

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA E  
PROPRIEDADE INTELECTUAL

# **Avaliação da atividade anti-hipertensiva de uma bebida probiótica em ratos espontaneamente hipertensos**

Alessandra Figueirôa Léo

Belo Horizonte  
2020

Alessandra Figueirôa Léo

# **Avaliação da atividade anti-hipertensiva de uma bebida probiótica em ratos espontaneamente hipertensos**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Área de Concentração: Inovação Biofarmacêutica  
Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo  
Co-Orientadores: Dr. Fillipe Luiz Rosa do Carmo  
Dr. Alfonso Gala-Garcia

Belo Horizonte  
2020

043 Léo, Alessandra Figueirôa.  
Avaliação da atividade anti-hipertensiva de uma bebida probiótica em ratos espontaneamente hipertensos [manuscrito] / Alessandra Figueirôa Léo. – 2020.

106 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. Coorientadores: Dr. Fillipe Luiz Rosa do Carmo e Dr. Alfonso Gala-Garcia.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual.

1. Hipertensão. 2. Probióticos. 3. Lactobacillus delbrueckii. 4. Peptidil Dipeptidase A. 5. Sistema Renina-Angiotensina. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Carmo, Fillipe Luiz Rosa do. III. Gala-Garcia, Alfonso. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 616.12



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Instituto de Ciências Biológicas  
 Departamento de Fisiologia e Biofísica  
 Mestrado Profissional Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual

## ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 116 De Alessandra Figueirôa Léo

Às 09:00 horas do dia 29 de julho de 2020, em ambiente virtual, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de *ALESSANDRA FIGUEIRÔA LÉO*. A presidência da sessão coube ao Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, ICB/UFMG, ORIENTADOR. Inicialmente o Presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: PROF. DR. ALFONSO GALA GARCÍA, ICB/UFMG - COORIENTADOR; PROF. DR. RODRIGO DIAS DE OLIVEIRA CARVALHO, MSU; PROFA. DRA. ANA CRISTINA GOMES SANTOS, UMA; PROFA. DRA. MARIANA MARTINS DRUMOND, CEFET; PROF. DR. THIAGO VERANO BRAGA, ICB/UFMG - SUPLENTE, E Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, ICB/UFMG, ORIENTADOR. EM Seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Dissertação de Mestrado, intitulada “*AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA DE UMA BEBIDA PROBIÓTICA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS*”. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e, logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar aprovada a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de julho de 2020.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

DocuSigned by:  
 Ana Hostt  
 15A17FB3EDF5432...

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA DE UMA BEBIDA PROBIÓTICA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS”**

ALESSANDRA FIGUEIRÔA LÉO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 29 de julho de 2020, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes membros:



PROF. DR. VASCO ARISTON DE CARVALHO AZEVEDO - ICB/UFMG

DocuSigned by:  
Ana Hostt  
15A17FB3EDF5432...

PROFA. DRA. ANA CRISTINA GOMES SANTOS - UMA



PROFA. DRA. MARIANA MARTINS DRUMOND - CEFET



PROF. DR. ALFONSO GALA GARCÍA- ICB/UFMG



PROF. DR. RODRIGO DIAS DE OLIVEIRA CARVALHO- MSU

Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Belo Horizonte, 29 de julho de 2020.



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Mestrado Profissional Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual

---

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o **PROF. VASCO ARISTON DE CARVALHO AZEVEDO** participou e presidiu a Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado de **ALESSANDRA FIGUEIRÔA LÉO**, intitulada “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA DE UMA BEBIDA PROBIÓTICA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**”, do Curso de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB.

Belo Horizonte, 29 de julho de 2020.

**Prof.<sup>a</sup> Dra. María Esperanza Cortés Segura**  
Coordenadora do Curso de Mestrado Profissional em  
Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual  
Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG

**BANCA EXAMINADORA:**

PROF. DR. VASCO ARISTON DE CARVALHO AZEVEDO, ICB/UFMG – ORIENTADOR  
PROF. DR. ALFONSO GALA GARCÍA, ICB/UFMG – COORIENTADOR  
PROFA. DRA. ANA CRISTINA GOMES SANTOS, UNA  
PROFA. DRA. MARIANA MARTINS DRUMOND, CEFET  
PROF. DR. RODRIGO DIAS DE OLIVEIRA CARVALHO, MSU  
PROF. DR. THIAGO VERANO BRAGA, ICB/UFMG - SUPLENTE



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Mestrado Profissional Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual

---

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o **PROF. DR. ALFONSO GALA GARCÍA** participou da Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado de **ALESSANDRA FIGUEIRÔA LÉO**, intitulada “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA DE UMA BEBIDA PROBIÓTICA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**”, do Curso de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB.

Belo Horizonte, 29 de julho de 2020.

**Prof.<sup>a</sup> Dra. María Esperanza Cortés Segura**  
Coordenadora do Curso de Mestrado Profissional em  
Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual  
Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG

**BANCA EXAMINADORA:**

PROF. DR. VASCO ARISTON DE CARVALHO AZEVEDO, ICB/UFMG – ORIENTADOR  
PROF. DR. ALFONSO GALA GARCÍA, ICB/UFMG – COORIENTADOR  
PROFA. DRA. ANA CRISTINA GOMES SANTOS, UNA  
PROFA. DRA. MARIANA MARTINS DRUMOND, CEFET  
PROF. DR. RODRIGO DIAS DE OLIVEIRA CARVALHO, MSU  
PROF. DR. THIAGO VERANO BRAGA, ICB/UFMG - SUPLENTE



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Mestrado Profissional Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual

---

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a **PROFA. DRA. ANA CRISTINA GOMES SANTOS** participou da Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado de **ALESSANDRA FIGUEIRÔA LÉO**, intitulada “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA DE UMA BEBIDA PROBIÓTICA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**”, do Curso de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB.

Belo Horizonte, 29 de julho de 2020.

**Prof.<sup>a</sup> Dra. María Esperanza Cortés Segura**  
Coordenadora do Curso de Mestrado Profissional em  
Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual  
Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG

**BANCA EXAMINADORA:**

PROF. DR. VASCO ARISTON DE CARVALHO AZEVEDO, ICB/UFMG – ORIENTADOR  
PROF. DR. ALFONSO GALA GARCÍA, ICB/UFMG – COORIENTADOR  
PROFA. DRA. ANA CRISTINA GOMES SANTOS, UNA  
PROFA. DRA. MARIANA MARTINS DRUMOND, CEFET  
PROF. DR. RODRIGO DIAS DE OLIVEIRA CARVALHO, MSU  
PROF. DR. THIAGO VERANO BRAGA, ICB/UFMG - SUPLENTE

---



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Mestrado Profissional Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual

---

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a **PROFA. DRA. MARIANA MARTINS DRUMOND** participou da Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado de **ALESSANDRA FIGUEIRÔA LÉO**, intitulada “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA DE UMA BEBIDA PROBIÓTICA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**”, do Curso de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB.

Belo Horizonte, 29 de julho de 2020.

**Prof.<sup>a</sup> Dra. María Esperanza Cortés Segura**  
Coordenadora do Curso de Mestrado Profissional em  
Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual  
Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG

**BANCA EXAMINADORA:**

PROF. DR. VASCO ARISTON DE CARVALHO AZEVEDO, ICB/UFMG – ORIENTADOR  
PROF. DR. ALFONSO GALA GARCÍA, ICB/UFMG – COORIENTADOR  
PROFA. DRA. ANA CRISTINA GOMES SANTOS, UNA  
PROFA. DRA. MARIANA MARTINS DRUMOND, CEFET  
PROF. DR. RODRIGO DIAS DE OLIVEIRA CARVALHO, MSU  
PROF. DR. THIAGO VERANO BRAGA, ICB/UFMG - SUPLENTE



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia e Biofísica  
Mestrado Profissional Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual

---

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o **PROF. DR. RODRIGO DIAS OLIVEIRA CARVALHO** participou da Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado de **ALESSANDRA FIGUEIRÔA LÉO**, intitulada “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA DE UMA BEBIDA PROBIÓTICA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**”, do Curso de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB.

Belo Horizonte, 29 de julho de 2020.

**Prof.<sup>a</sup> Dra. María Esperanza Cortés Segura**  
Coordenadora do Curso de Mestrado Profissional em  
Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual  
Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG

### **BANCA EXAMINADORA:**

PROF. DR. VASCO ARISTON DE CARVALHO AZEVEDO, ICB/UFMG – ORIENTADOR  
PROF. DR. ALFONSO GALA GARCÍA, ICB/UFMG – COORIENTADOR  
PROFA. DRA. ANA CRISTINA GOMES SANTOS, UNA  
PROFA. DRA. MARIANA MARTINS DRUMOND, CEFET  
PROF. DR. RODRIGO DIAS DE OLIVEIRA CARVALHO, MSU  
PROF. DR. THIAGO VERANO BRAGA, ICB/UFMG - SUPLENTE

---

---

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente sou imensamente grata a Deus, por iluminar meus caminhos, pelo dom da minha vida, por ser minha fortaleza em todos os momentos.

Aos meus pais, Antonio (*in memoriam*) e Elizabete por sempre me apoiarem, ser minha força, alicerce, exemplo de vida e de amor. Este trabalho é dedicado à pessoa que sempre esteve ao meu lado, presente em minha vida, me apoiando e incentivando na busca de novas realizações, minha mãe querida, pessoa que mais amo nesse mundo.

Aos meus irmãos Ricardo e Danielle pelo carinho e afeto. Aos sobrinhos Gabriela e Igor por encherem minha vida de alegria.

Ao meu esposo Wilce pelo seu amor e companheirismo, pela paciência nos momentos de muita ansiedade. Obrigada por me ajudar em tudo e por ser um grande exemplo.

À minha grande amiga Bruna, agradeço pela amizade, pelo carinho, pelo companheirismo, pelo amor, pelos ensinamentos, pelas ajudas, por ser meu amparo, apoio, por tudo e mais um tanto. Você é e sempre será muito especial, sou eternamente grata.

Ao Prof. Dr. Vasco Azevedo, por me dar a oportunidade de aprender e crescer mais. Obrigada pelos ensinamentos.

Ao Dr. Fillipe Luiz Rosa do Carmo e ao Dr. Alfonso Gala-Garcia pela aprendizagem, por me ensinar a caminhar sozinha, mas sem me deixar totalmente só.

Ao grupo Probióticos, mestrandos e ICs, pela dedicação, apoio e ajuda. Em especial as ICs mais sensacionais, Bel e Sara Giovana, pelo apoio incondicional, por terem sido uma fortaleza para mim.

A todos os colegas e amigos do LGCM, as secretárias, pelos excelentes momentos juntos. Em especial para Anne e Francielly pela amizade e carinho.

A todos os colaboradores deste trabalho pelas contribuições despendidas a ele.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>31</b>
1.1. O CORAÇÃO E A CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA .....	31
1.2. HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	32
1.3. FISIOPATOLOGIA DA HIPERTENSÃO.....	34
1.3.1. ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS E BIOQUÍMICAS .....	34
1.3.2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA .....	34
1.3.3. PAPEL DA MICROBIOTA NA HIPERTENSÃO.....	36
1.4. EPIDEMIOLOGIA.....	36
1.5. CAUSAS, SINTOMAS E DIAGNÓSTICO.....	38
1.6. PREVENÇÃO E TRATAMENTO .....	41
1.7. PROBIÓTICOS.....	43
1.8. MECANISMO DE AÇÃO DOS PROBIÓTICOS.....	45
1.8.1. COMPETIÇÃO POR SÍTIOS DE LIGAÇÃO OU EXCLUSÃO COMPETITIVA .....	46
1.8.2. ESTÍMULO AO SISTEMA IMUNE.....	46
1.8.3. EFEITO NUTRICIONAL.....	47
1.8.4. PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIBACTERIANAS E ENZIMAS .....	48
1.9. SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS .....	49
1.10. MERCADO DE PRODUTOS PROBIÓTICOS.....	49
1.11. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> .....	50
1.12. PRODUTOS FERMENTADOS, TECNOLOGIA EMPREGADA NA PRODUÇÃO DE PROBIÓTICOS NA INDÚSTRIA.....	51
1.13. BEBIDAS FERMENTADAS SUPLEMENTADAS COM WHEY PROTEIN ...	52
1.14. BIOATIVOS.....	54
1.14.1. INIBIDORES DA ENZIMA DE CONVERSÃO DA ANGIOTENSINA ....	55
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>57</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>59</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	59
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	59
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>61</b>
4.1. LINHAGEM BACTERIANA.....	61
4.2. CULTIVO DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> CNRZ 327 EM MEIO LEITE DESNATADO SUPLEMENTADO COM WHEY PROTEIN.....	61
4.3. FORMULAÇÕES DAS AMOSTRAS PARA OS ENSAIOS IN VITRO E IN VIVO 62	
4.4. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E BIOATIVOS DAS FORMULAÇÕES PROBIÓTICAS .....	62
4.4.1. DOSAGEM DE LACTOSE.....	63
4.4.2. DOSAGEM DE SÓDIO E CÁLCIO.....	63
4.5. BIOATIVOS .....	64
4.5.1. ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE PROBIOATIVOS PRODUZIDOS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE (MÉTODO DPPH) .....	64
4.5.2. ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE PROBIOATIVOS INIBIDORES DA ECA-I (ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA).....	64

4.6.	EXPERIMENTAÇÃO IN VIVO EM RATOS WISTAR E RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS .....	65
4.6.1.	ANIMAIS.....	65
4.6.2.	ACLIMATAÇÃO E ADAPTAÇÃO.....	65
4.7.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL (n=6).....	66
4.8.	MONITORAMENTO DO PESO DOS ANIMAIS, CONSUMO DE RAÇÃO E ÁGUA .....	67
4.9.	MEDIDA NÃO INVASIVA DE PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA .....	67
4.10.	ÍNDICES DE PESO CARDÍACO .....	68
4.11.	PERFIL LIPÍDICO E HEMOGRAMA .....	69
4.12.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	69
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>72</b>
5.1.	VIABILIDADE DA BACTÉRIA <i>Lactobacillus delbrueckii</i> CNRZ 327 EM LEITE DESNATADO E SUPLEMENTADO COM <i>WHEY PROTEIN</i> .....	72
5.2.	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E BIOATIVOS.....	72
5.3.	ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE PROBIOATIVOS PRODUZIDOS <i>L. delbrueckii</i> CNRZ 327 SUPLEMENTADA COM OU SEM <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO	73
5.4.	ANÁLISE DA VARIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL NO ENSAIO IN VIVO	75
5.5.	AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL .....	78
5.6.	PERFIL LIPÍDICO .....	80
5.7.	ÍNDICE DE PESO CARDÍACO.....	82
5.8.	HEMOGRAMA .....	83
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>95</b>
<b>9.</b>	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....</b>	<b>97</b>
<b>10.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>99</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> ORGANIZAÇÃO GERAL DO SISTEMA CIRCULATÓRIO. ....	32
<b>FIGURA 2:</b> ORGANIZAÇÃO GERAL DO SISTEMA RENINA-ANGITENSINA-ALDOSTERONA.. ....	35
<b>FIGURA 3:</b> MÉTODO PARA VERIFICAÇÃO DA MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E DIASTÓLICA.....	40
<b>FIGURA 4:</b> ALGUMAS MEDIDAS DE PREVENÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	42
<b>FIGURA 5:</b> MECANISMOS DE AÇÃO DOS PROBIÓTICOS.....	48
<b>FIGURA 6:</b> DESENHO EXPERIMENTAL DA UTILIZAÇÃO DE <i>LACTOBACILLUS DELBRUECKII</i> CNRZ 327 SUPLEMENTADO COM <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO NA AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL. ....	67
<b>FIGURA 7:</b> AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DA BEBIDA PROBIÓTICA FERMENTADA POR <i>L. delbrueckii</i> CNRZ 327 SUPLEMENTADA COM E SEM <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO.....	72
<b>FIGURA 8:</b> AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH E ATIVIDADES INIBITÓRIAS DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA DA BEBIDA PROBIÓTICA FERMENTADA POR <i>L. delbrueckii</i> CNRZ 327 SUPLEMENTADA COM <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO.. ....	74
<b>FIGURA 9:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DE BEBIDA PROBIÓTICA FERMENTADA POR <i>L. delbrueckii</i> CNRZ 327 SUPLEMENTADA COM <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO EM RATOS WISTAR.....	75
<b>FIGURA 10:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DE BEBIDA PROBIÓTICA FERMENTADA POR <i>L. delbrueckii</i> CNRZ 327 SUPLEMENTADA COM <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS....	76
<b>FIGURA 11:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DE BEBIDA PROBIÓTICA FERMENTADA POR <i>L. delbrueckii</i> CNRZ 327 SUPLEMENTADA COM <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS....	77

<b>FIGURA 12:</b> ADMINISTRAÇÃO DE BEBIDA PROBIÓTICA DIMINUI SIGNIFICANTE A MEDIDA PAS NO 14 ° DIA EXPERIMENTAL..	78
<b>FIGURA 13:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DE BEBIDA PROBIÓTICA FERMENTADA POR <i>L. delbrueckii</i> CNRZ 327 SUPLEMENTADA COM <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO EM RATOS WISTAR.....	78
<b>FIGURA 14:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DE BEBIDA PROBIÓTICA FERMENTADA POR <i>L. delbrueckii</i> CNRZ 327 SUPLEMENTADA COM <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS....	79
<b>FIGURA 15:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DE BEBIDA PROBIÓTICA FERMENTADA POR <i>L. delbrueckii</i> CNRZ 327 SUPLEMENTADA COM <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO EM RATOS WISTAR E RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS.....	80
<b>FIGURA 16:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DE BEBIDA PROBIÓTICA FERMENTADA POR <i>L. delbrueckii</i> CNRZ 327 SUPLEMENTADA COM <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO EM RATOS WISTAR E RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS.....	81
<b>FIGURA 17:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DE BEBIDA PROBIÓTICA FERMENTADA POR <i>L. delbrueckii</i> CNRZ 327 SUPLEMENTADA COM <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO EM RATOS WISTAR E RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS.....	82
<b>FIGURA 18:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DE BEBIDA PROBIÓTICA FERMENTADA POR <i>L. delbrueckii</i> CNRZ 327 SUPLEMENTADA COM <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO EM RATOS WISTAR E RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS NOS VENTRÍCULOS DIREITO E ESQUERDO.....	83

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> CLASSIFICAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL.....	33
<b>TABELA 2:</b> MORTALIDADE POR HIPERTENSÃO POR SEXO E ANO.. .....	38
<b>TABELA 3:</b> COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO, SABOR NATURAL. ....	62
<b>TABELA 4:</b> COMPOSIÇÃO DO LEITE FERMENTADO POR <i>L. delbrueckii</i> CNRZ 327 SUPLEMENTADO COM <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO. ....	73
<b>TABELA 5:</b> EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DE BEBIDA PROBIÓTICA FERMENTADA POR <i>L. delbrueckii</i> CNRZ 327 SUPLEMENTADA COM <i>WHEY PROTEIN</i> ISOLADO (30% CONCENTRAÇÃO) EM RATOS WISTAR E RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS NO SISTEMA IMUNOLÓGICO, NÚMERO DE LEUCÓCITOS TOTAL E DIFERENCIAL. ..	84

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**AHA:** *American Heart Association*

**ANOVA:** Análise de Variância

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ASCVD:** do inglês, *Atherosclerotic Cardiovascular Disease* (Doença Cardiovascular Aterosclerótica)

**BAL(s):** Bactéria(s) Ácido-Lática(s)

**°C:** Temperatura em Graus Celsius

**CEBIO:** Centro de Bioterismo

**CETEA:** Comitê de Ética em Experimentação Animal

**CHCM:** Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

**DC:** Débito cardíaco

**DCV:** Doenças cardiovasculares

**DPPH:** Método de Determinação da Atividade Antioxidante

**DSS:** do inglês, Dextran Sulfate Sodium

**ECA:** Enzima Conversora de Angiotensina

**FDA:** do inglês, *Food and Drug Administration*

**FOS:** Fibra Frutooligossacarídeos

**g:** Grama

**GABA:** Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GRAS:** do inglês, *Generally Recognized as Safe*

**h:** Horas

**HA:** Hipertensão Arterial

**HAS:** Hipertensão Arterial Sistêmica

**HCl:** Ácido Clorídrico

**HCM:** Hemoglobina Corpuscular Média

**HDL:** do inglês, *High Density Lipoprotein*, Lipoproteína de Alta Densidade

**HPLC:** do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*

**ICB:** Instituto de Ciências Biológicas

**IECA(s):** Inibidor(es) da Enzima Conversora de Angiotensina I

**IgA:** Imunoglobulina A

**INPI:** Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**INRA:** do inglês, *Institut National de la Recherche Agronomique*

**Kg:** Kilograma

*L.:* *Lactobacillus*

**L. CNRZ 327:** *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ327

**LD:** Leite em Pó Desnatado

**LDL:** do inglês, *Low Density Lipoprotein*, Lipoproteína de Baixa Densidade

**MAPA:** Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial

**mg:** Micrograma

**min:** Minuto

**ml:** Mililitros

**mmHg:** Milímetro de Mercúrio

**MRPA:** Monitorização Residencial da Pressão Arterial

**MRS:** de MAN, ROGOSA e SHARPE Meio de Cultura para Lactobacilos

**MS:** Ministério da Saúde

**NAFTA:** do inglês, *North American Free Trade Agreement*, Área de Livre Comércio da América do Norte

**NK:** do inglês, *Natural killer*

**nm:** Nanômetro

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**PA:** Pressão Arterial

**PAS:** Pressão Arterial Sistólica

**PAD:** Pressão Arterial Diastólica

**PBS:** Tampão Fosfato-Salino

**pH:** Potencial Hidrogeniônico

**p/v:** Peso/Volume

**RNA:** do inglês, *Ácido Ribonucleico*

**Rpm:** Rotação por Minuto

**RVP:** Resistência Vascular Periférica

**SIM:** Sistema de Informações sobre Mortalidade

**SHR:** do inglês, *Spontaneously hypertensive rat* (Ratos Espontaneamente Hipertensos)

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**SRAA:** Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

**TGI:** Trato Gastrointestinal

**ton:** Tonelada

**UFC:** Unidade Formadora De Colônias

**UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais

**VCM:** Volume Corpuscular Médio

**VIGITEL:** Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

**VLDL:** Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

**v/v:** Volume/Volume

**WPC:** *Whey Protein* Concentrado

**WPI:** *Whey Protein* Isolado

**%:** Porcentagem

**μL:** Microlitro

**μmol L<sup>-1</sup>:** Micromol por Litro

## RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é tida como um importante problema de saúde pública em âmbito mundial devido à sua alta prevalência e baixas taxas de controle, colaborando significativamente nas causas de morbidade e mortalidade cardiovascular. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de um milhão de pessoas são hipertensas, em todo o mundo. Mudanças no estilo de vida, adesão à medicação, assim como alimentação adequada podem auxiliar no melhor controle da hipertensão. O consumo de bactérias probióticas ou alimentos funcionais que as contém, tem sido associado à melhora da saúde gastrointestinal, e sugerem através de evidências recentes um papel importante em várias doenças, como por exemplo, a hipertensão. Algumas linhagens bacterianas são capazes de produzir peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA). A ECA exerce um papel fisiológico fundamental no controle da pressão arterial através da via da renina-angiotensina-aldosterona. A linhagem *Lactobacillus (L.) delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ327 tem apresentado resultados promissores em modelos experimentais de colite induzidas por agentes químicos, que promovem concomitantemente atividade inibitória da ECA. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito anti-hipertensivo de uma bebida probiótica fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ327 e suplementada com *Whey Protein Isolado (WPI)* em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (do inglês, *spontaneously hypertensive rats*). Inicialmente, um experimento *in vitro* foi dirigido para avaliar a viabilidade desta linhagem, cultivada em leite suplementado com *WPI* 30%. De maneira complementar, o potencial probiótico foi explorado através da dosagem de compostos bioativos no cultivo bacteriano suplementado com *WPI*. Adicionalmente, a composição centesimal da bebida fermentada foi investigada. Em seguida foi avaliado, no ensaio *in vivo*, o efeito da bebida probiótica na pressão arterial dos ratos SHR e Wistar. Os parâmetros analisados ainda, no ensaio *in vivo*, contemplaram peso corporal, perfil lipídico, peso ventricular, padrão hematológico e leucocitário. Os resultados *in vitro* demonstraram que a linhagem de lactobacilos apresentou valores de  $10^9$  UFC, atendendo assim as exigências estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Além disso, a bebida probiótica apresentou peptídeos inibidores da ECA, além de atividade antioxidante. Os resultados *in vivo* demonstraram redução significativa ( $p < 0,05$ ) da pressão arterial sistólica dos ratos SHR. Acredita-se que a

presença de peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina tenha gerado esse efeito, o que torna a bebida fermentada por *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 327 e suplementada com *WPI* promissora na prevenção e/ou tratamento da hipertensão arterial.

**Palavras-chave:** hipertensão, probióticos, *Lactobacillus delbrueckii*, enzima conversora de angiotensina, bioativos, sistema renina-angiotensina, inibidores da enzima conversora da angiotensina.

## Abstract

Systemic arterial hypertension (SAH) is considered an important public health problem worldwide due to its high prevalence and low control rates, contributing significantly to the causes of cardiovascular morbidity and mortality. According to the World Health Organization (WHO), more than one million people are hypertensive, worldwide. Changes in lifestyle, adherence to medication, as well as adequate nutrition can help in better control of hypertension. The consumption of probiotic bacteria or functional foods that contain them, has been associated with improved gastrointestinal health, and suggests through recent evidence an important role in various diseases, such as hypertension. Some bacterial strains are capable of producing peptides that inhibit angiotensin-converting enzyme (ACE). ACE plays a fundamental physiological role in controlling blood pressure via the renin-angiotensin-aldosterone pathway. The *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ327 has shown promising results in experimental models of colitis induced by chemical agents, which concurrently promote ACE inhibitory activity. Therefore, this study aimed to evaluate the antihypertensive effect of a probiotic drink fermented by *L. delbrueckii* CNRZ327 and supplemented with Isolated Whey Protein (WPI) in spontaneously hypertensive rats (SHR) (from English, spontaneously hypertensive rats). Initially, an *in vitro* experiment was conducted to evaluate the viability of this strain, grown in milk supplemented with WPI 30%. In a complementary way, the probiotic potential was explored through the dosage of bioactive compounds in bacterial culture supplemented with WPI. Additionally, the proximate composition of the fermented drink was investigated. Then, in the *in vivo* trial, the effect of the probiotic drink on the blood pressure of the SHR and Wistar rats was evaluated. The parameters analyzed also, in the *in vivo* test, include body weight, lipid profile, ventricular weight, hematological and leukocyte pattern. The *in vitro* results showed that the *lactobacillus* strain showed values of  $10^9$  CFU, thus meeting the requirements established by the National Health Surveillance Agency (ANVISA). In addition, the probiotic drink showed ACE-inhibiting peptides, in addition to antioxidant activity. The *in vivo* results demonstrated a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in the systolic blood pressure of SHR rats. It is believed that the presence of peptides inhibiting the angiotensin-converting enzyme has generated this effect, which makes the

drink fermented by *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 327 and supplemented with WPI promising in the prevention and / or treatment of arterial hypertension.

Keywords: hypertension, probiotics, *Lactobacillus delbrueckii*, angiotensin-converting enzyme, bioactive, renin-angiotensin system, angiotensin-converting enzyme inhibitors.





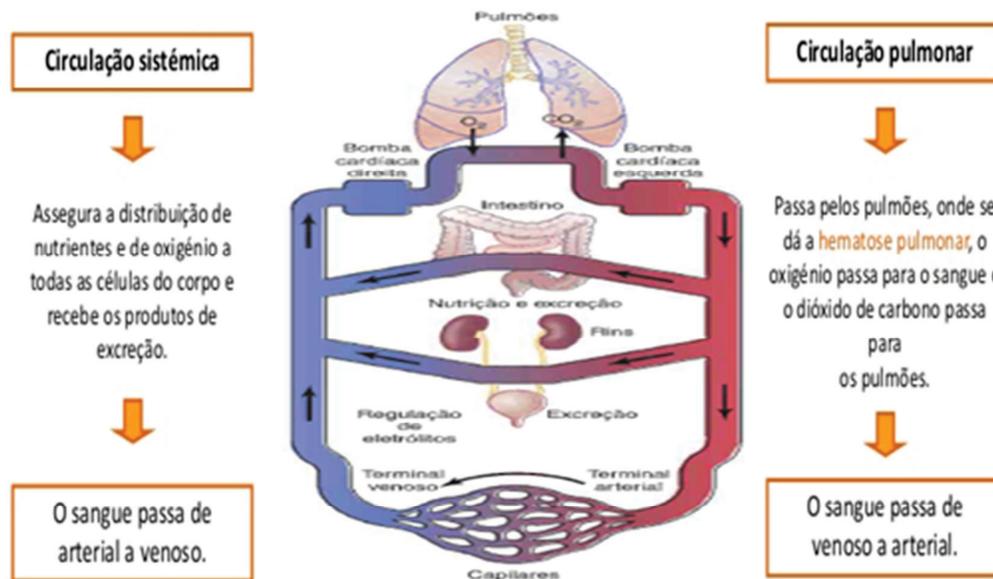
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O CORAÇÃO E A CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA

O coração é um órgão relativamente pequeno, que possui quatro câmaras musculares, sendo dois átrios e dois ventrículos, que juntas impulsionam o sangue através de uma rede de vasos sanguíneos (circulação) (MARTINI *et al.*, 2009). Para cada câmara cardíaca o ciclo cardíaco compreende o período de relaxamento do músculo cardíaco, denominado diástole, o qual o coração se enche de sangue, seguido do período de contração, denominado sístole (GUYTON; HALL, 2011).

A circulação sanguínea é descrita como o movimento que o sangue realiza no corpo, subdividindo-se em sistêmica ou pulmonar (Figura 1). A sistêmica é também conhecida como grande circulação ou circulação periférica, a qual promove o fluxo sanguíneo para todos os tecidos do corpo, exceto para o pulmão. A pulmonar, também denominada de pequena circulação, bombeia o sangue para os pulmões, promovendo a homeostase pulmonar, retornando ao coração rico em oxigênio. A função da circulação sanguínea é suprir as necessidades dos tecidos do corpo, levar nutrientes, eliminar produtos do metabolismo e transportar hormônios (MARTINI *et al.*, 2009; GUYTON; HALL, 2011).

A função do coração é bombear o sangue para o corpo, exercendo uma força contra a parede das artérias (MARTINI *et al.*, 2009). O coração e os vasos sanguíneos produzem o débito cardíaco (DC) e a pressão arterial (PA) necessários para gerar o fluxo sanguíneo tecidual requerido (GUYTON; HALL, 2011). Quando há aumento dessa força, as artérias oferecem resistência na passagem do sangue, o que causa uma sobrecarga cardíaca, exercendo um esforço maior que o normal ao órgão para permitir que o sangue consiga circular corretamente no corpo, causando a elevação da pressão arterial (OLIVEIRA, A. P., 2019).



**Figura 1:** Organização geral do sistema circulatório. Adaptado do livro Tratado de Fisiologia Médica, Guyton (2011).

## 1.2. HIPERTENSÃO ARTERIAL

A definição de normotenso é o indivíduo cujos valores da pressão arterial encontram-se entre: pressão arterial sistólica (PAS)  $\leq$  120 milímetro de mercúrio (mmHg) e pressão arterial diastólica (PAD)  $\leq$  80 mmHg. O aumento da pressão sanguínea pode ser apontada como um dos fatores de risco para outras doenças como acidente vascular cerebral, aneurisma arterial, infarto, insuficiência renal e doenças cardiovasculares (DCV), como por exemplo, a hipertensão (GUYTON; HALL, 2011; RADOVANOVIC *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016, RAI *et al.* 2017).

Hipertensão arterial (HA) é comumente conhecida como pressão alta. É uma doença crônica, evidenciada como não transmissível, de causas multifatoriais relacionada a alterações funcionais, estruturais e metabólicas, caracterizada pelos níveis elevados da pressão sanguínea nas artérias. (LIN *et al.* 2012; SILVA *et al.*, 2016; RAI *et al.* 2017). Estudos mostram que essa patologia é considerada "democrática", pois acomete todos os sexos, etnia, padrão social, faixa etária. Essa patologia acomete os vasos, coração, rins e cérebro (GUYTON; HALL, 2011; REBOUSSIN DAVID M. *et al.*, 2018) e suas consequências podem ser evitadas, desde que os hipertensos

reconheçam os sinais da doença e realizem os tratamentos necessários e adequados para o controle da pressão (NOBRE *et al.*, 2013; REBOUSSIN DAVID M. *et al.*, 2018).

No congresso que ocorreu em 2017, da *American Heart Association (AHA)*, o ponto alvo foi a nova diretriz, que mudou a definição de HA passando a ser considerado hipertensão arterial sistêmica, PAS  $\geq$  130 mmHg e/ou PAD  $\geq$  80 mmHg, anteriormente considerada igual ou superior a 140/80 mmHg (WHELTON *et al.*, 2017; “2017 Hypertension Clinical Guidelines”, 2017; REBOUSSIN DAVID M. *et al.*, 2018). A diretriz atualizada também recomenda a classificação dos demais tipos de hipertensão, conforme apresentado na Tabela 1 (NETO, 2000; WHELTON *et al.*, 2017; CALZERRA; GOMES; QUEIROZ, 2018).

**Tabela 1:** Classificação da pressão Arterial. Adaptado de WHELTON *et al.* (2017)

<b>Tipos de Hipertensão</b>	<b>Pressão arterial sistólica (PAS)</b>		<b>Pressão arterial diastólica (PAD)</b>
Normal	$\leq$ 120 mmHg	e	$\leq$ 80 mmHg
Elevada	120-129 mmHg	e	< 80 mmHg
Hipertensão Estágio 1	130-139 mmHg	ou	80-89 mmHg
Hipertensão Estágio 2	$\geq$ 140 mmHg	ou	$\geq$ 90 mmHg
Urgência Hipertensiva	>180 mmHg	e/ou	> 120 mmHg
Emergência Hipertensiva	PAS >180 mmHg + dano ao órgão alvo	e/ou	> 120 mmHg + dano ao órgão alvo

No Brasil, também foram discutidas importantes alterações na conduta diagnóstica e terapêutica para a HA, publicada na “V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial”. O foco foi oferecer conhecimento aos profissionais da saúde do país, sobre as mudanças mais relevantes na prevenção, no diagnóstico, no tratamento e no controle da hipertensão arterial. Foi no diagnóstico que ocorreu a mudança mais significativa, onde foi acrescentada a monitorização ambulatorial da pressão arterial (MAPA) e a monitorização residencial da pressão arterial (MRPA), levando em consideração o progresso verificado nas medições de pressão arterial fora do consultório médico (“V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial”, 2007; MVB *et al.*, 2016).

### **1.3. FISIOPATOLOGIA DA HIPERTENSÃO**

#### **1.3.1. ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS E BIOQUÍMICAS**

Uma das funções fisiológicas mais complexas do organismo é a regulação da PA (SANJULIANI, 2002), que é definida pelo produto do DC e da resistência vascular periférica (RVP). A RVP é descrita como a pressão exercida pelas paredes dos vasos contra o fluxo sanguíneo. A característica principal dos pacientes com HA é a combinação do aumento do DC e da RVP (SANJULIANI, 2002; CAVALCANTE, 2018).

Uma alteração causada pela hipertensão arterial são as alterações no perfil lipídico. Essas alterações podem elevar o débito cardíaco, a resistência vascular periférica, levando ao aumento da pressão arterial, podendo ser a causa de doenças cardiovasculares, aterosclerose, trombose, entre outras (LYE *et al.*, 2009).

Os vários parâmetros fisiológicos de animais de laboratório podem variar entre linhagens e cepas diferentes de uma dada espécie, assim como por fatores intrínsecos e extrínsecos. Para isso, é inevitável que cada Centro de Pesquisa sistematize os valores de referência para animais com base na espécie, na dieta, na linhagem, no gênero e na idade, bem como a metodologia a se utilizada na análise dos parâmetros (LIMA, C. M. *et al.*, 2014).

#### **1.3.2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA**

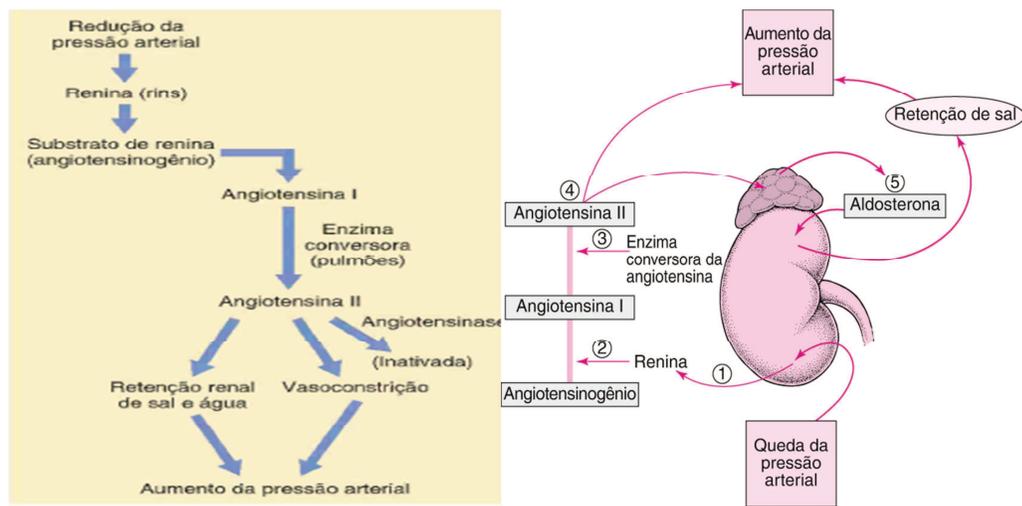
O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) exerce funções essenciais no organismo, como a manutenção da pressão arterial, além do controle do balanço hídrico e de sódio. A lógica imprescindível que preside o funcionamento do sistema é responder a uma instabilidade hemodinâmica e evitar a diminuição na perfusão tecidual sistêmica. Atua de modo a reverter a tendência à hipotensão arterial através da indução de vasoconstrição arteriolar periférica e a elevação da volemia por meio de retenção renal

de sódio, através da aldosterona, e água, através da liberação de hormônio anti diurético ou vasopressina (SILVERTHORN D., 2010; GUYTON; HALL, 2011).

O sistema renina-angiotensina é considerado o maior sistema regulador da PA, do equilíbrio renal, neuronal, além das funções endócrinas relacionadas com o controle cardiovascular (LIMA; HATAGIMA; SILVA, 2007; MEDEIROS, 2010). A renina é uma enzima produzida pelos rins, cuja função é controlar a secreção de aldosterona (SANJULIANI, 2002; ANDRÉ RODRIGUES DURÃES, 2019).

A pressão quando está abaixo dos níveis normais, os rins liberam renina no sangue, que age convertendo angiotensinogênio, produzido pelo fígado, em angiotensina I (decapeptídeo). A angiotensina I circula pelos vasos pulmonares, e através da ECA é convertida em angiotensina II (octapeptídeo com potente ação vasoconstritora) (Figura 2) (LIMA; HATAGIMA; SILVA, 2007; MEDEIROS, 2010; GONSALEZ *et al.*, 2018).

A angiotensina II atua em diversas regiões do organismo, promovendo lesão vascular devido a indução de vasoconstrição, proliferação e hipertrofia de células musculares lisas e inflamação vascular, bem como a degradação da matriz extracelular. A secreção de angiotensina II não é gerada apenas através do mecanismo endócrino, outras vias de produção de angiotensina II têm sido relatadas e diversos estudos demonstram a produção local do sistema renina-angiotensina no coração, parede dos vasos, cérebro, ovários, glândulas salivares, útero e fígado (SANJULIANI, 2002).



**Figura 2:** Organização geral do sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. Livro Tratado de Fisiologia Médica, Guyton (2011).

### 1.3.3. PAPEL DA MICROBIOTA NA HIPERTENSÃO

Segundo Silveira-Nunes *et al.*, (2020) supõe-se fortemente que a microbiota intestinal esteja envolvida na hipertensão arterial, mas seu papel ainda é pouco conhecido. Evidências emergentes revelam um papel da microbiota intestinal em diversos distúrbios no nível entérico, tanto quanto no nível sistêmico, incluindo doenças cardiovasculares. Diversos estudos em modelos de ratos hipertensos demonstram direta ou indiretamente a significância da microbiota intestinal na regulação da pressão arterial (GÓMEZ-GUZMÁN *et al.*, 2015; DURGAN DAVID J. *et al.*, 2016). Recentemente, um estudo identificou uma disbiose da microbiota intestinal em indivíduos hipertensos, caracterizada por biodiversidade reduzida e assinaturas bacterianas distintas, quando comparada com a contraparte normotensa (SILVEIRA-NUNES *et al.*, 2020).

## 1.4. EPIDEMIOLOGIA

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) representa um importante problema de saúde pública em âmbito mundial devido à sua alta prevalência e baixas taxas de controle, colaborando significativamente nas causas de morbidade e mortalidade cardiovascular. Essa patologia apresenta custos médicos e socioeconômicos elevados, decorrentes principalmente das suas complicações (GUYTON; HALL, 2011; REBOUSSIN DAVID M. *et al.*, 2018).

São considerados portadores de hipertensão primária, ou seja, aquelas as quais não se consegue estabelecer as exatas causas, em torno de 90 a 95% dos pacientes hipertensos (ALMEIDA, 2017).

A pressão alta, no Brasil, atinge cerca de 50% de idosos, 30% da população adulta e 5% de crianças e adolescentes (SILVEIRA-NUNES *et al.*, 2020), sendo ela responsável por 40% dos infartos, 80% dos derrames e 25% dos casos de insuficiência renal terminal (NOBRE *et al.*, 2013; REBOUSSIN DAVID M. *et al.*, 2018). A HA também é a causa de 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% daquelas por

doença coronariana (“V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial”, 2007; NOBRE *et al.*, 2013; MVB *et al.*, 2016).

Segundo pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde (MS), através do Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), a prevalência de hipertensão autorreferida passou de 22,6% em 2006 para 24,5% em 2019 (VIGITEL BRASIL, 2020; MVB *et al.*, 2016). A pressão arterial é propensa a aumentar com a idade, e nesse mesmo ano, chegou a 59,3% entre os adultos com 65 anos ou mais: 55,5% dos homens e 61,6% das mulheres (CESARINO *et al.*, 2008; KONTIS V. *et al.*, 2019; VIGITEL BRASIL, 2020).

Em indivíduos adultos, estudos brasileiros relataram que 50,8% tinham conhecimento de sua doença, 40,5% encontravam-se em tratamento e apenas 10,4% tinham controlada sua pressão arterial (< 140/90 mmHg). Pessoas com idade avançada, obesidade e baixo nível educacional identificavam as menores taxas de controle da hipertensão arterial (“V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial”, 2007; MVB *et al.*, 2016; PEREIRA, 2017).

As mulheres possuem a maior prevalência de diagnóstico médico de HA quando comparado aos homens, tendo registrado 27,3% contra 21,2% para eles (VIGITEL BRASIL, 2020). No Brasil, em 2019, as capitais com mais alta prevalência de HA entre as mulheres foram Rio de Janeiro com 34,7% e Recife com 30%, e entre os homens, foram Maceió com 26,3% e Natal com 26,2% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Segundo informações do Ministério da Saúde, o Rio de Janeiro permaneceu pelo segundo ano consecutivo como a capital brasileira com o mais elevado percentual de indivíduos hipertensos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Dados do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), do Ministério da Saúde, trouxeram uma realidade preocupante, em 2017, o Brasil registrou 141.878 mortes devido à hipertensão, o que mostrou que todos os dias aproximadamente 388 pessoas são vítimas fatais da doença, significando pouco mais de 16 óbitos por hora. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de um milhão de pessoas são hipertensas, em todo o mundo. Acredita-se que até 2030, em torno de 23,6 milhões de pessoas poderão morrer de doenças cardiovasculares (WHO, 2011; OMS, 2016). A Tabela 2 apresenta o número total de óbitos por ano, diferenciando o sexo, nos anos de 2006 a 2016.

**Tabela 2:** Mortalidade por hipertensão por sexo e ano. Adaptado do Ministério da Saúde (2019).

<b>Ano do Óbito</b>	<b>Sexo Masculino</b>	<b>Sexo Feminino</b>	<b>Total de indivíduos por ano</b>
<b>2006</b>	17164	19543	36710
<b>2007</b>	18468	20859	39330
<b>2008</b>	20303	22724	43030
<b>2009</b>	21082	23180	44266
<b>2010</b>	21190	23862	45056
<b>2011</b>	21699	24967	46668
<b>2012</b>	21212	24085	45300
<b>2013</b>	22031	24796	46832
<b>2014</b>	21382	24386	45776
<b>2015</b>	21893	25387	47288
<b>2016</b>	23529	26106	49640
<b>Total</b>	<b>22.9953</b>	<b>25.9895</b>	<b>4.898.96</b>

A taxa de mortalidade cardiovascular possui tendência lenta e constante de redução. Apesar da queda, a mortalidade no Brasil ainda é alta em comparação a outros países, tanto para doença cerebrovascular como para doenças do coração (“V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial”, 2007; MVB *et al.*, 2016).

## **1.5. CAUSAS, SINTOMAS E DIAGNÓSTICO**

Na maioria das vezes não é possível precisar as causas da HA, porém há diversos fatores responsáveis por ela. Essa patologia é comumente herdada dos pais em 90% dos casos, mas há diversos fatores que influenciam nos níveis da PA, como os hábitos de vida do indivíduo, idade, etnia (pessoas negras são mais propensas à doença),

peso, falta da prática de exercício físico, má alimentação, consumo excessivo de sal, álcool, tabagismo, estresse (SILVA *et al.*, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Na maioria da população, essa patologia não causa sintomas, apesar de muitas queixas serem coincidentes, de maneira equivocada consideram associados a essa patologia alguns sintomas como dores de cabeça, sangramento pelo nariz, tontura, rubor facial e cansaço (SILVA, M. G. C. DA; DOMINGOS; CARAMASCHI, 2018; SILVA, E. C. *et al.*, 2016). Em casos mais graves ou prolongados da doença, não sendo tratado, o paciente pode apresentar dores de cabeça, vômito, dispneia ou falta de ar, agitação e visão borrada decorrência de lesões que afetam o cérebro, os olhos, o coração e os rins (TUDOR; HART; SAVAGE, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018;).

O principal elemento para o estabelecimento do diagnóstico da HA é a medida da pressão arterial. As medições devem ocorrer em toda avaliação de saúde, por médicos de todas as especialidades e demais profissionais da área, devidamente treinados (“V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial”, 2007; MVB *et al.*, 2016). Durante a consulta de rotina o paciente deve informar ao médico se há algum parente que sofre dessa patologia, sobretudo se for o pai ou a mãe (ORTEGA *et. al.*, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

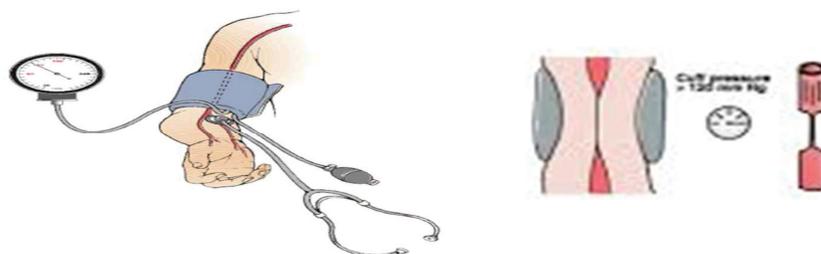
Medidas registradas com valores iguais ou superiores a 130/80 mmHg não são passíveis de diagnosticar a doença, com apenas uma leitura. Para assegurar o diagnóstico de hipertensão arterial, o paciente deve procurar um atendimento médico e realizar aferições periódicas da PA. Obtendo uma leitura inicial alta, a medida deve ser repetida por pelo menos mais duas vezes no mesmo dia, além de também ser realizada pelo menos nos dois dias seguintes. Assim, permanecendo os valores altos da pressão, fica assegurado o diagnóstico de hipertensão arterial. As leituras não apenas revelam a presença da HA, mas também auxiliam na classificação da gravidade da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

As aferições devem preferencialmente ser realizadas com o paciente na posição sentada, respeitando um período de repouso de 5 minutos, além de seguir orientações como evitar tomar café ou bebidas estimulantes, descansar bem no dia anterior e ficar relaxado. Na hora da aferição é imprescindível não se movimentar e conversas devem ser evitadas (Figura 3). Seguindo esses cuidados a confiabilidade dos resultados é assegurada, porém se mesmo assim surgir alguma dúvida, o especialista pode solicitar

outros exames (KOHLMANN JR. *et al.*, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; (MVB *et al.*, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

É recomendado também, dentro das possibilidades, a medição da PA fora do consultório para esclarecimento do diagnóstico, considerando a utilização da MAPA, que é o método que possibilita o registro indireto e intermitente da PA no período de 24 horas, enquanto o paciente executa suas atividades habituais diária e também durante o sono. A outra medição recomendada é a utilização da MRPA, que consiste no registro da pressão arterial, realizado pelo próprio paciente ou qualquer outra pessoa treinada, através do método indireto, realizando três aferições pela manhã e três à noite, durante cinco dias, no período da vigília, no domicílio ou no trabalho, com aparelhos (esfigmomanômetro) validados, a fim de identificar a hipertensão do avental branco e a hipertensão mascarada (“V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial”, 2007; ORTEGA *et al.*, 2008; MVB *et al.*, 2016).

Na prática clínica, nem sempre a aferição da PA é praticada de maneira adequada. Porém, os erros podem ser evitados seguindo a padronização da técnica da aferição da pressão arterial, o uso de equipamento calibrado, além do preparo adequado do paciente (“V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial”, 2007; ORTEGA *et al.*, 2008, MVB *et al.*, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).



**Figura 3:** Método para verificação da medida da pressão arterial sistólica e diastólica. Livro Tratado de Fisiologia Médica, Guyton (2011).

Como a hipertensão arterial não costuma apresentar sinais, segundo informações do MS é essencial aferir a pressão pelo menos uma vez por ano, para indivíduos maiores de 20 anos, e se houver casos de pessoas com pressão alta na família, as medições devem ser intensificadas, medindo no mínimo duas vezes por ano (“V

Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial”, 2007; ORTEGA *et al.*, 2008; MVB *et al.*, 2016).

## **1.6. PREVENÇÃO E TRATAMENTO**

É de suma importância que os profissionais de saúde identifiquem precocemente e abordem de forma adequada os fatores de risco para o desenvolvimento da HA, principalmente na população de alto risco, como por exemplo idosos, cardiopatas, entre outros (“V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial”, 2007; MVB *et al.*, 2016) realizando estratégias e ações gerais de promoção a saúde, de maneira que possa impedir ou retardar o desenvolvimento da doença. Por ser considerada uma doença crônica, o controle da HAS demanda acompanhamento e tratamento por toda a vida (MAGALHÃES *et al.*, 2010; RADOVANOVIC *et al.*, 2014).

Uma das medidas recomendadas pelo Ministério da Saúde para prevenção da HA é manter o peso adequado, se necessário, realizando mudanças nos hábitos alimentares. Indispensável adotar um estilo de vida saudável, não fazer uso excessivo do sal, adequando outros temperos para ressaltar o sabor dos alimentos, praticar atividade física regularmente, disfrutar de momentos de lazer, não fumar, evitar o consumo de álcool, evitar alimentos gordurosos, controlar a diabetes (Figura 4) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).



**Figura 4:** Algumas medidas de prevenção da hipertensão arterial. Site do Ministério da Saúde (2019).

O principal objetivo do tratamento da HA é reduzir a morbidade e a mortalidade cardiovasculares. A hipertensão arterial essencialmente não possui cura, mas existe tratamento o que evita possíveis complicações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Os tratamentos podem ser medicamentosos ou não medicamentosos (FERNANDES COSTA *et al.*, 2014). Para os tratamentos medicamentosos, os anti-hipertensivos podem não apenas diminuir a pressão arterial, como também os eventos cardiovasculares fatais e não fatais (SILVEIRA-NUNES *et al.*, 2020). Exceto os casos de pacientes com níveis pressóricos acima de 180/110 mmHg, os demais podem iniciar a redução da PA com cuidados não farmacológicos, através de alteração no estilo de vida, boa alimentação, atividade física regular, entre outras. Se necessário uso de medicações, porém é importante que sejam seguidas as recomendações médica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Segundo a nova diretriz sobre diagnóstico e tratamento da hipertensão arterial sistêmica, discutida no congresso da AHA, a decisão de quando e como iniciar o tratamento farmacológico não se baseia no valor da pressão arterial, mas sim no cálculo do risco cardiovascular realizado pelo escore global de Framingham, chamado de “Atherosclerotic Cardiovascular Disease (ASCVD) risk calculator” (GISMONDI, 2017; WHELTON *et al.*, 2017; “2017 Hypertension Clinical Guidelines”, 2017).

O tratamento com qualquer tipo de anti-hipertensivo, recomendado pelo médico, reduz o risco da elevação da PA e suas complicações. Atualmente o tratamento para essa patologia se dá com uso de anti-hipertensivos, como por exemplo, os diuréticos (furosemida, hidroclorotiazida), os vasodilatadores (minixidil, hidralazina), os bloqueadores dos canais de cálcio (captopril, enalapril) e os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) (propranolol, atenolol). Porém, essas medicações causam diversos efeitos colaterais, como tonturas, retenção de líquidos, alterações na frequência cardíaca, dor de cabeça, vômitos, náuseas, sudorese ou impotência (MVB *et al.*, 2016; Sociedade Brasileira de Hipertensão, 2017).

A falta de tratamento de pacientes portadores de PA pode ocasionar alterações cérebro vasculares, infarto, insuficiência cardíaca, aumento do coração, angina, insuficiência ou paralisia dos rins, alterações na visão podendo levar à cegueira, entre outras (Sociedade Brasileira de Hipertensão, 2017). Nesse contexto, na busca de novas alternativas de produtos inovadores para o tratamento da PA, diversas espécies de bactérias probióticas tem sido usadas como potencial para prevenção e/ou tratamento de diversas doenças, incluindo a hipertensão arterial (CARMO *et al.*, 2017; CAVALCANTE, 2018).

## 1.7. PROBIÓTICOS

A palavra probiótico deriva do grego e seu significado é “para a vida” (SILVA, 2007). Ela foi introduzida por Lilley e Stillwell, em 1965, para caracterizar microrganismos que desempenham atividades benéficas. Os microrganismos conhecidos como probióticos são descritos, segundo a Food and Agriculture Organization/ World Health Organization, (2002) (FAO/WHO), como microrganismos vivos que, sendo administrados em quantidades adequadas concedem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (SANTOS *et al.*, 2011; HILL *et al.*, 2014; FAO, 2016). Os probióticos são certificados pela *Food and Drug Administration (FDA)* como microrganismos com status GRAS (*Generally Recognized as Safe*), ou seja, seguros para o consumo e sem efeitos colaterais para o hospedeiro (ANVISA, 2019).

Segundo Reid e colaboradores, (2019) os requisitos mínimos para a avaliação de um probiótico eficaz devem seguir além da descrição sugerida por Hill e colaboradores, (2014), devem incluir: *i*) os microrganismos precisam estar vivos em quantidade adequada quando administrados; *ii*) as cepas necessitam ser identificadas geneticamente, classificadas aplicando a terminologia mais recente e designadas por números, letras ou nomes; que estudos de tamanho e design apropriados precisam ser efetuados para designar uma cepa como probiótica e utilizar a (s) cepa (s) no hospedeiro ao (s) qual (is) o (s) probiótico (s) se destina (s) (humano, gado, animal de companhia, etc); *iii*) as estirpes referidas que conferem um benefício a uma condição podem não ser probióticas para outra aplicação (ou seja, efeito linhagem específico); *iv*) as cepas probióticas para seres humanos, que estão sendo empregadas em estudos com animais, precisam ser notoriamente designadas como probióticos humanos sob teste experimental.

Segundo Furtado (2018), existem critérios para classificar o organismo como probiótico, utilizados e aceitos na literatura, como: ter origem humana, vegetal, animal, ou outra fonte possível, não ser patogênico; ser resistente ao processamento; ser estável e permanecer viável, após exposição aos sucos digestivos; ser capaz de persistir no trato gastrointestinal; ser capaz de influenciar atividade metabólica local. Esses microrganismos devem ser seguros e seus efeitos benéficos devem estar presentes durante a passagem no trato gastrointestinal. Sendo assim, sua capacidade de resistir aos ambientes do estômago e intestino é fundamental juntamente com a capacidade de adesão a células intestinais, inibição de patógenos e efeitos imunomoduladores (CARMO *et al.*, 2017).

As principais linhagens relatadas como probióticas são *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Saccharomyces boulardii*, *Propionibacterium freudenreichii* (MORAIS, JACOB, 2006; SANTOS *et al.*, 2011).

Os probióticos têm sido usados, de forma experimental, na prevenção e tratamento de doenças, para regular a microbiota intestinal, em disbioses (desequilíbrio

na microbiota intestinal) do metabolismo gastrointestinal, como imunomoduladores, e na inibição da carcinogênese (COPPOLA; GIL-TURNES, 2004; SANTOS *et al.*, 2011).

Seus benefícios incluem afetar a composição e a diversidade da microbiota intestinal. Mesmo o uso de probiótico sendo inicialmente associado à melhora da saúde gastrointestinal, evidências recentes também mostraram que os probióticos desempenham um papel importante em outras doenças, como a hipertensão, exercendo efeitos protetores cardiovasculares na hipertensão genética relacionada à melhora do estado pró-oxidativo e pró-inflamatório vascular (GÓMEZ-GUZMÁN *et al.*, 2015).

Para garantir um efeito contínuo dos benefícios atribuídos, os probióticos devem ser ingeridos na quantidade mínima por dose recomendada pela ANVISA (BRASIL, 2008). Alterações favoráveis na composição da microbiota intestinal foram observadas com doses de 100 g de produto alimentício contendo  $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) de microrganismos probióticos ( $10^7$  UFC/g de produto). Porém, para obter efeito terapêutico, na literatura, descreve-se doses variando de  $10^6$  a  $10^9$  UFC de bioproduto (COEURET, GUEGUEN, VERNOUX, 2004; SAAD, 2006).

Na literatura, as espécies de *Lactobacillus sp.* foram descritas como sendo eficazes no tratamento de diversas condições patológicas, e que possuem efeitos imunomodulatórios, antiinflamatórios e anti-hipertensivos (ASHAR; CHAND, 2004; KAFSI *et al.*, 2014).

Foi identificado que a linhagem *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* possui peptídeos anti-hipertensivos a partir de leites fermentados (RAI; SANJUKTA; JEYARAM, 2017), além também *Lb. delbrueckii subsp. lactis* possuem peptídeos inibidores da ECA (ELSALAM; EL-SHIBINY, 2018).

A linhagem *L. delbrueckii subsp. lactis* CNRZ327 é descrita na literatura como uma cepa com forte potencial de imunomodulação (KAFSI *et al.*, 2014).

## 1.8. MECANISMO DE AÇÃO DOS PROBIÓTICOS

Uma hipótese do uso de probióticos é a alteração da microbiota intestinal favorecendo a saúde do hospedeiro (GHADBAN, 2002). Os microrganismos que

compõem os probióticos introduzidos na dieta protegem o intestino contra bactérias patogênicas. Os mecanismos de ação dos probióticos, citados abaixo, fundamentam-se nos mesmos usados para a microbiota intestinal no desenvolvimento de suas funções (Figura 5) (BUSANELLO, 2013; DE, F. *et al.*, 2017; RABAH H *et al.*; 2017; VALDUGA F *et al.*; 2018).

### **1.8.1. COMPETIÇÃO POR SÍTIOS DE LIGAÇÃO OU EXCLUSÃO COMPETITIVA**

Os microrganismos probióticos viáveis que são introduzidos aos alimentos estabelecem uma barreira física, impossibilitando a colonização de patógenos, competindo pelos nutrientes e receptores celulares, além de competirem na ocupação dos sítios de aderência nas vilosidades intestinais, dificultando a livre fixação destes, protegendo as vilosidades e conseqüentemente a superfície absorptiva de toxinas irritantes causadas pelas bactérias patogênicas, além de também produzirem substâncias capazes de diminuir a quantidade dessas bactérias (bactericinas), assim reestabelecendo o equilíbrio da microbiota intestinal, esse mecanismo se aplica às bactérias lácticas (BAL) (ROTH, 2000; NICOLI e VIEIRA 2000; UTIYAMA, 2004; BUSANELLO, 2013).

### **1.8.2. ESTÍMULO AO SISTEMA IMUNE**

Os probióticos podem estimular tanto a resposta imune não-específica quanto a específica (KOPP-HOOLIHAN, 2001; CALDER, KEW, 2002; VAN DE WATER, 2003; SAAD, 2006). Segundo Ferreira e Astolfi-Ferrera (2006) as bactérias probióticas possuem competência de modulação de respostas imunes sistêmicas elevando não apenas o número como também a atividade de células fagocíticas do hospedeiro. Corroborando Perdígón e Holgado, (2000), salientam que o efeito no estímulo ao sistema imune pode estar associado à capacidade dos microrganismos probióticos exercerem interação com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e a migração de células T do intestino.

Acredita-se ainda que esses efeitos sejam também mediados por uma ativação dos macrófagos, por um aumento nos níveis de citocinas, por um aumento da atividade das células destruidoras naturais (*NK* - “*natural killer*”) e/ou dos níveis de imunoglobulinas (KOPP-HOOLIHAN, 2001; CALDER, KEW, 2002; VAN DE WATER, 2003; SAAD, 2006). Nesse sentido, Menten (2001) descreveu que alguns gêneros de bactérias intestinais, como os *Lactobacillus* e as *Bifidobacterium*, estão ligados diretamente com o estímulo da resposta imune, através do aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon. Delcenserie *et al.*, (2008), ainda acrescentam que os lactobacilos podem também modular a resposta imune intestinal, por meio do estímulo de secreção de citocinas determinadas por células epiteliais. Nesse contexto, Carlos *et al.*, (2003) reportaram que a ingestão de bactérias lácticas pode elevar a resistência a infecções por microrganismos patogênicos em virtude do aumento aparente na ativação de macrófagos e linfócitos, produção de anticorpos e resposta proliferativa tanto no baço, quanto em placas de Peyer. A hipertensão é uma doença inflamatória, acredita-se que os efeitos dos probióticos nessa patologia são mediados pela regulação imune, principalmente através do controle do balanço das citocinas, pró e antiinflamatórias (DALIRI; LEE; OH, 2017).

### 1.8.3. EFEITO NUTRICIONAL

A competição por nutrientes no lúmen intestinal ocorre entre as bactérias intestinais, por nutrientes específicos. Segundo Silva e Alves Filho (2000), a escassez de nutrientes disponíveis é um fator limitante para as bactérias patogênicas reduzindo consideravelmente algumas espécies na microbiota intestinal. Os probióticos ajudam na permeabilidade do epitélio intestinal, viabilizando maior eficiência na digestão e absorção de nutrientes (ROTH, 2000). Segundo Guillot (2000), os probióticos além de protegerem o epitélio intestinal, dificultam a utilização pelos patógenos, de aminoácidos, minerais e carboidratos para fermentação e produção de toxinas, colaborando para a eficiência alimentar e o desempenho de quem os utilizam (BUSANELLO, 2013).

#### 1.8.4. PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIBACTERIANAS E ENZIMAS

Conforme Petri (2000), as bactérias probióticas podem produzir e liberar compostos como as bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio que têm ação antibacteriana em comparação aos microrganismos patogênicos. Os ácidos orgânicos produzidos pelas Bactérias do Ácido-láctico (BALs) que favorecem os probióticos na competição pelos sítios de fixação na mucosa intestinal são os ácidos láctico, acético, propiônico, butírico, acetaldeído além do peróxido de hidrogênio, diacetil, dióxido de carbono e aminas (FLEMMING, 2005). Utyiama (2004) e Flemming (2005) descrevem as bacteriocinas como compostos proteicos com ação inibitória ou destrutiva contra uma espécie ou cepa específica de bactéria, da mesma forma como Silva (2006), que menciona que as bacteriocinas agem como antibióticos com ação local, contra o crescimento de patógenos intestinais. Petri (2000) menciona que as bactérias probióticas além da barreira física e efeito biológico, proporcionam também efeito químico, através da produção dos ácidos orgânicos, láctico e propiônico, os quais levam a uma diminuição do pH do ambiente intestinal, com uma consequente inibição de bactérias patogênicas (BUSANELLO, 2013).

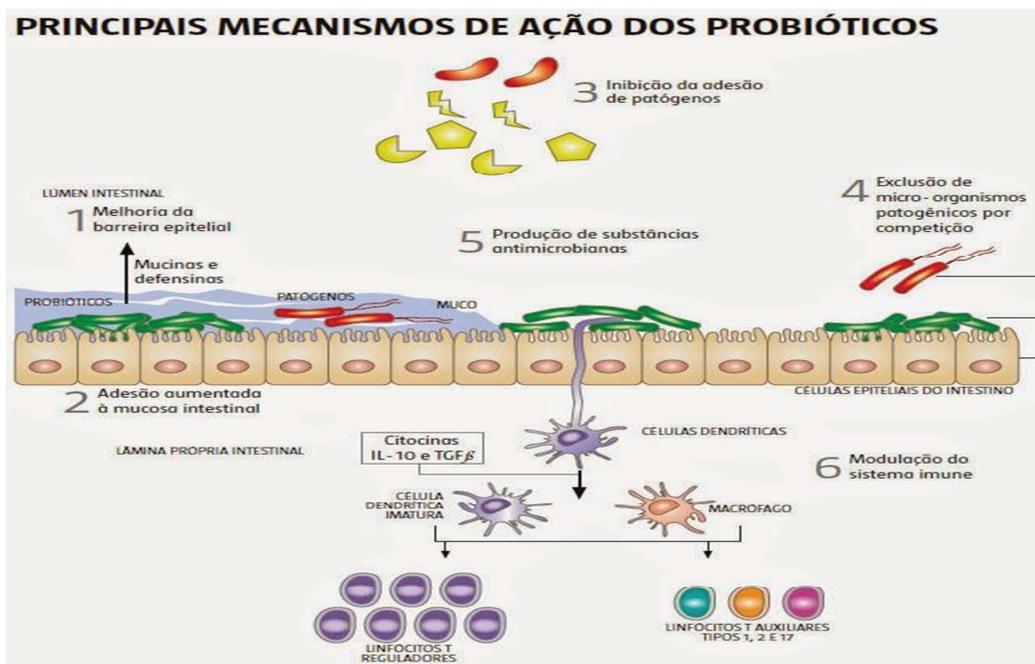


Figura 5: Mecanismos de ação dos probióticos. Saad (2006).

## **1.9. SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS**

A seleção de bactérias probióticas segue os seguintes critérios preferenciais: o gênero ao qual pertence à bactéria pode ser de origem humana, animal, vegetal, entre outras; preferível que as linhagens utilizadas sejam hospedeiro específicas, a estabilidade frente ao ácido e à bile; a capacidade de aderir à mucosa intestinal; a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal (TGI) humano; a capacidade de produzir compostos antimicrobianos; e ser metabolicamente ativo no intestino. Além, de ser seguro para uso humano, tem que possuir histórico de não patogenicidade e não estar associadas a outras doenças tais como endocardite, além da ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos (COLLINS *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1999; SAARELA *et al.*, 2000; ALVIM, 2015).

## **1.10. MERCADO DE PRODUTOS PROBIÓTICOS**

Os produtos acrescidos de probióticos tiveram sucesso em diversas regiões do mundo. Existe uma ampla gama de produtos disponível no mercado, desde alimentos convencionais até medicamentos de prescrição (MEDEIROS, 2010; DE *et al.*, 2017).

No mercado brasileiro, vários alimentos funcionais já estão presentes, além dos iogurtes com probióticos é possível citar os leites enriquecidos com ferro (que auxilia na prevenção e no tratamento da anemia), com vitaminas e com o ácido ômega-3 (que auxilia no controle do colesterol), assim como margarinas enriquecidas também com ômega-3. O mercado de água mineral também aderiu e ingressou àquele das bebidas funcionais, disponibilizando águas que detêm alta concentração de vitaminas C e do complexo B, com o propósito de fortalecer o sistema imunológico, além de bebidas que dispõem da fibra frutooligosacarídeos (FOS) prometendo auxiliar na prevenção dos cânceres de mama e de cólon, como também de reduzir os riscos de doenças cardiovasculares, além de regular o intestino (RAUD, 2008; FERNANDES, 2013).

Os probióticos são um dos ingredientes mais relevantes para a indústria de alimentos lácteos e funcionais, contribuindo para um mercado de milhões de dólares

(DOHERTY *et al.*, 2012; FERNANDES, 2013). No Brasil, estima-se que o consumo de leites fermentados contendo probióticos gire em torno de 120 mil ton/ano (FOOD INGREDIENTS, 2000; GONZÁLEZ, J. A. A., 2015). O mercado global para alimentos contendo probióticos seguramente se elevou em mais de 50%, isso significou um aumento em 2016 para 42 mil milhões de dólares e ainda estima-se que ultrapasse 64 bilhões de dólares até 2023 (DOHERTY *et al.*, 2012; INC, 2016; DE, F. *et al.*, 2017; REID *et al.*, 2019).

Observa-se certa disparidade, entre regiões, no que diz respeito à comercialização dos alimentos funcionais. A Área de Livre Comércio da América do Norte (NAFTA) corresponde 72% do mercado mundial, em comparação com os 12% da União Européia e 14% do Japão (RAUD, 2008).

Numa conjuntura econômica cada vez mais concorrencial, a inovação de um produto é um meio necessário de manutenção e conquista de novos segmentos de mercado (OLIVEIRA *et al.*, 2008), visto que o mercado de probióticos é bem promissor (FERNANDES, 2013).

### **1.11. *Lactobacillus delbrueckii***

*Lactobacillus delbrueckii* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbica, filamentosa, isolada de ambiente intestinal humano. Possui ação probiótica, estimula o sistema imunológico, minimiza os níveis de colesterol e PA, auxilia no combate a doenças inflamatórias crônicas e intolerância à lactose (SERNA-COCK; STOUVENEL, 2005).

Das BAL, o *L. delbrueckii* é um dos microrganismos utilizados, em larga escala, na produção de ácido láctico, pois possui vantagens como fermentar de forma eficaz a glicose e ser um microrganismo termofílico com temperatura ótima de crescimento 41,5°C, o que diminui os custos de resfriamento e esterilização. A bactéria se alimenta de lactose para produção de ácido láctico, que é usado para preservar o leite, além disso, é uma das principais bactérias utilizadas na produção de iogurte, sendo também encontrada em outros produtos fermentados, sendo considerada acidúrica ou acidofílica, uma vez que necessita de um pH em torno de 5,4- 4,6 para crescer de forma eficaz (SERNA-COCK; STOUVENEL, 2005).

Os efeitos benéficos da bactéria *Lactobacillus delbrueckii* inclui atividade antioxidante, imunomodulatória e anti-hipertensiva, através dos peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina, que impede a conversão da angiotensina I em angiotensina II, levando a homeostase da pressão arterial (DONKOR *et al.*, 2007; QIAN *et al.*, 2011).

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* são isoladas de uma variedade de produtos lácteos, fermenta uma ampla gama de carboidratos como por exemplo, frutose, glicose, lactose, maltose, manose, sacarose (RIZZELLO; DE ANGELIS, 2016). Coronado *et al.*, (2018) em seu estudo relatou que a bactéria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pode beneficiar indivíduos com intolerância a lactose.

A *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ 327 é uma linhagem isolada de queijo, com efeitos imunomodulatórios, anti-inflamatórios e probióticos comprovados pelo grupo de pesquisa de Santos Rocha *et.al.*, (2014) e também por Kafsi *et al.*, (2014), que a descreve como uma cepa com forte potencial de imunomodulação capaz de regular a ativação da factor kappa B nuclear (NF- $\kappa$ B) nas células epiteliais intestinais HT29 *in vitro* e melhorar os sintomas *in vivo* da colite induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS) em camundongos, um modelo de colite ulcerosa humana. Além disso, essa linhagem teve seu genoma sequenciado e foram identificados genes para a produção de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), que é um neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central dos mamíferos com efeitos anti-hipertensivos (SANTOS ROCHA *et.al.*, 2014; MA *et al.*, 2015).

## **1.12. PRODUTOS FERMENTADOS, TECNOLOGIA EMPREGADA NA PRODUÇÃO DE PROBIÓTICOS NA INDÚSTRIA**

A fermentação é uma das mais antigas formas de conservação de alimentos. Os mais comuns e conhecidos alimentos probióticos são os produtos lácteos, destacando-se o leite fermentado que é produzido através do processo de fermentação do leite utilizando uma ou mais bactérias e os alimentos acrescidos com esses microrganismos (BRASIL, 2007; WENDLING; WESCHENFELDER, 2013; SOUZA; BRUNARI, 2017). Contudo, também existem outros produtos no mercado tais como preparações farmacêuticas em cápsulas, sachês, pó (produto liofilizado), tabletes, suspensões

líquidas ou secas (HOLANDA *et al.*, 2008; FERNANDES, 2013). As bactérias mais frequentemente utilizadas para a produção dos produtos fermentados são as BALs não patogênicas (REZAUL *et al.*, 2017).

De preparo simples, os produtos probióticos atualmente passam por processos sofisticados de alta qualidade, a baixos custos. Todos os aspectos associados à obtenção das cepas probióticas, para sua posterior adição aos produtos alimentícios, devem ser estudadas minuciosamente, uma vez que as tecnologias de fermentação, de liofilização e de microencapsulação das culturas influenciam significativamente a funcionalidade dos probióticos (KOMATSU *et al.*, 2008).

O campo para o desenvolvimento de tecnologias envolvendo o uso de culturas probióticas é extremamente promissor e requer inúmeras pesquisas, com o propósito de que se possa estabelecer definitivamente os veículos apropriados para que essas culturas cheguem ao intestino em condições e concentrações efetivas para que possam desempenhar seu efeito de maneira apropriada (BALLUS *et al.*, 2010).

O primordial objetivo da indústria é agregar valor mediante obtenção de produto que, além de nutritivo, seja capaz de beneficiar a saúde de quem o consome. É de suma importância que todos os requisitos para a fabricação de produto lácteo probiótico em sua máxima funcionalidade sejam seguidos, para que o consumidor possa usufruir do alimento que apresente as alegadas propriedades benéficas (BALLUS *et al.*, 2010).

### **1.13. BEBIDAS FERMENTADAS SUPLEMENTADAS COM WHEY PROTEIN**

O termo “bebida láctea” possui sentido amplo e compreende uma série de produtos fabricados com leite e/ou soro, podendo o leite ser apresentado *in natura* esterilizado, em pó, integral, entre outros, e o soro de leite pode ser líquido, em pó, adicionado ou não de produto ou substância alimentícia, além de também serem apresentados como leite fermentado, fermentos lácteos selecionados e outros tipos de produtos lácteos (BRASIL, 2004; THAMER; PENNA, 2006).

Nas bebidas fermentadas, a fermentação ocorre mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos e/ou acrescido de leite fermentado, não podendo receber tratamento térmico após a fermentação (BRASIL, 2004; THAMER; PENNA, 2006). O

processo de fermentação tem como objetivo inicial prolongar a vida útil de alguns alimentos e bebidas, além de melhorar sua segurança, digestibilidade e propriedades organolépticas, ainda possuir benefícios de promoção da saúde (ŞANLIER; GÖKCEN; SEZGIN, 2017; GONZÁLEZ *et al.*, 2019).

O leite fermentado é um tipo de bebida láctea, rica em proteínas facilmente digeríveis, possuindo alto valor nutricional e ampla gama de propriedades bioativas. As propriedades promotoras de saúde do leite fermentado são dependentes do organismo vivo ingerido, probiótico, ou ao metabólito microbiano por ele produzido, fração livre de células, gerado durante o processo de fermentação (ŞANLIER; GÖKCEN; SEZGIN, 2017; GONZÁLEZ *et al.*, 2019). Esses produtos contêm ácidos graxos, vitaminas e minerais, além de peptídeos bioativos e microrganismos vivos com potencial para modular as respostas imunes e o efeito na composição e na funcionalidade da microbiota intestinal (CHAKRABARTI *et al.*, 2014; SEVERYN e BHATT, 2018; GONZÁLEZ *et al.*, 2019).

No leite fermentado há peptídeos IECA, entre os diferentes tipos de peptídeos bioativos, visto que esse peptídeo age na hipertensão arterial, muitos estudos vêm sendo realizados, buscando uma redução dessa patologia, devido sua alta incidência. Os produtos lácteos fermentados são considerados fontes naturais dos peptídeos IECA, que são constituídos durante a hidrólise das proteínas do leite pelas proteases microbianas, produzidas pela cultura inicial. (RAI; SANJUKTA; JEYARAM, 2017). Em um produto a base de leite fermentado pode haver uma mistura de diferentes peptídeos da IECA, que se diferenciam na sua capacidade de sobreviver à digestão gastrointestinal (RAI; SANJUKTA; JEYARAM, 2017).

Usado como matriz de proteção para probiótico, além de serem veículos de entrega eficientes para direcionar moléculas e microrganismos protetores ao epitélio digestivo, as proteínas do leite (caseínas representando 80% e as proteínas do soro de leite representando 20%) se mostram interessantes para a indústria de produtos fermentados lácteos (LIVNEY, 2010; COUSIN *et al.*, 2012; VARGAS *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2016; CARMO *et al.*, 2017). Diversas frações do soro podem ser obtidas através das técnicas de separação por membranas, podendo ser aproveitadas na forma de lactose, soro em pó e concentrados proteicos com elevados teores de proteínas, tais como o *Whey Protein Concentrado (WPC)* constituído de 35, 50, 65 ou 80% de

proteínas ou *Whey Protein* Isolado (*WPI*), com mais de 90% de proteínas (Figura 6) (CORDEIRO *et al.*, 2018).

As proteínas do soro de leite do *WPC* e *WPI* possuem características que demonstram o potencial de ambas como matrizes de proteção para produtos lácteos, o que aumenta a sobrevivência e a viabilidade das bactérias probióticas (CORDEIRO *et al.*, 2018). Evidências sustentam a teoria de que essas proteínas, além de seu alto teor biológico, também detêm alto valor nutricional, contendo alto teor de aminoácidos essenciais, alto teor de cálcio, possuindo também peptídeos bioativos, que atuam como agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, reguladores da função imune, assim como fatores de crescimento (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

#### **1.14. BIOATIVOS**

Substâncias bioativas são segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), nutrientes e não nutrientes que possuem ação metabólica ou fisiológica específica. Os bioativos podem ser produzidos por animais, plantas ou sintetizados em laboratório. Estão compreendidos dentro das substâncias bioativas os carotenóides, os fitoesteróis, os flavonóides, os fosfolipídeos, os organossulfurados e os polifenóis. Para que qualquer uma dessas substâncias possam ser utilizadas nessa categoria de produtos é necessário que sejam encontradas naturalmente em partes comestíveis dos alimentos. Sendo esse requisito cumprido, torna-se possível que as substâncias bioativas sejam extraídas de fontes alimentares e não alimentares ou obtida por síntese (ANVISA, 2013).

Em 2010, o termo “probioativo” foi proposto para identificar compostos bioativos que se encontram diretamente associados à presença de microorganismos probióticos (FARNWORTH; CHAMPAGNE, 2010). Esses compostos podem ser sintetizados pelos próprios microorganismos ou serem obtidos como resultado da transformação da matriz alimentar fornecida como meio de cultura. Porém, os probioativos variam de acordo com a cepa utilizada, com isso, a escolha da cepa é imprescindível para garantir resultados em trabalhos que visam o uso de probióticos tanto na saúde quanto para a indústria de produção de alimentos (CHAMPAGNE;

GOMES DA CRUZ; DAGA, 2018). Além disso, estudos realizados por Shiby *et al.*, em 2013 sugerem que o método mais eficaz para aumentar a produção de probióticos é a fermentação (SHIBY; MISHRA, 2013). Nesse processo, a contagem de UFCs final na maioria das vezes é de um bilhão por porção, o que permite uma maior quantidade de probióticos em alimentos. Isso ocorre porque a matriz, ou o meio de cultura utilizado na fermentação pode favorecer o crescimento do probiótico e a produção de probióticos específicos (CHAMPAGNE; GOMES DA CRUZ; DAGA, 2018; FARNWORTH; CHAMPAGNE, 2010). Dentre os principais componentes bioativos pesquisados em culturas de *Lactobacillus* temos a produção de inibidores da ECA, com atividade anti-hipertensiva e avaliação do potencial antioxidante realizado pelo método baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (CHAMPAGNE; GOMES DA CRUZ; DAGA, 2018).

O consumo de compostos bioativos através da dieta é um fator protetor adicional para o equilíbrio do estado redox da célula. Esse complexo sistema de proteção antioxidante, endógeno e exógeno interage entre si e age sinergicamente para neutralizar os radicais livres (KALIORA; DEDOUSSIS, 2005). Os compostos bioativos que estão presentes nos alimentos podem atuar de diversas maneiras, tanto no que se refere aos alvos fisiológicos quanto aos mecanismos de ação. Salienta-se que estes compostos podem ter ação antioxidante, principalmente por causa do potencial de óxido-redução de determinadas moléculas, capacidade de competir por sítios ativos e receptores nas diversas estruturas celulares ou, ainda modular a expressão de genes que codificam proteínas compreendidas em mecanismos intracelulares de defesa contra processos oxidativos degenerativos de estruturas celulares. Da mesma maneira os compostos bioativos podem impossibilitar a peroxidação de lipídios e, assim, precaver o aparecimento de aterosclerose, infarto do miocárdio, dentre outras doenças (DAIMIEL; VASGAS, 2012; BARBOSA, FERNANDES, 2014).

#### **1.14.1. INIBIDORES DA ENZIMA DE CONVERSÃO DA ANGIOTENSINA**

Os peptídeos da IECA são definidos como inibidores competitivos de substratos da ECA, normalmente possuem de dois a doze aminoácidos (PHELAN e KERINS, 2011; RAI; SANJUKTA; JEYARAM, 2017).

A hiperatividade do SRAA tem sido relacionada à gênese de várias doenças como a HA, o infarto agudo do miocárdio, a insuficiência cardíaca congestiva, as arritmias cardíacas, entre outras (MORAIS *et al.*, 2003). A ECA exerce um papel fisiológico fundamental no controle da pressão arterial através da via da renina-angiotensina-aldosterona (RAI; SANJUKTA; JEYARAM, 2017). O peptídeo IECA impede a atividade da ECA, inibindo a conversão da angiotensina I em angiotensina II, que é considerado um potente vasoconstritor, gerando um efeito hipotensor (NOBRE *et al.*, 2013; RAI; SANJUKTA; JEYARAM, 2017). O leite é uma excelente fonte de peptídeos IECA, que são liberados durante a fermentação através de hidrólise proteolítica (RAI e JEYARAM, 2015).

Diante do exposto o presente estudo propõe o uso de probióticos, como uma alternativa no auxílio para o tratamento da HA, já que evidências recentes também mostraram que os probióticos desempenham um papel importante na hipertensão (GÓMEZ-GUZMÁN *et al.*, 2015; CAVALCANTE, 2018). Utilizando para o desenvolvimento desse trabalho ratos SHR que são considerados o modelo experimental de hipertensão arterial que mais se assemelha ao desenvolvimento da hipertensão humana. (JÚNIOR, R.C. *et al.*, 2001; CESARETTI; KOHLMANN JUNIOR, 2006; RODRIGUEZ-FIGUEROA *et al.* 2013; RAI *et al.* 2017).

## 2. JUSTIFICATIVA

Hipertensão arterial é comumente conhecida como pressão alta. A hipertensão arterial sistêmica é tida como um importante problema de saúde pública em âmbito mundial devido à sua alta prevalência e baixas taxas de controle, colaborando significativamente nas causas de morbidade e mortalidade cardiovascular. Ela apresenta custos médicos e socioeconômicos elevados, decorrentes principalmente das suas complicações. Nesse contexto, são imprescindíveis alternativas de tratamento para essa patologia. Os probióticos, devido aos seus mecanismos de ação, surgem como uma oportunidade a ser explorada para auxiliar no tratamento dessa patologia. Dentre, as formas de veiculação dos probióticos, as bebidas fermentadas são produtos de fácil aceitação. Entretanto é primordial que o produto seja desenvolvido com linhagem que apresenta efeitos terapêuticos no hospedeiro. A bactéria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ327 (*L. CNRZ327*), já apresentou efeitos anti-inflamatórios em modelo de colite ulcerativa, através um trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, o que demonstra que esta linhagem pode ser útil para ser aplicada em outros modelos experimentais. Além disso, espécies selecionadas do gênero lactobacilos apresentam atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina, que possui efeitos hipotensores. Para isso, os probióticos podem auxiliar não apenas diminuindo a pressão arterial, como também os eventos cardiovasculares. Evidências recentes mostraram que os probióticos podem desempenhar um papel importante em diferentes doenças, dentre elas a hipertensão. Levando em consideração tais características, esse estudo propõe o desenvolvimento de produtos fermentados utilizando a linhagem *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327 suplementado com *Whey Protein* Isolado para a prevenção da hipertensão arterial em modelo murino.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito anti-hipertensivo de uma bebida probiótica fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ327 e suplementada com *Whey Protein* Isolado em ratos espontaneamente hipertensivos.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar se a formulação probiótica por *L. delbrueckii* CNRZ327 suplementada ou não com *Whey Protein* Isolado atende as regulamentações da ANVISA;
- Avaliar *in vitro* o potencial anti-hipertensiva da linhagem *L. delbrueckii* CNRZ327 suplementada ou não com *Whey Protein* Isolado;
- Avaliar o efeito anti-hipertensivo de uma bebida probiótica fermentada *L. delbrueckii* CNRZ327 e suplementada com *Whey Protein* em ratos espontaneamente hipertensivos.



## 4. METODOLOGIA

### 4.1. LINHAGEM BACTERIANA

Para o presente estudo, foi utilizada a cepa bacteriana de *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327, fornecida pelo instituto UMR1219 MICALIS (INRA-AgroParisTech, Jouy-Em-Josas, France).

Inicialmente, a linhagem bacteriana de *L. delbrueckii* CNRZ 327 foi cultivada (4% v/v) em meio de cultura MRS (deMan, Rogosa e Sharpe) e incubada por 24 h a 37°C. Em meio sólido (MRS-Agar 15%), foram inoculadas 50 µL da linhagem *L. delbrueckii* CNRZ 327 em cada placa, permanecendo incubadas durante 48 h, em estufa bacteriológica à 37°C.

### 4.2. CULTIVO DE *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327 EM MEIO LEITE DESNATADO SUPLEMENTADO COM WHEY PROTEIN

Para preparação do leite foi utilizado leite em pó desnatado (LD) instantâneo (Itambé, Brasil) na concentração de 12% p/v, contendo carboidratos, proteínas, gorduras totais e sódio. Para o cultivo de *L.delbrueckii* CNRZ 327 no LD, foi acrescentado extrato de levedura 1,2% p/v (KASVI, Curitiba, Brasil) e glicose 2% p/v (Merck, Germany), de acordo com a literatura (THARMARAJ; SHAH, 2003).

Para o cultivo de *L.delbrueckii* CNRZ 327, foi adicionada caseína peptona 1 g (KASVI, Curitiba, Brasil), de acordo com COUSIN *et al.*, 2012. O leite foi autoclavado à 110°C, durante 15 minutos. O leite desnatado acrescido de *L.delbrueckii* CNRZ 327 foi suplementado com WPI, sabor natural, 90% de proteína (Vulgo Suplementos, Brasil) na concentração de 30% p/v, conforme (HUANG *et al.*, 2016). As mesmas condições de tempo de incubação, temperatura e agitação, utilizadas para o cultivo da linhagem no seu meio líquido convencional, foi respeitada para o cultivo no leite com e sem suplementação de WPI. Para avaliar a viabilidade da bactéria *L. delbrueckii* CNRZ 327 na bebida fermentada suplementado com WPI foi realizado o método de diluição

seriada. A composição nutricional do *Whey Protein* Isolado está apresentada na Tabela 3.

**Tabela 3:** Composição nutricional do *Whey Protein* Isolado, sabor natural (Vulgo Suplemento, Brasil).

	<b>Quantidade a cada 30 g</b>
<b>Valor Calórico</b>	120 Kcal = 504KJ
<b>Carboidratos</b>	0,5 g
<b>Proteínas</b>	27 g
<b>Gorduras totais</b>	1 g
<b>Gorduras saturadas</b>	0 g
<b>Gorduras Trans</b>	0 g
<b>Fibra alimentar</b>	0 g
<b>Sódio</b>	268 mg
<b>Açúcares (lactose)</b>	0 g

#### **4.3. FORMULAÇÕES DAS AMOSTRAS PARA OS ENSAIOS IN VITRO E IN VIVO**

Nos ensaios *in vitro* foram utilizadas as formulações: grupo controle utilizamos leite desnatado e leite desnatado acrescido de *WPI*; grupo experimental utilizamos leite desnatado fermentado por *L.delbrueckii* CNRZ 327 acrescido ou não de *WPI*.

Para os ensaios *in vivo* foi utilizada a formulação de leite desnatado fermentado por *L.delbrueckii* CNRZ 327 acrescido de *WPI* como grupo experimental, e seus resultados foram comparados com grupo controle dos ratos Wistar e SHR que receberam apenas PBS.

#### **4.4. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E BIOATIVOS DAS FORMULAÇÕES PROBIÓTICAS**

A composição centesimal (umidade, proteína e gordura) das formulações probióticas foi estabelecida usando métodos descritos abaixo. Inicialmente, as amostras foram diluídas em água estéril na proporção 1 g de amostra: 10 mL de água estéril. A umidade foi estabelecida secando 5 g de amostra a 100-105 °C por 24 h. A quantidade de proteínas foi determinada em duplicata pelo método de Kjeldahl (determina a matéria nitrogenada total de uma amostra), multiplicando o conteúdo de nitrogênio pelo fator 6,38, e a gordura foi quantificada pelo método de Gerber, que consiste no tratamento de um determinado volume de leite com ácido sulfúrico e álcool amílico, no butirômetro de Gerber. O método tem como princípio a destruição das micelas de gordura e a dissolução da caseína, facilitando a separação da gordura. (FELICIO *et al.*, 2016). Os resultados foram expressos em g/100g.

#### **4.4.1. DOSAGEM DE LACTOSE**

A lactose foi estabelecida usando cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography* - HPLC) usando uma coluna Aminex X-87H (300 mm x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA), conforme o protocolo estabelecido por Ong e colaboradores (2006).

#### **4.4.2. DOSAGEM DE SÓDIO E CÁLCIO**

O conteúdo mineral foi determinado por Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (Spectro Analytical Instruments, Kleve, Alemanha) conforme FELICIO *et al.*, (2016). As curvas de calibração foram construídas usando os padrões de sódio e cálcio. Dez gramas de amostra foram hidrolisados usando 2 mL de solução de ácido nítrico-perclórico (2:1) por aproximadamente 16 horas a 120°C ± 2°C. As amostras foram então aquecidas em um termo bloco (Technal, São Paulo, Brasil) em um exaustor em fervura lenta à 100°C ± 2°C durante 1h e mantidas por mais 2 horas a 170°C (± 2°C). Após o resfriamento das amostras à temperatura ambiente, 2 mL de

ácido nítrico-perclórico foram acrescentados a cada tubo e aquecidos por mais 4 h a 170°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) no bloco digestor.

## **4.5. BIOATIVOS**

### **4.5.1. ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE PROBIOATIVOS PRODUZIDOS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE (MÉTODO DPPH)**

Foram preparados os extratos de acordo com Cappato e colaboradores, (2017). Inicialmente, aproximadamente 1g das amostras de bebida fermentada acrescida de *WPI* foram pesadas e extraídas usando uma solução etanólica (50:50 v/v) na proporção 1:10 p/v. O conteúdo foi agitado a 200 rpm (SL180/D, Solab, Piracicaba, SP, Brasil) durante 1h em temperatura ambiente. Logo após, o extrato foi filtrado sob vácuo e colocado sob-refrigeração a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento da análise.

A capacidade antioxidante química do ensaio DPPH foi realizada conforme as condições experimentais realizadas por Amaral e colaboradores (2018). Primeiramente, 150  $\mu\text{L}$  de cada extrato foram colocados em 2,85 mL de uma solução de DPPH (0,006  $\mu\text{mol/mL}$ ). Após os tubos foram homogeneizados na ausência de luz por 60 minutos e a leitura da absorbância das amostras foi realizada a 517 nm. Os resultados foram expressos como equivalentes de Trolox/ g por amostra.

### **4.5.2. ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE PROBIOATIVOS INIBIDORES DA ECA-I (ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA)**

A atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I, nos filtrados das bebidas de soro de leite foi determinada conforme Konrad e colaboradores, (2014). Primeiramente, 20  $\mu\text{L}$  de enzima ECA (0,1 unidade/ mL) foram acrescentadas nos balões e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 30 min. Logo após 250  $\mu\text{L}$  de 1 mol/ L HCl foi adicionado para inativar a enzima. O conteúdo dos frascos foi evaporado e em seguida

foram ressuspensos em água deionizada e a leitura de absorvância das amostras foram feitas a 228 nm. A inibição da ECA-I foi determinada usando a seguinte equação (1):

$$\text{Inibição da ECA-I (\%)} = 1 - \frac{C-D}{A-B} \times 100 \quad \text{Eq (1)}$$

Onde, A: representa a absorvância com a enzima e sem amostra; B: nem amostra nem a enzima; C: apresentando enzima e amostra; D: contendo a amostra, mas não a enzima.

#### **4.6. EXPERIMENTAÇÃO IN VIVO EM RATOS WISTAR E RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

##### **4.6.1. ANIMAIS**

Para o presente estudo foram utilizados ratos machos das linhagens Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Os ratos Wistar machos com 16 semanas de idade foram obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG – Belo Horizonte, Brasil). Os animais foram mantidos em grupo de quatro animais por gaiola, recebendo uma dieta padrão (Nuvilab) e água *ad libitum*, mantidos em biotério, com temperatura ambiente entre 22-23°C, com um ciclo luz/escuridão de 12/12 horas. Os ratos machos SHR, também com 16 semanas de idade foram obtidos do Laboratório de Animais da Hipertensão do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais, mantidos nas mesmas condições. Todos os procedimentos adotados no presente estudo foram devidamente aprovados pelo Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, protocolo de pesquisa n° (264/2019).

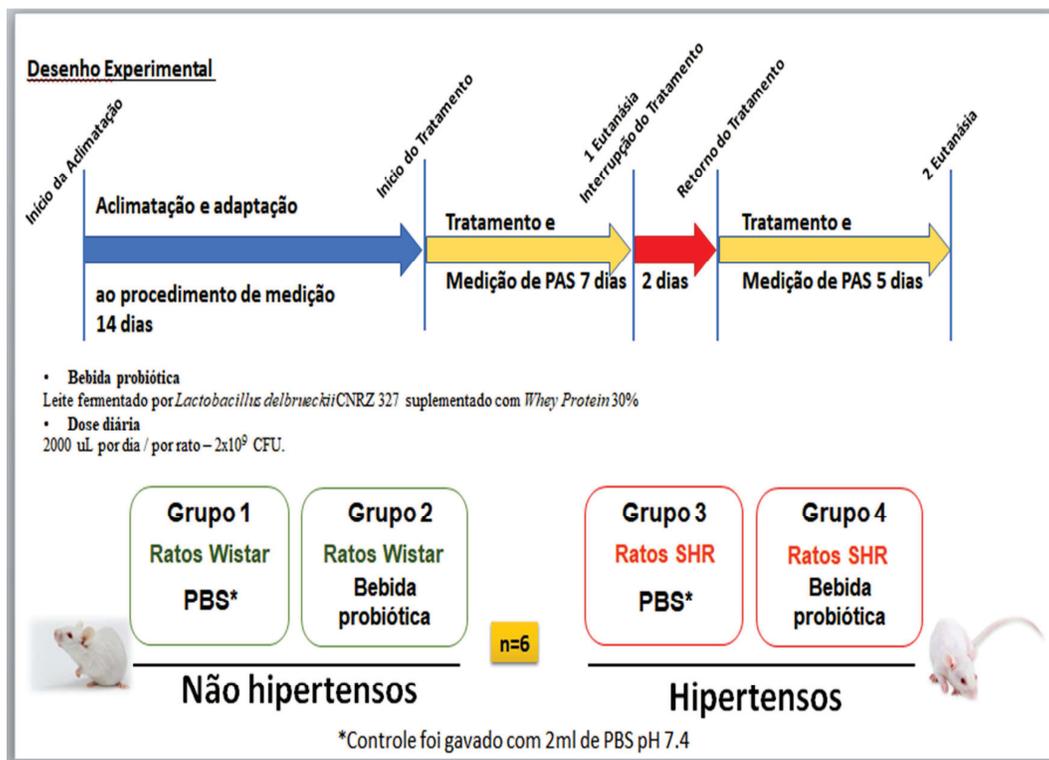
##### **4.6.2. ACLIMATAÇÃO E ADAPTAÇÃO**

Antes do início dos protocolos experimentais foi realizado um período de aclimatação e adaptação dos animais ao equipamento. Para tanto, diariamente, durante

duas semanas todos os animais (Wistar e SHR) foram então submetidos à medição da pressão arterial por plestimografia de cauda.

#### **4.7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL (n=6)**

Os animais (16 semanas de idade) foram distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais e controle. Dessa forma, 12 ratos Wistar e 12 ratos SHR foram distribuídos em quatro grupos com seis animais por grupo. Os grupos foram identificados da seguinte forma: grupo controle WKY e grupo controle SHR (ambos receberam PBS, 2 mL), além de um grupo SHR e um grupo Wistar administrado com leite suplementado com *Whey Protein* Isolado (30% concentração) mais *L. delbrueckii* CNRZ327. A dose de probiótico administrada foi de  $2 \times 10^9$  UFC / dia em 2 mL de leite desnatado, através de administração oral com auxílio de uma seringa, de acordo com os estudos de SANTOS ROCHA *et al.*, (2014). Após 7 dias de tratamento metade (n=3) dos animais de cada grupo foram eutanasiados e a outra metade continuou com o tratamento por mais 5 dias, após interrupção de 2 dias. As formulações utilizadas *in vivo* PBS para o grupo controle experimental e leite desnatado fermentado por *L. delbrueckii* com *WPI*. A Figura 6 representa o delineamento experimental adotado neste trabalho.



**Figura 6:** Desenho experimental da utilização de *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327 suplementado com *Whey Protein* Isolado 30% (2000  $\mu$ L por dia / por camundongo –  $10^9$ -UFC) na avaliação da pressão arterial.

#### 4.8. MONITORAMENTO DO PESO DOS ANIMAIS, CONSUMO DE RAÇÃO E ÁGUA

Durante todo o período experimental, os ratos tiveram livre acesso à água filtrada e comida. O consumo de ração e água foram avaliados diariamente, pesando e mensurando, respectivamente. Os animais também foram pesados diariamente em balança digital.

#### 4.9. MEDIDA NÃO INVASIVA DE PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A pressão arterial sistólica foi medida durante a fase de aclimação e adaptação ao procedimento de medição (14 dias) e ao longo de todo o protocolo experimental (14 dias). As medidas foram obtidas em animais livres de efeito anestésico ou analgésico,

por meio de método indireto não invasivo. Para tanto, em um pletismógrafo (CODA® *High Throughput System Noninvasive Blood Pressure System*), os animais foram colocados em contensores e acondicionados em uma câmara aquecida, com um cuff de pulso pneumático acoplado na região proximal da cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinflado automaticamente, e o valor da pressão arterial sistólica foi obtido através dos sinais do transdutor acoplado a um computador. O procedimento foi realizado em cada animal individualmente, todos os dias de medição e obtiveram-se dez valores de pressão arterial (10 medições), sendo suficiente para análise. Ao menos cinco medidas válidas por animal foram utilizadas, e o valor de PAS foi dado como a média entre as cinco medidas validadas.

#### **4.10. ÍNDICES DE PESO CARDÍACO**

A hipertrofia do ventrículo esquerdo em hipertensos atenua o efeito da sobrecarga de pressão, determina uma adaptação miocárdica que resulta em aumento da massa ventricular, (MACIEL, 2001) que a hipertensão exerce sobre a parede do ventrículo esquerdo e eleva a função contrátil global do coração. Por outro lado, a sua presença está relacionada com maior aumento de risco cardiovascular expresso por insuficiência cardíaca e morte súbita. Inicialmente ela parece ser um mecanismo compensatório ao aumento da pós-carga, porém está associada a alterações estruturais e funcionais do miocárdio. Alguns autores, confirmado em estudos subsequentes, relacionam a massa do ventrículo esquerdo com a pressão arterial medida clinicamente (SILVA, R. P.; AMODEO; RAMIRES, 2002).

Os animais foram submetidos à jejum de 12 horas antes do procedimento de eutanásia, que ocorreu por meio de administração intraperitoneal de Cetamina (100mg/Kg) e Xilasina (10mg/Kg).

O sangue foi coletado através de punção cardíaca, logo após o animal atingir o plano anestésico, para análises do perfil lipídico e hematológico. Por fim os ratos foram sacrificados por aprofundamento do plano anestésico. Foi retirado o coração, e dividido em ventrículo direito e ventrículo esquerdo mais septo. Logo após, os ventrículos foram então pesados, utilizando uma balança de precisão, e os valores foram anotados,

descartando o peso do recipiente, para posterior análise. A medida do peso dos ventrículos foi analisada de acordo com Maciel, (2001), que descreve a hipertensão como fator de hipertrofia do ventrículo esquerdo atenuando o efeito da sobrecarga de pressão, determinando uma adaptação miocárdica que resulta em aumento da massa ventricular.

#### **4.11. PERFIL LIPÍDICO E HEMOGRAMA**

Para análises bioquímicas foi utilizado o Analisador Automático de Bioquímica BS120 (Bioclin – Mindray) indicado para hemograma. Os parâmetros analisados foram: contagem global de hemácias, leucócitos, plaquetas e dosagem de hemoglobina. Para determinação do colesterol foi utilizado o kit Colesterol Monoreagente K083 (Bioclin – Mindray), para quantificação do HDL, LDL e VLDL foi usado o kit HDL Direto K071 (Bioclin – Mindray), de acordo com as recomendações dos fabricantes. Os parâmetros lipídicos foram avaliados, pois de acordo com (MARTE; SANTOS, 2007), os níveis de HDL, LDL, VLDL podem influenciar no aumento da PA. Já os parâmetros sanguíneos foram avaliados, pois segundo KASAL; NEVES, (2011) são utilizados na detecção de processos inflamatórios, podendo eles acometerem a pressão arterial.

#### **4.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os resultados foram realizados como média  $\pm$  desvio padrão e analisados por meio de One-Way ANOVA ou Two-Way ANOVA seguidos pelo pós-teste de Tukey ou Sidak (indicados nas legendas das figuras). As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, E.U.A.) e consideradas significativas as diferenças: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Para a análise da composição centesimal, atividades inibitórias da ECA, atividade antioxidante pelo método DPPH os valores foram expressos com média  $\pm$  desvio padrão; para o ensaio *in vivo* do efeito anti-hipertensivo foi expresso como média  $\pm$  SD e média  $\pm$  SEM, p estimado múltiplos teste T de Student; para o peso corporal, lipidograma os valores são expressos como média  $\pm$

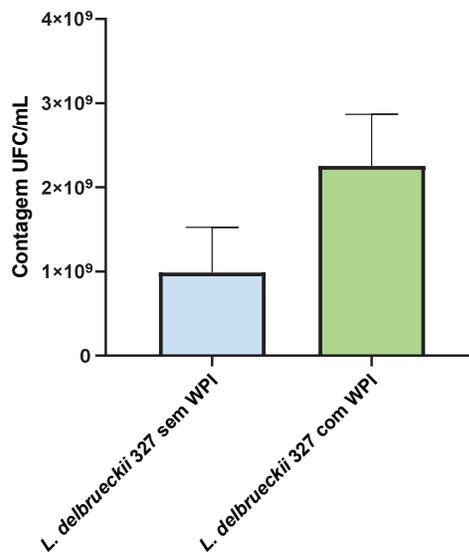
SEM, p estimado por ANOVA seguido do teste de múltipla comparação Tukey; para o peso dos ventrículos e rins os valores foram expressos por grupo, p estimado por ANOVA de duas vias e teste de comparações múltiplas de Sidak; para o hemograma e leucograma os valores foram expressos por animais, por grupo, p estimado por ANOVA de duas vias e teste de comparações múltiplas de sidak. Foram utilizados contagem de células para o leucograma.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. VIABILIDADE DA BACTÉRIA *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327 EM LEITE DESNATADO E SUPLEMENTADO COM *WHEY PROTEIN*

Após a realização do protocolo para verificação da viabilidade observou-se que a bactéria *L. delbrueckii* CNRZ 327 na bebida fermentada suplementado por *WPI* apresentou um crescimento da ordem de  $2,25 \times 10^9$  UFC/mL, comparado a bebida fermentada suplementado sem *WPI* que apresentou um crescimento de  $9,9 \times 10^8$  UFC/mL. Observamos que há uma menor quantidade de bactérias nas amostras sem *WPI*, porém não havendo diferença significativa entre elas. Os resultados estão apresentados na Figura 7.



**Figura 7:** Avaliação da viabilidade da bebida probiótica fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com e sem *Whey Protein* Isolado. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 6). \* p < 0,05 valor de p estimado pelo teste T de Student.

### 5.2. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E BIOATIVOS

A composição centesimal da bebida fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *WPI*, além dos seus respectivos controles, está descrita na tabela 4. Os parâmetros analisados foram umidade, proteína, lipídeos e lactose. Além disso, foram dosados os minerais cálcio e sódio. Os resultados apresentados na tabela 4 revelaram que não houve diferença significativa nos parâmetros analisados.

**Tabela 4:** Composição do leite fermentado por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementado com *Whey Protein* Isolado.

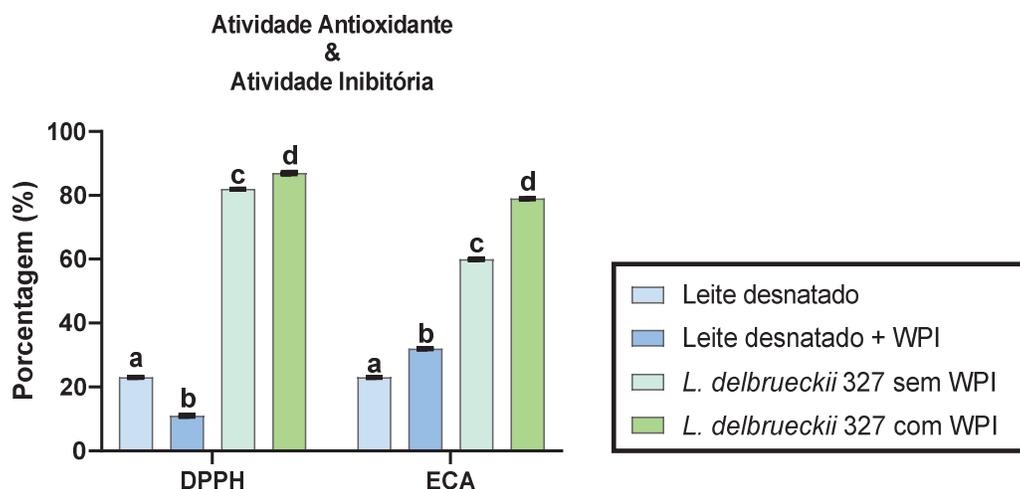
Amostras	Umidade	Proteína	Lipídeos	Lactose	Sódio (mg)	Cálcio (mg)
<i>L. delbrueckii</i>	86.7 ± 0.34 <sup>a</sup>	3.17 ± 0.98 <sup>a</sup>	3.41 ± 0.45 <sup>a</sup>	3.23 ± 0.12 <sup>a</sup>	50.2 ± 1.45 <sup>a</sup>	126.7 ± 1.20 <sup>a</sup>
<b>WPI</b>						
<i>L. delbrueckii</i>	87.2 ± 0.43 <sup>a</sup>	3.09 ± 1.02 <sup>a</sup>	3.49 ± 0.49 <sup>a</sup>	3.92 ± 0.13 <sup>a</sup>	46.7 ± 1.32 <sup>a</sup>	124.3 ± 1.80 <sup>a</sup>
<b>Leite desnatado + WPI</b>						
<b>Leite desnatado</b>	86.2 ± 0.44 <sup>a</sup>	3.19 ± 1.05 <sup>a</sup>	3.52 ± 0.56 <sup>a</sup>	4.52 ± 0.21 <sup>a</sup>	46.7 ± 1.32 <sup>a</sup>	122.4 ± 1.56 <sup>a</sup>
<b>Leite desnatado</b>	87.7 ± 0.71 <sup>a</sup>	3.02 ± 1.03 <sup>a</sup>	3.46 ± 0.43 <sup>a</sup>	4.57 ± 0.45 <sup>a</sup>	46.7 ± 1.32 <sup>a</sup>	120.4 ± 1.35 <sup>a</sup>

Os dados são expressos como a média ± desvio padrão de pelo menos três réplicas.

<sup>a-f</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras ( $p < 0.05$ ). Os valores de umidade, proteína, lipídeos, lactose são expressos em porcentagem (%). Cálcio e Sódio são expressos em mg/100 g.

### 5.3. ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE PROBIOATIVOS PRODUZIDOS *L. delbrueckii* CNRZ 327 SUPLEMENTADA COM OU SEM *WHEY PROTEIN* ISOLADO

Inicialmente, foram realizados testes *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante pelo método DPPH e atividades inibitórias da enzima conversora de angiotensina da bebida fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* Isolado (30% concentração). Os resultados estão apresentados na Figura 8.



**Figura 8:** Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH e atividades inibitórias da enzima conversora de angiotensina da bebida probiótica fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* Isolado. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 6$ ). As letras (a-d) e as suas combinações indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ). O leite desnatado e o leite desnatado com WPI foram usados como controle.

Analisando os resultados do gráfico observamos que o leite desnatado apresenta bioativos antioxidantes e inibidores da ECA, na concentração aproximada de 20%.

Com relação aos valores de DPPH a bebida fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com ou sem WPI foi capaz de produzir probioativos antioxidantes com valores significativos ( $p < 0.05$ ).

Observamos também que a bebida fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com WPI apresentou 86,5 %  $\pm$  0,26 de antioxidante, em relação a bebida sem suplementação, que apresentaram valores de 82,1% $\pm$ 0,05.

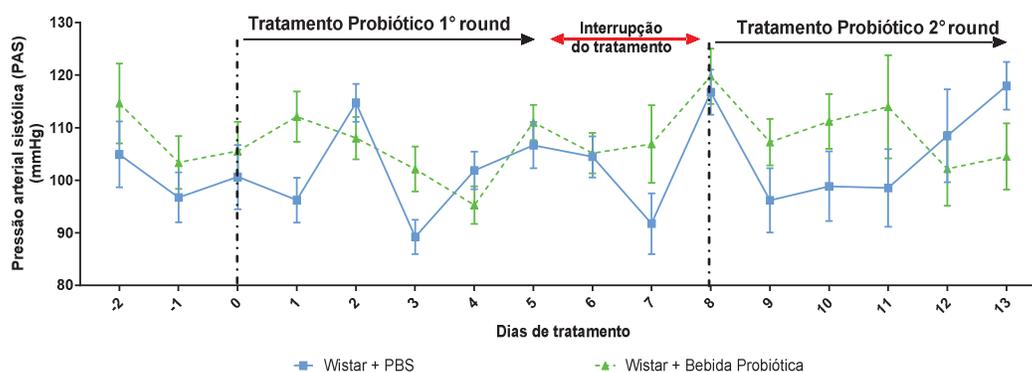
Quanto à produção dos probioativos capazes de inibir a enzima ECA a amostra da bebida fermentada pelo *L. delbrueckii* CNRZ 327 acrescida ou não de WPI foi capaz de produzir maior quantidade de probioativos, sendo esses valores significativos ( $p < 0.05$ ).

Com relação a bebida fermentada com suplementação de WPI obtivemos valores de 78,9%  $\pm$  0,11, enquanto a bebida fermentada sem suplementação revelou valores de 60,1% $\pm$  0,23, mostrando que a suplementação com WPI é capaz de aumentar a

produção tanto de probióticos inibidores de ECA, quanto de atividade antioxidante pelo *L. delbrueckii* CNRZ 327.

#### 5.4. ANÁLISE DA VARIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL NO ENSAIO IN VIVO

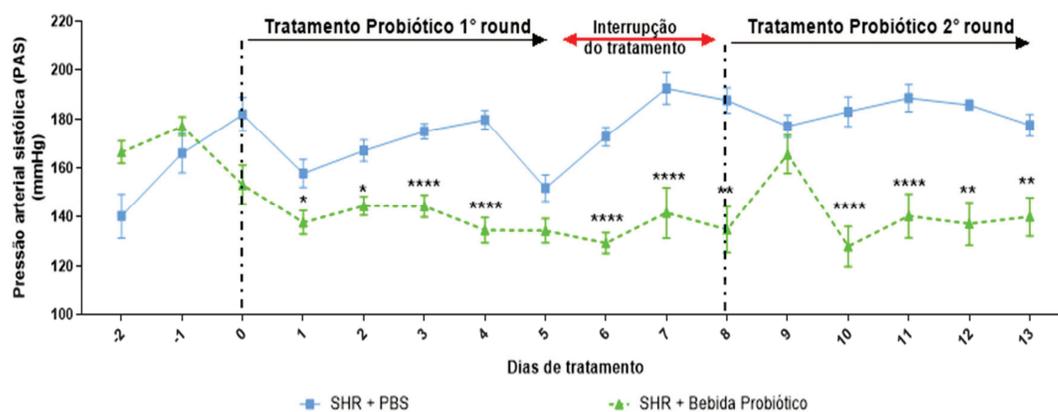
A figura abaixo demonstra a pressão arterial dos ratos Wistar ao longo do período experimental, durante os 14 dias de tratamento. Foi observado que não houve diferença significativa no grupo tratado ou não com a bebida probiótica. (Figura 9).



**Figura 9:** Efeito da administração diária de bebida probiótica fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* Isolado em ratos Wistar. A pressão arterial sistólica medida pela pletismografia do manguito de cauda em ratos Wistar. Os valores são expressos como média  $\pm$  SD (n = 3-6 ratos). \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001, valor de p estimado por múltiplos teste T de Student (Holm-Sidak) . O grupo Wistar+PBS foi utilizado como grupo controle.

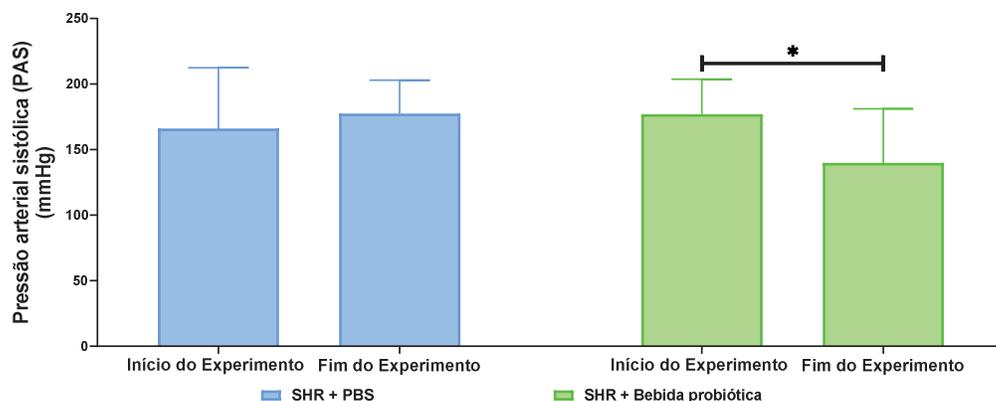
Na figura 10, observa-se a pressão arterial dos ratos SHR, ao longo dos 14 dias de tratamento com a bebida probiótica suplementada com *Whey Protein* Isolado. Nota-se uma diferença significativa (p <0,05) nos animais SHR tratados com a bebida fermentada a partir do 2º dia experimental, 137.49 $\pm$ 4.80 mmHg, quando comparados com os animais não tratados, 157.70 $\pm$ 5.74 mmHg. Os valores mínimos e máximos após o início do tratamento com a bebida fermentada, foram respectivamente, 127.88 $\pm$ 4.80 mmHg e 139.85 $\pm$ 7.83 mmHg. Para o grupo tratado com PBS, foram respectivamente,

157.70±7.74 mmHg e 188.50±5.54 mmHg. No 5º e 9º dia, não houve diferenças significativas.



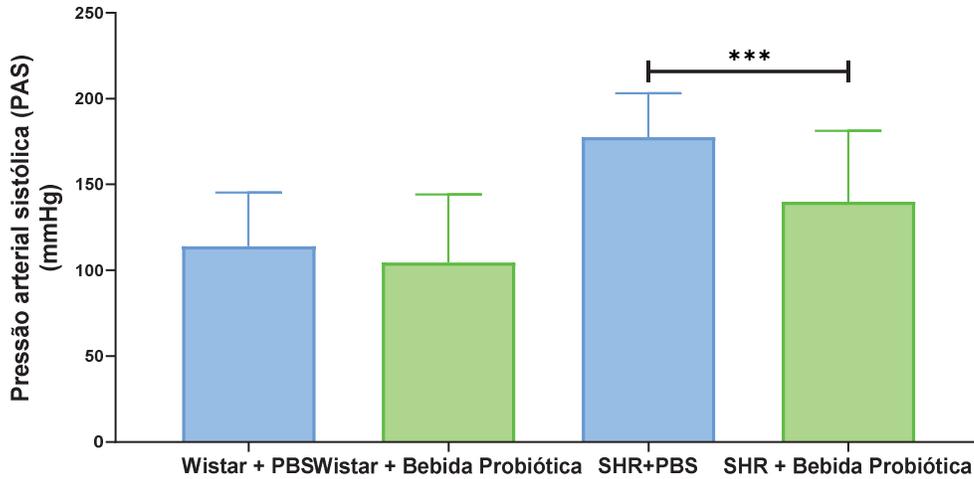
**Figura 10:** Efeito da administração diária de bebida probiótica fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* Isolado em ratos SHR. A pressão arterial sistólica medida pela pletismografia do manguito de cauda em ratos. Os valores são expressos como média ± SD (n = 3-6 ratos). \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001, valor de p estimado por múltiplos teste T de Student (Holm-Sidak). O grupo SHR+PBS foi utilizado como grupo controle.

A comparação entre o primeiro e último dia experimental (Figura 11), dos animais SHR, mostra que o grupo tratado com a bebida fermentada apresentou valores para a pressão arterial sistólica de 177.043±3.80 mmHg para o 1º dia experimental e 139.85±7.83 mmHg, para o último dia, apresentando uma redução significativa (p<0,05), na pressão arterial.



**Figura 11:** Efeito da administração diária de bebida probiótica fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* Isolado em ratos SHR. A pressão arterial sistólica (mmHg) medida pela pletismografia do manguito de cauda comparando o 1º dia experimental e o ultimo dia experimental nos ratos SHR que receberam ou não o tratamento com a bebida probiótica. Os valores são expressos como média  $\pm$  SD (n = 3-6 ratos). \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001, valor de p estimado pelo teste T de Student. O grupo Wistar+PBS foi utilizado como grupo controle.

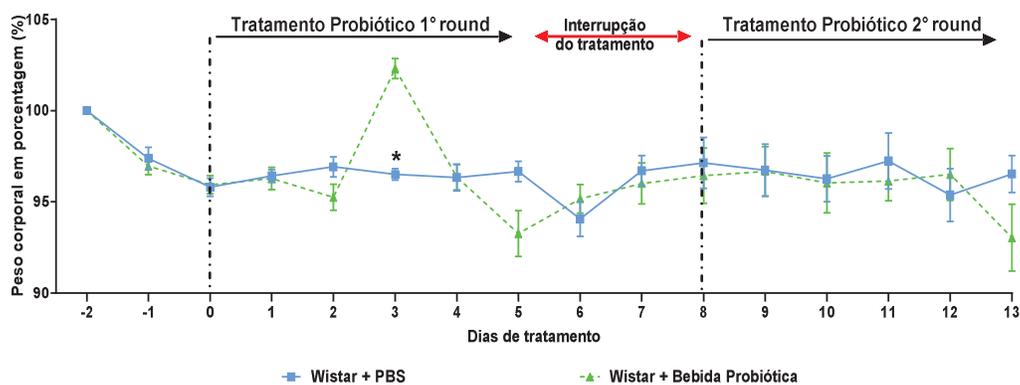
A Figura 12 representa todos os grupos analisados, com seus respectivos tratamentos, durante os quatorze dias experimentais. Podemos observar que não houve diferença significativa no valor da pressão sistólica média ( $114 \pm 5,13$  mmHg) para o grupo Wistar tratado com PBS, em comparação ao grupo Wistar tratado com a bebida probiótica ( $104,5 \pm 6,28$  mmHg). Contudo, há uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no valor da pressão sistólica média dos ratos SHR ( $177 \pm 4,5$  mmHg), em relação aos ratos espontaneamente hipertensos ( $139,9 \pm 7,8$  mmHg).



**Figura 12:** Administração de bebida probiótica diminui significante a medida PAS no 14 ° dia experimental. Os valores são expressos como média ± SEM (n = 3 ratos). \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001, valor de p estimado pelo teste T de Student. O grupo Wistar+PBS e SHR+PBS foram utilizados como grupos controles.

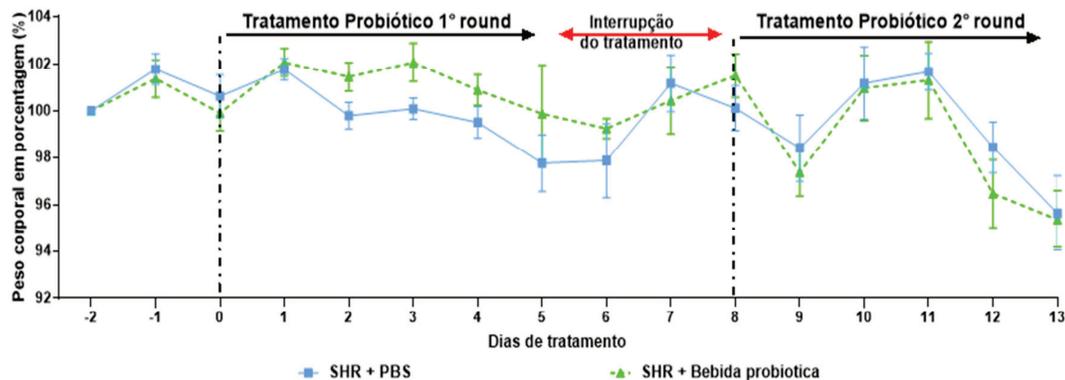
## 5.5. AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL

Com relação a variação do peso dos ratos Wistar tratados com a bebida probiótica, observamos que não houve diferença significativa (p < 0.05), quando comparados aos animais Wistar que não receberam tratamento (Figura 13).



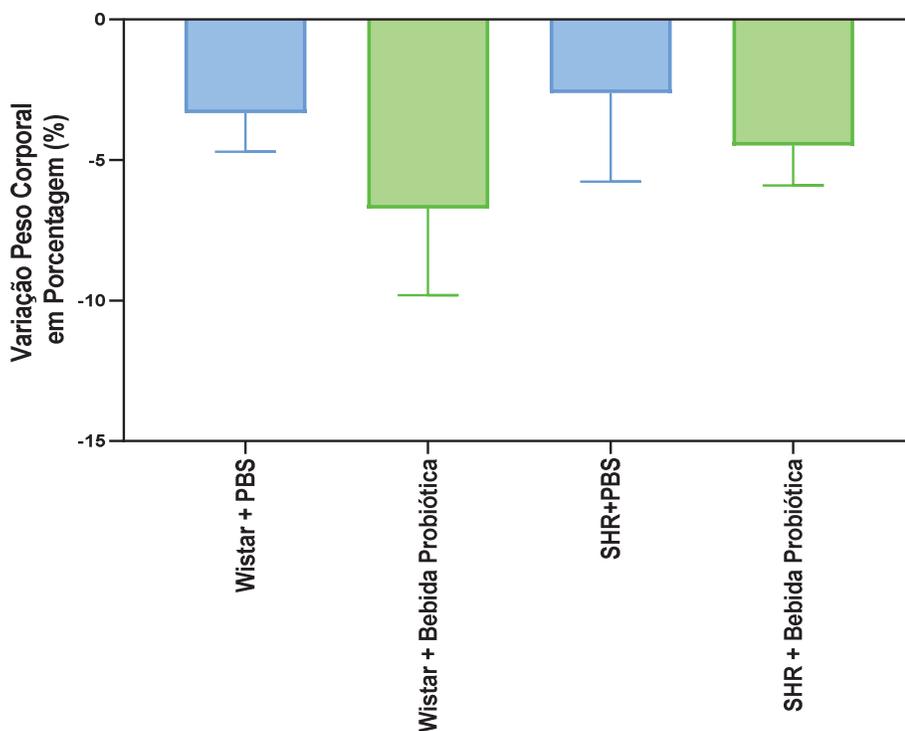
**Figura 13:** Efeito da administração diária de bebida probiótica fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* Isolado em ratos Wistar. Avaliação do peso corporal dos ratos usando balança de precisão. Os valores são expressos como média ± SEM (n = 3-6 ratos). \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001, valor de p estimado por múltiplos teste T de Student (Holm-Sidak). O grupo PBS foi utilizado como grupo controle.

O monitoramento dos ratos espontaneamente hipertensos tratados com a bebida fermentada (figura 14) mostra também que não houve diferenças significativas no peso desses animais, quando comparados ao grupo que não recebeu tratamento.



**Figura 14:** Efeito da administração diária de bebida probiótica fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* Isolado em ratos SHR. Avaliação do peso corporal dos ratos usando balança de precisão. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM (n = 3-6 ratos). \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001, valor de p estimado por múltiplos teste-t de Student (Holm-Sidak). O grupo PBS foi utilizado como grupo controle.

A Figura 15 representa todos os grupos analisados, com seus respectivos tratamentos, durante os quatorze dias experimentais. Observa-se que entre o primeiro dia experimental e o último dia experimental, não houve alteração significativa em relação a todos os grupos Wistar e SHR, tratados ou não com a bebida probiótica.



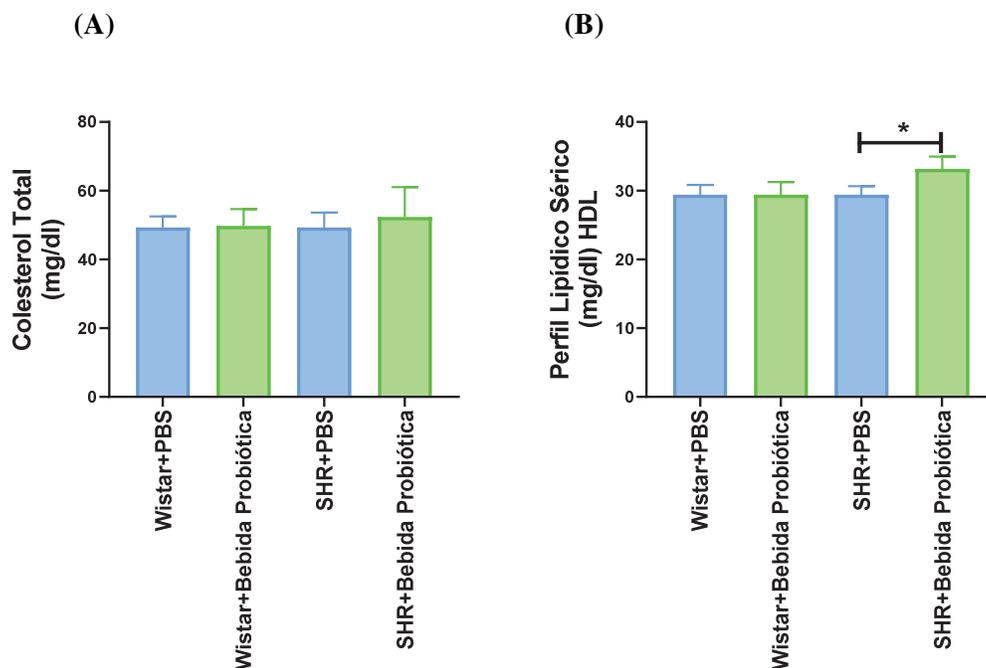
**Figura 15:** Efeito da administração diária de bebida probiótica fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* Isolado em ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Avaliação do peso corporal dos ratos usando balança de precisão. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM (n = 3-6 ratos). \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001, valor de p estimado pelo teste T de Student. O grupo PBS (Wistar ou SHR) foi utilizado como grupo controle.

## 5.6. PERFIL LIPÍDICO

Foram analisados colesterol total e suas frações séricas de colesterol HDL, LDL e VLDL das amostras de sangue dos animais que receberam ou não a bebida fermentada *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* (30% concentração).

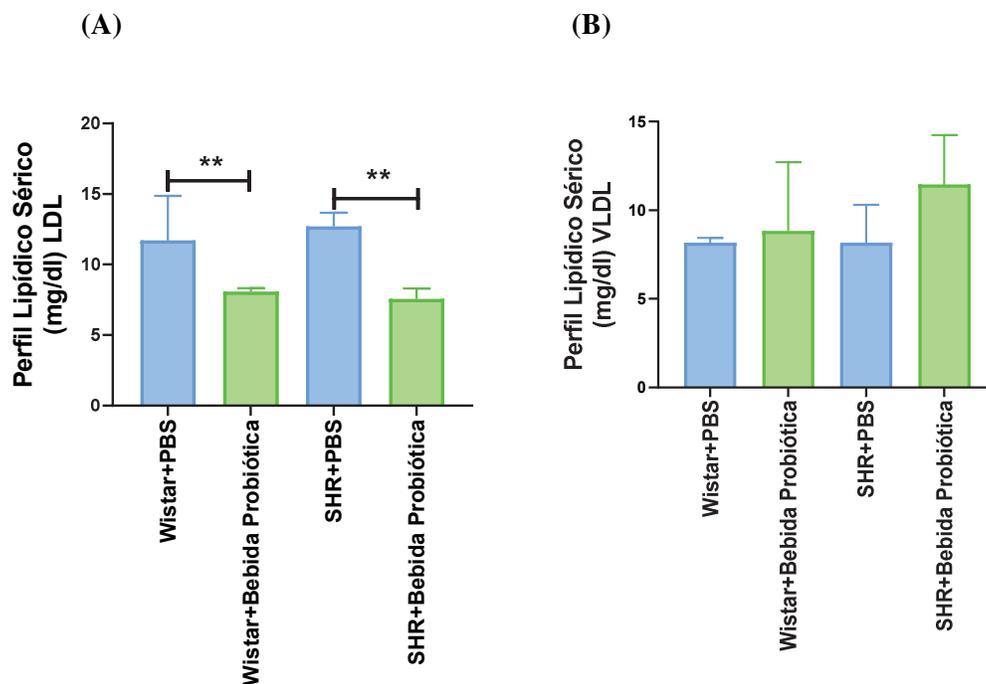
Na análise do perfil lipídico, após a administração da bebida fermentada *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* (30% concentração) não houve diferença significativa nos dados obtidos para o colesterol total (figura 16 A) dos ratos SHR e Wistar tratados ou não pela bebida probiótica. Porém, evidenciamos um aumento significativo (p <0,05) no valor de HDL (11.45 $\pm$ 2.78 mg/dL) (figura 16 B) no grupo de ratos SHR tratado com a bebida probiótica em relação ao grupo SHR que

recebeu PBS ( $8.16 \pm 2.15 \text{ mg/dL}$ ). No grupo Wistar não houve diferença significativa entre os grupos analisados.



**Figura 16:** Efeito da administração diária de bebida probiótica fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* Isolado em ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos. Os exames de colesterol total (soma de todos os valores de colesterol) (figura A) e frações HDL (figura B) são realizados através da coleta de amostra de sangue dos animais, para determinar o risco de doenças cardiovasculares. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM ( $n = 3-6$  ratos). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , valor de  $p$  estimado pelo teste T de Student. O grupo PBS (Wistar ou SHR) foi utilizado como grupo controle.

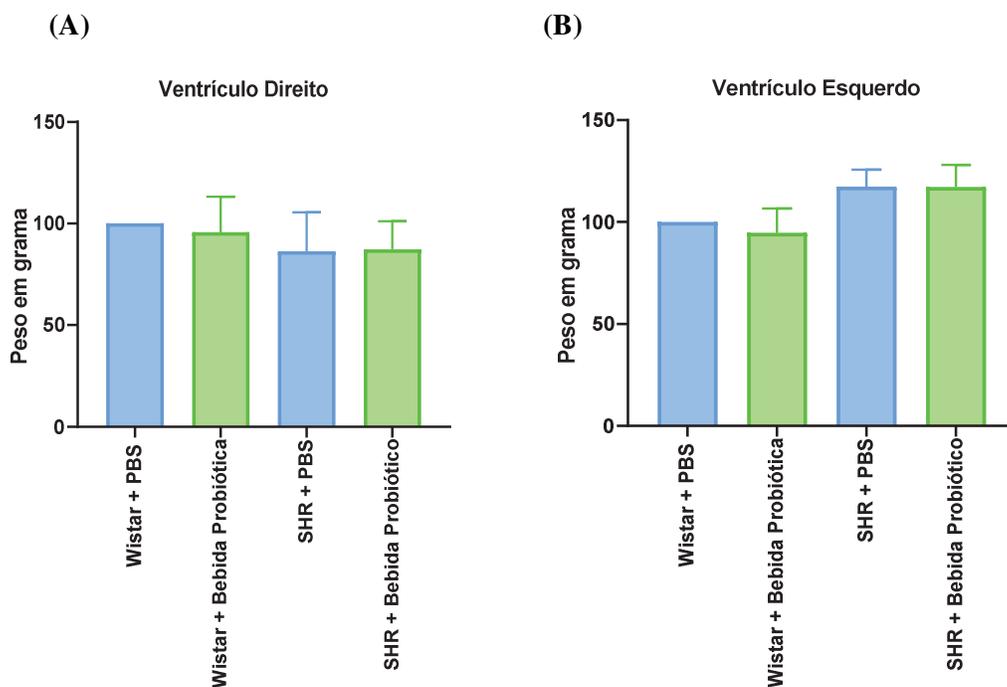
Na análise do perfil lipídico LDL (figura 17 A) observa-se uma redução significativa ( $p < 0,01$ ) após a administração da bebida fermentada *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* (30% concentração) em ambas as linhagens dos ratos Wistar e SHR,  $8.06 \pm 0.26 \text{ mg/dL}$  e  $7.55 \pm 0.76 \text{ mg/dL}$ , respectivamente. Na análise da fração VLDL (figura 17 B) não houve diferença significativa observada entre os grupos analisados.



**Figura 17:** Efeito da administração diária de bebida probiótica fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* Isolado em ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos. Os exames de frações (subtipos do colesterol) LDL (figura A) e VLDL (figura B) são realizados através da coleta de amostra de sangue dos animais, para determinar o risco de doenças cardiovasculares. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM (n = 3-6 ratos). \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001, valor de p estimado pelo teste T de Student. O grupo PBS (Wistar ou SHR) foi utilizado como grupo controle.

## 5.7. ÍNDICE DE PESO CARDÍACO

Com relação a pesagem do coração, separados em ventrículo direito e ventrículo esquerdo, não houve diferença significativa a ser considerada nas análises dos pesos dos ventrículos direito (figura 18 A) e esquerdo (figura 18 B), tanto nos ratos SHR, quanto nos ratos Wistar que receberam ou não tratamento.



**Figura 18:** Efeito da administração diária de bebida probiótica fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* Isolado em ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos nos ventrículos direito (figura A) e esquerdo (figura B). Os valores são expressos por grupo (n = 6 ratos). \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001, valor de p estimado pelo teste T de Student. O grupo PBS (Wistar ou SHR) foi utilizado como grupo controle.

## 5.8. HEMOGRAMA

Para monitorar o padrão sanguíneo, amostras de sangue foram coletadas no dia da eutanásia dos animais. Não houve diferença significativa a ser considerada nas análises de hemoglobina, plaquetas e hemácias (Tabela 5).

Durante todo o período experimental da administração diária de bebida probiótica fermentada por *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* (30% concentração) nos ratos Wistar e SHR, para análise dos leucócitos total e diferencial, que são células responsáveis pela defesa do organismo.

Pode-se notar que não houve diferença significativa nos valores de leucócitos total e diferenciais: Neutrófilo, Monócitos, Eosinófilo e Linfócitos, comparando-se os grupos controles com os grupos tratados (Tabela 5).

**Tabela 5:** Efeito da administração diária de bebida probiótica fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* Isolado (30% concentração) em ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos no sistema imunológico, número de leucócitos total e diferencial.

GRUPOS	Wistar + PBS		Wistar + Bebida Probiótica		SHR + PBS		SHR + Bebida Probiótica	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
HEMOGLOBINA (g/dL)	16,6	3,096	16,05	1,223	16,2	8,817	16,38	2,678
PLAQUETAS (10 <sup>3</sup> /µL)	242,3	61,23	284,2	96,27	213	111,7	273,8	55,39
HEMÁCIAS (10 <sup>6</sup> /µL)	7,463	1,348	7,495	0,6596	8,482	4,624	10,61	5,036
LEUCÓCITO TOTAL (10 <sup>3</sup> /µL)	6,883	1,734	6,333	1,808	6,1	1,349	5,5	0,728
NEUTRÓFILO (%)	1218	495,5	1538	357,5	2115	476,1	2975	2127
EOSINÓFILO (%)	66,67	13,05	55,33	8,737	66,33	1,155	120,7	98,15
LINFÓCITOS (%)	5673	2135	4762	1533	4262	718,5	4082	576
MONÓCITOS (%)	90	81,26	16	27,71	44	38,12	0	-

Para análise do leucograma os valores são expressos por animais, por grupo. \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001, p estimado por ANOVA de duas vias e teste de comparações múltiplas de sidak. O grupo PBS (Wistar ou SHR) foi utilizado como grupo controle. Não foram encontradas diferenças significativas. Contagem de células para o leucograma.



## 6. DISCUSSÃO

A patogênese da hipertensão é multifatorial e altamente complexa. A doença envolve a interação de múltiplos sistemas orgânicos e numerosos mecanismos de vias independentes ou interdependentes. Os fatores que desempenham um papel importante na patogênese da hipertensão incluem genética, ativação de sistemas neuro-hormonais, como o sistema nervoso simpático, obesidade e aumento da ingestão de sal na dieta. Além disso, o sistema renina-angiotensina-aldosterona é considerado um importante fator de regulação da pressão arterial, através de peptídeos inibidores da ECA (CALZERRA; GOMES; QUEIROZ, 2018).

De acordo com WHO, (2002) e HILL *et al*, (2014), um dos requisitos para promulgar os efeitos terapêuticos das linhagens probióticas é de estarem em quantidades adequadas durante sua ingestão. A ANVISA, determina que um produto probiótico precisa conter uma quantidade mínima inicial de  $10^8$ - $10^9$  UFC/dose diária do produto (BRASIL, 2008). Diante disso, produtos como *Whey Protein* Isolado, podem ser adicionados aos produtos que serão fermentados pela bactéria, e assim auxiliarem na sobrevivência dessas, devido sugerirem que o leite desnatado suplementado com *WPI* é uma matriz de proteção efetiva para as diversas linhagens probióticas (CORDEIRO *et al.*, 2018).

Em nosso estudo, a bebida fermentada por *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* (30% concentração) mostrou uma população de  $4,5 \times 10^9$  UFC em 2 mL, enquanto que a bebida fermentada suplementado sem *WPI* apresentou uma população de  $9,9 \times 10^8$  UFC/mL, ambas atendendo assim as exigências estabelecidas pela ANVISA (BRASIL, 2008). Sugerimos que o aumento da viabilidade da bactéria poderia ser decorrente do ambiente rico em nutrientes (carboidratos, cálcio, aminoácidos) ocasionado pela presença do leite e do *WPI* nas formulações avaliadas. De acordo com Pescuma *et al.*, (2007) a linhagem de *L. delbrueckii bulgaricus* quando cultivada em soro de leite obteve resultados ( $10^9$  UFC) semelhantes ao encontrado no nosso estudo.

A composição centesimal foi avaliada tomando como base as recomendações da Anvisa e de acordo com o Ministério da Agricultura e abastecimento do Brasil, 2003, que determina que as especificações do produto devem constar nos seus rótulos, além

de atender também às solicitações da Organização Mundial da Saúde, que tornou obrigatória a declaração do valor energético e teores de proteína, carboidrato, gordura total, gordura trans, gordura saturada, fibra alimentar e sódio nos produtos alimentícios embalados para consumo humano (BRASIL, 2006).

Os valores de proteína correspondentes à composição da bebida fermentada por *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* Isolado (30% concentração), foi de 3,17g, o que condiz com a legislação, a qual recomenda uma ingestão mínima de 1,7g/100g de proteína de origem láctea (BRASIL, 2006). Os teores de proteína encontrados para a bebida probiótica foram superiores ao valor mínimo preconizado pela legislação vigente para bebida láctea fermentada com adição de produtos ou de substâncias alimentícias (BRASIL, 2006). Diante do exposto, a nossa bebida fermentada mostra-se importante, pois fornece proteínas de origem láctea, que são de alto valor nutricional, devido a presença dos aminoácidos essenciais, além de liberarem no organismo, durante o processo digestivo ou tratamento enzimático, peptídeos bioativos, com diversos efeitos benéficos para a saúde.

Referente ao teor de lipídeos, a legislação vigente para bebida láctea fermentada não faz menção quanto à sua recomendação (BRASIL, 2006). No geral, as bebidas lácteas disponíveis no comércio possuem baixos teores de gordura. O conteúdo de gordura dos diferentes tipos de bebidas lácteas varia de 0,1% a 10% (THAMER; PENNA, 2006). O teor de lipídeo encontrado nesta pesquisa foi de 3.41g/100g do produto que está de acordo com o que sugere a legislação nacional do produto (BRASIL, 2006). Dessa forma, nossa bebida fermentada possui baixo teor de gordura o que é benéfico para a HA, visto que alimentação saudável é uma das recomendações de prevenção e tratamento dessa patologia.

No nosso estudo encontramos também na composição centesimal valores de umidade de 86,7g. Valores semelhantes também para umidade foram demonstrados por Cunha *et al.*, (2008) ao avaliarem as propriedades físico-químicas de bebidas lácteas, com 70% de leite e 30% de soro, o qual obteve um valor médio de 81,91%. O teor de umidade determina a preservação do alimento (CUNHA *et al.*, 2008), o que demonstra que nossa bebida fermentada está de acordo com o teor de umidade encontrados em outras bebidas lácteas.

Os produtos lácteos contêm diversos eletrólitos, que podem afetar a pressão sanguínea, tendo como exemplo o cálcio, magnésio, potássio e sódio. A suplementação de cálcio atenua o desenvolvimento de hipertensão nos SHR (SIPOLA *et al.*, 2001). Na análise da bebida fermentada do nosso estudo foi encontrado 126,7mg de cálcio. Já o consumo de sódio por humanos segue a recomendação da Organização Mundial da Saúde, determina que seja de apenas 5g por dia (1 colher de chá) de sódio. No presente estudo foi encontrado 50,2mg de sódio na bebida probiótica, o que está de acordo com a recomendação de consumo diário, sendo esta, portanto, apropriada para o consumo de indivíduos que padecem da referida patologia.

Outra análise feita foi a de concentração de lactose, que na nossa pesquisa foi encontrado o valor de 3,23g. Valores semelhantes (3,05g a 3,51g) foram também observados no estudo de CABRAL *et al.*, (2018) ao analisar sua bebida probiótica fermentada. Entre os efeitos benéficos decorrentes do consumo de microrganismos probióticos, destaca-se a diminuição dos sintomas da má absorção da lactose (SIMONE JOVENASSO MANZONI; CAVALLINI; ROSSI, 2009). Os processos de fermentação pelas bactérias do ácido lático que metabolizam a lactose formando moléculas de ácido lático elevam a acidez do produto. A maioria dos indivíduos intolerante à lactose pode consumir, sem causar sintomas característicos, apenas 6g por porção. Sua concentração no leite varia de acordo com a espécie, tendo o leite humano cerca de 7,5% e no leite de vaca 5% de lactose (TERRA, 2007). Assim, nossos resultados demonstram que a bebida probiótica proposta pode ser consumida por pessoas intolerantes a lactose.

Face aos relatos acima, a bebida probiótica proposta neste trabalho, atende as recomendações da Anvisa e do Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil.

Estudos preliminares mostram também que bactérias probióticas ou seus produtos fermentados podem exercer um papel no controle da pressão arterial (SAAD, 2006). Diversos pesquisadores levantaram a hipótese de que alguns peptídeos formados através da hidrólise de proteínas alimentares possuem a capacidade de inibir a ECA (FITZGERALD *et al.*, 2004; HARTMANN e MEISEL, 2007; KORHONEN, 2009; CRUZ, 2015). Os produtos lácteos contendo peptídeos inibidores da ECA podem proporcionar uma abordagem útil na prevenção e ou tratamento da hipertensão.

As amostras de bebida fermentada pela cepa *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com e sem WPI foram submetidas ao ensaio de quantificação de

bioativos inibidores da ECA. Foi observado que a linhagem de *L.delbrueckii* CNRZ 327 é capaz de produzir peptídeos inibidores de ECA quando fermenta o leite desnatado suplementado ou não com o *Whey Protein* Isolado. Além disso, a presença de *WPI* aumenta a produção desses peptídeos. De acordo com YAMAMOTO; AKINO; TAKANO, (1994) a linhagem de *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* apresentou maior atividade de IECA em relação a outras cinco linhagens de *Lactobacillus* comparados. Em outro estudo realizado por Donkor *et al.*, (2007) foi relato que na linhagem *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* em matriz láctea apresentou uma atividade inibitória da ECA aumentada de 70% para 90% durante o período de armazenamento do produto, sugerindo que as proteínas da matriz láctea (caseína) é fonte de aminoácidos para a produção de peptídeos bioativos inibidores da ECA. Em nosso trabalho sugerimos que a caseína presente no leite e os aminoácidos presentes no *WPI* atuaram como matéria prima para a produção dos peptídeos inibidores da ECA produzidos pela linhagem de *L. delbrueckii* CNRZ 327.

Com relação a produção de peptídeos antioxidantes foi observada uma alta atividade na formulação testada. Sugerimos que o *WPI* provavelmente promove um aumento da proteólise causada pela bactéria probiótica *L.delbrueckii* 327. A atividade antioxidante também é encontrada nas proteínas do soro de leite (TAVARES, T. G.; MALCATA, 2013). A ingestão de suplementos antioxidantes ou alimentos que possuam antioxidantes pode diminuir os danos ao organismo humano como as inflamações geradas pela hipertensão (WANG *et al.*, 2006).

Face às observações na literatura e verificado os dados da análise dos biotivos do nosso estudo, vimos que a bebida fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com *Whey Protein* (30% concentração) apresentou aumento significativo de atividade inibitória da ECA, bem como a atividade antioxidante, que nos levou a avaliar seu potencial anti-hipertensivo em modelo de ratos SHR.

Nos resultados obtidos nos experimentos *in vivo*, quando avaliamos a pressão arterial em um modelo de experimentação consolidado e amplamente utilizado na obtenção de informações a respeito da hipertensão arterial humana, consolidamos que a bebida probiótica suplementada com *WPI* reduziu a PA dos ratos SHR. Pins e Keenan, (2004) em seu estudo analisaram o efeito de um hidrolisado probiótico em proteínas do soro e verificaram que sua utilização diminuiu significativamente a pressão sanguínea,

tanto sistólica como diastólica, através da inibição da ECA em humanos. Em outro estudo, realizado durante oito semanas, os autores constataram que a administração de leite fermentado, enriquecido com *Whey Protein*, reduziu significativamente a pressão sanguínea sistólica em humanos (KAWASE et al., 2000; HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006). Nossos resultados sugerem que a produção dos peptídeos inibidores da ECA, pela linhagem *L. delbrueckii* CNRZ 327 presentes na bebida proposta nesse trabalho, juntamente com os efeitos anti-hipertensivos e antiinflamatórios do leite suplementado com *WPI* foram os possíveis responsáveis pela redução da PA nos ratos SHR utilizados nesse experimento.

Quando avaliamos se a formulação probiótica testada era capaz de interferir no peso dos animais, observamos que houve uma redução em ambos os grupos analisados, mas sem significância ou correlação com os resultados encontrados na PAS, sugerindo que possa ter ocorrido excesso de estresse devido ao procedimento utilizado na medição da PA.

No perfil lipídico observado no nosso estudo, nota-se que os ratos SHR que receberam a bebida probiótica proposta neste trabalho tiveram os níveis de HDL aumentados e os níveis de LDL diminuídos. De forma semelhante aos resultados encontrados no presente trabalho, Pereira, Gibson, (2002) relatou uma redução dos níveis de Colesterol total, LDL e triglicérides, demonstrando então, que a administração desses microrganismos auxilia nos processos metabólicos relacionados ao colesterol, possivelmente através da produção de AGCC via fermentação de alimentos não digeríveis no intestino que levam à reduções sistêmicas de lipídeos circulantes com inibição de síntese de colesterol hepático e/ou da redistribuição do colesterol do plasma para o fígado, o que explicaria os resultados encontrados no presente estudo que demonstraram uma redução nesses parâmetros, bem como aumento do HDL.

Sabe-se ainda, que na literatura médica humana os níveis aumentados de LDL causam aterosclerose, que geram doenças cardiovasculares graves, que aparece como uma das principais causas da HA (TAVARES, R. M. S., 2019), já a redução nos níveis de HDL são benéficas para a saúde humana, pois previne a aterosclerose e outras doenças cardiovasculares, sendo nossos resultados benéficos para redução de fatores de risco para a hipertensão arterial.

A redução da pressão arterial também está associada a alguns peptídeos derivados da proteína do leite por fermentação probiótica, uma vez que esses peptídeos têm ação hipotensora e operam no sistema renina-angiotensina com potencial inibidor da ECA e efeito redutor da pressão arterial (SPERRY *et al.*, 2018).

Sugerimos que os resultados obtidos no perfil lipídico (HDL e LDL) podem ter colaborado com a redução da PA nos ratos SHR tratados com a bebida probiótica fermentada por *L. delbrueckii* CNRZ 327 suplementada com WPI.

No presente estudo também avaliamos a variação do peso dos ventrículos, onde não foi observado relação significativa entre os grupos testados.

Por último, analisamos o perfil hematológico e verificamos que tanto os ratos SHR, quanto os Wistar que receberam ou não a bebida probiótica proposta neste trabalho não apresentaram alterações sistêmicas. É de conhecimento que os leucócitos desempenham um papel fundamental em várias doenças cardiovasculares, porém os nossos resultados não foram consistentes com os encontrados na literatura, que de acordo com o estudo de Schmid-Schönbein *et al.*, (1991) a contagem total de leucócitos nos ratos hipertensos estava 50-100% acima dos controles, além disso, o número de monócitos, monócitos ativados e a contagem de linfócitos também tiveram seus valores elevados, em relação aos valores nos Wistar-Kyoto. Lima e colaboradores, (2014) relatam que os valores de referência devem ser avaliados de acordo com os diversos métodos de coleta do sangue, do tipo de anestésico utilizado. Isso pode explicar algumas diferenças de faixa de valores. As diferenças também podem estar relacionadas com a ausência de padronização quanto à dieta, tempo de jejum e estresse durante a coleta, aos quais os animais foram submetidos. Ainda foi dito, que os resultados só podem ser generalizados em determinadas condições específicas de estudo, com a mesma linhagem de ratos, idade e dieta, assim como a metodologia, que podem interferir nos resultados.



## 7. CONCLUSÕES

Concluimos que a formulação probiótica proposta segue as recomendações de viabilidade bacteriana impostas pela Anvisa.

Além disso, a formulação probiótica está de acordo com as regulamentações do Ministério da Agricultura e Pecuária em relação a sua composição centesimal, além de sugerirem seu efeito anti-hipertensivo.

Também concluimos que a linhagem *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327 foi capaz de produzir bioativos com alto potencial de inibição da ECA e potencial antioxidante em matriz láctea suplementada com *WPI*.

Nos ensaios *in vivo*, a bebida probiótica proposta foi capaz de reduzir a pressão sistólica em ratos espontaneamente hipertensos.

A bebida probiótica parece ter sido capaz de diminuir os níveis de LDL e aumentar os níveis de HDL, podendo constituir uma alternativa viável para o auxílio do controle e prevenção das dislipidemias e conseqüente redução do risco de doenças cardiovasculares. Estudos adicionais são necessários para determinar o mecanismo envolvido neste efeito.

Além disso, é essencial comparar nossa formulação probiótica com os medicamentos clássicos usados no controle da hipertensão em um estudo mais amplo.

Em conclusão, sugiro que a bebida probiótica desenvolvida nesse trabalho possui potencial anti-hipertensivo no modelo animal analisado, porém se faz necessário elucidar outros efeitos anti-hipertensivos.



## 8. PERSPECTIVAS

-Avaliar a viabilidade da bactéria nos ensaios que simulam a passagem no tratogastrointestinal;

-Avaliar o perfil hematológico completo dos animais antes e após administração do probiótico;

-Verificar a modulação da microbiota intestinal após a administração da bebida probiótica e sua correlação com os resultados encontrados;

-Avaliar a expressão relativa de genes relacionados às respostas inflamatórias no ventrículo e no colón dos animais;

-Avaliar a presença de GABA nas bebidas probióticas, devido seu efeito hipotensor;

-Identificar os peptídeos da ECA da bebida probiótica;

-Comparar os efeitos hipotensores da formulação probiótica com grupos experimentais controles administrando medicamentos anti-hipertensivos como, por exemplo, o captopril; além dos controles do leite desnatado e leite desnatado suplementado com *WPI*;

-Analisar a pressão diastólica dos animais;

-Avaliar a expressão relativa de genes (ACE; eNOS; iNOS; TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ; IL-10; TLR 4) relacionados às repostas inflamatórias nos ventrículos, rins e no colón dos animais.



## 9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### - ARTIGOS PUBLICADOS

- ✓ Doença do refluxo gastroesofágico: principais orientações proferidas pelo enfermeiro ao cuidador familiar de crianças entre 0 e 2 anos de vida

Autores: Karla Rona da SILVA, Alessandra Gomes **FIGUEIROA**, Claudia Cristina Marques MENDES, Joyce Carolina Lellis da CRUZ, Rhayenne Luiza de FREITAS  
DOI: [HTTP://DX.DOI.ORG/10.15601/2238-1945/PCNB.V5N9P11-20](http://dx.doi.org/10.15601/2238-1945/PCNB.V5N9P11-20)

- ✓ Prato cheese containing *Lactobacillus casei* 01 fails to prevent DSS-induced colitis

Autores: Barbara F Cordeiro, Luisa Lemos, Emiliano Rosa Oliveira, Sara Heloisa da Silva, Bruna M Savassi, Alessandra G **Figueiroa**, Ana Maria C Faria, Enio Ferreira, Erick A Esmerino, Adriano G Cruz, Fillipe Luiz Rosa do Carmo, Vasco Azevedo

- ✓ Probiotic *Propionibacterium freudenreichii* requires SlpB protein to mitigate mucositis induced by chemotherapy

Autores: Fillipe Luiz Rosa do Carmo, Houem Rabah, Barbara Fernandes Cordeiro, Sara Heloisa da Silva, Rafaela Miranda Pessoa, Simone Odília Antunes Fernandes, Valbert Nascimento Cardoso, Valérie Gagnaire, Martine Deplanche, Bruna Savassi, Alessandra **Figueirôa**, Emiliano Rosa Oliveira, Caio César Fonseca, Maria Izabel Alves Queiroz, Núbia Moraes Rodrigues, Sávio Henrique de Cicco Sandes, Álvaro Cantini Nunes, Luisa Lemos, Juliana de Lima Alves, Ana Maria Caetano Faria, Ênio Ferreira, Yves Le Loir, Gwénael Jan, Vasco Azevedo

### -ARTIGOS EM REDAÇÃO

- ✓ Avaliação da atividade anti-hipertensiva de uma bebida probiótica em ratos espontaneamente hipertensos.

## **-PARTICIPAÇÕES**

- ✓ Workshop “DEVELOPMENT, LOCK-INS, TRAPS AND CATCH UP: India, China, South Africa, South Korea and Latin America”.
- ✓ Seminário Comemorativo: Os 10 anos de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual da UFMG.
- ✓ International Meeting LIA (2018) – Bct-Inflam.
- ✓ International Meeting LIA (2019) – Facing bacterial determinants involved in pro or anti-inflammatory processes in various contextsFacing bacterial.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, N. M. DE. *Efeitos hemodinâmicos, inflamatórios e histológicos após a exposição à exaustão do combustível diesel em modelo experimental de hipertensão arterial*. 2017. Mestrado em Fisiopatologia Experimental – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-25102017-111256/>>. Acesso em: 8 maio 2020.
- ALVIM, L. B. Segurança e Efeito Probiótico de *Weissella paramesenteroides* WpK4 Isolada de Suíno na Infecção Experimental com *Salmonella Typhimurium* em camundongos. p. 97, 2015.
- AMARAL, G. V. *et al.* Whey-grape juice drink processed by supercritical carbon dioxide technology: Physicochemical characteristics, bioactive compounds and volatile profile. *Food Chemistry*, v. 239, p. 697–703, 15 jan. 2018.
- ANDRÉ RODRIGUES DURÃES. *O sistema renina-angiotensina-aldosterona versus a infecção pelo coronavírus 2019*. Disponível em: <<https://pebmed.com.br/o-sistema-renina-angiotensina-aldosterona-versus-a-infeccao-pelo-coronavirus-2019/>>. Acesso em: 16 jun. 2020.
- ASHAR, M. N.; CHAND, R. *Antihypertensive peptides purified from milks fermented with Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. 2004 Disponível em: <[/paper/Antihypertensive-peptides-purified-from-milks-with-Ashar-Chand/6a86cc71da9f5f281c806bf151c268a5af06d4fc](http://paper/Antihypertensive-peptides-purified-from-milks-with-Ashar-Chand/6a86cc71da9f5f281c806bf151c268a5af06d4fc)>. Acesso em: 20 jul. 2020.
- BARUZZI, F. *et al.* Development of a Synbiotic Beverage Enriched with Bifidobacteria Strains and Fortified with Whey Proteins. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00640/full>>. Acesso em: 9 jul. 2020.
- BATISTA, A. L. D. *et al.* Quality parameters of probiotic yogurt added to glucose oxidase compared to commercial products through microbiological, physical–chemical and metabolic activity analyses. *Food Research International*, v. 77, p. 627–635, 1 nov. 2015.
- BUSANELLO, M. Probióticos, seus modos de ação e a produção animal. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 11, n. 4, p. 14–24, 2012.
- C. SINDHU, S.; KHETARPAUL, N. Effect of feeding probiotic fermented indigenous food mixture on serum cholesterol levels in mice. *Nutrition Research - NUTR RES*, v. 23, p. 1071–1080, 1 ago. 2003.
- CABRAL, N. DE S. M. *et al.* Desenvolvimento e avaliação microbiológica e físico-química de bebida probiótica fermentada sabor chocolate. *Brazilian Journal of Food Research*, v. 9, n. 2, p. 52–63, 31 dez. 2018.
- CALZERRA, N. T. M.; GOMES, C. F.; QUEIROZ, T. M. DE. Aspectos fisiopatológicos da hipertensão arterial dependente de angiotensina II: revisão integrada da literatura. *Acta Brasiliensis*, v. 2, n. 2, p. 69–73, 28 maio 2018.

- CAPPATO, L. P. *et al.* Ohmic heating in dairy processing: Relevant aspects for safety and quality. *Trends in Food Science & Technology*, v. 62, p. 104–112, 1 abr. 2017.
- CARMO, F. L. *et al.* *Applications of Probiotic Bacteria and Dairy Foods in Health*. [S.l: s.n.], 2017.
- CAVALCANTE, R. G. S. *Administração oral de Lactobacillus fermentum 296 reduz a pressão arterial via inibição do tônus simpático e melhora os parâmetros metabólicos em ratos dislipidêmicos*. 2018. Dissertação. Disponível em: <<https://repositorio.ufpb.br>>. Acesso em: 24 jun. 2020.
- CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN JUNIOR, O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 50, n. 2, p. 190–197, abr. 2006.
- CESARINO, C. B. *et al.* Prevalence and sociodemographic factors in a hypertensive population in São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 91, n. 1, p. 31–35, jul. 2008.
- CHAKRABARTI, S.; JAHANDIDEH, F.; WU, J. Food-Derived Bioactive Peptides on Inflammation and Oxidative Stress. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 608979, 2 jan. 2014.
- COPPOLA, M. DE M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*, v. 34, n. 4, p. 1297–1303, ago. 2004.
- CORDEIRO, B. *et al.* Whey Protein Isolate-Supplemented Beverage, Fermented by *Lactobacillus casei* BL23 and *Propionibacterium freudenreichii* 138, in the Prevention of Mucositis in Mice. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 2035, 1 set. 2018.
- CORONADO, M. *et al.* Aislamiento e identificación molecular de una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* en leche de Cabra (*Capra hircus*). v. 59, p. 18–27, 3 out. 2018.
- COUSIN, F. J. *et al.* Dairy propionibacteria as human probiotics: A review of recent evidence. *Dairy Science & Technology*, v. 91, n. 1, p. 1–26, 1 fev. 2011.
- COUSIN, F. J. *et al.* Milk Fermented by *Propionibacterium freudenreichii* Induces Apoptosis of HGT-1 Human Gastric Cancer Cells. *PLOS ONE*, v. 7, n. 3, p. e31892, 19 mar. 2012.
- CRUZ, J. N. DA. *Hidrolisado proteico da semente de cupuaçu como fonte de peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I*. 2015. Doutorado em Bromatologia – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-29042015-100916/>>. Acesso em: 10 jul. 2020.
- DALIRI, E. B.-M.; LEE, B. H.; OH, D. H. Current Perspectives on Antihypertensive Probiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 9, n. 2, p. 91–101, 1 jun. 2017.
- DE, F. *et al.* Probióticos e prebióticos. p. 35, 2017.

- DONKOR, O. N. *et al.* ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, Rheology and Structure of Fermented Milk. v. 17, n. 11, p. 1321–1331, 1 nov. 2007.
- DURGAN DAVID J. *et al.* Role of the Gut Microbiome in Obstructive Sleep Apnea–Induced Hypertension. *Hypertension*, v. 67, n. 2, p. 469–474, 1 fev. 2016.
- ELSALAM, M. A.; EL-SHIBINY, S. *Blood Pressure Lowering Effect of Fermented Milk Products*. 2018.
- FELICIO, T. L. *et al.* Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minas cheese added with arginine. *Food Chemistry*, v. 196, p. 628–637, 1 abr. 2016.
- FERNANDES COSTA, Y. *et al.* O papel educativo do enfermeiro na adesão ao tratamento da Hipertensão Arterial Sistêmica: revisão integrativa da literatura. *O Mundo da Saúde*, v. 38, n. 4, p. 473–481, 31 dez. 2014.
- FERNANDES, G. R. APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS ATUAIS E POTENCIAIS NO MERCADO PARA ALIMENTOS PROBIÓTICOS. p. 43, 2013.
- GANDHI, A.; SHAH, N. P. Salt Reduction in a Model High-Salt Akawi Cheese: Effects on Bacterial Activity, pH, Moisture, Potential Bioactive Peptides, Amino Acids, and Growth of Human Colon Cells. *Journal of Food Science*, v. 81, n. 4, p. H991–H1000, 2016.
- GISMONDI, R. *Nova diretriz de hipertensão muda definição de HAS*. 2017. Disponível em: <<https://pebmed.com.br/nova-diretriz-sobre-hipertensao-da-aha-muda-definicao-para-has-veja-os-keypoints/>>. Acesso em: 2 mar. 2020.
- GÓMEZ-GUZMÁN, M. *et al.* Antihypertensive effects of probiotics Lactobacillus strains in spontaneously hypertensive rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 59, n. 11, p. 2326–2336, nov. 2015.
- GONSALEZ, S. R. *et al.* Atividade inadequada do sistema renina-angiotensina-aldosterona local durante período de alta ingestão de sal: impacto sobre o eixo cardiorrenal. *Brazilian Journal of Nephrology*, v. 40, n. 2, p. 170–178, jun. 2018.
- GONZÁLEZ, J. A. A. Análisis preliminar de la relación entre el ejercicio y consumo de probióticos: Una mirada al consumidor costarricense. *Tec Empresarial*, v. 9, n. 1, p. 41–49, 2015.
- GONZÁLEZ, S. *et al.* Fermented Dairy Foods: Impact on Intestinal Microbiota and Health-Linked Biomarkers. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1046, 2019.
- Guia-para-Comprovacao-da-Seguranca-de-Alimentos-e-Ingredientes-ANVISA*. 2013. Disponível em: <<https://alimentosprocessados.com.br/arquivos/Seguranca-e-qualidade-dos-alimentos/Guia-para-Comprovacao-da-Seguranca-de-Alimentos-e-Ingredientes-ANVISA.pdf>>. Acesso em: 9 jul. 2020. , [S.d.]
- HAQUE, E.; CHAND, R. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *European Food Research and Technology*, v. 227, n. 1, p. 7–15, 1 maio 2008.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C. DE; PAULA, H. DE. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Revista de Nutrição*, v. 19, n. 4, p. 479–488, ago. 2006.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology, Plant biotechnology / Food biotechnology*. v. 18, n. 2, p. 163–169, 1 abr. 2007.

2017 Hypertension Clinical Guidelines. Disponível em: <[https://professional.heart.org/professional/ScienceNews/UCM\\_496965\\_2017-Hypertension-Clinical-Guidelines.jsp](https://professional.heart.org/professional/ScienceNews/UCM_496965_2017-Hypertension-Clinical-Guidelines.jsp)>. Acesso em: 2 mar. 2020.

INC, G. M. I. *Probiotics Market Size to Exceed USD 64 Billion by 2023: Global Market Insights Inc.* Disponível em: <<https://www.prnewswire.com/news-releases/probiotics-market-size-to-exceed-usd-64-billion-by-2023-global-market-insights-inc-578769201.html>>. Acesso em: 8 mar. 2020.

JÚNIOR, R. C. *et al.* Hipertensão arterial: o que tem a dizer o sistema nervoso. v. 8, p. 14, 2001.

KAFSI, H. *et al.* Genome Sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CNRZ327, a Dairy Bacterium with Anti-Inflammatory Properties. *Genome announcements*, v. 2, 3 jul. 2014.

KASAL, D.; NEVES, M. Inflamação como mecanismo patogênico na hipertensão arterial. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, v. 10, n. 3, 2011. Disponível em: <<https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/revistahupe/article/view/8856>>. Acesso em: 21 jul. 2020.

KOHLMANN JR., O. *et al.* III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 43, p. 257–286, 1999.

KONRAD, B. *et al.* The Evaluation of Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV,  $\alpha$ -Glucosidase and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activities of Whey Proteins Hydrolyzed with Serine Protease Isolated from Asian Pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 20, n. 4, p. 483–491, 1 dez. 2014.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, v. 1, n. 2, p. 177–187, 1 abr. 2009.

LIMA, C. M. *et al.* Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena*, v. 10, n. 3, 7 abr. 2014. Disponível em: <<https://www.scienciaplena.org.br/sp/article/view/1784>>. Acesso em: 25 jun. 2020.

LIMA, S. G. DE; HATAGIMA, A.; SILVA, N. L. C. L. DA. Sistema renina-angiotensina: é possível identificar genes de suscetibilidade à hipertensão? *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 89, n. 6, p. 427–433, dez. 2007.

- LOLLO, P. C. B. *et al.* Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n. 7, p. 3549–3558, 1 jul. 2012.
- LOLLO, PABLO C. B. *et al.* Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. *Food Research International*, v. 76, p. 611–617, 1 out. 2015.
- LYE, H.-S. *et al.* Lye HS, Kuan CY, Ewe JA, Fung WY, Liong MT. The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *Int J Mol Sci* 10, 3755-3775. *International journal of molecular sciences*, v. 10, p. 3755–75, 1 set. 2009.
- MA, P. *et al.* Effect of GABA on blood pressure and blood dynamics of anesthetic rats. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, v. 8, n. 8, p. 14296–14302, 15 ago. 2015.
- MACIEL, B. C. A hipertrofia cardíaca na hipertensão arterial sistêmica: mecanismo compensatório e desencadeante de insuficiência cardíaca. v. 8, p. 6, 2001.
- MAGALHÃES, M. E. C. *et al.* Prevenção da hipertensão arterial: para quem e quando começar? p. 6, 2010.
- MARTE, A. P.; SANTOS, R. D. Bases fisiopatológicas da dislipidemia e hipertensão arterial. p. 6, 2007.
- MEDEIROS, V. R. Investigação de enzimas proteolíticas na produção de um leite mais digerível. p. 111, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Hipertensão/Pressão alta: sintomas e tratamento*. 2018. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/hipertensao>>. Acesso em: 9 abr. 2019.
- MISHRA, V. *et al.* Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 63, 26 mar. 2015.
- MVB, M. *et al.* 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. p. 103, 2016.
- NETO, O. M. V. Níveis pressóricos normais. v. 7, p. 4, 2000.
- NOBRE, F. *et al.* Hipertensão arterial sistêmica primária. p. 17, 2013.
- OLIVEIRA, A. P. Estudo de alterações em artérias de ratos espontaneamente hipertensos após o tratamento com bloqueadores dos receptores da angiotensina II usando microscopia de raios x de baixa energia com radiação síncrotron. p. 121, 2019.
- PEREIRA, I. M. O. *Adesão ao tratamento da hipertensão arterial sistêmica na Estratégia Saúde da Família Vila Gabriel Passos*. Trabalho de conclusão de curso. 2017 Disponível em: <<https://ares.unasus.gov.br/acervo/handle/ARES/8385>>. Acesso em: 24 jun. 2020.
- PESCUMA, M. *et al.* Hydrolysis of whey proteins by *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* grown in a

- chemically defined medium. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, n. 5, p. 1738–1746, 2007.
- PESSIONE, E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 2, p. 86, 2012.
- QIAN, B. *et al.* Antioxidant, antihypertensive, and immunomodulatory activities of peptide fractions from fermented skim milk with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB340. *Journal of Dairy Research*, v. 78, n. 1, p. 72–79, fev. 2011.
- RADOVANOVIC, C. A. T. *et al.* Arterial Hypertension and other risk factors associated with cardiovascular diseases among adults. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 22, n. 4, p. 547–553, ago. 2014.
- RAI, A. K.; SANJUKTA, S.; JEYARAM, K. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory (ACE-I) peptides during milk fermentation and their role in reducing hypertension. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 57, n. 13, p. 2789–2800, 2 set. 2017.
- REBOUSSIN DAVID M. *et al.* Systematic Review for the 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*, v. 71, n. 6, p. e116–e135, 1 jun. 2018.
- REID, G.; GADIR, A. A.; DHIR, R. Probiotics: Reiterating What They Are and What They Are Not. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 424, 2019.
- RIZZELLO, C. G.; DE ANGELIS, M. *Lactobacillus delbrueckii* Group. *Reference Module in Food Science*. Elsevier, 2016. p. B9780081005965009000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081005965008544>>. Acesso em: 16 jul. 2020.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 1, p. 1–16, mar. 2006.
- SANJULIANI, A. F. Fisiopatologia da hipertensão arterial: conceitos teóricos úteis para a prática clínica. n. 4, p. 9, 2002.
- ŞANLIER, N.; GÖKCEN, B. B.; SEZGIN, A. C. Health benefits of fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 59, n. 3, p. 506–527, 4 fev. 2019.
- SANTOS, R. B.; BARBOSA, L. P. J. DE L.; BARBOSA, F. H. F. PROBIÓTICOS: MICRORGANISMOS FUNCIONAIS. *Ciência Equatorial*, v. 1, n. 2, 2011. Disponível em: <<https://periodicos.unifap.br/index.php/cienciaequatorial/article/view/562>>. Acesso em: 5 mar. 2020.
- SANTOS ROCHA, C. *et al.* Local and Systemic Immune Mechanisms Underlying the Anti-Colitis Effects of the Dairy Bacterium *Lactobacillus delbrueckii*. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, 21 jan. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3897545/>>. Acesso em: 21 jul. 2020.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. *et al.* Leukocyte counts and activation in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, v. 17, n. 3, p. 323–330, mar. 1991.

SERNA-COCK, L.; STOUVENEL, A. R. Producción biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte biotechnological production of lactic acid: State of the art producción biotecnológica de ácido láctico: Estado do arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, v. 5, n. 1, p. 54–65, dez. 2005.

SILVA, M. G. C. DA; DOMINGOS, T. DA S.; CARAMASCHI, S. Hipertensão arterial e cuidados com a saúde: concepções de homens e mulheres. *Psicologia, Saúde & Doenças*, v. 19, n. 2, p. 435–452, ago. 2018.

SILVA, E. C. *et al.* Prevalência de hipertensão arterial sistêmica e fatores associados em homens e mulheres residentes em municípios da Amazônia Legal. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 19, p. 38–51, mar. 2016.

SILVA, R. P.; AMODEO, C.; RAMIRES, J. A. F. O Ventrículo Direito e a Hipertensão Arterial: Aspectos Ecocardiográficos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 79, n. 3, p. 313–318, set. 2002.

SILVEIRA-NUNES, G. *et al.* Hypertension Is Associated With Intestinal Microbiota Dysbiosis and Inflammation in a Brazilian Population. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, p. 258, 2020.

SIMONE JOVENASSO MANZONI, M.; CAVALLINI, D.; ROSSI, E. EFEITOS DO CONSUMO DE PROBIÓTICOS NOS LÍPIDES SANGÜÍNEOS. *Alimentos e Nutrição*, v. 19, 1 jun. 2009.

SIPOLA, M. *et al.* Long-term intake of milk peptide attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, v. 52, p. 745–54, 1 dez. 2001.

*Sociedade Brasileira de Hipertensão*. Disponível em: <<https://www.sbh.org.br/>>. Acesso em: 8 jul. 2020.

SOUZA, B. M. S. DE; BRUNARI, N. C. BACTÉRIAS PROBIÓTICAS E SUA APLICAÇÃO EM LEITES FERMENTADOS. *Revista Científica de Medicina Veterinária - UNORP*, v. 1, n. 1, p. 22–29, 29 maio 2017.

SPERRY, M. F. *et al.* Probiotic Minas Frescal cheese added with L. casei 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women – A randomized double-blind pilot trial. *Journal of Functional Foods*, v. 45, p. 435–443, 1 jun. 2018.

TAVARES, R. M. S. Hipertensão arterial sistêmica e dislipidemia como fatores de risco para complicações cardiovasculares - projeto de intervenção em uma unidade básica de saúde de Esmeraldas - Minas Gerais. p. 32, 2019.

TAVARES, T. G.; MALCATA, F. X. Whey Proteins as Source of Bioactive Peptides Against Hypertension. *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*, 30 jan. 2013. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/bioactive-food-peptides-in-health>>

and-disease/whey-proteins-as-source-of-bioactive-peptides-against-hypertension>. Acesso em: 10 jun. 2020.

TERRA, F. M. *Teor de lactose em leites fermentados por grãos de kefir*. 2007. Specialization – Universidade de Brasília, Brasília, 2007. Disponível em: <<http://bdm.unb.br/handle/10483/185>>. Acesso em: 13 jun. 2020.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 3, p. 589–595, set. 2006.

THARMARAJ, N.; SHAH, N. P. Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *Journal of Dairy Science*, v. 86, n. 7, p. 2288–2296, 1 jul. 2003.

*Três Intervenções em Saúde Pública Poderiam Salvar 94 milhões de Vidas em 25 anos. Análise de Avaliação do Impacto Global | Sociedade Brasileira de Hipertensão*. Disponível em: <<https://www.sbh.org.br/arquivos/tre%CC%82s-intervenc%CC%A7o%CC%83es-em-saude-publica-poderiam-salvar-94-milho%CC%83es-de-vidas-em-25-anos-analise-de-avaliac%CC%A7a%CC%83o-do-impacto-global/>>. Acesso em: 8 jul. 2020.

TUDOR, J.; HART, J. T.; SAVAGE, W. *Tudo Sobre Hipertensão Arterial*. 2016. Editora Andrei, 2016. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=4xOft2kKuNwC>>.

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 89, n. 3, p. e24–e79, set. 2007.

VARGAS, L. A.; OLSON, D. W.; ARYANA, K. J. Whey protein isolate improves acid and bile tolerances of *Streptococcus thermophilus* ST-M5 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB-12. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 4, p. 2215–2221, 1 abr. 2015.

WHELTON, P. K. *et al.* 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*, v. 71, n. 6, jun. 2018. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYP.000000000000065>>. Acesso em: 2 mar. 2020.

YAMAMOTO, N.; AKINO, A.; TAKANO, T. Antihypertensive Effects of Different Kinds of Fermented Milk in Spontaneously Hypertensive Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 58, n. 4, p. 776–778, 1 jan. 1994.