foi normalizada. Ao final do teste (28 dias) houve diferença de peso para todos os grupos quando comparados ao dia inicial de tratamento, o que pode-se dizer que o produto em teste não afetou o crescimento dos animais, confirmado pela ingestão de água e ração, mostrando assim que o leite fermentado com o microrganismo em estudo não é considerado tóxico, e é seguro para uso por um período de 28 dias em relação ao comportamento, consumo de água e ração, ou aumento de peso, corroborando com resultados encontrados por Fareez *et al.* (2018), onde ao avaliarem a toxicidade aguda e subcrônica da cepa *Lactiplantibacillus plantarum* LAB12, observaram que não houve mortalidade relacionada aos testes de toxicidade, bem como não houve alteração no peso corporal, ingestão hídrica, consumo, ou mudanças no comportamento clínico relacionadas ao tratamento, sugerindo que o microrganismo avaliado é provavelmente não tóxico ou patogênico, assim como o produto em estudo.

Foi constatado no presente estudo que não houve mudança nos pesos ou aparência macroscópica dos órgãos, fígado e rins, entre os grupos tratados ou controle, para a toxicidade de doses repetidas, o que é confirmado pelos achados histopatológicos que não revelaram anormalidades nem alterações nos grupos tratados quando relacionadas ao controle, mesmo quando submetido a tratamento em dose mais elevada, onde podemos acreditar que o produto em questão não apresenta toxicidade em qualquer um desses órgãos.

Na análise hematológica do presente estudo, observou-se que não houve diferença significativa entre nenhum dos parâmetros avaliados para ambos os sexos, confirmando mais uma vez a ausência de preditores de toxicidade, assim como encontrado em estudos feitos por Silva (2015) onde também não encontrou sinais de toxicidade na análise hematológica. Além de destacar que os valores encontrados para todos os parâmetros analisados estão dentro do intervalo de referência considerado normal.

Na análise da função hepática, um aumento persistente das enzimas ALT e AST é indicativo da existência de danos ao fígado, e a avaliação da função renal pode ser guiada medindo a ureia e a creatinina. Os valores bioquímicos fornecem referências ao estado clínico dos animais, bem como ao seu equilíbrio nutricional, estado imunológico e também permitem monitorar seus tratamentos e prognóstico. Os níveis plasmáticos bioquímicos, tanto para a função renal quanto para função hepática, de animais machos e fêmeas nos grupos de toxicidade de dose repetida não sofreu alterações significativas após o tratamento, e seus valores estão dentro da faixa de referência considerada normal, compatível com a análise histopatológica que também não mostra sinais de danos a esses órgãos, indicando que o produto em teste é seguro para uso também a nível renal e hepático.

Nesse estudo também foi investigado o impacto da Dieta Ocidentalizada e o efeito do tratamento do leite fermentado sobre o perfil lipídico e outros fatores relacionados à síndrome metabólica nos animais.

Os resultados apresentados reproduziram um quadro de obesidade nos animais alimentados com DO a partir da décima semana, concordando com Silva (2015) e Franco (2016), onde, em estudos semelhantes, também observaram quadro de obesidade nos animais a partir do mesmo período (10^a semana). Pode-se afirmar que os animais desenvolveram um quadro clínico compatível com síndrome metabólica (dislipidemia, níveis séricos de glicose elevados, aumento do peso corporal, da circunferência abdominal e do IMC, além de aumento da pressão arterial). Esses resultados são corroborados com He *et al.* (2022), onde observaram que os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram quadro compatíveis com síndrome metabólica semelhantes aos resultados desse estudo.

É provável que a maior quantidade de calorias (12%) presentes na Dieta Ocidentalizada (4,08 kcal/g), em relação à dieta padrão (3,6 kcal/g) tenha contribuído para a redução da ingestão verificados no grupo DO e, possivelmente, o maior teor de lipídios presente na DO, tenha influenciado o aumento de peso dos animais. Os resultados aqui mostrados se assemelham aos obtidos por Oblak *et al.* (2022), que avaliaram animais alimentados com dieta hiperlipídica e como resultado esperado, esses apresentaram um aumento significativo no peso corporal em comparação aos alimentados com dieta controle.

Yang *et al.* (2018) abordam a relação entre a microbiota intestinal e a comunicação intestino-cérebro, onde trazem ser este um ponto crucial para o início de desenvolvimento e estabelecimento da hipertensão. A partir da desregulação do eixo microbiota-intestino-cérebro, o quadro de obesidade e de dislipidemia pode ter contribuído para o aumento dos níveis pressóricos nos animais alimentados com a DO no presente estudo. Os resultados mostraram que os animais tratados por 30 dias com o leite de cabra fermentado com a cultura potencialmente probiótica *L. mucosae* e o prebiótico inulina nas doses 3 e 6 mL/kg tiveram redução significativa nesses níveis pressóricos e que esses valores não foram influenciados pela frequência cardíaca, já que não houve diferença nesses valores durante o período de tratamento. Tal fato pode ter ocorrido pelo reestabelecimento dessa microbiota intestinal e/ou pela hidrólise das proteínas do leite ocorrendo a liberação de peptídeos bioativos com ação hipotensora, através da atividade dos microrganismos presentes no produto oferecido durante o período de tratamento. Fulling *et al.* (2019) trazem dados semelhantes quando mostram que a microbiota tem a capacidade de síntese e liberação de neurotransmissores, como noradrenalina, dopamina e serotonina, conduzindo a sinalização intestino-cérebro, atuando diretamente no sistema

nervoso central (SNC), influenciando assim no controle da pressão arterial. Sabe-se também que esses microrganismos são responsáveis pela produção de AGCC gerados no intestino e que podem influenciar a PA, que através de receptores acoplados à proteína G podem modular indiretamente a PA e através da ligação com seus receptores GPR43 e GPR41 nos colonócitos. Também podem sinalizar para o cérebro a indução de secreção de hormônios intestinais, como o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP1) e o peptídeo YY (PYY), além de promover a secreção de leptina, ativando uma cascata de sinalizações envolvidas no aumento da saciedade, melhorando a sensibilidade à insulina e reduzindo a ingestão alimentar (DALILE *et al.*, 2019; CHRISTIANSEN *et al.*, 2018). Tomando como base essas avaliações, é possível afirmar que alterações na microbiota intestinal pode levar à desregulação da PA causando hipertensão. Assim, um potencial alvo terapêutico na prevenção dessa doença é a manipulação desse local através de tratamento com produto probiótico e/ou prebiótico.

As medidas murinométricas dos animais são indicadores de sobrepeso e obesidade; entretanto, essas medidas não sofreram alterações em decorrência do tratamento de 30 dias. Porém, a circunferência abdominal e o IMC dos animais alimentados com a DO foram maiores que as apresentadas pelos animais alimentados com a DP, o que já era esperado quando se correlaciona com o encontrado de resultado sobre o peso corporal dos animais do mesmo grupo e esses dados podem prever também alterações no perfil lipídico desses animais. Resultados semelhantes podem ser encontrados por Silva (2015), onde percebeu um aumento de 10% na circunferência abdominal aos 60 dias e de 11% no IMC aos 90 e 120 dias dos animais que consumiram DO quando comparado aos que consumiram DP. Yang *et al.* (2021) por sua vez, concluíram que *Limosilactobacillus reuteri* FYNLJ109L1 reduziu o aumento de peso, ingestão de alimentos e acúmulo de gordura, e amenizou sinais da síndrome metabólica por redução da inflamação através da modulação da microbiota intestinal. Talvez um tratamento por maior tempo desses animais com o leite fermentado fosse necessário para que houvesse uma alteração relacionada a esses parâmetros. Hariri *et al.* (2015), avaliaram pacientes tratados por 8 semanas com leite de soja probiótico e também perceberam que não houve alteração no IMC desses indivíduos decorrentes do tratamento com o referido produto.

Quanto à análise do perfil lipídico e bioquímico, pode-se dizer que a Dieta Ocidentalizada causou alteração nesses parâmetros, induzindo aumento dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e LDL-c, quando comparados aos animais que consumiram DP, corroborando com resultados encontrados por Franco (2016) em estudo semelhante, onde percebeu que os animais alimentados por DO aos 150 dias apresentaram aumento médio significativo para colesterol total e triglicerídeos de 23,59% e 38,75%, respectivamente, quando comparados aos

animais que consumiram DP. Após 30 dias de tratamento, pode-se encontrar resultados positivos para os animais tratados com o leite fermentado, pois tiveram níveis de colesterol total, triglicerídeos e LDL-c reduzidos. Pode-se atribuir essa redução ao produto administrado, visto que os animais do grupo controle não apresentaram diferença alguma. Resultados semelhantes foram encontrados por Yadav *et al.* (2019), os quais perceberam uma redução nos níveis séricos de CT, LDL-c e TG em ratos com hipercolesterolemia induzida por dieta rica em colesterol e que tiveram tratamento com leite fermentado com a cepa probiótica MTCC 5898, atualmente classificada como pertencente à espécie *Limosilactobacillus fermentum* (anteriormente denominada *Lactobacillus fermentum* MTCC 5898). Alguns estudiosos propuseram que o efeito hipocolesterolêmico dos probióticos está relacionado à capacidade de assimilação do colesterol, adesão epitelial ao cólon e inibição da captação de colesterol pelas células epiteliais do cólon, o que reduz a disponibilidade do colesterol no lúmen intestinal, e também através da atividade da enzima hidrolase de sais biliares. Quando a desconjugação dos sais biliares é catalisada por essa enzima esses sais biliares desconjugados são absorvidos com menor eficiência no intestino, aumentando a excreção de ácidos biliares nas fezes e assim diminuindo os níveis séricos de colesterol (PALANIYANDI *et al.*, 2020; KHARE; GAUR, 2020). Estes efeitos podem justificar os resultados obtidos para o colesterol nos animais do presente estudo. Já para os parâmetros de ureia e creatinina não foram encontradas diferenças durante o período de tratamento e nem entre os grupos de diferentes dietas, assim como no trabalho semelhante de Silva (2015), onde também não foi encontrada diferença para esses parâmetros quando se comparou animais que consumiram DO aos que consumiram DP. Alterações nesses parâmetros poderiam ser indicadores de danos renais e, fazendo a correlação com a histologia renal, pode-se reforçar que os órgãos permaneceram sem danos quanto aos parâmetros bioquímicos e histológicos.

A glicemia de jejum mais elevada nos animais alimentados com DO pode ser relacionada ao teor de gorduras e açúcares refinados presentes na dieta, o que também pode contribuir para a hiperlipidemia nesses animais, resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos de Silva (2015) e Franco (2016), onde também obtiveram resultados de aumento de glicemia de jejum em animais alimentados com DO quando comparados aos alimentados com DP. Os resultados mostraram uma redução nesse parâmetro bioquímico nos animais do grupo DO tratados com o leite de cabra fermentado quando comparados aos animais do mesmo grupo que receberam água, o que nos faz relacionar essa redução à formulação do produto, contendo *L. mucosae* e o prebiótico inulina. Não houve diferença do efeito sobre a glicemia para a dosagem de leite fermentado utilizada (3 mL/kg e 6mL/kg). Resultados semelhantes foram encontrados

por Sun *et al.* (2019), quando ao estudarem camundongos com obesidade induzida por dieta rica em gordura, constataram que o tratamento com cepa probiótica de *Lactobacillus acidophilus* La-SJLH001 que conseguiu reduzir a hiperglicemia e a hipercolesterolemia dos animais através de melhoria da homeostase da glicose e colesterol. Segundo Yabe *et al.* (2019), a microbiota intestinal saudável é capaz de converter carboidratos não digeríveis em AGCC e esses compostos orgânicos podem estimular as células intestinais a secretarem hormônios GLP-1, GLP-2 e PYY, influenciando as células beta pancreáticas a liberarem insulina e, assim, contribuir para a redução da glicemia de jejum. De acordo com Cao *et al.* (2021), em revisão de ensaios sobre o efeito da suplementação de probióticos nos parâmetros glicêmicos em pacientes com metabolismo anormal da glicose, as principais espécies as quais relataram ter um efeito significativo no papel de redução da glicemia foram da família *Lactobacillaceae* e do gênero *Bifidobacterium*.

Quanto ao peso relativo dos órgãos (coração, fígado e rim) dos animais pode-se dizer que não houve diferença significativa entre os grupos, tanto em decorrência do tratamento de 30 dias, como quando relacionando os animais que receberam diferentes tipos de dietas, semelhante ao encontrado por Franco (2016), onde não encontrou diferença significativa nos pesos relativos de coração e fígado frente ao tipo de dieta consumida pelos animais, se DO ou DP, já em estudo semelhante realizado por Silva (2015), o peso relativo do fígado de animais alimentados com DO foi maior que o dos animais alimentados com DP. Esses resultados concordam com a avaliação macroscópica desses órgãos, os quais não apresentaram alterações aparentes e/ou danos a olho nu.

Estudos mostram que alterações na microbiota intestinal induzida pelo consumo de dietas hiperlipídicas e hipercalóricas promovem alterações na composição de microrganismos intestinais favorecendo a multiplicação de patógenos, o desencadeamento de processos inflamatórios e outras doenças associadas à síndrome metabólica. Alguns lipopolissacarídeos das células desses patógenos são considerados um dos fatores da resposta inflamatória, sugerindo uma possível associação entre eles e as doenças cardiometabólicas. Os processos inflamatórios sobre o tecido adiposo tendem a ser minimizados com o consumo de probióticos e prebióticos, pois sabe-se que estes inibem o crescimento da população de bactérias patogênicas devido à capacidade de colonizar o epitélio intestinal por meio de exclusão competitiva de patógenos pela adesão e por nutrientes, além de inibir a proliferação dos mesmos pela produção de substâncias antimicrobianas. Reduzindo essa inflamação, os adipócitos param de acumular gordura descontroladamente e o indivíduo tende a apresentar redução de peso

corporal. (CAVALCANTE *et al.*, 2019; ORTEGA *et al.*, 2020; PLAZA-DIAZ *et al.*, 2019; YOSHIDA *et al.*, 2018).

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o leite de cabra adicionado da inulina prebiótica e fermentado com autóctone de *L. mucosae* CNPC007, usada como cultura adjunta com o iniciador *S. thermophilus* QGE, não causou efeito tóxico quando aplicado em dose única de 20 mL/kg ($1,8 \times 10^9$ UFC *L. mucosae* CNPC007 e 1 g de inulina por kg/ dia), nem em doses repetidas de 3 mL/kg, 6 mL/kg e 12 mL/kg por 28 dias ($2,75 \times 10^8$, $5,5 \times 10^8$, e $1,1 \times 10^9$ UFC *L. mucosae* CNPC007 e médias de inulina de 0,15 g, 0,3 g e 0,6 g por kg/dia, respectivamente).

Pode-se dizer que o nível de efeito adverso (NOAEL) do leite fermentado com *L. mucosae* CNPC007, *S. thermophilus* QGE e inulina para machos e fêmeas é considerado superior a 20 mL/kg após administração oral de dose única e superior a 6 mL/kg após administração oral de doses repetidas (sendo que cada mL fornece 7,4 – 7,9 log UFC de *L. mucosae*), que foi a dose mais alta analisada em cada teste, para a qual não foi demonstrado sinais de toxicidade ou mortalidade.

Com base nesses resultados e de acordo com os níveis de dose mais altos exigidos pelo Sistema Globalmente Harmonizado (GHS) OCDE 423, o material em estudo é considerado de baixa toxicidade, seguro para uso em roedores e, portanto, permitiu um possível uso futuro em novos estudos. No entanto, o presente estudo ainda não pode confirmar o efeito probiótico in vivo de *L. mucosae* CNPC007, sendo esta uma limitação do estudo, que deve ser melhor investigada.

Os animais em estudo alimentados com a Dieta Ocidentalizada desencadearam a síndrome metabólica, já que apresentaram aumento de peso corporal, de IMC, de circunferência abdominal, de colesterol total, de LDL-c, de triglicerídeos, de glicemia de jejum e hipertensão arterial sistólica frente aos alimentados com a dieta padrão. O tratamento desses animais com o leite fermentado pelo período de 30 dias promoveu redução dos níveis de pressão arterial, de colesterol total, de LDL-c, de triglicerídeos e de glicemia de jejum mesmo com a continuidade da ingestão da Dieta Ocidentalizada, e que esses resultados não são alterados em função da dose administrada de 3 mL/kg ou 6 mL/kg.

Sugere-se, portanto, que o leite fermentado com o probiótico *L. mucosae* CNPC007 adicionado de inulina é um produto com potencial a ser usado frente ao tratamento de doenças que envolvem a síndrome metabólica, necessitando, para isso, de estudos complementares com animais para que possam ser avaliados pontos que o candidatem como possível terapia não farmacológica.

REFERÊNCIAS

ADEDOKUN, T. O. *et al.* Evaluation of functional attributes and storage stability of novel juice blends from baobab, pineapple, and black-plum fruits. **Heliyon**, v. 8, n. 5, e09340, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09340>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844022006284>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n° 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 União**. Seção 1, Brasília, DF, 03 dez. 1999, p. 23-24. Disponível em: <https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjI0OQ%2C%2C>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. **Probióticos:** construção da lista de linhagens probióticas. Brasília. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/3845226/0/An%C3%A1lise+das+Linhagens+de+Probi%C3%B3ticos__23042018.pdf/6e37da13-2151-4330-85b0-0f449dbb0e95. Acesso em 07 abr. 2022.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial da União**. Seção 1, Brasília, DF, 03 maio 1999. Disponível em: <https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjI1MQ%2C%2C>. Acesso em: 12 maio 2022.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. **Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos**. Guia n° 21/2021 – versão 2. Brasília. 2021. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5280930/guia+21+v2.pdf/dac5bf5f-ae56-4444-b53c-2cf0f7c15301>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ALKHATIB, A. *et al.* Functional foods and lifestyle approaches for diabetes prevention and management. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1310, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu9121310>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/9/12/1310>. Acesso em: 12 jun. 2022.

ALMEIDA NETA, M. C. *et al.* Fermented dessert with whey, ingredients from the peel of jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) and an indigenous culture of *Lactobacillus plantarum*: composition, microbial viability, antioxidant capacity and sensory features. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1214, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10091214>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/10/9/1214>. Acesso em: 12 jul. 2022.

AMADIEU, C. *et al.* Liver alterations are not improved by inulin supplementation in alcohol use disorder patients during alcohol withdrawal: a pilot randomized, double-blind, placebo-controlled study. **EBioMedicine**, v. 80, p. 104033, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104033>. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964\(22\)00214-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964(22)00214-6/fulltext). Acesso em: 12 jul. 2022.

APPEL-DA-SILVA, M. C. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* fungemia following probiotic treatment. **Medical Mycology Case Reports**, v. 18, p. 15–17, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2017.07.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211753917300441>. Acesso em: 12 jul. 2022.

BARROS, V.C. *et al.* Uma análise de consumo de alimentos probióticos com estudantes de uma instituição de ensino superior. **Research Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e47710716728, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i17>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/download/16728/15041/214913>. Acesso em: 12 jul. 2022.

BEAUVOIR, Simone de. **Mémoires d'une jeune fille rangée**. Paris: Gallimard, 1958.

BEISNER, J. *et al.* Probiotic inulin and sodium butyrate attenuate obesity-induced intestinal barrier dysfunction by induction of antimicrobial peptides. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 678360, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.678360>. Disponível em: [https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.678360/full#:~:text=10.3389%2Ffimmu.2021.678360-,Prebiotic%20Inulin%20and%20Sodium%20Butyrate%20Attenuate%20Obesity%2DInduced%20Intestinal%20Barrier,by%20Induction%20of%20Antimicrobial%20Peptides&text=Defects%20in%20the%20mucosal%20barrier,fatty%20liver%20disease%20\(NAFLD\)](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.678360/full#:~:text=10.3389%2Ffimmu.2021.678360-,Prebiotic%20Inulin%20and%20Sodium%20Butyrate%20Attenuate%20Obesity%2DInduced%20Intestinal%20Barrier,by%20Induction%20of%20Antimicrobial%20Peptides&text=Defects%20in%20the%20mucosal%20barrier,fatty%20liver%20disease%20(NAFLD)). Acesso em: 12 jul. 2022.

BLAAK, E. E. *et al.* Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. **Beneficial Microbes**, v. 11, n. 5, p. 411–455, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3920/BM2020.0057>. Disponível em: <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/BM2020.0057>. Acesso em: 12 jul. 2022.

BOVOLINI, A. *et al.* Metabolic syndrome pathophysiology and predisposing factors. **International Journal of Sports Medicine**, v. 42, n. 3, p. 199–214, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1055/a-1263-0898>. Disponível em: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/a-1263-0898>. Acesso em: 12 jul. 2022.

BROSSEAU, C. *et al.* Probiotics: mechanisms and preventive effects in allergy. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1841, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11081841>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6722770/#:~:text=Nutrients%20with%20prebiotic%20properties%20are,further%20credence%20to%20this%20hypothesis>. Acesso em: 12 jul. 2022.

CALLAWAY, L. K. *et al.* Probiotics for the prevention of gestational diabetes mellitus in overweight and obese women: findings from the SPRING double-blind randomized controlled trial. **Diabetes Care**, v. 42, n. 3, p. 364–371, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc18-2248>. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/care/article/42/3/364/36096/Probiotics-for-the-Prevention-of-Gestational>. Acesso em: 12 jul. 2022.

CABELLO-OLMO, M. *et al.* Antidiabetic effects of *Pediococcus acidilactici* pA1c on HFD-induced mice. **Nutrients**, v. 14, n. 3, p 692, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu14030692>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/3/692>. Acesso em: 12 jul. 2022.

CAO, D. X. *et al.* Effect of probiotic supplementation on glycemic outcomes inpatients with abnormal glucose metabolism: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 77, n. 5, p. 251-261, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1159/000518677>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/354674989_Effect_of_Probiotic_Supplementation_on_Glycemic_Outcomes_in_Patients_with_Abnormal_Glucose_Metabolism_A_Systematic_Review_and_Meta-Analysis_of_Randomized_Controlled_Trials. Acesso em: 12 jul. 2022.

CASTRO-BARQUERO, S. *et al.* Dietary polyphenol intake is associated with HDL-cholesterol and a better profile of other components of the metabolic syndrome: a PREDIMED-plus sub-study. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 689-705, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7146338/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

CAVALCANTE, R. G. S. *et al.* The probiotic *Lactobacillus fermentum* 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 29, n. 12, p. 1408-1417, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2019.08.003>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31640890/>. Acesso em: 12 ago. 2022.

CHRISTIANSEN, C. B. *et al.* The impact of short-chain fatty acids on GLP-1 and PYY secretion from the isolated perfused rat colon. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 315, n. 1, p. 53-65, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00346.2017>. Disponível em: [https://chem.ku.dk/ansatte/alle/?pure=da%2Fpublications%2Fthe-impact-of-short-chain-fatty-acids-on-glp1-and-pyy-secretion-from-the-isolated-perfused-rat-colon\(57e1d409-3960-45a3-bda9-00918ec07c05\)%2Fexport.html](https://chem.ku.dk/ansatte/alle/?pure=da%2Fpublications%2Fthe-impact-of-short-chain-fatty-acids-on-glp1-and-pyy-secretion-from-the-isolated-perfused-rat-colon(57e1d409-3960-45a3-bda9-00918ec07c05)%2Fexport.html). Acesso em: 12 jul. 2022.

CUNNINGHAM, M. *et al.* Shaping the future of probiotics and prebiotics. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 667-685, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X21000056>. Acesso em: 12 jul. 2022.

DE BARCELOS, S. C. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo *Petit-Suisse* caprino potencialmente probiótico com polpa de acerola (*Malpighia emarginata* DC)**. 2017. 172 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Limoeiro do Norte, Ceará, 2017. Disponível em: <https://docplayer.com.br/82044771-Instituto-federal-de-educacao-ciencia-e-tecnologia-do-ceara-ifce-campus-limoeiro-do-norte-mestrado-em-tecnologia-de-alimentos.html>. Acesso em: 12 jul. 2022.

DELGADILLO-PUGA, C. *et al.* Goat's milk intake prevents obesity, hepatic steatosis and insulin resistance in mice fed a high-fat diet by reducing inflammatory markers and increasing energy expenditure and mitochondrial content in skeletal muscle. **International Journal of Molecular Sciences**, v 21, n. 15, p 5530, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21155530>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32752280/#:~:text=in%20Skeletal%20Muscle->

,Goat's%20Milk%20Intake%20Prevents%20Obesity%2C%20Hepatic%20Steatosis%20and%20Insulin%20Resistance,doi%3A%2010.3390%2Fijms21155530. Acesso em: 12 jul. 2022.

DE MORAES, G. M. D. *et al.* Functional properties of *Lactobacillus mucosae* strains isolated from Brazilian goat milk. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 9, n. 3, p. 235-245, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9244-8>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27943049/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

DALILE, B. *et al.* The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. **Nature Reviews, Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 8, p. 461-478, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41575-019-0157-3>. Acesso em: 12 jul. 2022.

DOERN, C. D. *et al.* Probiotic associated aspiration pneumonia due to *Lactobacillus rhamnosus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 3124–3126, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01065-14>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01065-14>. Acesso em: 13 jul. 2022.

DOS SANTOS, I. R. O. *et al.* Efeitos dos probióticos nas dislipidemias: a scoping review. **Brazilian of Journal of Development**, v. 5, n. 11, p. 27672-27687, 2019. DOI: <https://doi.org/10.34111/bjdv5n11-365>. Disponível em: <https://brazilianjournals.com/ojs/index.php/BRJD/article/view/4999/4596>. Acesso em: 12 jul. 2022.

DROBNÁ, E. *et al.* Antifungal activity and aflatoxin binding ability of *Lactobacillus* species isolated from lamb and goatling stomach mucus. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 56, n. 3, p. 255–264, 2017. Disponível em: <https://www.vup.sk/resources/bulletin/jfnr201725.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2022.

FAREEZ, I. M.; LIM, M. S. M. e RAMASAMY, K. Microencapsulated *Lactobacillus plantarum* LAB12 showed no sign of acute or subchronic toxicity *in vivo*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 2, p. 447–459, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9442-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-018-9442-7>. Acesso em: 12 jul. 2022.

FARIA, A. P. *et al.* Proposed inflammatory score of circulating cytokines/adipokines associated with resistant hypertension, but dependent on obesity parameters. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 112, n. 4, p. 383-389, 2019. DOI: <https://doi.org/10.5935/abc.20190032>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/BrKHbCx3XmWWCY59BpTLDvC/?lang=en>. Acesso em: 12 jul. 2022.

FERRO-CAVALCANTE, T. C. *et al.* Early exposure of dams to a westernized diet has long-term consequences on food intake and physiometabolic homeostasis of the rat offspring. **International Journal of Food Sciences Nutrition**, v. 65, n.8, p.1–5, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.950208>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09637486.2014.950208>. Acesso em: 12 jul. 2022.

FERRO-CAVALCANTE, T. C. *et al.* Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. **Lipids**, v. 48, n. 11, p.1157–1168, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3833-z>. Disponível em: <https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1007/s11745-013-3833-z>. Acesso em: 12 jul. 2022.

FILBIDO, G. S.; SIQUIERI, J. P. A. e BACARJI, A. G. Perfil do consumidor de alimentos lácteos funcionais em Cuiabá-MT. **Revista Principia**, v. 45, n. 1, p. 31-39, 2019. Disponível em: <https://periodicos.ifpb.edu.br/index.php/principia/article/viewFile/2384/1073#:~:text=Alimentos%20%C3%A1lcteos%20funcionais%2066%2C6,1%20a%203%20vezes%2Fsemana>. Acesso em: 12 jul. 2022.

FRANCO, E. S. **Avaliação do efeito antidiabético de *Parkinsonia aculeata* L. (Caesalpinaceae) em ratos *wistar* com síndrome metabólica**: repercussões bioquímicas e moleculares. 2016. 97 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2016. Disponível em: https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/17826/1/Tese_2016_Eryvelton%20PPGCF_UFPE.pdf.

FÜLLING, C.; DINAN, T. G. e CRYAN, J. F. Gut microbe to brain signaling: what happens in vagus. **Neuron**, v. 101, n. 6, p. 998-1002, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627319301175>. Acesso em: 12 jul. 2022.

GALDINO, I. K. C. P. O. *et al.* Fermentative behavior of native lactobacilli in goat milk and their survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v.135, p. 109905, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109905>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364382030894X>. Acesso em: 12 jul. 2022.

GIBSON, G. R. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v 14, n. 8, p 491-502, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2017.75>. Acesso em: 12 jul. 2022.

GRANATO, D. *et al.* Functional foods: product development, technological trends, efficacy testing, and safety. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, p. 93-118, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-food-032519-051708>. Acesso em: 12 jul. 2022.

GUL, K.; SINGH, A. K. e JABEEN, R. Nutraceuticals and functional foods: the foods for the future world. **Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 16, p. 2617-2627, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.903384>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2014.903384>. Acesso em: 12 jul. 2022.

HARIRI, M. *et al.* The effect of probiotic soy milk and soy milk on anthropometric measures and blood pressure in patients with type II diabetes mellitus: a randomized double-blind clinical trial. **Arya Atherosclerosis**, v. 11, n. 1, p. 74-80, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4530661/#:~:text=CONCLUSION,anthropometric%20measures%20in%20these%20patients>. Acesso em: 12 jul. 2022.

HE, Q. *et al.* A pilot dynamic analysis of formative factors of nephrolithiasis related to metabolic syndrome: evidence in a rat model. **Renal failure**, v. 44, n. 1, p. 1134-1143, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/0886022X.2022.2097922>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9291672/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

HIEL, S. *et al.* Effects of a diet based on inulin-rich vegetables on gut health and nutritional behavior in healthy humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 109, n. 6, p. 1683-1695, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz001>. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/109/6/1683/5479239>. Acesso em: 12 jul. 2022.

HILL, C. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>. Acesso em: 12 jul. 2022.

HUANG, R.; WANGE, K. e HU, J. Effect of probiotics on depression: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 483-495, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu8080483>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/8/8/483>. Acesso em: 12 jul. 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA – IBGE. **Censo agropecuário 2017 - resultados preliminares**. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=26&tema=75662. Acesso em: 10 fev. de 2022.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes atlas**, 10^a ed., 2021, 141 pg. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>. Acesso em: 10 fev. de 2022.

JIANG, T. *et al.* *Lactobacillus mucosae* strain promoted by high-fiber diet in genetic obese child alleviates lipid metabolism and modifies gut microbiota in *ApoE* ^{-/-} mice on a western diet. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1225, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081225>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/8/1225>. Acesso em: 12 jul. 2022.

KAASIAN, N.; *et al.* Probiotic and symbiotic supplementation could improve metabolic syndrome in prediabetic adults: A randomized controlled trial. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 5, p. 2991-2996, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.07.016>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30076087/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

KASINSKA, M. A. e DRZEWOSKI, J. Effectiveness of probiotic in type 2 diabetes: a meta-analysis. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v. 125, n. 11, p. 803-813, 2015.

DOI: <https://doi.org/10.20452/pamw.3156>. Disponível em: <https://www.mp.pl/paim/issue/article/3156/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

KHARE, A. e GAUR, S. Cholesterol-lowering effects of *Lactobacillus* species. **Current Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 638-644, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01903-w>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-020-01903-w>. Acesso em: 12 jul. 2022.

KIM, S. K. *et al.* Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 1335-1340, 2019. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.1906.06064>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31434172/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

KIM, E-D. *et al.* Antioxidant and angiotensin-converting enzyme (ace) inhibitory activities of yogurt supplemented with *Lactiplantibacillus plantarum* NK181 and *Lactobacillus delbrueckii* KU200171 and sensory evaluation. **Foods**, v. 10, n. 10, p 2324, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10102324>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/10/2324>. Acesso em: 12 jul. 2022.

KLEEREBEZEM, M. *et al.* Understanding mode of action can drive the translational pipeline towards more reliable health benefits for probiotics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 55-60, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2018.09.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166918300910>. Acesso em: 12 jul. 2022.

KOCHAN, P. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* administration causes sepsis in a cardiosurgical patient — is the time right to revise probiotic safety guidelines? **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n. 10, p.1587–1592, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03614.x>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14618838>. Acesso em: 12 jul. 2022

LANGENBERG, C.; LOTTA, L. A. Genomic insights into the causes of type 2 diabetes. **Lancet**, v. 391, n. 10138, p. 2463-2474, 2018. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31132-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31132-2). Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673618311322>. Acesso em: 12 jul. 2022.

LIMA, T. R. *et al.* Clusters of cardiometabolic risk factors and their association with atherosclerosis and chronic inflammation among adults and elderly in Florianópolis, southern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 117, n. 1, p.39-48, 2021. DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20200230>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abc/a/RkNt98yB8Q9dsbQNPJNNRHv/?lang=en>. Acesso em: 12 jul. 2022.

MANO, M. C. R.; *et al.* Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic Revolution on the industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 1, p 17-37, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29032473/>. Acesso em: 12 jul. 2022. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8564-2>.

MIAO, M. *et al.* The protective effects of inulin-type fructans against high-fat/sucrose diet-induced gestational diabetes mice in association with gut microbiota regulation. **Frontiers in**

Microbiology, v. 13, p. 832151, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.832151>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.832151/full>. Acesso em: 12 jul. 2022.

NAYIK, G. A. *et al.* Nutritional profile, processing and potential products: a comparative review of goat milk. **Dairy**, v. 3, p. 622-647, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/dairy3030044>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2624-862X/3/3/44/htm>. Acesso em: 5 set. 2022.

NAYIK, G. A. *et al.* Recent insight into processing approaches and potential health benefits of goat milk and its products: a review. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 789117, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.789117>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2021.789117/full>. Acesso em: 12 jul. 2022.

NURLIYANI, N.; HARMAYANI, E. e SUNARTI, S. Synbiotic goat milk kefir improves health status in rats fed a high-fat and high-fructose diet. **Veterinary World**, v. 15, n. 1, p. 173-181, 2022. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.173-181>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8924388/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Test No. 423**: acute oral toxicity - acute toxic class method. OECD Publishing: Section 4, Paris, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en. Acesso em: 12 jul. 2022.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Test No. 407**: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. OECD Publishing: Section 4, Paris, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264070684-en>. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en. Acesso em: 12 jul. 2022.

OBLAK, A. L. *et al.* *Plcg^{M28L}* interacts with high fat/high sugar diet to accelerate alzheimer's disease-relevant phenotypes in mice. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 14, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.886575>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2022.886575/full>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ORTEGA, M. A. *et al.* Type 2 Diabetes Mellitus Associated with Obesity (Diabesity). The Central Role of Gut Microbiota and Its Translational Applications. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2749, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12092749>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32917030/>. Acesso em: 12 ago. 2022.

PAJARILLO, E. A. B. *et al.* Proteomic view of the crosstalk between *Lactobacillus mucosae* and intestinal epithelial cells in co-culture revealed by Q EXactive-based quantitative proteomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2459, 2017. DOI: <https://doi.org/>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5732961/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

PALANIYANDI, S. A. *et al.* Probiotic characterization of cholesterol-lowering *Lactobacillus fermentum* MJM60397. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 3, p. 1161-1172,

2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09585-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-019-09585-y>. Acesso em: 12 jul. 2022.

PELUZIO, M. C. G. *et al.* Kefir and intestinal microbiota modulation: implications in human health. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 638740, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.638740>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7938729/#:~:text=Peptides%2C%20bioactive%20compounds%20and%20strains,consequently%20may%20generate%20health%20benefits>. Acesso em: 12 jul. 2022.

PEREIRA, A. M. S. *et al.* Influence of a co-culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus casei* on the proteolysis and ACE-Inhibitory activity of a beverage based on reconstituted goat whey powder. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 1, p. 273-282, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9362-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-017-9362-y>. Acesso em: 12 jul. 2022.

PLAZA-DIAZ, J. *et al.* Mechanisms of action of probiotics. **Advances in Nutrition**, v.10, n. 1, p. 49-66, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6363529/#:~:text=One%20of%20the%20major%20mechanisms,which%20bind%20to%20specific%20antigens>. Acesso em: 12 jul.

QIAO, Z.; *et al.* A novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from goat milk casein hydrolysate modulates angiotensin II-stimulated effects on vascular smooth muscle cells. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 878768, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.878768>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35479750/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. *et al.* Hematological and histopathological analysis in Nile tilapia exposed to sublethal concentrations of sodium selenite (Na₂SeO₃Se₄⁺). **Boletim do Instituto de Pesca São Paulo**, v. 40, n. 1, p. 23–33, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/220155>. Acesso em: 12 jul. 2022.

REMELY, M.; HASLBERGER, A. G. The microbial epigenome in metabolic syndrome. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 54, p 71-77, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.09.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098299716300140?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ROUPAR, D. *et al.* Evaluation of microbial-fructo-oligosaccharides metabolism by human gut microbiota fermentation as compared to commercial inulin-derived oligosaccharides. **Foods**, v. 11, n. 7, p. 954, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11070954>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/7/954>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ROUXINOL-DIAS, A. *et al.* Probiotics for the control of obesity — its effect on weight change. **Porto Biomedical Journal**, v. 1, n. 1, p. 12–24, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbj.2016.03.005>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6806938/#:~:text=Conclusions%3A,gain%20compared%20to%20controls%3B%20L>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ROYAN, M. *et al.* *In vitro* assessment of safety and functional probiotic properties of *Lactobacillus mucosae* strains isolated from Iranian native ruminants intestine. **Italian Journal of Animal Science**, v. 20, n. 1, p. 1187-1200, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1947908>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1828051X.2021.1947908>. Acesso em: 12 jul. 2022.

RYAN, P. M. *et al.* *Lactobacillus mucosae* DPC6426 as a bile-modifying and immunomodulatory microbe. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 33, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1403-0>. Disponível em: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-019-1403-0>. Acesso em: 12 jul. 2022.

SAWAS, T. A. L. *et al.* Patients receiving prebiotics and probiotics before liver transplantation develop fewer infections than controls: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 9, p. 1567–1574, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2015.05.027>. Disponível em: [https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565\(15\)00762-4/fulltext](https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565(15)00762-4/fulltext). Acesso em: 12 jul. 2022.

SHERLING, D. H.; PERUMAREDDI, P. e HENNEKENS, C. H. Metabolic syndrome: clinical and policy implications of the new silent killer. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 22, n. 4, p. 365-367, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1177/1074248416686187>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1074248416686187>. Acesso em: 12 jul. 2022.

SILVA, P. A. A. **Avaliação do efeito anti-hiperlipemiante de *Parkinsonia aculeata* em ratos Wistar submetidos à dieta “ocidentalizada”**. 2015. 86 p. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/16964/1/disserta%20a7%20a3o%20mestrado%20PRISCILA%20ARAG%20830.pdf>.

SILVA, V. e ORLANDELLI, R. C. Desenvolvimento de alimentos funcionais nos últimos anos: uma revisão. **Revista UNINGÁ**, v. 56, n. 2, p. 182–194, 2019. Disponível em: <https://revista.uninga.br/uninga/article/view/1110/1978>. Acesso em: 12 jul. 2022.

SUN, Q. *et al.* Mechanism analysis of improved glucose homeostasis and cholesterol metabolism in high-fat-induced obese mice treated with La-SJLH001 via transcriptomics and culturomics. **Food Functional**, v. 10, n. 6, p.3556, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1039/c9fo00205g>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/FO/C9FO00205G>. Acesso em: 12 jul. 2022.

SWANSON, K. S. *et al.* The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of symbiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, p. 687-701, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2>. Disponível em <https://www.nature.com/articles/s41575-020-0344-2>. Acesso em: 15 jul. 2022.

TERPOU, A. *et al.* Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1591,

2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11071591>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/7/1591>. Acesso em: 12 jul. 2022.

TONUCCI, L. B. *et al.* Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 85–92, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.11.011>. Disponível em: [https://www.clinicalnutritionjournal.com/article/S0261-5614\(15\)00331-3/fulltext](https://www.clinicalnutritionjournal.com/article/S0261-5614(15)00331-3/fulltext). Acesso em: 12 jul. 2022.

TRAN, V. *et al.* The vascular consequences of metabolic syndrome: rodent models, endothelial dysfunction, and current therapies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 148, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00148>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7064630/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

WAN, Y. *et al.* Effects of dietary fat on gut microbiota and faecal metabolites, and their relationship with cardiometabolic risk factors: a 6-month randomised controlled-feeding trial. **Gut**, v. 68, p. 1417–1429, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317609>. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/68/8/1417>. Acesso em: 12 jul. 2022.

WANG, Z. *et al.* Inulin alleviates inflammation of alcoholic liver disease *via* SCFAS-inducing suppression of m1 and facilitation of m2 macrophages in mice. **International Immunopharmacology**, v. 78, p. 106062, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106062>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576919319629?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jul. 2022.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. WGO Practice Guideline. **Probiotics and Prebiotics**. 2017. Disponível em: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/probiotics-and-prebiotics>. Acesso em: 13 maio 2022.

WANG, R. *et al.* Inulin activates FXR-FGF15 signaling and further increases bile acids excretion in non-alcoholic fatty liver disease mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 600, p. 156-162, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.02.033>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X22002224?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jul. 2022.

YABE, D.; KUWATA, H. e SEINO, Y. The journey to understanding incretin systems: Theory, practice and more theory. **Journal Diabetes Investigation**, v. 10, n. 5. p. 1171-1173, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/jdi.13123>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jdi.13123>. Acesso em: 12 jul. 2022.

YADAV, R. *et al.* Consumption of probiotic *Lactobacillus fermentum* MTCC: 5898-fermented milk attenuates dyslipidemia, oxidative stress, and inflammation in male rats fed on cholesterol-enriched diet. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 2, p. 509-518, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9429-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-018-9429-4>. Acesso em: 12 jul. 2022.

YAGI, S. *et al.* Infective endocarditis caused by *Lactobacillus*. **Internal Medicine Journal**, v. 47, n. 12, p. 1113–1116, 2008. DOI: <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.47.0744>.

Disponível em:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/47/12/47_12_1113/_article. Acesso em: 12 jul. 2022.

YANG, B. *et al.* *Lactobacillus reuteri* FYNLJ109L1 attenuating metabolic syndrome in mice via gut microbiota modulation and alleviating inflammation. **Foods**, v. 10, n. 9, p. 2081, 2021.

DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10092081>. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8469823/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

YANG, T. *et al.* The gut microbiota and the brain-gut-kidney axis in hypertension and chronic kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, v.14, n. 7, p. 442-456, 2018. DOI:

<https://doi.org/10.1038/s41581-018-0018-2>. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/s41581-018-0018-2>. Acesso em: 12 jul. 2022.

YANG, X-J. *et al.* Leukocyte-related parameters in older adults with metabolic syndrome. **Endocrine**, v. 68, n.2, p. 312-319, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12020-020-02243-2>.

Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12020-020-02243-2>. Acesso em: 12 jul. 2022.

YAVAROV-DAYLIEV, D. *et al.* *Pediococcus acidilactici* CECT9879 (pA1c) counteracts the effect of a high-glucose exposure in *C. elegans* by affecting the insulin signaling pathway (iis). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2689, 2022. DOI:

<https://doi.org/10.3390/ijms23052689>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/5/2689>. Acesso em: 12 jul. 2022.

YOSHIDA, N. *et al.* *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* reduce gut microbial lipopolysaccharide production and inhibit atherosclerosis. **Circulation**, v. 138, n. 22, p. 2486-2498, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033714>. Disponível em:

<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033714>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ZAFAR, H. *et al.* *Lacticaseibacillus rhamnosis* FM9 and *Limosilactobacillus fermentum* Y57 are as effective as statins at improving blood lipid profile in high cholesterol, high-fat diet model in male wistar rats. **Nutrient**, v. 14, n. 8, p. 1654, 2022. DOI:

<https://doi.org/10.3390/nu14081654>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/8/1654>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ZHANG, L.; KO, C-Y. e ZENG, Y-M. Immunoregulatory effect of short-chain fatty acids from gut microbiota on obstructive sleep apnea-associated hypertension. **Nature and Science of Sleep**, v. 14, p. 393-405, 2022. DOI: <https://doi.org/10.2147/NSS.S354742>. Disponível em:

<https://www.dovepress.com/immunoregulatory-effect-of-short-chain-fatty-acids-from-gut-microbiota-peer-reviewed-fulltext-article-NSS>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>. Disponível em:

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004107>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ZHAO, L. *et al.* Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2. **Diabetes Science**, v. 359, n. 6380, p. 1151-1156, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aao5774>. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aao5774>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ZOU, Y-F. *et al.* Restorative effects of inulin from *Codonopsis pilosula* on intestinal mucosal immunity, anti-inflammatory activity and gut microbiota of immunosuppressed mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 786141, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.786141>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.786141/full>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ZHU, Y-T. *et al.* Prebiotics inulin metabolism by lactic acid bacteria from young rabbits. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 719927, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.719927>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8517115/>. Acesso em: 12 jul. 2022.

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO COMO RESULTADO DA PESQUISA

Probiotics and Antimicrobial Proteins
<https://doi.org/10.1007/s12602-021-09898-x>



Safety Evaluation of Goat Milk Added with the Prebiotic Inulin Fermented with the Potentially Probiotic Native Culture *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 in Co-culture with *Streptococcus thermophilus* QGE: Analysis of Acute and Repeated Dose Oral Toxicity

Áurea Marcela de Souza Pereira¹ · Larissa Caroline de Almeida Sousa Lima¹ · Laisa Wanessa Santos Lima¹ · Tamires Meira Menezes¹ · Ângela Magalhães Vieira² · Eryvelton de Souza Franco³ · Silvânia Tavares Paz⁴ · Carina Scanoni Maia⁴ · Antônio Sílvia do Egito⁵ · Karina Maria Olbrich dos Santos⁶ · Flávia Carolina Alonso Burity⁷ · Maria Bernadete de Sousa Maia¹

Accepted: 21 December 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

Despite functional goat milk products having emerged due to their importance for human nutrition and health, few studies have assessed the safety of consumption of goat dairy products containing potentially probiotic autochthonous lactic acid bacteria supplemented with prebiotic carbohydrates. Aiming this field, this study evaluated the safety of goat's milk fermented with *Streptococcus thermophilus* QGE, the autochthonous *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 culture, and the prebiotic inulin, through single- and repeated-dose oral toxicity tests (SDT and RDT, respectively) in animals. Ten female Swiss Webster mice were used for SDT evaluation — 2 groups, SDTc (20 mL/kg of filtered water) and SDTt (20 mL/kg of fermented milk) — and 40 Wistar rats for RDT — RDT3, RDT6, and RDT12 (treated with fermented milk at doses of 3 mL/kg, 6 mL/kg, and 12 mL/kg, respectively) and also RDTc (12 mL/kg of filtered water). For SDT, no signs of mortality or toxicity were observed, and the animals maintained the expected weight gain and feed intake. The RDT trials did not show mortality or signs of toxicity, as well as no change in body weight and organs, in the hematological and biochemical parameters, and also in relation to morphology and histology. Since the fermented milk did not cause any toxic effect in the conditions evaluated, it can be said that its no-adverse effect level (NOAEL) was considered to be higher than 20 mL/kg/day. Thus, the fermented milk with *L. mucosae* CNPC007 and inulin was considered to be of low toxicity, safe for use in rodents, and allowed for use in further studies.

Keywords Autochthonous lactic acid bacteria · Goat dairy products · In vivo assay · No-adverse effect level · Prebiotics

✉ Áurea Marcela de Souza Pereira
 aurea_marcela@hotmail.com

¹ Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Recife, PE 50670-901, Brazil

² Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Recife, PE 50670-901, Brazil

³ Department of Veterinary Medicine, Brazilian University Center (UNIBRA), Rua Padre Inglês, 257, Recife, PE 50050-230, Brazil

⁴ Department of Histology and Embryology, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Recife, PE 50670-901, Brazil

⁵ Embrapa Goats and Sheep, Northeast Regional Unity, Brazilian Agricultural Research Corporation, R. Osvaldo Cruz, 1143, Campina Grande, PB 58428-095, Brazil

⁶ Embrapa Food Technology, Brazilian Agricultural Research Corporation, Av. das Américas, 29501, Rio de Janeiro, RJ 23020-470, Brazil

⁷ Department of Pharmacy, State University of Paraíba, R. Juvêncio Arruda, s/n, Campina Grande, PB 58429-600, Brazil

Published online: 14 January 2022

Springer

ANEXO B - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 20 de dezembro de 2018

Ofício nº 115/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof. Maria Bernadate de Sousa Maia**
 Centro de Biociências
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 0062/2018

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do Efeito de Leite Caprino Fermentado Sobre um Modelo Experimental de Síndrome Metabólica." registrada com o nº0062/2018, sob a responsabilidade de Prof.ª Maria Bernadate de Sousa Maia que envolvem a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 18/12/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Março de 2019 a fevereiro de 2022
Espécie/linhagem/raça	Ratos Heterogenico, Camundongo heterogênico e Camundongo isogenicos
Nº de animais	124
Peso/idade	45-55g/ 21 dias
Sexo	(Macho 70) e (Fêmea 54)
Origem	Bioterio do Departamento de Nutrição da UFPE.