



**U. PORTO**



**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE DO PORTO**

EFEITO DE UM LEITE FERMENTADO COM *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* E  
*BIFIDOBACTERIUM LONGUM* NOS LÍPIDOS PLASMÁTICOS DE MULHERES COM  
VALORES NORMAIS OU LIGEIRAMENTE ELEVADOS DE COLESTEROL

SARA ISABEL OLIVEIRA CASTRO ANDRADE

SETEMBRO 2005

**U.** PORTO



**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO  
UNIVERSIDADE DO PORTO**

EFEITO DE UM LEITE FERMENTADO COM *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* E  
*BIFIDOBACTERIUM LONGUM* NOS LÍPIDOS PLASMÁTICOS DE MULHERES COM  
VALORES NORMAIS OU LIGEIRAMENTE ELEVADOS DE COLESTEROL

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Nutrição Clínica

Orientador: Professor Doutor Nuno Borges

Sara Isabel Oliveira Castro Andrade

Setembro 2005

Quero dedicar este trabalho à minha filha, Marta, que apesar de ainda não ter nascido, deu-me grande parte da força necessária para levá-lo até ao fim, e ao Carlos, o seu pai, pelo amor, apoio e compreensão, constantes até o último minuto.

Obrigada.

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador Professor Doutor Nuno Borges, pelo apoio fundamental, pelo incentivo, pela boa disposição contagiante, pela orientação clara, perspicaz e totalmente disponível e por tudo o que com ele aprendi.

À Lactogal, por ter patrocinado o estudo, com um agradecimento especial:

à Sra. Engenheira Anabela Gomes, pela total disponibilidade e pelas respostas atempadas;

à Sra. Engenheira Donzília Cantarinho, pela sua receptividade em relação a este trabalho;

ao Sr. Emídio Rodrigues, pelo seu dinamismo;

e ao Sr. Inácio, pela determinação incansável na distribuição dos produtos.

Ao Serviço Regional de Saúde por ter autorizado este estudo.

Ao CITMA (Centro de Investigação e Tecnologia da Madeira) pela atribuição da bolsa de investigação.

Aos Directores dos Centros de Saúde, Dr. Paulo Jorge e Dr.<sup>a</sup> Marília Fernandes, por terem acompanhado este trabalho e disponibilizado todas as condições necessárias à sua realização.

Ao Laboratório de Saúde Pública, em especial à Dra. Margarida Dionísio e ao Dr. Paulo Góis, pela ajuda no controlo analítico.

À Divisão de Nutrição, nomeadamente à colega Dra. Teresa Esmeraldo, pelo parecer favorável e pela disponibilidade demonstrada.

À Dra. Mónica Fernandez (Análise Estatística Madeira) e ao Dr. Bruno (FCNAUP) pelo apoio estatístico.

À colega e amiga Dra. Amélia Teixeira pelos desabafos e sugestões.

À minha prima, Raquel, por me ter recebido com carinho, nas últimas estadias no Porto.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Joana, pelo carinho e compreensão.

Por fim, um agradecimento muito especial aos meus pais, pelo amor e paciência incessantes e por terem estado sempre presentes.

## Índice

Lista de abreviaturas	i
Lista de tabelas e gráficos	ii
Resumo	v
Abstract	vii
1. Introdução	1
1.1. Probióticos	1
1.1.1. Segurança	5
1.1.2. Efeitos gerais	7
1.1.2.1. Diarreia	8
1.1.2.2. Doença Inflamatória Intestinal	10
1.1.2.3. Síndrome do Intestino Irritável	11
1.1.2.4. Intolerância à lactose	11
1.1.2.5. Cancro do cólon	12
1.1.2.6. <i>Helicobacter pylori</i>	13
1.1.2.7. Imunomodulação	13
1.1.2.8. Alergia alimentar	14
1.1.2.9. Infecções urogenitais	15
1.1.3. Efeito hipocolesterolémico	16
1.1.3.1. Mecanismos de acção	23
1.1.3.2. Limitações dos ensaios clínicos	26
1.2. Fundamentação e objectivo	27
1.2.1. Fundamentação	27
1.2.2. Objectivo	29
2. Metodologia	30
2.1. Desenho do estudo	30
2.2. Amostragem e participantes	32
2.3. Produto teste e produto de referência	33
2.4. Ingestão alimentar	35
2.5. Avaliação antropométrica	36
2.6. Técnicas analíticas	37
2.7. Análise estatística	38

2.8. Ética	38
3. Resultados	40
3.1. Parâmetros do estudo	42
3.1.1. Colesterol total	45
3.1.2. LDL	51
3.1.3. HDL	57
3.1.4. Triacilgliceróis	63
3.2. Ingestão alimentar	65
3.3. Características antropométricas	74
3.4. Funcionamento intestinal, actividade física e adesão	77
3.5. Ocorrências não previstas	77
4. Discussão	78
5. Conclusões	93
6. Referências bibliográficas	95
Anexos	
Anexo 1- Diário do participante	a1
Anexo 2- Recordação das 24 horas precedentes	a2
Anexo 3- Técnicas analíticas- Olympus	a3
Anexo 4- Folha de informação aos participantes do estudo	a4
Anexo 5- Autorização da Comissão Ética	a5
Anexo 6- Consentimento informado	a6

## Lista de Abreviaturas

Apo – apoproteína ou apolipoproteína

*B. bifidum* – *Bifidobacterium bifidum*

*B. breve* – *Bifidobacterium breve*

*B. infantis* – *Bifidobacterium infantis*

*B. longum* – *Bifidobacterium longum*

CT – colesterol total

*E. faecium* – *Enterococcus faecium*

*E. coli* – *Escherichia coli*

FAO- Food and Agriculture Organization

HDL – lipoproteínas de alta densidade

*H. pylori* – *Helicobacter pylori*

Ig A – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

Ig M – Imunoglobulina M

*L. acidophilus* – *Lactobacillus acidophilus*

*L. bulgaricus* – *Lactobacillus bulgaricus*

*L. casei* – *Lactobacillus casei*

*L. fermentum* – *Lactobacillus fermentum*

*L. gasseri* – *Lactobacillus gasseri*

*L. johnsonii* – *Lactobacillus johnsonii*

*L. reuteri* – *Lactobacillus reuteri*

*L. rhamnosus* – *Lactobacillus rhamnosus*

LDL – lipoproteínas de baixa densidade

LF – leite fermentado

NK - Natural Killers

RCT – Randomized Control Trials (ensaios controlados aleatoriamente)

*S. boulardi* – *Saccharomyces boulardi*

*S. thermophilus* – *Streptococcus thermophilus*

Th – células T helper

TG – triacilgliceróis

UFC - Unidades Formadoras de Colónias

WHO- World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

**Lista de tabelas e gráficos**

Tabelas		
Tabela 1-	Resumo de alguns RCT recentes com as bactérias <i>L. acidophilus</i> e <i>B. longum</i>	22
Tabela 2-	Composição nutricional dos produtos teste e de referência (por 100g)	34
Tabela 3-	Descritiva das variáveis idade, estatura, peso, IMC e percentagem de gordura corporal	40
Tabela 4-	Teste One-Sample Kolmogorov-Smirnov- idade, estatura, peso, IMC e percentagem de gordura corporal	41
Tabela 5-	Teste T para Amostras não Relacionadas- idade, estatura, peso, IMC e percentagem de gordura corporal	41
Tabela 6-	Teste One-Sample Kolmogorov-Smirnov- colesterol, LDL; HDL e TG	43
Tabela 7-	Descritiva do colesterol	45
Tabela 8-	Teste T para Amostras não Relacionadas- colesterol	46
Tabela 9-	ANOVA- colesterol	47
Tabela 10-	Efeito do período na variação do colesterol para os grupos A e B- ANOVA	48
Tabela 11-	Descritiva do colesterol por grupo e por subgrupo	49
Tabela 12-	Efeito do período na variação de colesterol para os subgrupos- ANOVA	50
Tabela 13-	Identificação dos períodos e dos grupos para os indivíduos com colesterol >190 mg/dl- ANOVA (variável colesterol)	50
Tabela 14-	Descritiva das LDL	51
Tabela 15-	Teste T para Amostras não Relacionadas- LDL	52
Tabela 16-	ANOVA- LDL	53
Tabela 17-	Efeito do período na variação das LDL para os grupos A e B- ANOVA	53
Tabela 18-	Descritiva das LDL por grupo e por subgrupo	54

Tabela 19-	Efeito do período na variação das LDL para os subgrupos- ANOVA	55
Tabela 20-	Identificação dos períodos e dos grupos para os indivíduos com colesterol >190 mg/dl- ANOVA (variável LDL)	55
Tabela 21-	Decréscimo das LDL com o produto teste	56
Tabela 22-	Descritiva das HDL	57
Tabela 23-	Teste T para Amostras não Relacionadas- HDL	58
Tabela 24-	ANOVA- HDL	59
Tabela 25-	Efeito do período na variação das HDL para o grupo A e B- ANOVA	59
Tabela 26-	Identificação do período para os grupos A e B- ANOVA (variável HDL)	60
Tabela 27-	Descritiva das HDL por grupo e por subgrupo	61
Tabela 28-	Efeito do período na variação das HDL para os subgrupos- ANOVA	61
Tabela 29-	Identificação dos períodos para os grupos e subgrupos- ANOVA (variável HDL)	61
Tabela 30-	Decréscimo da relação LDL/HDL com o produto teste	62
Tabela 31-	Descritiva dos TG	63
Tabela 32-	Teste T para Amostras não Relacionadas- TG	64
Tabela 33-	ANOVA- TG	64
Tabela 34-	Descritiva das variáveis da ingestão alimentar	65
Tabela 35-	Teste One-Sample Kolmogorov-Smirnov- Ingestão alimentar	66
Tabela 36-	Teste T para Amostras não Relacionadas- Ingestão alimentar no <i>baseline</i> (grupo A e grupo B)	67
Tabela 37-	Teste T para Amostras não Relacionadas- Ingestão alimentar no período 1 (grupo A e grupo B)	68

Tabela 38-	Teste T para Amostras não Relacionadas- Ingestão alimentar no período 2 (grupo A e grupo B)	69
Tabela 39-	Teste de Mann-Whitney- Álcool	70
Tabela 40-	Correlações de Pearson- Ingestão alimentar e parâmetros do estudo	71
Tabela 41-	Correlação de Spearman- Álcool e parâmetros do estudo	72
Tabela 42-	Teste T para Amostras Relacionadas por subgrupo e por período- Ingestão alimentar	73
Tabela 43-	Descritiva das características antropométricas	74
Tabela 44-	Modelos de regressão linear- características antropométricas e parâmetros do estudo	75
Tabela 45-	Coefficientes dos modelos de regressão- características antropométricas e parâmetros do estudo	76

#### Gráficos

Gráfico 1-	Intervalos de confiança- colesterol	46
Gráficos 2- (2.1. e 2.2.)	Intervalos de confiança por grupo e subgrupo- colesterol	49
Gráfico 3-	Intervalo de confiança- LDL	52
Gráficos 4- (4.1. e 4.2.)	Intervalos de confiança por grupo e subgrupo- LDL	54
Gráfico 5-	Intervalo de confiança- HDL	58

## Resumo

Os efeitos na saúde atribuídos às bactérias probióticas são cada vez mais numerosos. Alguns destes estão bem fundamentados, nomeadamente o efeito na prevenção, no tratamento e na recuperação de vários tipos de diarreia, enquanto outros são mais inconsistentes.

O efeito hipocolesterolémico dos produtos lácteos fermentados tem sido estudado desde 1970, mas ainda é alvo de muitas controvérsias. Foram propostos alguns mecanismos de acção para explicar este efeito, contudo o mecanismo exacto continua por esclarecer.

No presente trabalho foi investigado o efeito de um leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* nos lípidos plasmáticos de mulheres com valores normais ou ligeiramente elevados de colesterol plasmático.

O estudo consistiu num ensaio clínico controlado aleatoriamente por placebo, com delineamento cruzado e dupla ocultação, constituído por dois períodos de tratamento de 4 semanas cada, separados por uma semana de *washout*. Participaram nesta intervenção 34 mulheres saudáveis que foram distribuídas aleatoriamente por dois grupos. Durante os períodos de tratamento, as participantes consumiram 125 gramas do produto teste (leite fermentado com *L. acidophilus* e *B. longum*) ou do produto de referência (iogurte tradicional), três vezes por dia, integrados na alimentação habitual. As análises dos parâmetros do estudo (colesterol total, LDL, HDL e triacilgliceróis) foram efectuadas nas semanas 0, 5 e 10, ou seja, antes da intervenção e no final de cada período de tratamento.

Os resultados deste trabalho demonstraram que o consumo do leite fermentado com *L. acidophilus* e *B. longum*, quando comparado com o de iogurte, reduziu de modo significativo os níveis séricos de LDL, nos indivíduos com colesterolémia inicial superior a 190 mg/dl de ambos os grupos. A redução média esteve na ordem dos 14,3%.

Os níveis de colesterol total também diminuíram significativamente com o produto teste, mas apenas nos indivíduos com colesterolémia inicial superior a 190 mg/dl de um dos grupos (grupo A). Simultaneamente a estas alterações, verificou-se um decréscimo das HDL em ambos os grupos, independente da colesterolémia inicial, após o consumo quer do produto teste, quer do de referência. As alterações nos triacilgliceróis ao longo do estudo foram negligenciáveis. De salientar que nem todos os participantes responderam ao produto. Alguns demonstraram um aumento do colesterol total, mas de modo não significativo.

Algumas questões que permanecem, no entanto, por esclarecer, são se estes efeitos são sustentáveis a longo prazo, até que ponto dependem da quantidade de produto utilizada e se são específicos das estirpes bacterianas e da amostra deste estudo.

Sendo a hipercolesterolémia um dos principais factores de risco para a doença cardiovascular, o consumo regular destes alimentos poderá representar uma importante medida de promoção da saúde pública. Por conseguinte são necessários mais estudos que esclareçam estas questões e que utilizem diferentes estirpes bacterianas, outras formas de administração, testes de adesão adequados e um maior tamanho amostral, de forma a estabelecer inequivocamente o papel dos probióticos nos lípidos plasmáticos.

## Abstract

The number of health effects attributed to probiotic bacteria have grown substantially. Some of these effects are well-founded, such as the prevention, treatment and recovery of many types of diarrhea, but others are inconsistent.

The hypocholesterolemic effect of fermented dairy products has been studied since 1970, but it is still an object of debate. Some mechanisms of action have been proposed, but the exact mechanism for this claimed effect remains to be clarified.

In the present work, the effect of a fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* on serum lipids in women with normal to borderline high serum cholesterol levels, was investigated.

The study was a randomized placebo-controlled, double-blind, cross-over trial with two treatment periods of four weeks, separated by a washout period of one week. Thirty four normal healthy women were included in this study. Subjects were randomly allocated to receive the yoghurt (reference product) or the fermented milk with *L. acidophilus* and *B. longum* (test product). During the treatment periods, they consumed three times daily 125 g of either test or reference product. as a part of their habitual diet.

Blood samples for serum lipid levels analysis were taken before the start of the experiment and at the end of both treatment periods.

The results of this study demonstrate that, when compared to the reference product, consumption of the test product resulted in significantly lower values of serum LDL in subjects of both groups with baseline serum total cholesterol levels higher than 190 mg/dl. Average LDL reduction was 14,3%.

The levels of serum total cholesterol also reduced significantly, but only in the subjects of one of the groups (group A) with baseline serum cholesterol levels higher than 190 mg/dl. The HDL concentration decreased in both groups. This reduction was not dependent on the baseline cholesterol levels and was observed with both products. There were no changes on triacylglycerols concentration throughout this study. Not all subjects seem to respond to the product. A few subjects showed a cholesterol increment, but this was not significant.

However, several points still require clarification: what is the effect during long-term treatment?; is the effect dose-dependent?; is the effect specific for the strains and for the sample used in this study?

Hypercholesterolemia is one of the most important risk factors for cardiovascular disease. The regular consumption of fermented dairy products could be an important public health promotion measure. Accordingly, further investigations are required to clarify these questions and using different bacterial strains, different delivery systems, appropriate compliance tests and larger samples, before firm conclusions can be reached concerning the effect of probiotics on serum lipid levels.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. PROBIÓTICOS

O conceito “probióticos” evoluiu duma teoria proposta pela primeira vez por Elie Metchnikoff, cientista russo vencedor Prémio Nobel (1908), que sugeriu que a longevidade de camponeses búlgaros resultava do consumo de produtos lácteos fermentados porque as bactérias ingeridas nestes produtos eliminavam as toxinas produzidas pelas bactérias intestinais. Segundo Metchnikoff, através da alimentação era possível modular os microrganismos intestinais e substituir os patogénicos pelos benéficos <sup>(1, 2)</sup>.

Mas as qualidades dos leites fermentados são já conhecidas há muitos séculos. Em 76 a.C. eram já recomendados para tratar gastroenterites, sendo encontradas referências no Antigo Testamento dos efeitos benéficos do “leite azedo” <sup>(3,4)</sup>.

Apesar de Metchnikoff se ter focado nas bactérias ácido lácticas dos produtos lácteos, o interesse de outros cientistas rapidamente se virou para as bactérias ácido lácticas de origem intestinal <sup>(5)</sup>.

Um dos primeiros cientistas foi Henneberg que propôs a utilização do *Lactobacillus acidophilus* de origem intestinal para produzir o que ele chamou de “Acidophilus-Milch”, que anos mais tarde reformulado deu origem ao iogurte. Por volta dos anos 80 o iogurte tornou-se um sucesso na Alemanha e noutros países da Europa Ocidental. As espécies de lactobacilos então utilizadas eram seleccionadas somente com base nas suas propriedades tecnológicas e não nos potenciais efeitos na saúde <sup>(5)</sup>.

Ainda que o conceito “probióticos” tenha origem numa teoria do início do século XX, o termo é relativamente recente e a respectiva definição tem evoluído ao longo das décadas, acompanhando a evolução de conhecimentos. Um grupo de especialistas em probióticos da FAO/WHO, num encontro realizado em Outubro de 2001, introduziu a definição considerada mais consensual:

“Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem um efeito benéfico ao hospedeiro” (1,2,6).

Geralmente os probióticos são consumidos sob a forma de produtos lácteos fermentados, sendo neste caso considerados alimentos funcionais, ou seja alimentos que podem apresentar efeitos benéficos para a saúde e/ou reduzem o risco de doenças crónicas, para além da função nutricional básica (7).

Já há cerca de duas décadas que os alimentos funcionais com probióticos têm vindo a crescer no mercado, sendo cada vez mais conhecidos pela maioria dos consumidores (8). Menos frequentemente os probióticos são administrados como suplementos ou preparações farmacêuticas (9), sob a forma de culturas liofilizadas (cápsulas, saquetas ou comprimidos). (10,11) Num futuro não muito distante poderão ser encontrados em carnes e produtos derivados (salsichas), cereais e vegetais fermentados (5,12) e sumos de fruta (9).

De acordo com as conclusões de De Jong e col. (2003) os alimentos funcionais e/ou os suplementos podem ser utilizados no contexto dum estilo de vida saudável ou como um meio de compensar um estilo de vida menos saudável. Apesar de não consensual, outros estudos recentes indicam que é mais provável que estes produtos sejam utilizados por mulheres com elevado nível de formação, não fumadoras, com uma ingestão baixa de bebidas alcoólicas e uma ingestão adequada de nutrientes (13).

Os produtos lácteos constituem o maior segmento do mercado dos probióticos, o que se deve em parte à existência de há longa data de registos de que os produtos lácteos são saudáveis. Os consumidores estão já familiarizados com o facto de que estes produtos possuem microrganismos vivos e de que esta associação é benéfica. Por outro lado, por razões tecnológicas, os produtos lácteos são bons transportadores de probióticos: garantem a estabilidade e sobrevivência destes microrganismos sem alteração do aroma e do sabor durante todo o processo de armazenagem e período de validade, bem como após o consumo <sup>(5)</sup>.

Nem todos os probióticos são capazes de colonizar o tracto gastrointestinal quando veiculados pelos alimentos. Para que o microrganismo probiótico possa ser administrado oralmente deve obedecer aos seguintes requisitos: não ser patogénico <sup>(7,8,14)</sup>; demonstrar antagonismo contra as bactérias patogénicas através da produção de substâncias antimicrobianas ou por competição exclusiva <sup>(8,15)</sup>; ser tolerante aos ácidos e à bÍlis; ter boa capacidade de adesão e colonização da mucosa intestinal; chegar ao intestino grosso em quantidade suficiente para exercer a sua acção; ter capacidade de suportar os processos tecnológicos e permanecer viável durante o período de validade do alimento; ter boas propriedades organolépticas; apresentar efeitos benéficos evidentes para a saúde <sup>(7,14,15)</sup>; apresentar resistência aos antibióticos e não transmitir ou induzir essa resistência ao hospedeiro <sup>(8,14)</sup>.

Os probióticos devem ainda ser geneticamente estáveis e ter idealmente origem humana <sup>(7,8)</sup>. A relevância deste último aspecto ainda está em debate pelos investigadores. Acredita-se que uma estirpe probiótica exerce melhor o seu efeito

num ambiente similar ao ambiente do qual foi originalmente retirada, como é o caso do tracto gastrointestinal humano <sup>(8)</sup>.

O grupo mais vasto de probióticos compreende as bactérias ácido lácticas, que são bactérias gram positivas anaeróbias mas aerotolerantes, com a capacidade de digerir a lactose e outros açúcares e convertê-los em ácido láctico, diminuindo, conseqüentemente, o pH do microambiente <sup>(9,14)</sup>. A este grupo pertencem os géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Bifidobacterium* <sup>(14)</sup>. Os géneros de bactérias mais utilizados e considerados mais benéficos são os *Lactobacillus* e os *Bifidobacterium* <sup>(10-12,16)</sup>.

As bactérias ácido lácticas desenvolvem-se em ambientes ricos em nutrientes tais como alimentos, plantas, solo, água, adubo, esgoto e silagem. Quando presentes nos alimentos podem fermentá-los e/ou estragá-los <sup>(9)</sup>.

Estima-se que o complexo ecossistema da microflora intestinal do adulto abrigue cerca de 500 espécies diferentes de bactérias. Algumas destas são potencialmente prejudiciais devido à capacidade de produção de toxinas, de invasão da mucosa e à capacidade de activação de carcinogénicos e de respostas inflamatórias <sup>(17)</sup>. As bactérias ácido lácticas são habitantes da cavidade oral, da vagina e do tracto gastrointestinal do homem e podem ter uma influência benéfica nestes ecossistemas humanos, nomeadamente as estirpes de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* <sup>(9)</sup>.

Existem muitas espécies de *Lactobacillus*. Estas são bactérias anaeróbias facultativas, a maioria delas de origem humana <sup>(14)</sup>. As espécies de *Lactobacillus* das quais as estirpes de probióticos foram isoladas incluem: *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* e *L. reuteri* <sup>(5)</sup>.

Os *Bifidobacterium* também de origem maioritariamente humana, são bactérias estritamente anaeróbias<sup>(14)</sup> As estirpes de *Bifidobacterium* isoladas englobam: *B. bifidum*, *B. longum* e *B. infantis* <sup>(5)</sup>.

Diferentes estirpes de bactérias probióticas podem exercer efeitos distintos baseados em capacidades e actividades enzimáticas específicas, mesmo dentro da mesma espécie. Os vários microrganismos expressam preferências por habitat que podem diferir de hospedeiro para hospedeiro. Considerando a grande variedade de espécies, de características das estirpes e as especificidades de habitat, torna-se evidente que o efeito probiótico de uma estirpe ou espécie não pode ser imputado a outra<sup>(1)</sup>.

#### 1.1.1. Segurança

A segurança dos microrganismos mais frequentemente utilizados nos probióticos tem sido confirmada ao longo dos muitos anos de utilização na história humana. Registos de efeitos prejudiciais raramente foram encontrados, sendo esta prova um dos melhores testes de segurança <sup>(18,19)</sup>.

Quando novas estirpes, espécies e géneros são seleccionados, os procedimentos normais de segurança são rigorosamente seguidos. A taxonomia apropriada é exigida na descrição da estirpe probiótica e constitui um requisito para a sua comercialização <sup>(19)</sup>.

O Grupo de Trabalho da FAO/WHO elaborou um documento com um conjunto de normas para avaliação dos probióticos nos alimentos, segundo as quais, após identificação das estirpes por métodos fenotípicos e genotípicos e depósito da estirpe numa cultura internacional, são desenvolvidos estudos *in vitro* e *in vivo*, em animais e com confirmação no Homem (normalmente com desenho

duplamente cego, aleatório e controlado por placebo), de forma a que a segurança dos produtos fique comprovada <sup>(2,20)</sup>.

Este Grupo de Trabalho reconhece a importância da validação da qualidade dos instrumentos de avaliação utilizados nos estudos, recomenda a confirmação dos resultados em mais que um centro de investigação bem como a publicação em revistas científicas e médicas, inclusive dos resultados negativos <sup>(2,20)</sup>.

O número de estudos que seguiu grandes populações durante longos períodos de tempo, com uma monitorização simultânea dos efeitos adversos, é escasso <sup>(21)</sup>.

No que diz respeito às doses, as generalizações são difíceis devido à utilização de múltiplas estirpes em diferentes doses e variados padrões de consumo. Na maioria dos ensaios são utilizadas entre  $10^6$  e  $10^9$  Unidades Formadoras de Colónias (UFC). Contudo, estes intervalos podem variar muito e, tendo em conta que os efeitos dependem do número de agentes utilizado, da dose, dos padrões de consumo e das características do hospedeiro, é fundamental a realização de estudos que estabeleçam claramente as especificidades para cada efeito <sup>(21)</sup>.

A falta de regulamentação e uniformização dos probióticos relativamente a estes aspectos, por um lado, dificulta a recomendação de estirpes específicas na prática clínica e, por outro, permite a existência no mercado de produtos ineficazes <sup>(21)</sup>.

Há uma necessidade crescente da indústria em providenciar informação mais útil ao consumidor sobre o teor em probióticos dos alimentos <sup>(3)</sup>. O rótulo alimentar deveria mencionar, não só os géneros e as espécies destes microrganismos, mas

também o nível mínimo das estirpes viáveis presentes no final do prazo de validade e alegações de saúde mais específicas e inequívocas <sup>(20)</sup>.

Na maioria dos casos os lactobacilos e as bifidobactérias utilizados na indústria alimentar, tal como os mais estudados em ensaios clínicos, parecem ser seguros e bem tolerados por adultos e crianças saudáveis <sup>(21)</sup>. Consumos diários de  $10^6$ - $10^9$  UFC de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* durante períodos inferiores ou iguais a um ano não provocaram efeitos adversos. A ocorrência normal destas bactérias comensais na flora de mamíferos e a sua segura utilização numa diversidade de alimentos e de suplementos a nível mundial suportam esta conclusão <sup>(20)</sup>.

#### 1.1.2. Efeitos gerais

A terapêutica com probióticos baseia-se no conceito duma microflora saudável <sup>(17)</sup>. A utilização de culturas de bactérias probióticas estimula o crescimento dos microrganismos benéficos no intestino, em detrimento dos patogénicos e reforça os mecanismos de defesa naturais do organismo <sup>(8)</sup>.

A bactérias probióticas podem ajudar a normalizar a permeabilidade intestinal, a equilibrar a microecologia alterada, melhorando, desta forma, a função de barreira imunológica da mucosa do intestino <sup>(17)</sup>.

São especialmente as condições clínicas associadas a uma deterioração destas funções que beneficiam dos probióticos, nomeadamente as doenças infecciosas e inflamatórias <sup>(17)</sup>. É possível que estes efeitos sejam mais notórios e de maior relevância clínica em populações de maior risco, como recém-nascidos, crianças desnutridas e pessoas com malabsorção severa <sup>(21)</sup>.

A evidência que suporta as vantagens nutricionais dos pre e probióticos, geralmente baseada em RCT e na consistência de resultados de estudo para estudo, está a crescer rapidamente <sup>(22,23)</sup>.

Os efeitos na saúde atribuídos à utilização dos probióticos são numerosos. Alguns destes estão muito bem documentados, outros são mais inconsistentes <sup>(1)</sup>.

Este trabalho incide essencialmente no papel dos probióticos nos lípidos plasmáticos (aprofundado em 1.1.3. Efeito hipocolesterolémico), pelo que os efeitos gerais são abordados de forma resumida.

#### 1.1.2.1. Diarreia

Vários tipos de diarreia podem beneficiar da utilização dos probióticos, na sua prevenção, tratamento e recuperação: a diarreia associada aos antibióticos, à infecção por rotavírus e à quimioterapia e, em menor extensão, a diarreia do viajante <sup>(1,2,14,16,22,24-27)</sup>.

De um modo geral a utilização de probióticos resulta numa diminuição da duração e da frequência dos episódios de diarreia <sup>(1,21,24)</sup>.

A diarreia associada aos antibióticos ocorre em cerca de 20% dos doentes em antibioterapia e resulta essencialmente dum desequilíbrio dos microrganismos intestinais <sup>(1,22)</sup>.

Vários RCT já demonstraram que o *Saccharomyces boulardii*, o *L. rhamnosus* GG e o *Enterococcus faecium* SF68 são significativamente mais eficazes do que o placebo na redução do risco de diarreia em voluntários saudáveis e em doentes em antibioterapia <sup>(1,2,11)</sup>. A administração oral de *S. boulardii* em homens e animais a receber antibiótico, diminuiu a colonização do ecossistema endógeno e a

produção de toxinas pelo *Clostridium difficile* e, noutros estudos, mostrou-se eficaz na melhoria da função de barreira do intestino <sup>(1,22)</sup>.

O mecanismo envolvido ainda não está determinado. Inclui provavelmente a produção de ácidos, de peróxido de hidrogénio e de substâncias antimicrobianas, a competição por nutrientes e receptores de adesão, as acções antitoxina e a estimulação do sistema imunitário <sup>(22,28)</sup>.

O efeito benéfico do *L. rhamnosus* GG no tratamento de diarreias devido à infecção por rotavírus foi bem comprovado por Guandalini e col. (2000) e Marteau e col. (2001). Outros probióticos também são provavelmente eficazes <sup>(2,11,22)</sup>.

O papel preventivo do *B. bifidum* e do *Streptococcus thermophilus* foi demonstrado por Saavedra e col. (1994), num RCT duplamente cego com crianças admitidas numa unidade de cuidados crónicos hospitalares. A diarreia ocorreu em 7% das crianças que receberam probióticos *versus* 31% nas que receberam o controlo, e a infecção por rotavírus ocorreu em 10% *versus* 39% <sup>(11,17,22)</sup>.

Os efeitos benéficos no tratamento da diarreia aguda e nas doenças inflamatórias intestinais podem ser explicados por uma estabilização da microflora indígena, por uma redução da duração da infecção por rotavírus, por uma diminuição da permeabilidade intestinal (aumentada devido à infecção por rotavírus) e por um aumento significativo das células secretoras da Ig A para este vírus <sup>(17,28)</sup>.

A diarreia aguda ocorre em cerca de metade dos viajantes, em zonas de alto risco. Foram desenvolvidos alguns ensaios clínicos com probióticos, mas geralmente a metodologia utilizada (variedade dos agentes, população estudada,

áreas geográficas, objectivo, critérios de exclusão e tratamento estatístico) não foi uniforme nem suficiente para traçar conclusões consistentes <sup>(21,22)</sup>.

De qualquer forma, alguns estudos mais recentes indicam um efeito protector de algumas estirpes de bactérias ácido lácticas relativamente a este tipo de diarreia <sup>(2,17)</sup>, nomeadamente do *L. rhamnosus* GG, o que poderá representar uma redução da probabilidade de diarreia de 25 a 50%, em zonas geográficas de elevado risco <sup>(11)</sup>.

#### 1.1.2.2. Doença Inflamatória Intestinal

As doenças inflamatórias do intestino são doenças de causa desconhecida caracterizadas por inflamações crónicas e recorrentes. Incluem colite ulcerosa, doença de Crohn e inflamação crónica da bolsa ileal. Os mecanismos responsáveis pela iniciação e perpetuação do processo inflamatório permanecem desconhecidos <sup>(11,22)</sup>.

Pensa-se que, para que estas doenças ocorram, tem de haver uma predisposição genética, um distúrbio imunológico e a influência de agentes desencadeadores intraluminais, tais como substâncias alergénicas, antígenos, bactérias ou viroses <sup>(17)</sup>.

Considerando a importância crescente destas doenças nos países industrializados e interligando todos estes factores que podem estar na sua origem, Isolauri (2001) sugere que o decréscimo dos mecanismos de defesa intestinal do hospedeiro nas sociedades ocidentais, verificado nas últimas décadas, pode ser um resultado da alimentação <sup>(17)</sup>.

Logo após o nascimento a distribuição das espécies de bactérias no intestino é determinada pela alimentação. Os alimentos esterilizados e processados, os

alimentos com adoçantes artificiais, com conservantes e com antibióticos são cada vez mais comuns nos países industrializados. Todas estas substâncias podem privar o sistema imunitário de importantes sinais ambientais indutores de tolerância, tais como processos anti-inflamatórios promovidos por microrganismos específicos e antioxidantes externos fornecidos por hortofrutícolas frescos <sup>(17)</sup>.

Vários ensaios recentes demonstraram que alguns probióticos podem ter grande interesse clínico na prevenção e tratamento das doenças inflamatórias intestinais. Para alguns o nível de evidência está próximo do necessário para que estes produtos sejam recomendados na prática clínica. No entanto, muitos outros necessitam de mais investigação <sup>(2,22,25)</sup>.

#### 1.1.2.3. Síndrome do Intestino Irritável

Alguns estudos demonstraram diminuições significativas na obstipação associada à Síndrome do Intestino Irritável <sup>(16,29)</sup>.

Pelo menos dois ensaios clínicos evidenciaram que alguns probióticos podem influenciar o tempo de trânsito intestinal em adultos saudáveis mas, presentemente, a maioria dos estudos apresenta resultados negativos, pelo que o nível de comprovação ainda é baixo. <sup>(1,22,29)</sup>

#### 1.1.2.4. Intolerância à lactose

As bactérias classicamente adicionadas aos produtos lácteos, nomeadamente o *L. bulgaricus* e o *S. thermophilus*, podem exercer uma actividade lactásica *in vivo* no lúmen intestinal, facilitando a digestão e aliviando a intolerância à lactose <sup>(21)</sup>.

Este efeito é motivado pela lactase presente nas bactérias do iogurte e libertada quando estas sofrem a lise pelos ácidos biliares <sup>(17,22,30)</sup>.

Há, no entanto, resultados não tão esclarecedores com outras bactérias (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium*, entre outros) o que poderá estar relacionado com um número reduzido de células utilizado nos produtos e com a capacidade que os lactobacilos e as bifidobactérias têm de resistir à bilis, impedindo a libertação da lactase intracelular <sup>(21,9)</sup>.

Alguns estudos comparativos do *S. thermophilus* e do *L. acidophilus* mais o *Bifidobacterium*, não encontraram diferenças significativas na digestão da lactose, mas sim na actividade lactásica, o que levou os investigadores a atribuir a aptidão em digerir este açúcar à capacidade destas bactérias em atrasar a velocidade de esvaziamento gástrico e não à lactase microbiana <sup>(3,9)</sup>.

#### 1.1.2.5. Cancro do Cólon

O consumo regular de alguns probióticos pode reduzir o nível de enzimas fecais, de mutagénicos e de ácidos biliares secundários, substâncias que poderão estar envolvidas na carcinogénese do cólon <sup>(12,22)</sup>.

Alguns lactobacilos e bifidobactérias têm a capacidade de diminuir o nível de enzimas fecais, nomeadamente a  $\beta$ -glucuronidase, a  $\beta$ -glucosidase, a nitroreductase e a urease, enzimas envolvidas na activação metabólica de mutagénicos e carcinogénicos <sup>(14,30)</sup>. A capacidade de degradar compostos nitrosados e a de inibir o crescimento da flora que produz estes compostos, também são mecanismos referidos por Mombelli e Gismondo <sup>(14)</sup>.

Actualmente decorrem vários ensaios clínicos a nível europeu com o objectivo de esclarecer o efeito dos probióticos nos adenomas do cólon <sup>(11,12,14,22)</sup>.

#### 1.1.2.6. *Helicobacter pylori*

Existem alguns estudos *in vitro* sobre a acção antagonista de algumas estirpes de *Lactobacillus* em relação à *H. pylori* <sup>(2,22,31)</sup>.

Recentemente têm sido desenvolvidos vários estudos *in vivo* no Homem <sup>(22)</sup>.

Canducci e col. (2000) e Felley e col. (2001) demonstraram em dois RCT que a ingestão de um leite fermentado contendo *L. acidophilus* vivo ou inactivo pelo calor, ajudava a diminuir a colonização gástrica pela *H. pylori* <sup>(22)</sup>. Cremonini e col. (2002) verificaram que o *L. rhamnosus* GG, o *S. boulardii* e uma combinação de *Lactobacillus* com *Bifidobacterium* tiveram um efeito preventivo da infecção por *H. pylori* no Homem e Wang e col. (2004) concluíram que o *L. acidophilus* La5 e a *B. lactis* Bb12, um efeito supressivo desta infecção. <sup>(31,32)</sup>

#### 1.1.2.7. Imunomodulação

A capacidade de adesão das bactérias probióticas permite uma interacção com a superfície da mucosa intestinal, um maior contacto com o tecido linfóide associado e assim uma mediação dos efeitos imunes locais e sistémicos <sup>(8,33)</sup>. A adesão também promove a exclusão competitiva das bactérias patogénicas do epitélio intestinal <sup>(8)</sup>.

Muitos dos efeitos dos probióticos são mediados por imunorregulação através dum controlo do balanço das citocinas pro e anti-inflamatórias <sup>(34)</sup>. Existem, todavia, diferenças quer quantitativas, quer qualitativas, na exclusão, eliminação e regulação imunes entre as várias bactérias <sup>(34)</sup>.

Várias estirpes probióticas demonstraram induzir *in vivo* a libertação de citocinas pro-inflamatórias, do factor de necrose tumoral e da interleucina 6, o que reflecte a estimulação da imunidade não específica <sup>(17)</sup>.

A estimulação de respostas imunes humorais específicas e de respostas não específicas a antígenos potencialmente prejudiciais, foi documentada para o *B. bifidum*, para o *B. breve* e para o *L. rhamnosus* GG, entre outros <sup>(17)</sup>.

Apesar dos efeitos de imunomodulação serem promissores, os mecanismos envolvidos não estão bem identificados <sup>(14,33)</sup>. A resposta humoral específica parece ser induzida localmente por alimentos com substâncias alergénicas e por microrganismos patogénicos <sup>(14)</sup>.

Um aumento das células secretoras de IgM e da seroconversão da IgA e da IgM, foram demonstrados para o *L. rhamnosus* GG. A indução da IgA *in vitro* (no Rato) provocada pelas bifidobactérias, foi observada por Yasui e col. <sup>(14)</sup>.

A avaliação da imunidade celular através da actividade fagocitária, da actividade das células Natural Killers (NK) e da produção de citocinas em indivíduos saudáveis, levou a resultados contraditórios. O *L. casei* não afectou a imunidade sistémica em indivíduos saudáveis, enquanto que o *L. johnsonii* incluído num leite fermentado, aumentou significativamente a actividade fagocitária <sup>(14,28)</sup>.

Não obstante a controvérsia de alguns estudos <sup>(14)</sup>, Isolauri e col. (2001) defendem que muitos dados propõem que os probióticos podem ser ferramentas inovadoras no alívio da inflamação intestinal, na normalização da disfunção da mucosa intestinal e na regulação das reacções de hipersensibilidade <sup>(34)</sup>.

#### 1.1.2.8. Alergia alimentar

Uma aplicação mais específica das bactérias ácido lácticas é nas reacções alérgicas à caseína. Alguns lactobacilos degradam esta proteína em peptídeos mais pequenos e aminoácidos <sup>(14)</sup>.

O efeito do *L. rhamnosus* GG em crianças com eczema atópico após eliminação do leite de vaca da alimentação, foi estudado. Os resultados demonstraram uma redução significativa na extensão e na severidade da dermatite atópica <sup>(14)</sup>. Isto poderá ser devido a uma diminuição da inflamação intestinal e da reacção de hipersensibilidade, mas o mecanismo exacto ainda não está determinado <sup>(2,14)</sup>.

Resultados similares foram obtidos em adultos hipersensíveis ao leite, cuja resposta imunoinflamatória característica foi prevenida através da junção duma estirpe probiótica ao leite <sup>(17)</sup>.

A microflora intestinal pode contribuir para o processamento de antígenos alimentares e reduzir a respectiva imunogenicidade <sup>(21)</sup>. Os microrganismos do intestino contribuem para o desenvolvimento duma população de células T *helper* (Th) “obedientes” à indução da tolerância oral <sup>(21)</sup>.

As inflamações alérgicas poderão representar um novo alvo da terapêutica com probióticos, quer através do controlo da produção excessiva da IgE, quer do controlo no desenvolvimento das células Th 2, ambas respostas características da atopia <sup>(17)</sup>.

#### 1.1.2.9. Infecções urogenitais

Alguns estudos *in vitro* verificaram que as bactérias ácido lácticas interferiam no crescimento e na adesão de microrganismos patogénicos nos tractos urinário e vaginal <sup>(12,14)</sup>.

Num modelo de Rato, o *L. fermentum* foi eficaz no tratamento da infecção urinária por *E. Coli*, quando administrado oralmente com doses baixas de

antibiótico e o *L. casei* foi capaz de prevenir a infecção no Rato, quando instilado na bexiga <sup>(14)</sup>.

Um estudo desenvolvido por Hilton, concluiu que a administração oral de *L. johnsonii* reduziu significativamente a candidíase vaginal <sup>(2,14)</sup>.

Outros estudos com lactobacilos apresentaram resultados contraditórios e ainda existem poucos RCT que suportam estes efeitos <sup>(2,12,14)</sup>.

Recentemente têm surgido algumas evidências sobre o potencial papel dos probióticos na redução da severidade das doenças respiratórias <sup>(2,3,11)</sup>, na prevenção da recorrência do cancro da bexiga <sup>(2,14,30)</sup> e na diminuição da hipertensão <sup>(3)</sup> bem como estudos sobre a relação inversa entre o consumo de iogurte e o cancro da mama <sup>(3)</sup>.

O efeito na colesterolémia é ainda muito controverso <sup>(2,3,15,26)</sup> e o efeito nos triacilgliceróis pouco estudado <sup>(1,12)</sup>.

São necessários mais RCT que comprovem a eficácia dos agentes, que envolvam comparações agente-dose, custo-benefício e que esclareçam os mecanismos exactos pelos quais os probióticos exercem os seus efeitos <sup>(21)</sup>. Alguns efeitos estão claramente demonstrados, no entanto, a extrapolação dos resultados para outras situações clínicas, outros produtos, outras doses e outras estirpes deve ser evitada <sup>(2,26)</sup>.

### 1.1.3. Efeito hipocolesterolémico

O primeiro registo da influência dos produtos lácteos nos lípidos sanguíneos do Homem data de há mais de 30 anos. Shaper e col. (1963) e Mann e Spoerry (1974) observaram que os homens das tribos africanas Samburu e Maasai

apresentavam uma redução do colesterol sérico após o consumo de grandes quantidades (4-8,3 L/dia) de um leite fermentado com uma estirpe de *Lactobacillus* <sup>(35-40)</sup>. A incidência de doenças cardiovasculares nestas tribos era relativamente baixa, apesar da alimentação aterogénica, caracterizada pelo elevado consumo de carne, sangue e leite <sup>(35)</sup>.

Este estudo levou outros cientistas a procurar um factor presente no leite responsável pelo efeito hipocolesterolémico <sup>(35,41)</sup>. Buonopane e col. (1992) concluíram que o consumo de 1,1 L por dia de leite magro provocava decréscimos significativos nas concentrações séricas de colesterol e de triacilgliceróis apenas no grupo dos indivíduos que apresentava um colesterol inicial (no *baseline*) superior a 4,9 mmol/L <sup>(35)</sup>.

Howard e Marks (1977) verificaram (no Homem) que o consumo de 2 L por dia de leite gordo e leite magro reduziu o colesterol sérico em 5 e 15%, respectivamente, enquanto que o consumo da mesma quantidade de gordura láctea, sob a forma de manteiga, aumentou o colesterol em 7% <sup>(36)</sup>.

Vários estudos chegaram à conclusão que o leite, gordo ou magro, diminui as concentrações séricas de colesterol. São propostos diferentes mediadores, em particular, o magnésio, a riboflavina, o ácido orótico, a IgG, um factor inibidor desconhecido ou mesmo a flora intestinal, mas nenhum dos estudos demonstrou qual o componente exacto responsável por este efeito <sup>(35)</sup>.

Estudos no Homem sobre os produtos lácteos fermentados e a colesterolémia têm sido conduzidos desde 1970 <sup>(35)</sup>.

A observação de que alguns animais excretam nas fezes quantidades de colesterol maiores do que as de animais "isentos de germes" sugere, segundo

Eyssen (1973), que microrganismos colonizadores do intestino podem influenciar os níveis plasmáticos de colesterol <sup>(3)</sup>.

Muitos estudos em animais apontam para um efeito hipocolesterolémico dos produtos lácteos fermentados mais eficaz do que o dos produtos lácteos não fermentados e que, de facto, o conteúdo em bactérias pode ser responsável por este efeito. <sup>(35,38)</sup>. O efeito hipocolesterolémico tem sido alvo de muitas controvérsias <sup>(12)</sup>. Vários estudos *in vitro* têm demonstrado o efeito hipocolesterolémico de algumas bactérias e o número de estudos *in vivo* no Homem tem vindo a aumentar <sup>(28)</sup>.

Algumas investigações mostram que a combinação de vários tipos de bactérias exerce um efeito mais favorável no metabolismo do colesterol do que apenas um tipo e que diferentes estirpes de bactérias ácido lácticas exercem efeitos diferentes nos níveis de colesterol <sup>(35,39,42)</sup>. O iogurte também já demonstrou ter um efeito hipocolesterolémico no Homem, apesar deste efeito ser em alguns casos transitório <sup>(35,36,38)</sup>.

Anderson e col. (1995) compararam um leite com baixo teor em gordura (1L/dia) com um leite também de baixo teor em gordura mas fermentado com estirpes de *L. lactis* e *L. cremoris* (na mesma quantidade – 1L/dia) em indivíduos ileostomizados e apesar de não terem encontrado diferenças significativas nos níveis séricos de colesterol total, a absorção intestinal deste lípido foi inferior no grupo que consumiu o leite fermentado. <sup>(36)</sup>

O efeito lipídico do Gaio ®, um leite fermentado produzido pela acção da cultura bacteriana constituída por uma estirpe de *Enterococcus faecium* e duas estirpes de *S. thermophilus* (cultura CAUSIDO ®), tem sido amplamente investigado. As estirpes bacterianas deste produto foram isoladas da flora

intestinal dos habitantes do Cáucaso, uma região conhecida pela longevidade do seu povo e onde o leite fermentado é uma parte fundamental da alimentação.

(36,43)

Agerbaek e col. (1995) encontraram reduções de 6% para o colesterol total e de 10% para as LDL, após o consumo de 200 ml/dia de Gaio ® durante o período de 6 semanas. Um RCT desenvolvido por Richelsen e col. (1996) chegou à conclusão que a redução das LDL verificada após um mês de consumo de 200 ml por dia deste mesmo leite fermentado não se manteve durante os 6 meses de duração do estudo <sup>(36,38,39,43,44)</sup>. A interpretação deste RCT foi difícil pelo facto de que durante a segunda metade do estudo as concentrações do *E. faecium* do produto teste baixaram de  $2 \times 10^8$  UFC/ml para  $10^4$ - $10^5$  UFC/ml. Uma redução destas bactérias pode ter sido responsável pela diminuição da eficácia do produto já que vários estudos *in vitro* demonstraram que o *S. thermophilus* é ácido-sensível e não sobrevive à passagem pelo intestino delgado, pelo menos em quantidade significativa, logo o *E. faecium* seria o responsável pelo efeito benéfico deste leite fermentado. <sup>(36,44)</sup>.

Sessions e col. (1998) não encontraram qualquer efeito deste mesmo produto nos níveis de colesterol <sup>(36)</sup> mas, Larsen (2000) ao comparar 5 tratamentos (o Gaio ®, um iogurte contendo *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, um outro iogurte com *S. thermophilus* e *L. rhamnosus*, o iogurte placebo e o placebo em comprimidos) constatou que apenas o Gaio ® reduziu as LDL (em 8,4%) no grupo dos indivíduos com excesso de peso. Esta redução teve significado estatístico apenas quando comparada com o placebo (em iogurte e em comprimidos), pelo que este efeito foi atribuído à cultura CAUSIDO ®, particularmente ao *E. faecium*.

(36,44)

Larsen e col. (2000) conduziram uma meta-análise de estudos de intervenção com o objectivo de avaliar o efeito da cultura CAUSIDO ® nos níveis plasmáticos de colesterol total e das LDL. Com base em 5 estudos de curta duração, concluíram que os produtos fermentados com esta cultura provocavam uma redução estatisticamente significativa e clinicamente importante de 5% nas LDL, mas que são necessários mais estudos de longa duração que confirmem se este efeito é sustentável ao longo do tempo <sup>(45)</sup>.

No que diz respeito ao *L. acidophilus*, alguns estudos no Homem suporta o efeito hipocolesterolémico (Schaafsma e col., 1998; Anderson e Gilliland, 1999, Ashar e Prajapati, 2000) <sup>(37-39)</sup>, mas também são encontrados resultados controversos que salientam a necessidade de mais investigação (De Roos e col., 1999; Larsen e col., 2000; De Roos e col., 2000; Kiebling e col., 2002; Lewis e Burmeister, 2005) <sup>(28,44,46-48)</sup>.

Quanto ao *B. longum*, existem algumas evidências mas em menor número. Xiao e col. (2003) verificaram uma redução significativa do colesterol no grupo de indivíduos com colesterol inicial superior a 240 mg/dl, ao fim de 4 semanas de consumo de um iogurte líquido enriquecido com *B. longum* BL1, o que vem apoiar o potencial efeito benéfico desta bactéria no perfil lipídico <sup>(40)</sup>.

O efeito conjunto destas duas bactérias (*L. acidophilus* e *B. longum*) nos lípidos plasmáticos, foi investigado por Kiessling e col. (2002). Este estudo demonstrou que o consumo de 300 g por dia de um iogurte enriquecido com *L. acidophilus* 145 e *B. longum* 913 e enriquecido com oligofrutose (1%), não diminuiu o colesterol total e as LDL, em 29 mulheres saudáveis, tendo sido verificado, no entanto, um aumento da concentração das HDL e uma consequente melhoria da relação LDL/HDL, efeitos estes não relacionados com a presença de

oligofrutose ou dos microrganismos no leite fermentado, mas sim com o consumo a longo prazo do iogurte <sup>(47)</sup>.

Na tabela 1 estão resumidos alguns RCT recentes que envolveram as espécies *L. acidophilus* e *B. longum*.

Tabela 1- Resumo de alguns RCT recentes com as bactérias *L. acidophilus* e *B. longum*

REFERÊNCIA	DESENHO	AMOSTRA - n e sexo (M/H) - idade - outras características	PRODUTO - tipo - dose (g ou ml) - duração da intervenção (semanas)	ESPÉCIES/ ESTIRPES	RESULTADOS (com significado estatístico)
Schaafsma e col. 1998 (38)	Cruzado – 1 sem <i>washout</i> Controlado aleatoriamente por placebo Dupla ocultação	30H 33-64 normolipidêmicos	LF 3×125 ml 2×3 sem.	<i>L. acidophilus</i> (DN 112.053 e DN112.096)+ fruto-oligossacarídeos	- 4,4% CT -5,4% LDL -5,3% LDL/HDL
Anderson e Gilliland 1999 (39)	Cruzado – 2 sem <i>washout</i> Controlado aleatoriamente por placebo Dupla ocultação	22M 18H 52-61 c/ hipercolesterolemia primária	LF 200 2×4	<i>L. acidophilus</i> L-1	-3,2% CT*
De Roos e col. 1999 (46)	Paralelo – 2 grupos Controlado aleatoriamente por placebo	56M 22H 18-65 normolipidêmicos	iogurte LA 500 6	<i>L. acidophilus</i> L-1	=CT =LDL =HDL
Larsen 2000 (44)	Paralelo – 5 grupos Controlado aleatoriamente por placebo Dupla ocultação	50M 20H 18-55 c/ excesso peso e obesos	LF 450 8	<i>S. thermophilus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>E. faecium</i>	-8,4% LDL*
Ashar e Prajapati 2000 (37)	Paralelo – 4 grupos	27 sem dados sobre sexo e idade normo e hiperlipidêmicos	LF c/ pouca gord. 200 3 sem	<i>L. acidophilus</i> V3	-21-12% CT* -1,4% LDL/HDL** -1,3% CT/HDL** + TG(0,53g/L)***
Kiessling e col. 2002 (47)	Cuzado – 9 dias <i>washout</i> Controlado aleatoriamente por placebo Dupla ocultação	29M 19-56 normo e hiperlipidêmicas	iogurte simbiótico 300 3×7	<i>L. acidophilus</i> 145 <i>B. longum</i> 913 (+ oligofrutose)	=CT =LDL +HDL (0,3 mmol/L) +LDL/HDL
Xiao e col. 2003 (40)	Paralelo Controlado aleatoriamente por placebo Ocultação simples	32H 28-60 normo e hiperlipidêmicos	iogurte líquido c/ pouca gord. 300 4	<i>B. longum</i> BL1	-CT*
Lewis e Burmeister 2005 (48)	Cruzado – 6 sem <i>washout</i> Controlado aleatoriamente por placebo Dupla ocultação	51M 28H 20-65 hipercolesterolemicos (>5,0mmol/L)	Cápsulas (6×10 <sup>10</sup> UFC) 2× 6 sem	<i>L. acidophilus</i> LA-1	=CT =LDL =HDL =TG

M – Mulheres; H – Homens; LF – Leite fermentado; Iogurte LA – iogurte enriquecido com *L. acidophilus*; CT – colesterol total; LDL – colesterol das lipoproteínas de baixa densidade; HDL – colesterol das lipoproteínas de alta densidade; TG – triacilgliceróis.

\* Apenas no 1º período de tratamento.

\* Apenas no grupo dos indivíduos com excesso de peso que consumiram o Gaio® (*S. thermophilus* e *E. faecium*)

\* Apenas nos grupos com CT=2,0-2,2 g/L e com CT=2,2-2,5 g/L, respectivamente.

\*\* Apenas no grupo com CT *borderline* (CT=2,0-2,2 g/L).

\*\*\* Apenas no grupo com CT < 2,0 g/L.

\* Apenas no grupo com CT inicial > 240 mg/dl.

### 1.1.3.1. Mecanismos de acção

Foram propostos alguns mecanismos para explicar este efeito dos probióticos. Os mais comuns incluem: a desconjugação enzimática dos sais biliares, a assimilação directa do colesterol pelas bactérias probióticas, a adesão do colesterol à superfície celular das bactérias <sup>(49-51)</sup> e as acções fisiológicas dos produtos finais da fermentação dos ácidos gordos saturados de cadeia curta, em particular do propionato <sup>(36,39,52)</sup>.

Vários lactobacilos e bifidobactérias já demonstraram ter capacidade para hidrolizar *in vitro* os sais biliares conjugados e conseqüentemente diminuir o colesterol devido à precipitação deste com os ácidos biliares desconjugados, à medida que o pH do meio vai diminuindo com a produção de ácido <sup>(35,36,38,49)</sup>. A actividade da hidrolase dos sais biliares presente em algumas bactérias ácido lácticas poderá ter um papel importante neste mecanismo <sup>(36)</sup>. Os ácidos biliares desconjugados são menos solúveis e menos absorvidos pelo lúmen intestinal do que os conjugados. Assim a desconjugação levaria a um aumento da excreção fecal dos ácidos biliares desconjugados e à respectiva diminuição das quantidades absorvidas na circulação enterohepática e das concentrações séricas, o que resultaria num mecanismo de compensação hepático de aumento da captação do colesterol para a síntese *de novo* dos ácidos biliares <sup>(28,35,36,53,54)</sup>. Então, em condições de equilíbrio, a desconjugação dos sais biliares provocaria uma redução do colesterol sérico através do aumento da formação de novos ácidos biliares ou através da redução da absorção intestinal do colesterol, já que parte desta deixaria de ser suportada pelos sais biliares <sup>(35,36,53,55)</sup>.

Contudo, *in vivo*, este mecanismo seria pouco provável, porque o pH do tracto intestinal é geralmente superior a 6,0 e a desconjugação e a coprecipitação ocorreriam a um pH inferior a 5,5 <sup>(36,46)</sup>.

Buck e Gilliland (1994) ao estudarem várias estirpes de *L. acidophilus* de origem humana, concluíram que o *L. acidophilus* L1 apresentava uma elevada actividade *in vitro* no que respeita à resistência à bÍlis, à hidrólise dos sais biliare e à assimilação do colesterol <sup>(39,56)</sup>. Outros estudos *in vitro* com diferentes estirpes de *L. acidophilus* também já demonstraram que a remoção do colesterol era provavelmente provocada por uma coprecipitação com os sais biliare desconjugados em meio ácido <sup>(35,36,38,56,57)</sup>. Gilliland propôs que, se uma estirpe de *Lactobacillus* que exiba uma elevada actividade da hidrolase dos sais biliare for incorporada no tracto intestinal, a hidrólise da bÍlis aumenta <sup>(35)</sup>.

Algumas bactérias podem interferir com a absorção intestinal de colesterol quer através duma desconjugação dos sais biliare, quer por assimilação directa do colesterol <sup>(36,50)</sup>. Noh e col. (1997) verificaram *in vitro* que o *L. acidophilus* ATCC 43121, captava o colesterol durante o crescimento a um pH de 6,0, pelo que a coprecipitação não seria o único mecanismo responsável <sup>(58)</sup>.

A hipótese de assimilação ou de coprecipitação do colesterol por espécies de *Bifidobacterium* foi estudada por Tahri e col. (1995). Neste estudo verificou-se uma intensa ligação entre a superfície celular e o colesterol, que foi considerada como uma captação do colesterol para o interior das células. Os autores concluíram que esta assimilação estava dependente do crescimento celular e da presença de sais biliare e assim, que a remoção do colesterol não poderia ser atribuída apenas à coprecipitação do colesterol com sais biliare desconjugados mas sim à combinação dos dois mecanismos, a desconjugação e a assimilação.

<sup>(36)</sup> Dambekodi e Gilliland (1997) confirmaram este efeito de assimilação do colesterol *in vitro*, na membrana celular do *B. longum* <sup>(59)</sup> e Xiao e col. (2003) comprovaram a forte actividade da hidrolase dos sais biliares desta bactéria (*B. longum* BL1), bem como a eficácia em melhorar o perfil lipídico no Homem e no Rato <sup>(40)</sup>.

Outro mecanismo possível é a adesão do colesterol à superfície celular das bactérias, sem incorporação na membrana. Hosono e Tono-oka (1995) verificaram que as bactérias ácido lácticas, incluindo os *Lactococcus*, têm a capacidade de ligar o colesterol às suas células. Os investigadores sugeriram que poderia ser um fenómeno físico relacionado com a parede celular <sup>(49)</sup>.

Os ácidos gordos de cadeia curta também podem ter um papel na melhoria do perfil lipídico <sup>(35,36,52)</sup>. As bactérias probióticas, uma vez no intestino humano, fermentam hidratos de carbono indigeríveis o que resulta num aumento destes ácidos gordos <sup>(35,36)</sup>.

A produção de ácidos gordos de cadeia curta no intestino grosso anda à volta dos 100 a 450 mmol por dia, com as proporções de acetato, propionato e butirato em cerca de 60:20:15, respectivamente, dependendo do substrato <sup>(35,36)</sup>. O acetato, no soro, parece aumentar os níveis de colesterol, enquanto que o propionato aumenta a glicémia e baixa a resposta hipercolesterolémica do acetato, através duma redução da sua utilização pelo fígado para a síntese de ácidos gordos e colesterol <sup>(35,36,60)</sup>. Todavia, para haver um efeito hipocolesterolémico, teria que ser produzida uma quantidade suficiente de propionato, de forma a anular os efeitos de precursor da síntese dos lípidos do acetato <sup>(35,36)</sup>. Assim, dependendo da proporção de cada ácido gordo produzido durante a fermentação bacteriana, as concentrações plasmáticas de colesterol

poderiam sofrer alterações. Este mecanismo não está, contudo, bem fundamentado <sup>(36)</sup>.

Em resumo, os exactos mecanismos de acção responsáveis pelo efeito hipocolesterolémico continuam por esclarecer <sup>(36)</sup>. O mecanismo mais referido nos estudos é o da desconjugação dos sais biliares e a respectiva coprecipitação com o colesterol. <sup>(38-40,46,47,53)</sup>. É, no entanto, necessária mais investigação sobre os mecanismos *in vitro*, numa variedade de meios e condições de crescimento, e sobre os mecanismos *in vivo* <sup>(36)</sup>. De salientar que há uma variabilidade marcada entre as estirpes duma mesma espécie que se poderá repercutir em resultados diferentes nos estudos humanos. <sup>(36,38)</sup>.

#### 1.1.3.2. Limitações dos ensaios clínicos

Como se pode verificar na Tabela 1, nem todos os estudos reportam um efeito hipocolesterolémico.

Contrariamente ao observado há algumas décadas atrás, em que os investigadores utilizavam quantidades excessivas de produto (0,5 a 8,4 litros/dia) <sup>(12)</sup>, actualmente têm sido utilizadas quantidades mais baixas (Tabela 1). Mesmo assim, alguns não encontraram diferenças no perfil lipídico, o que poderá estar relacionado com o desenho experimental <sup>(36)</sup>. Outros dos problemas indicados são a falta de poder estatístico, o tamanho amostral inadequado, falhas no controlo da ingestão alimentar e no gasto energético durante a intervenção, variações nos níveis iniciais dos lípidos dos participantes <sup>(36)</sup>, ausência de múltiplas avaliações antes do início do estudo, alterações nos grupos controlo <sup>(12)</sup>, utilização de placebos inadequados <sup>(48,61)</sup> e falhas na identificação da composição e da concentração em bactérias dos produtos em estudo <sup>(35)</sup>.

Por outro lado, as diferenças entre os estudos, especialmente no que diz respeito ao tipo e à quantidade de produto, ao sexo, à idade, aos níveis de colesterol iniciais dos participantes, à duração do período de intervenção <sup>(36)</sup> e à presença de confundidores, tais como alterações dos teores de gordura da alimentação, dificultam as comparações e as conclusões <sup>(12,35)</sup>.

## 1.2. FUNDAMENTAÇÃO E OBJECTIVO

### 1.2.1. Fundamentação

A doença cardiovascular é uma doença multifactorial com elevada taxa de mortalidade e uma das principais causas de morte nos países ocidentais <sup>(43,44)</sup>. Em Portugal, estas doenças, nomeadamente o acidente vascular cerebral e a doença coronária ou doença isquémica do coração, são um dos mais importantes problemas de saúde pública, ocupando um lugar de destaque entre as causas de internamento hospitalar, e a principal causa de morte no país, em ambos os sexos. É considerada das taxas mais elevadas da Europa e do Mundo <sup>(62)</sup>. A Região Autónoma da Madeira (RAM) não escapa a esta tendência, sendo que nos últimos anos, as doenças do aparelho circulatório constituíram a principal causa de mortalidade nesta Região <sup>(62)</sup>.

Um dos principais factores de risco para a doença cardiovascular é a presença de elevados níveis plasmáticos de lípidos, em particular de colesterol total e LDL <sup>(37,43,44,49,62,63)</sup>.

Como uma redução de 1% no colesterol sérico está associada a uma redução de 2-3% do risco estimado para a doença coronária, pequenas reduções de

colesterol provocadas pelo consumo de leite fermentado, podem ser clinicamente importantes.<sup>(39)</sup> Segundo Anderson e Gilliland (1999) o consumo regular dum leite fermentado com uma estirpe apropriada de *L. acidophilus*, tem o potencial de reduzir o risco de doença cardíaca em 6-10%<sup>(47)</sup>.

O National Cholesterol Education Program da American Heart Association, Adult Treatment Panel III (NCEP-AHA ATPIII), estabelece como níveis óptimos de lípidos valores inferiores a 200 mg/dl para o colesterol total e a 100 mg/dl para as LDL<sup>(63)</sup>. A Third Joint European Societies Task Force on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice aconselha valores inferiores a 190 mg/dl para o colesterol total e a 115 mg/dl para as LDL<sup>(64)</sup>. Neste trabalho foram consideradas as Recomendações Europeias como valores de referência e como pontos de corte no tratamento estatístico.

A amostra deste estudo foi constituída apenas por mulheres com níveis plasmáticos de colesterol normais ou ligeiramente elevados porque: a maioria dos casos de doença coronária sintomática não é constituída por indivíduos com o colesterol muito alto, mas por indivíduos com o colesterol normal ou ligeiramente elevado e com outros factores de risco associados<sup>(43)</sup>; no recrutamento dos participantes foi maior o número de mulheres que se voluntariou, por isso, e de forma a uniformizar a amostra, os homens foram excluídos; uma das limitações de estudos anteriores é a falta de homogeneidade das amostras relativamente ao sexo<sup>(36)</sup>; pelo menos um estudo foi desenvolvido apenas com mulheres<sup>(47)</sup> e o grupo alvo dos probióticos é provavelmente constituído por indivíduos do sexo feminino<sup>(13)</sup>.

O período de intervenção teve a duração de 4 semanas, com desenho experimental cruzado (4 semanas + 1 semana *washout* + 4 semanas) porque:

estudos anteriores com desenho cruzado foram desenvolvidos em períodos inferiores ou semelhantes (Tabela 1); o desenho experimental cruzado aumenta o poder do estudo <sup>(39)</sup> e a adesão aos produtos tem tendência a diminuir em estudos de longa duração <sup>(45)</sup>.

A quantidade de 375g/dia foi escolhida com base em estudos anteriores recentes (Tabela 1) e por ser uma quantidade relativamente fácil de atingir diariamente.

### 1.2.2. Objectivo

Por serem limitados e inconclusivos os estudos relativos ao efeito nos lípidos plasmáticos dos probióticos em geral, e em particular do *L. acidophilus* e da *B. longum*, e com base em tudo o que foi anteriormente exposto, o presente estudo tem como objectivo:

**Investigar o efeito de um leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* nos lípidos plasmáticos de mulheres com níveis normais ou ligeiramente elevados de colesterol plasmático, na Região Autónoma da Madeira.**

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. DESENHO DO ESTUDO

Este trabalho consistiu num estudo experimental com delineamento cruzado, controlado aleatoriamente por placebo e com dupla ocultação.

Teve a duração total de 9 semanas, divididas em 2 períodos de tratamento: as primeiras 4 semanas (período 1) e as últimas 4 semanas (período 2). Estes dois períodos foram separados por 1 semana de *washout*<sup>x</sup>, na qual os produtos eram suspensos.

Os 34 participantes da amostra, foram distribuídos aleatoriamente por dois grupos, o grupo A (n=19) e o grupo B (n=15). Durante as primeiras 4 semanas o grupo A consumiu o produto teste, um leite fermentado com *L. acidophilus* 145 e *B. longum* BB536, três vezes ao dia (3×125 g), e o grupo B o produto controlo, um iogurte com as bactérias habituais (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*), nas mesmas quantidades (3×125 g por dia). Após a semana de *washout* e nas últimas 4 semanas, o grupo A passou a consumir o produto controlo, enquanto que o grupo B o produto teste. Os produtos foram integrados no pequeno-almoço, almoço e jantar<sup>(65, 66)</sup>.

Antes da intervenção, na fase de selecção da amostra, todos os participantes foram a uma consulta médica, de modo a avaliar o respectivo estado de saúde, através do exame físico, da história clínica e dos testes laboratoriais de rotina (hemograma, perfil lipídico, função hepática, função renal e urina tipo II), e a uma consulta de nutrição para medição do peso e da estatura e averiguação dos critérios de inclusão. Na semana antes da intervenção (semana 0 ou *baseline*)

---

<sup>x</sup> Fase de suspensão da intervenção<sup>(67)</sup>

todos os participantes fizeram avaliação da composição corporal por bioimpedância eléctrica.

Foi pedido a cada voluntário para não consumir qualquer tipo de leite fermentado nas 2 semanas anteriores ao estudo <sup>(44)</sup>.

Os participantes receberam instruções sobre todas as fases do estudo e foram acompanhados na consulta de nutrição durante as 9 semanas. Nos dias da consulta era feito um reforço para manterem ao máximo os seus hábitos alimentares e o peso corporal e para consumirem os produtos. A única mudança na alimentação era a substituição dos iogurtes ou leites fermentados consumidos habitualmente pelos produtos do estudo. A avaliação da adesão aos produtos era feita por questionário no fim de cada consulta. Quem não cumprisse era excluído do estudo.

Foi pedido a cada participante para registar todas as alterações dos seus comportamentos habituais, tais como, um aumento da ingestão de bebidas alcoólicas, uma alteração na actividade física ou a introdução de um novo medicamento num diário (Anexo 1). A avaliação da ingestão alimentar foi feita nas semanas 0, 4 e 9, de forma a diagnosticar os hábitos alimentares antes da intervenção, no período 1 e no período 2, respectivamente.

Depois da intervenção (semana 10), os participantes foram novamente avaliados, no que diz respeito ao peso e à composição corporal, por bioimpedância.

Os níveis plasmáticos de lípidos (parâmetros do estudo: o colesterol total, as LDL, as HDL e os triacilgliceróis), foram controlados analiticamente três vezes: antes da intervenção (semana 0), na semana de *washout* (semana 5) e depois da intervenção (semana 10) <sup>(28,36-40,43-47)</sup>.

Este estudo decorreu em quatro Centros de Saúde do Serviço Regional de Saúde, E.P.E., da Região Autónoma da Madeira (Centros de Saúde: Dr. Rui Adriano, St. António, S. Roque e Monte).

Todas as consultas tiveram lugar no Centro de Saúde da área de residência do participante.

A intervenção propriamente dita começou na segunda semana de Outubro e acabou na terceira semana de Dezembro.

O projecto deste estudo foi aprovado pelo Serviço Regional de Saúde, E.P.E., e pela Direcção dos Centros de Saúde, dos quais obtive toda a colaboração necessária.

## 2.2. AMOSTRAGEM E PARTICIPANTES

Os participantes eram indivíduos voluntários, utentes dos Centros de Saúde, que obedeciam aos seguintes critérios de inclusão:

- sexo feminino;
- idades compreendidas entre 18 e 65 anos;
- IMC inferior a 30;
- isentos de doença coronária, diabetes, hipotiroidismo e hipertensão;
- sem terapêutica farmacológica hipolipemiante, antifúngica, imunossupressora e antihipertensora;
- sem hábitos alcoólicos;
- consumirem pelo menos 2 iogurtes por dia;
- não estarem grávidas ou a amamentar <sup>(37-40,43-47,68)</sup>.

Recorrendo a uma lista de números ao acaso, os participantes foram seleccionados aleatoriamente do total de indivíduos que obedecia aos critérios de

inclusão e que frequentava ou já tinha frequentado a consulta de nutrição ou então que vinha pela primeira vez, por encaminhamento dos profissionais de saúde, com o propósito de entrar no estudo. Os critérios de inclusão foram dados a conhecer aos vários profissionais de saúde e eram confirmados no respectivo processo clínico do utente.

A selecção foi feita entre os meses de Maio e Setembro de 2004, tendo sido recrutadas 41 pessoas, que foram distribuídas pelo grupo A (n=21) e pelo grupo B (n=20). Apesar de estar prevista uma amostra de 50 indivíduos, alguns foram excluídos, porque a empresa patrocinadora apenas pôde disponibilizar produtos para 41 indivíduos<sup>(65,66)</sup>. O número de indivíduos que chegou ao fim foi de 34. Ao longo das 9 semanas, 7 indivíduos desistiram porque: não gostaram dos produtos (3 indivíduos); não conseguiram comer a quantidade exigida diariamente (2 indivíduos); adoeceram (infecção respiratória com antibioterapia) e preferiram desistir (2 indivíduos).

### 2.3. PRODUTO TESTE E PRODUTO DE REFERÊNCIA

Os produtos teste e de referência foram preparados pela Lactogal Produtos Alimentares S.A.

O produto teste era um leite fermentado com *L. acidophilus* 145 e *B. longum* BB536.

O produto de referência era um iogurte, ou seja, um leite fermentado com *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*.

A composição nutricional dos produtos teste e de referência está descrita na Tabela 2. Como se pode verificar, os produtos tinham uma composição semelhante.

Os resultados analíticos aos produtos feitos pela Lactogal, confirmaram a presença de  $1,4 \times 10^8$ - $2,1 \times 10^8$  UFC/g de *L. acidophilus*, de  $2,7 \times 10^7$ - $1,0 \times 10^8$  UFC/g de *B. longum* no produto teste e a ausência destas espécies no produto de referência.

Estudos anteriores realizados pela Lactogal sobre a capacidade de sobrevivência das bactérias em causa, concluíram que estas se mantêm relativamente constantes, ao longo do tempo de vida do leite fermentado.

Tabela 2  
Composição nutricional dos produtos teste e de referência (por 100 g)

<i>Resultados analíticos</i>	<i>Produto Teste</i>	<i>Produto de Referência</i>
Proteína (g/100g)	4,1	4,1
Hidratos de Carbono (g/100g)	9,5	9,4
Lactose	5,5	5,5
Sacarose	4,0	3,9
Lípidos (g/100g)	0,1	0,1
Energia (Kcal/100g)	55,3	54,9

A Lactogal (com sede no Porto) enviou os produtos para a delegação do Funchal, três vezes ao longo do estudo. Até a semana 6 os produtos eram de morango (com pedaços) e nas últimas 3 semanas mudaram para o sabor framboesa e pêsego/nectarina (com pedaços) a pedido dos participantes. Apesar desta mudança, a composição nutricional dos produtos manteve-se.

Os produtos eram fornecidos aos participantes de duas em duas semanas, no Centro de Saúde ou na delegação da Lactogal.

Quer o produto teste, quer o de referência vinham em unidades de 125 g cada e em embalagens brancas apenas com data de validade, de forma a assegurar a dupla ocultação. A data de validade serviu como código para distinção entre o produto teste e o de referência.

Os participantes receberam instruções para conservar os produtos no frigorífico a uma temperatura aproximada de 6°C e consumir 3 unidades por dia (3×125g), após o pequeno-almoço, o almoço e o jantar.

#### 2.4. INGESTÃO ALIMENTAR

Foram realizadas 3 avaliações não consecutivas da ingestão alimentar em cada indivíduo, nas semanas 0, 4 e 9, de modo a conhecer o consumo alimentar do Grupo A e do Grupo B antes da intervenção e durante cada um dos períodos de tratamento, o período 1 e o período 2.

O instrumento utilizado foi a Recordação das 24 horas Precedentes. Este foi administrado indirectamente, através duma entrevista, na qual cada indivíduo foi convidado a recordar e a descrever todos os alimentos que ingeriu nas últimas 24 horas, e a respectiva porção.

Os participantes não sabiam em que dia iam ser entrevistados de forma a não alterarem os seus hábitos alimentares. As entrevistas decorreram a meio da semana, de forma a não apanhar nenhum dia do fim-de-semana. No mesmo dia em que era feita a Recordação das 24 horas Precedentes, cada indivíduo era questionado relativamente a alterações da actividade física e do funcionamento gastrointestinal, bem como em relação à adesão aos produtos (Anexo 2) <sup>(69,70)</sup>.

Para estimar o tamanho da porção ingerida e facilitar a descrição, foi utilizado o Manual de Quantificação dos Alimentos da Faculdade de Ciências da Nutrição e

Alimentação da Universidade do Porto <sup>(71)</sup>. Para determinar as quantidades de alguns pratos mais compostos foi utilizado um livro de culinária com receitas típicas madeirenses <sup>(72)</sup>.

A codificação e a análise da composição nutricional (gordura, proteínas, hidratos de carbono, álcool e total calórico) foram feitas através do programa informático *MicroDiet* versão 1.1 (2000) <sup>(73)</sup>.

## 2.5. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

O peso corporal foi determinado numa balança (marca Seca) com escala padrão, com os indivíduos com roupa, sem sapatos, permanecendo na posição vertical sobre o centro da plataforma. A leitura do peso foi feita até ao 0,1 Kg mais próximo. A medição foi realizada na fase de selecção da amostra, na semana 0 (antes da intervenção) e na semana 10 (depois da intervenção), sempre na mesma balança.

A estatura foi avaliada num estadiómetro (Seca), com os indivíduos em pé, descalços, com os calcanhares unidos e encostados à parte posterior do estadiómetro, assim como as nádegas, espáduas e cabeça, que estava posicionada no plano de Frankfort. A leitura foi feita ao 0,1 cm mais próximo. A medição foi feita na fase de selecção da amostra <sup>(74)</sup>.

O índice de massa corporal (IMC) foi obtido dividindo o peso em quilogramas pelo quadrado da estatura em metros e os indivíduos foram classificados de acordo com os intervalos de IMC da WHO <sup>(75)</sup>, tendo sido excluídos na fase de selecção da amostra os obesos, isto é, os que apresentavam um IMC superior ou igual a 30 <sup>(76)</sup>.

A composição corporal foi determinada por bioimpedância eléctrica através dum aparelho MALTRON BF-906 Body Fat Analyser, tetrapolar, com equações padronizadas. As avaliações foram realizadas nas semanas 0 e 10. De modo a obter resultados válidos as mulheres eram avaliadas a meio do ciclo menstrual, deitadas sobre as suas costas, perfeitamente direitas e relaxadas, com os braços e as pernas ligeiramente afastados de forma a não tocar nenhuma outra parte do corpo, sem adornos de metal e em camas devidamente isoladas. Cada participante foi avaliado sempre com os mesmos eléctrodos, que estavam posicionados nas superfícies dorsais do pé direito e da mão direita, com a mesma distância entre eles. Todos os indivíduos foram ainda instruídos a não consumir alimentos nem beber grande quantidade de água nas 2 a 3 horas anteriores, a não fazer exercício físico pelo menos nas 12 horas prévias, a não ingerir bebidas alcoólicas, café, chá, bebidas energéticas e refrigerantes nas últimas 24 horas e a urinar antes da avaliação <sup>(77-79)</sup>.

## 2.6. TÉCNICAS ANALÍTICAS

As análises dos parâmetros do estudo foram efectuadas nas semanas 0, 5 e 10, no Laboratório da Saúde Pública do Serviço Regional de Saúde, E.P.E.

As amostras de sangue foram colhidas da veia antecubital, após 10 horas de jejum nocturno, centrifugadas e imediatamente conservadas a 4-6°C até serem analisadas.

Os níveis séricos de colesterol total, HDL, LDL e triacilgliceróis foram determinados através de métodos enzimáticos padronizados, em analisadores Olympus, com ensaios enzimáticos e reagentes Olympus diferentes consoante o lípido a determinar (Anexo 3).

## 2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos em cada grupo, antes da intervenção (*baseline*) e no fim de cada período de tratamento (período 1 e período 2) foram comparados pela ANOVA (Análise da Variância). Para determinar se as variáveis tinham uma distribuição normal foi utilizado o Teste One\_Sample Kolmogorov Smirnov e para comparar os dois grupos no *baseline* aplicou-se o Teste T para Amostras não Relacionadas ou as alternativas não paramétricas para as variáveis não normais (Teste Mann-Whitney). Para comparar a ingestão alimentar de cada um dos grupos foi utilizado o Teste T para Amostras não Relacionadas e entre os subgrupos de cada grupo, o Teste T para Amostras Relacionadas. As associações entre a ingestão alimentar e os lípidos foram determinadas através dos coeficientes de correlação (Pearson ou Spearman consoante a normalidade da variável) assim como as relações entre as características antropométricas e os lípidos <sup>(80)</sup>.

O programa informático utilizado foi o *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 13.0 (2004) <sup>(81)</sup>.

No decorrer da análise dos resultados de colesterol total e de LDL, os participantes de cada grupo (A e B) foram divididos em dois subgrupos consoante os níveis de colesterol que apresentavam no *baseline*: valores iguais ou inferiores a 190 mg/dl e valores superiores a 190 mg/dl. Para estabelecer e avaliar as comparações também foi utilizada a ANOVA.

## 2.8. ÉTICA

Todos os participantes tiveram conhecimento dos objectivos, das diversas fases e do carácter de confidencialidade do estudo, através duma folha de

informação escrita de forma simples e inteligível. Esta folha também continha informação sobre os benefícios, os eventuais desconfortos e o direito em recusar e desistir do estudo em qualquer altura (Anexo 4).

Em Agosto de 2004, o projecto do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde do Serviço Regional de Saúde, E.P.E., com parecer favorável por unanimidade (Anexo 5).

Antes da intervenção, todos os participantes deram o seu consentimento informado (Anexo 6).

### 3. RESULTADOS

Das 34 mulheres que participaram no estudo, 19 pertenciam ao Grupo A e 15 ao Grupo B. As idades variaram entre os 18 e os 60 anos, com uma média de 35 anos no Grupo A e de 36 no Grupo B, e o IMC entre 18 e 29,7, com um valor médio de 24,6 no Grupo A e 24,9 no Grupo B. A percentagem de gordura corporal determinada por bioimpedância foi, em média, 31,2% e 32,3% nos grupos A e B, respectivamente.

Na tabela 3, para além das médias estão os desvios padrão e os valores máximos e mínimos das variáveis idade, estatura, peso, IMC e percentagem de gordura corporal dos participantes antes da intervenção.

**Tabela 3**  
Descritiva das variáveis idade, estatura, peso, IMC e percentagem de gordura corporal

		Idade	Estatura	Peso	IMC	Percentagem de gordura
Grupo A	Mínimo	18	154,1	47,1	18,2	17,2
	Máximo	60	175,0	74,6	29,5	38,3
	Média	35	159,8	62,6	24,6	31,2
	Desvio Padrão	12	5,7	8,4	3,5	6,3
	N Total	19	19	19	19	19
Grupo B	Mínimo	25	151,5	48,5	18,0	17,9
	Máximo	54	177,0	81,8	29,7	40,6
	Média	36	160,1	64,0	24,9	32,3
	Desvio Padrão	10	7,1	9,8	3,4	6,4
	N Total	15	15	15	15	15
Total	Mínimo	18	151,5	47,1	18,0	17,2
	Máximo	60	177,0	81,8	29,7	40,6
	Média	35	159,9	63,2	24,8	31,7
	Desvio Padrão	11	6,3	8,9	3,4	6,3
	N Total	34	34	34	34	34

Foi aplicado o Teste One-Sample Kolmogorov-Smirnov para averiguar se estas variáveis seguem uma distribuição normal (tabela 4) <sup>(80)</sup>.

**Tabela 4**

Teste One-Sample Kolmogorov-Smirnov – idade, estatura, peso, IMC e percentagem de gordura corporal

		Idade	Estatura	Peso	IMC	% de gordura
N		34	34	68	68	68
Parâmetros (a,b)	Média	35,26	159,94	63,41	24,81	31,70
	Desvio Padrão	10,799	6,2857	9,1503	3,5044	6,3415
Kolmogorov-Smirnov Z		,768	1,031	,838	,719	,953
Valor - p		,596	,238	,483	,679	,324

a Distribuição Normal

b Calculados a partir dos dados.

Como o valor de probabilidade (p) é superior a 0,05, aceitamos a hipótese nula, ou seja, as variáveis em questão têm uma distribuição normal, pelo que, foi utilizado o Teste T para Amostras não Relacionadas para saber se estas variáveis diferem de modo estatisticamente significativo entre o grupo A e o grupo B no *baseline* (tabela 5) <sup>(80)</sup>.

**Tabela 5**

Teste T para Amostras não Relacionadas – idade, estatura, peso, IMC e percentagem de gordura corporal

		Teste de Levene da igualdade de variâncias		Teste t-Student					
		F	Valor-p	t	gl	Valor-p (bilateral)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença das médias a 95%	
								Limite inferior	Limite superior
Idade	Assume igualdade de variâncias	,725	,401	-,443	32	,661	-1,674	-9,366	6,018
	Não assume igualdade de variâncias			-,454	31,955	,653	-1,674	-9,179	5,832
Estatura	Assume igualdade de variâncias	1,240	,274	-,145	32	,885	-,3200	-4,8094	4,1694
	Não assume igualdade de variâncias			-,142	26,650	,889	-,3200	-4,9618	4,3218
Peso	Assume igualdade de variâncias	,355	,556	-,420	32	,677	-1,3112	-7,6700	5,0475
	Não assume igualdade de variâncias			-,412	27,612	,683	-1,3112	-7,8337	5,2112
IMC	Assume igualdade de variâncias	,024	,878	-,272	32	,788	-,3281	-2,7882	2,1321

	Não assume igualdade de variâncias			-,273	30,628	,787	-,3281	-2,7827	2,1266
% gordura	Assume igualdade de variâncias	,016	,900	-,527	32	,602	-1,1554	-5,6219	3,3110
	Não assume igualdade de variâncias			-,526	29,957	,603	-1,1554	-5,6430	3,3321

gl-graus de liberdade

Com níveis de significância (valor de p) superiores a 0,05, podemos concluir que, antes da intervenção, os sujeitos de ambos os grupos eram comparáveis <sup>(80)</sup>. Quaisquer diferenças que surjam na inferência não são provocadas por diferenças entre os grupos no *baseline*.

### 3.1. PARÂMETROS DO ESTUDO (colesterol total, LDL, HDL e triacilgliceróis)

Neste estudo foi utilizado o ensaio clínico *crossover* 2x2 com o seguinte

modelo:  $y_{ijk} = \mu + \xi_{ij} + \pi_k + \phi_{\delta_{ik}} + \varepsilon_{ijk}$  <sup>(82,83)</sup>, no qual:

$i$  - sequência do tratamento (teste→controlo ou controlo→teste);

$k$  - período (1 ou 2);

$y_{ijk}$  - é a resposta do  $j$ -ésimo doente na  $i$ -ésima sequência do  $k$ -ésimo período;

$\mu$  - é a média global;

$\xi_{ij}$  - é o efeito aleatório do doente  $j$  na sequência  $i$ ; (a)

$\pi_k$  - é o efeito do período  $k$ ; (b)

$\phi_{\delta_{ik}}$  - é o efeito de cada tratamento em cada período na sequência  $i$ ; ( $\delta$  tem em consideração a sequência  $i$  e o período  $k$ ) (c)

$\varepsilon_{ijk}$  - é o desvio aleatório provocado por factores não avaliados em qualquer das sequências, dos tratamentos e dos períodos.

Para analisar estes efeitos recorreu-se à Análise de Variância (ANOVA) que testa as diferenças entre diversas situações, para duas ou mais variáveis. Este modelo revela-se simples na análise e dispensa a realização de múltiplos testes. São de considerar as hipóteses de interesse decorrentes do modelo que avaliam a significância dos efeitos indicados em (a), (b) e (c)

Assim, pretendemos testar as seguintes hipóteses:

$H'_0$ : O efeito do tratamento sobre os valores dos lípidos é nulo;

$H''_0$ : O valor médio dos lípidos é igual em cada período;

$H'''_0$ : Os indivíduos não têm efeitos sobre os valores de lípidos registados.

Sendo a ANOVA um teste paramétrico, é necessário garantir que as variáveis em análise seguem uma distribuição normal. Foi então aplicado o Teste One-Sample Kolmogorov-Smirnov para todas as variáveis <sup>(80,82-84)</sup>.

Os resultados deste teste estão na tabela 6. Repare-se que foram feitos para cada parâmetro, em cada grupo e em cada período. O *baseline* diz respeito aos valores dos parâmetros na semana 0, o período 1 refere-se aos valores dos parâmetros na semana 5, ou seja, no fim do período 1 e o período 2, aos valores na semana 10, ou seja, no fim do período 2.

**Tabela 6**  
Teste One-Sample Kolmogorov-Smirnov – colesterol, LDL, HDL e triacilgliceróis

			Colesterol		LDL		HDL		Triacilgliceróis	
			Grupo		Grupo		Grupo		Grupo	
Período			A	B	A	B	A	B	A	B
<i>Baseline</i>	N		19	15	19	15	19	15	19	15
	Parâmetros (a,b)	Média	189,84	195,87	108,42	112,67	60,26	58,07	87,47	86,53
		Desvio Padrão	35,810	28,854	26,964	24,085	11,860	8,464	36,374	31,888
	Kolmogoro v-Smirnov Z		,689	,633	,817	,558	,452	,658	1,016	,816
	Valor - p		,729	,818	,517	,915	,987	,780	,253	,518

Período 1	N		19	15	19	15	19	15	19	15
	Parâmetros (a,b)	Média	180,11	191,87	103,21	114,47	53,37	51,20	84,63	87,33
		Desvio Padrão	30,296	36,261	22,795	30,921	8,361	5,226	28,310	27,333
	Kolmogoro v-Smirnov Z		,547	,526	,656	,566	,681	,668	,421	,570
	Valor - p		,926	,945	,783	,906	,742	,763	,994	,901
Período 2	N		19	15	19	15	19	15	19	15
	Parâmetros (a,b)	Média	185,21	182,33	102,53	104,80	58,84	51,67	81,89	84,07
		Desvio Padrão	24,697	34,121	17,621	28,277	11,649	7,237	26,772	33,393
	Kolmogoro v-Smirnov Z		,579	,738	,782	,675	,550	,482	,558	,676
	Valor - p		,891	,647	,574	,752	,923	,974	,915	,750

a Distribuição Normal

b Calculados a partir dos dados.

Dado que todos os níveis de significância foram superiores a 0,05 não há evidência estatística para rejeitar a normalidade das variáveis colesterol, LDL, HDL e triacilgliceróis.

Passamos agora a abordar cada parâmetro do estudo isoladamente.

Para todas as variáveis foi utilizado o mesmo procedimento pela seguinte ordem: estatística descritiva (mínimo, máximo, média e desvio padrão), apresentação dos intervalos de confiança para as médias de cada um dos grupos em gráficos de barras, Teste T para Amostras não Relacionadas (de forma a garantir que os grupos A e B são comparáveis no *baseline*) e por fim a Análise da Variância (ANOVA) (para os dois grupos, A e B, em simultâneo).

Para além destes testes, nas variáveis colesterol, LDL e HDL, foi analisado o efeito do período, em cada um dos grupos, isoladamente, também através da ANOVA, já que poderão existir oscilações que o modelo não determina <sup>(83)</sup>.

## 3.1.1. Colesterol

**Tabela 7**  
 Descritiva do colesterol

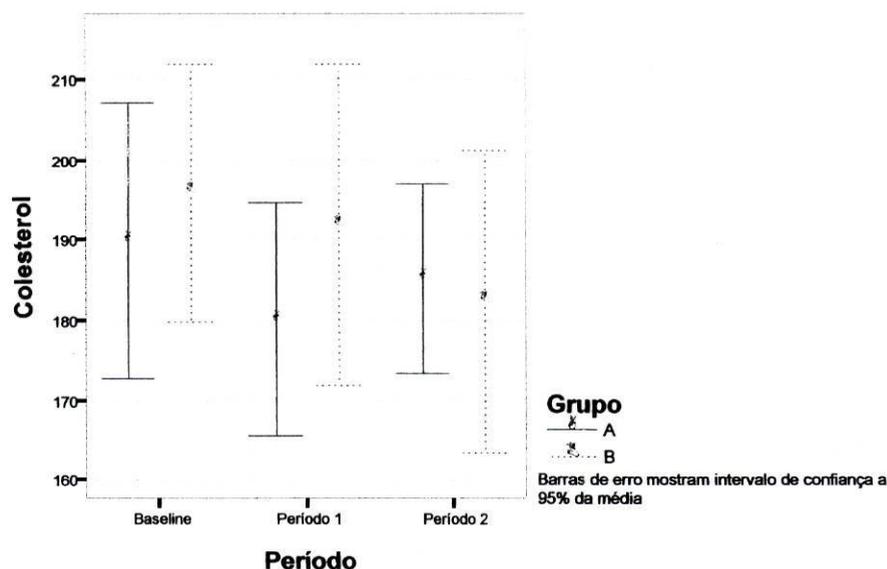
Período		Colesterol	
		Grupo	
		A (n=19)	B (n=15)
<i>Baseline</i>	Mínimo	148	164
	Máximo	249	271
	Média	190	196
	Desvio Padrão	36	29
Período 1	Mínimo	131	142
	Máximo	225	263
	Média	180	192
	Desvio Padrão	30	36
Período 2	Mínimo	130	134
	Máximo	229	260
	Média	185	182
	Desvio Padrão	25	34

Os dados da tabela 7 indicam que:

- O grupo A tinha um colesterol médio de 190 mg/dl, que diminuiu no fim do período 1 para 180 mg/dl e aumentou no fim do período 2 para 185 mg/dl;
- No grupo B as oscilações foram diferentes. Partindo de um valor próximo ao registado no grupo A (196 mg/dl) os indivíduos deste grupo ao fim do período 1 registaram uma diminuição para 192 mg/dl e ao fim do período 2, para 182 mg/dl.

No gráfico 1 estão representados os intervalos de confiança para os valores médios de colesterol em cada período e para cada grupo.

**Gráfico 1**  
Intervalos de confiança- colesterol



Na tabela 8 são apresentados os resultados do Teste T para Amostras não Relacionadas. Com um valor de p de 0,164, podemos afirmar que não existem diferenças entre os valores médios de colesterol do grupo A e do grupo B, pelo que estes dois grupos podem ser comparados quanto a esta variável.

**Tabela 8**  
Teste T para Amostras não Relacionadas - colesterol

Colesterol(Baseline )	Teste de Levene da igualdade de variâncias		Teste t-Student					
	F	Valor -p	t	g.l.	Valor -p (bilateral)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença das médias a 95%	
							Limite inferior	Limite superior
Assume igualdade de variâncias	2,024	,164	-,529	32	,600	-6,025	-29,205	17,156
Não assume igualdade de variâncias			-,543	31,975	,591	-6,025	-28,616	16,566

A tabela 7 e o gráfico 1 sugerem que há diferenças entre os valores médios de colesterol dos dois grupos, mas terão essas diferenças significado estatístico?

**Tabela 9**  
ANOVA - Colesterol

	Soma dos quadrados	gl	Média dos quadrados	F	Valor-p
Tratamento	898,121	1	898,121	2,933	,096
Período	82,180	1	82,180	,268	,608
Indivíduos	52740,059	33	1598,184	5,219	,000
Erro	9798,761	32	306,211		

gl- graus de liberdade

Da análise da tabela 9 resulta que as diferenças encontradas nos valores médios de colesterol são provocadas pela variabilidade dos indivíduos dentro dos grupos ( $p < 0,01$ ) e não por efeitos dos tratamento ou dos períodos<sup>(80)</sup>.

#### Efeito do período no Grupo A e no Grupo B

Embora a ANOVA indique que o período não tem efeitos sobre o colesterol, foi avaliada a evolução desta variável em cada um dos períodos (1 e 2) para cada um dos grupos. Note-se que a ANOVA da tabela 9 testou o efeito do tratamento e do período para os dois grupos em simultâneo. Ao fazer esta análise separadamente para cada um dos grupos, o efeito do tratamento também será testado, porque à partida sabemos que o grupo A no período 1 foi sujeito ao produto teste e no período 2 ao produto de referência, enquanto que o grupo B no período 1 fez o de referência e no período 2 o teste (tabela 10).

Como no *baseline* não há diferenças entre os valores médios de colesterol, interessa pesquisar as diferenças da variação deste parâmetro de grupo para grupo nos períodos considerados. Foi aplicado novamente a ANOVA.

**Tabela 10**  
Efeito do período na variação do colesterol para os Grupos A e B - ANOVA

Grupo	Fonte de variação	Soma dos quadrados	gl	Média dos quadrados	F	Valor-p
A	Período	901,368	2	450,684	1,253	,298
	Erro(Período)	12947,965	36	359,666		
B	Período	1450,178	2	725,089	2,067	,145
	Erro(Período)	9820,489	28	350,732		

gl- graus de liberdade

A tabela anterior permite afirmar que tanto para o grupo A como para o grupo B o efeito do período sobre os valores médios de colesterol é nulo (valor de  $p > 0,05$ ), isto é, o colesterol médio dos indivíduos do grupo A não difere significativamente do *baseline* (semana 0) para o período 1 (semana 5) e do período 1 (semana 5) para o período 2 (semana 10). As mesmas conclusões podemos tirar em relação ao grupo B.

Estas conclusões vão de encontro aos resultados da ANOVA apresentados anteriormente (tabela 9), ou seja, os efeitos do período e do tratamento sobre os valores médios de colesterol são nulos e apenas a variabilidade dentro de cada Grupo, provocada pelos indivíduos, tem significado estatístico.

Surgiu a hipótese do efeito do leite fermentado sobre o colesterol estar dependente da colesterolémia inicial (no *baseline*) dos participantes. Assim, foram considerados dois subgrupos dentro de cada grupo: os indivíduos com valores no *baseline* menores ou iguais a 190 mg/dl e os indivíduos com valores no *baseline* superiores a 190 mg/dl.

Na tabela 11, podemos verificar que, no grupo A ( $n=19$ ), existem 10 mulheres com colesterol até 190 mg/dl (valor médio de 161) e 9 mulheres com valores superiores a 190 mg/dl (média de 222) e no grupo B ( $n=15$ ), 7 participantes com

valores até 190 mg/dl e 8 com mais de 190 mg/dl (valores médios de 174 e 215 mg/dl respectivamente).

Esta tabela (tabela 11) e os gráficos 2.1. e 2.2. mostram ainda a variação das médias de colesterol para cada um dos subgrupos. Podemos observar que os indivíduos com decréscimos mais acentuados foram os do grupo A com mais de 190 mg/dl, especialmente do *baseline* para o período 1, e os indivíduos do grupo B com mais de 190 mg/dl, especialmente do período 1 para o período 2.

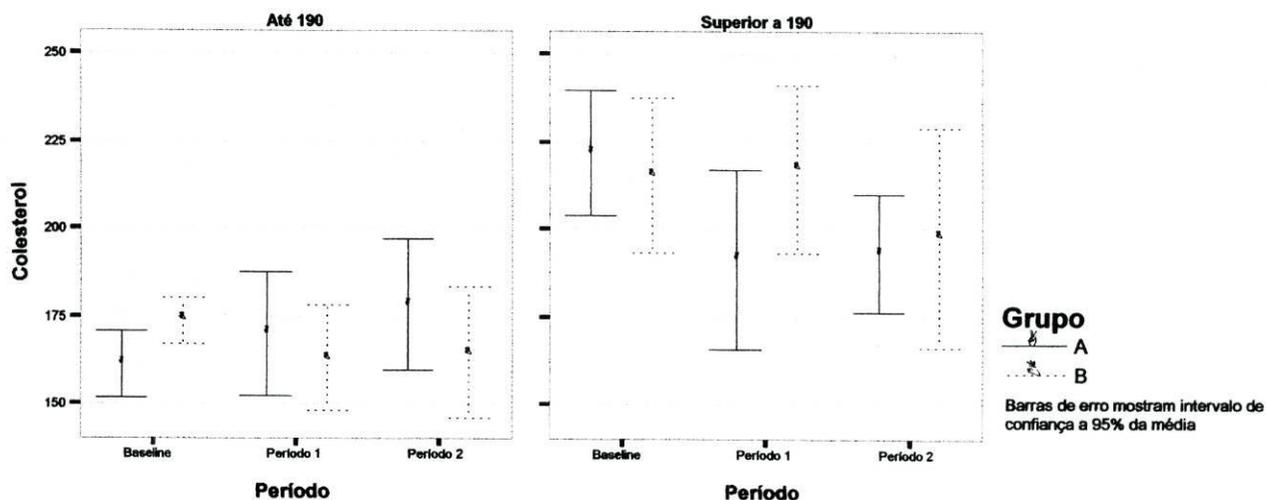
**Tabela 11**  
Descritiva do colesterol por grupo e subgrupo

		Colesterol (grupo)			
		Até 190		Mais de 190	
		Grupo		Grupo	
		A	B	A	B
Colesterol ( <i>Baseline</i> )	Média	161	174	222	215
	Desvio Padrão	13	7	23	26
	N	10	7	9	8
Colesterol (Período 1)	Média	169,90	162,86	191,44	217,25
	Desvio Padrão	24,92	16,25	33,04	28,73
	N	10	7	9	8
Colesterol (Período 2)	Média	178,10	164,57	193,11	197,88
	Desvio Padrão	26,06	20,02	21,80	37,33
	N	10	7	9	8

Os gráficos seguintes (2.1. e 2.2.) mostram os intervalos de confiança.

**Gráficos 2.1. e 2.2.**

Intervalos de confiança por grupo e subgrupo- colesterol



Para saber se estas diferenças são estatisticamente significativas fomos avaliar o efeito do período nos valores médios do colesterol através da ANOVA, para cada um dos subgrupos (até 190 e mais de 190 mg/dl).

**Tabela 12**  
Efeito do período na variação do colesterol para os subgrupos - ANOVA

Colesterol (grupo)	Fonte de variação		Soma dos quadrados	g.l.	Média dos quadrados	F	Valor-p
Até 190	Período	Assume a esfericidade	391,804	2	195,902	,967	,391
	Erro(Período)	Assume a esfericidade	6485,529	32	202,673		
Mais de 190	Período	Assume a esfericidade	4744,157	2	2372,078	5,623	,008
	Erro(Período)	Assume a esfericidade	13498,510	32	421,828		

gl- graus de liberdade

De facto, nos indivíduos com mais de 190 mg/dl, o efeito do período nos valores médios de colesterol é significativo ( $p=0,008$ ). É importante saber em que grupos e em que períodos estas diferenças têm significado estatístico, pelo que na tabela 13 foi feita esta identificação.

**Tabela 13**  
Identificação dos períodos e dos grupos para os indivíduos com colesterol >190 mg/dl – ANOVA (variável colesterol)

Grupo	Fonte de variação	Período	Soma dos quadrados	g.l.	Média dos quadrados	F	Valor-p
A	Período	Baseline vs. Período 1	8160,111	1	8160,111	29,906	,001
		Período 1 vs. Período 2	25,000	1	25,000	,027	,874
	Erro (Período)	Baseline vs. Período 1	2182,889	8	272,861		
		Período 1 vs. Período 2	7504,000	8	938,000		
B	Período	Baseline vs. Período 1	28,125	1	28,125	,026	,875
		Período 1 vs. Período 2	3003,125	1	3003,125	3,909	,089
	Erro (Período)	Baseline vs. Período 1	7448,875	7	1064,125		
		Período 1 vs. Período 2	5377,875	7	768,268		

gl-graus de liberdade

Pode-se concluir que apenas os indivíduos com mais de 190 mg/dl do grupo A, apresentaram reduções significativas do *baseline* para o período 1, ou seja, no período em que consumiram o produto teste ( $p=0,001$ ). O mesmo não se verificou nos indivíduos (com mais de 190) do grupo A no período 2 ( $p= 0,874$ ) nem para os indivíduos do grupo B, quer no período 1( $p=0,875$ ), quer no período 2 ( $p=0,089$ ).

### 3.1.2. LDL

**Tabela 14**  
Descritiva das LDL

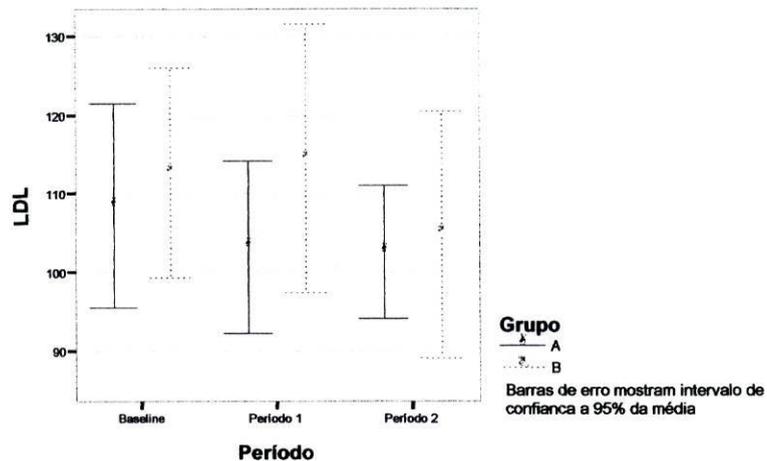
			LDL	
			Grupo	
			A (n=19)	B (n=19)
Período	<i>Baseline</i>	Mínimo	72	85
		Máximo	159	175
		Média	108	113
		Desvio Padrão	27	24
	Período 1	Mínimo	70	78
		Máximo	147	170
		Média	103	114
		Desvio Padrão	23	31
	Período 2	Mínimo	75	65
		Máximo	134	164
		Média	103	105
		Desvio Padrão	18	28

A estatística descritiva para as LDL indica que:

- O grupo A tinha em média 108 mg/dl no *baseline*. Este valor diminuiu para 103 mg/dl no fim do período 1 e manteve-se até o final do período 2.
- No grupo B a média das LDL era de 113 mg/dl no *baseline*, passou para 114 mg/dl no final do período 1 e para 105 mg/dl no final do período 2

O gráfico 3 ilustra a evolução das LDL (intervalos de confiança) em cada grupo desde o *baseline* até ao fim do período 2.

**Gráfico 3**  
Intervalos de confiança- LDL



O Teste T para Amostras não Relacionadas, representado na tabela 15, indica-nos que o grupo A e o grupo B são comparáveis quanto à variável LDL.

**Tabela 15**  
Teste T para Amostras não Relacionadas - LDL

		Teste de Levene da igualdade de variâncias		Teste t-Student					
		F	Valor-p	t	g.l.	Valor-p (bilateral)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença das médias a 95%	
								Limite inferior	Limite superior
LDL( <i>Baseline</i> )	Assume igualdade de variâncias	,427	,518	-,477	32	,636	-4,246	-22,358	13,866
	Não assume igualdade de variâncias			-,484	31,457	,632	-4,246	-22,125	13,633

g.l- graus de liberdade

Tal como foi feito para o colesterol total, também foi aplicada a ANOVA para a variável LDL, com a finalidade de testar os efeitos do tratamento, do período e do indivíduo.

**Tabela 16**  
ANOVA- LDL

			Soma dos quadrados	g.l.	Média dos quadrados	F	Valor-p
Fonte de variação	Tratamento	Hipótese	338,163	1	338,163	2,233	,145
		Erro	4845,719	32	151,429		
	Período	Hipótese	449,045	1	449,045	2,965	,095
		Erro	4845,719	32	151,42)		
	ID	Hipótese	35443,529	33	1074,046	7,093	,000
		Erro	4845,719	32	151,42)		

gl-graus de liberdade

Na tabela 15 é possível observar que os valores médios de LDL encontrados não dependem nem do tratamento ( $p=0,145$ ) nem dos período ( $p=0,095$ ), mas sim da variabilidade dentro do grupo (ID) ( $p<0,01$ ).

#### Efeito do período no Grupo A e no Grupo B

De seguida é analisado, em separado para cada um dos grupos, o efeito do período através da ANOVA, tal como foi feito para o colesterol total.

**Tabela 17**  
Efeito do período na variação das LDL para os Grupos A e B - ANOVA

Grupo	Fonte de variação	Soma dos quadrados	g.l.	Média dos quadrados	F	Valor-p
A	período	394,982	2	197,491	,999	,378
	Erro(Período)	7115,018	36	197,639		
B	período	792,844	2	396,422	2,315	,117
	Erro(Período)	4794,489	28	171,232		

gl-graus de liberdade

Quer para o grupo A ( $p=0,378$ ), quer para o grupo B ( $p=0,117$ ), o período não exerce efeito significativo.

Fomos averiguar se a colesterolémia inicial no *baseline* afecta a evolução de valores das LDL ao longo do estudo.

Para tal, foi utilizado o mesmo ponto de corte que para o colesterol, ou seja, os indivíduos foram divididos nos que tinham valores de colesterol no *baseline* inferiores ou iguais a 190 mg/dl e nos com mais de 190 mg/dl (tabela 18).

**Tabela 18**

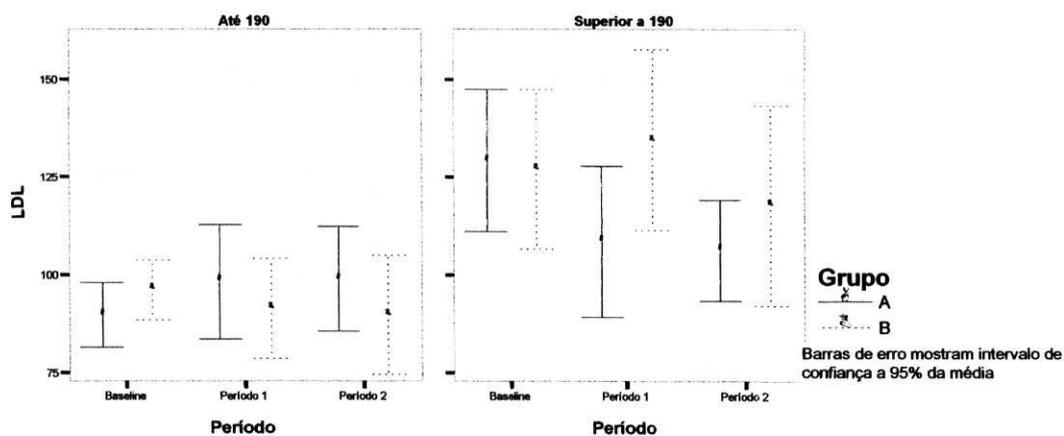
Descritiva das LDL por grupo e subgrupo

		Colesterol (grupo)			
		Até 190		Mais de 190	
		Grupo		Grupo	
		A	B	A	B
LDL( <i>Baseline</i> )	Média	90	96	129	127
	Desvio Padrão	11	8	24	24
	N	10	7	9	8
LDL(Período 1)	Média	98,30	91,57	108,67	134,50
	Desvio Padrão	20,43	13,77	25,22	27,69
	N	10	7	9	8
LDL(Período 2)	Média	99,00	89,71	106,44	118,00
	Desvio Padrão	18,45	16,39	16,82	30,70
	N	10	7	9	8

Os gráficos 4.1. e 4.2. ilustram os intervalos de confiança.

**Gráficos 4.1. e 4.2.**

Intervalos de confiança por grupo e subgrupo- LDL



A tabela 18 e os gráficos 4.1. e 4.2. apresentam a evolução das LDL em ambos os subgrupos. Através da ANOVA (tabela 19), vamos então verificar se as variações foram significativas.

**Tabela 19**

Efeito do período na variação das LDL para os subgrupos – ANOVA

Colesterol (grupo)	Fonte de variação	Soma dos quadrados	g.l.	Média dos quadrados	F	Valor-p
Até 190	Período	99,098	2	49,549	,474	,627
	Erro(Período)	3346,235	32	104,570		
Mais de 190	Período	2263,882	2	1131,941	4,903	,014
	Erro(Período)	7388,118	32	230,879		

gl-graus de liberdade

Na tabela 19, podemos observar que o período exerce um efeito estatisticamente significativo nas LDL dos indivíduos com mais de 190 mg/dl de colesterol ( $p=0,014$ ).

A tabela 20 identifica os períodos e o significado estatístico das variações para cada grupo.

**Tabela 20**

Identificação dos períodos e dos grupos para os indivíduos com colesterol >190 mg/dl – ANOVA (variável LDL)

Grupo	Fonte de variação	LDL	Soma dos quadrados	g.l.	Média dos quadrados	F	Valor-p
A	LDL	Baseline vs. Período 1	3802,778	1	3802,778	18,042	,003
		Período 1 vs. Período 2	44,444	1	44,444	,100	,760
	Erro(LDL)	Baseline vs. Período 1	1686,222	8	210,778		
		Período 1 vs. Período 2	3559,556	8	444,944		
B	LDL	Baseline vs. Período 1	450,000	1	450,000	,856	,386
		Período 1 vs. Período 2	2178,000	1	2178,000	5,618	,050
	Erro(LDL)	Baseline vs. Período 1	3682,000	7	526,000		
		Período 1 vs. Período 2	2714,000	7	387,714		

gl-graus de liberdade

Da análise da estatística descritiva (tabela 18) e da ANOVA (tabela 20), resulta que:

- No grupo A, os indivíduos com mais de 190 mg/dl, apresentaram uma redução estatisticamente significativa das LDL, de 129 mg/dl (no *baseline*) para 109 mg/dl (no final do período 1), com um valor de p de 0,003; do período 1 para o período 2 houve uma redução de 109 mg/dl para 106 mg/dl, mas sem significado estatístico ( $p=0,760$ )
- No grupo B, os indivíduos com mais de 190 mg/dl, tiveram uma redução estatisticamente significativa do período 1 para o período 2, de 134,5 mg/dl para 118 mg/dl ( $p=0,05$ ); o mesmo não se verificou no final do período 1, no qual as LDL até aumentaram de 127 mg/dl para 134,5 mg/dl mas de modo não significativo ( $p=0,386$ ).

De salientar que as diferenças encontradas dizem respeito ao período em que os dois grupos fizeram o produto teste, ou seja, o período 1 para os indivíduos do grupo A e o período 2 para os indivíduos do grupo B.

Podemos observar na tabela 21 a percentagem da redução das LDL no período do produto teste.

**Tabela 21**

Decréscimo das LDL com o produto teste

		Colesterol (grupo)		
		Até 190	Mais de 190	Total
Variação (%) das LDL no grupo A, período 1	Média	9,52	-15,99	-2,56
	N	10	9	19
	Mínimo	-17,65	-37,39	-37,39
	Máximo	30,69	-2,00	30,69
Variação (%) das LDL no grupo B, período 2	Média	-1,88	-12,49	-7,54
	N	7	8	15
	Mínimo	-17,28	-28,13	-28,13
	Máximo	19,54	12,33	19,54

Os indivíduos do grupo A com mais de 190 mg/dl tiveram uma diminuição de 16% nas LDL do *baseline* para o período 1 e os do grupo B apresentaram uma redução na ordem dos 12,5% do período 1 para o período 2.

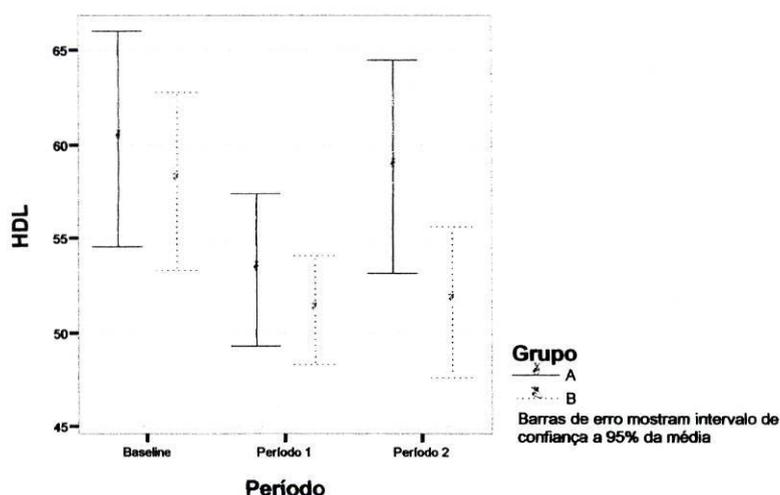
### 3.1.3. HDL

**Tabela 22**  
Descritiva das HDL

			HDL	
			Grupo	
			A	B
Período	<i>Baseline</i>	N	19	15
		Mínimo	39	46
		Máximo	82	82
		Média	60	58
		Desvio Padrão	12	8
	Período 1	N	19	15
		Mínimo	39	45
		Máximo	67	64
		Média	53	51
		Desvio Padrão	8	5
	Período 2	N	19	15
		Mínimo	40	38
		Máximo	79	64
		Média	59	52
		Desvio Padrão	12	7

Em média os indivíduos do grupo A apresentaram valores de HDL de 60mg/dl e os do grupo B de 58 mg/dl no *baseline* . Estes valores decresceram até o final do período 1 em ambos os grupos, para 53 e 51 mg/dl, respectivamente. No final do período 2, as HDL aumentaram nos dois grupos para 59 e 52 mg/dl, sendo que a diferença mais ligeira foi para o grupo B.

**Gráfico 5**  
Intervalos de confiança- HDL



No gráfico 5 podemos observar as semelhanças entre os grupos no *baseline* e no final do período 1. Já no final do período 2 os valores das HDL para cada grupo diferem, pois no grupo A aumentam mais que no grupo B.

O Teste T para Amostras não Relacionadas, diz-nos que os dois grupos são comparáveis quanto às HDL (tabela 23).

**Tabela 23**  
Teste T para Amostras não Relacionadas - HDL

		Teste de Levene da igualdade de variâncias		Teste t-Student					
		F	Valor-p	t	g.l.	Valor-p (bilateral)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença das médias a 95%	
								Limite inferior	Limite superior
HDL ( <i>Baseline</i> )	Assume igualdade de variâncias	3,704	,063	,605	32	,549	2,196	-5,198	9,591
	Não assume igualdade de variâncias			,629	31,735	,534	2,196	-4,914	9,307

gl-graus de liberdade

De forma a averiguar se as diferenças encontradas na descritiva têm significado estatístico, foi feita a ANOVA (tabela 24).

**Tabela 24**  
ANOVA- HDL

Fonte de variação	Soma dos quadrados	g.l.	Média dos quadrados	F	Valor-p
Tratamento	105,074	1	105,074	4,727	,037
Período	147,897	1	147,897	6,654	,015
ID	4471,368	33	135,496	6,096	,000
Erro	711,235	32	22,226		

A ANOVA indica-nos que, para além da variabilidade dentro do grupo provocada pelos indivíduos ( $p < 0,01$ ), a variabilidade entre os indivíduos de cada grupo exerce diferenças, quer pelo efeito do tratamento ( $p = 0,037$ ), quer pelo efeito do período ( $p = 0,015$ ), ou seja, o produto teste teve um efeito significativo nos níveis de HDL. Vamos então ver para cada um dos grupos separadamente.

#### Efeito do período no Grupo A e no Grupo B

**Tabela 25**  
Efeito do período na variação das HDL para os Grupos A e B - ANOVA

Grupo	Fonte de variação	Soma dos quadrados	g.l.	Média dos quadrados	F	Valor-p
A	Período	503,614	2	251,807	9,049	,001
	Erro(Período)	1001,719	36	27,826		
B	período	441,644	2	220,822	8,233	,002
	Erro(Período)	751,022	28	26,822		

gl-graus de liberdade

Esta tabela diz-nos que as diferenças estatisticamente significativas que foram encontradas na ANOVA ocorreram em ambos os grupos.

Interessa determinar qual o período que provoca diferenças significativas, de forma a saber se foi quando os participantes consumiram o produto teste ou quando consumiram o de referência.

**Tabela 26**  
Identificação do período para os grupos A e B- ANOVA (variável HDL)

Grupo	Fonte de variação	Período	Soma dos quadrados	gl	Média dos quadrados	F	Valor-p
A	período	<i>Baseline vs. Período 1</i>	903,211	1	903,211	24,943	,000
		<i>Período 1 vs. Período 2</i>	569,263	1	569,263	11,452	,003
	Erro(Período)	<i>Baseline vs. Período 1</i>	651,789	18	36,211		
		<i>Período 1 vs. Período 2</i>	894,737	18	49,708		
B	período	<i>Baseline vs. Período 1</i>	707,267	1	707,267	17,754	,001
		<i>Período 1 vs. Período 2</i>	3,267	1	3,267	,087	,773
	Erro(Período)	<i>Baseline vs. Período 1</i>	557,733	14	39,838		
		<i>Período 1 vs. Período 2</i>	527,733	14	37,695		

gl-graus de liberdade

Da análise da tabela 26 pode-se constatar que:

- No grupo A as alterações significativas ocorreram em ambos os períodos (1 e 2): de 60,26 mg/dl para 53,37 mg/dl no período 1 ( $p < 0,01$ ) e de 53,37 mg/dl para 58,84 mg/dl no período 2 ( $p = 0,003$ ).
- No grupo B as alterações significativas foram verificadas apenas no período 1, com um decréscimo de 58,07 para 51,20 mg/dl ( $p = 0,001$ ).

Assim, os indivíduos do grupo A apresentaram uma redução das HDL quando consumiram o produto teste e um aumento, quando consumiram o produto de referência. Por outro lado nos indivíduos do grupo B foi verificada uma pequena redução quando estes consumiram o produto de referência e nenhuma diferença significativa quando consumiram o produto teste.

Tal como foi feito para o colesterol total e para as LDL, fomos determinar se para as HDL a colesterolémia inicial dos indivíduos teve alguma influência sobre os resultados encontrados. Foi utilizado o mesmo ponto de corte (190 mg/dl) (tabelas 27, 28, 29)

**Tabela 27**  
 Descritiva das HDL por grupo e por subgrupo

		Colesterol (grupo)			
		Até 190		Mais de 190	
		Grupo		Grupo	
		A	B	A	B
HDL (Baseline)	Média	55	58	66	58
	Desvio Padrão	12	6	9	11
	N	10	7	9	8
HDL (Período 1)	Média	50,60	51,43	56,44	51,00
	Desvio Padrão	7,88	6,45	8,20	4,34
	N	10	7	9	8
HDL (Período 2)	Média	56,40	52,43	61,56	51,00
	Desvio Padrão	12,12	6,95	11,15	7,89
	N	10	7	9	8



**Tabela 28**

Efeito do período na variação das HDL para os subgrupos - ANOVA

Colesterol	Fonte de variação	Soma dos quadrados	g.l.	Média dos quadrados	F	Valor-p
Até 190	Período	263,098	2	131,549	4,034	,027
	Erro(Período)	1043,569	32	32,612		
Mais de 190	Período	617,569	2	308,784	12,770	,000
	Erro(Período)	773,765	32	24,180		

gl-graus de liberdade

**Tabela 29**

Identificação dos períodos para os grupos e subgrupos- ANOVA (variável HDL)

Grupo	Colesterol (grupo)	Fonte de variação	HDL	Soma dos quadrados	gl.	Média dos quadrados	F	Valor-p
A	Até 190	HDL	Baseline vs. Período 1	202,500	1	202,500	5,651	,041
			Período 1 vs. Período 2	336,400	1	336,400	5,152	,049
		Erro(HDL)	Baseline vs. Período 1	322,500	9	35,833		
			Período 1 vs. Período 2	587,600	9	65,289		
	Mais de 190	HDL	Baseline vs. Período 1	821,778	1	821,778	31,573	,000
			Período 1 vs. Período 2	235,111	1	235,111	6,169	,038
		Erro(HDL)	Baseline vs. Período 1	208,222	8	26,028		
			Período 1 vs. Período 2	304,889	8	38,111		
B	Até 190	HDL	Baseline vs. Período 1	315,571	1	315,571	10,436	,018
			Período 1 vs. Período 2	7,000	1	7,000	,134	,727
		Erro(HDL)	Baseline vs. Período 1	181,429	6	30,238		
			Período 1 vs. Período 2	314,000	6	52,333		

	Mais de 190	HDL	Baseline vs. Período 1	392,000	1	392,000	7,298	,031
			Período 1 vs. Período 2	,000	1	,000	,000	1,000
		Erro(HDL)	Baseline vs. Período 1	376,000	7	53,714		
			Período 1 vs. Período 2	210,000	7	30,000		

gl-graus de liberdade

Através das tabelas 27, 28 e 29, podemos concluir que:

- Para o grupo A as diferenças com significado estatístico ( $p < 0,05$ ) ocorreram quer nos indivíduos com colesterol até 190, quer nos com mais de 190 mg/dl, em ambos os períodos.
- Para o grupo B, nos indivíduos com valores até 190 mg/dl, as diferenças foram significativas em ambos os períodos (1 e 2), mas nos indivíduos com mais de 190 mg/dl as diferenças foram significativas apenas no final do período 1.

Na tabela 30 foram calculadas as alterações da relação LDL/HDL no período do produto teste.

**Tabela 30**  
Decréscimo da relação LDL/HDL com o produto teste

		Colesterol (subgrupo)		
		Até 190	Mais de 190	Total
Variação (%) de LDL/HDL no grupo A período 1	N	10	9	19
	Mínimo	-17,65	-14,38	-17,65
	Máximo	62,95	9,16	62,95
	Média	19,13	-2,01	9,12
	Desvio Padrão	25,23	8,76	21,68
Variação (%) de LDL/HDL no grupo B período 2	N	7	8	15
	Mínimo	-27,38	-20,36	-27,38
	Máximo	13,36	3,72	13,36
	Média	-3,41	-12,37	-8,19
	Desvio Padrão	14,19	8,06	11,84

Em média, no período do produto teste, houve um aumento de 9% na relação LDL/HDL no grupo A e um decréscimo de 8% no grupo B. Olhando para os subgrupos, podemos confirmar que no grupo A, os indivíduos com 190 mg/dl ou menos de colesterol total, tiveram um acréscimo de 19% e os indivíduos com

mais de 190, uma redução de 2%, enquanto que no grupo B, a relação LDL/HDL diminuiu em ambos os subgrupos, 3,4% nos indivíduos com colesterol até 190 e 12,4% nos com mais de 190 mg/dl.

#### 3.1.4. Triacilgliceróis

Através dos parâmetros de localização e dispersão descritos na tabela 31, podemos inferir que estes lípidos variaram pouco ao longo das 9 semanas de estudo.

**Tabela 31**  
Descritiva dos Triacilgliceróis

		Triacilgliceróis		
		Grupo		
		A	B	
Período	<i>Baseline</i>	Mínimo	41	49
		Máximo	201	159
		Média	87	87
		Desvio Padrão	36	32
		N	19	15
	Período 1	Mínimo	30	35
		Máximo	132	136
		Média	85	87
		Desvio Padrão	28	27
		N	19	15
	Período 2	Mínimo	38	34
		Máximo	139	143
		Média	82	84
		Desvio Padrão	27	33
		N	19	15

**Tabela 32**  
Teste T para Amostras não Relacionadas

		Teste de Levene da igualdade de variâncias		Teste t-Student					
		F	Valor-p	t	g.l.	Valor-p (bilateral)	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença das médias a 95%	
								Limite inferior	Limite superior
Triacilgliceróis ( <i>Baseline</i> )	Assume igualdade de variâncias	,000	,994	,079	32	,938	,940	-23,320	25,201
	Não assume igualdade de variâncias			,080	31,600	,937	,940	-22,950	24,831

Como o valor de p é superior a 0,05 no *baseline* podemos comparar os valores de triacilgliceróis entre ambos os grupos (tabela 32).

**Tabela 33**  
ANOVA - Triacilgliceróis

			Soma dos quadrados	gl	Média dos quadrados	F	Valor-p
Fonte de variação	Tratamento	Hipótese	1,177	1	1,177	,004	,949
		Erro	9010,309	32	281,572		
	Período	Hipótese	151,059	1	151,059	,536	,469
		Erro	9010,309	32	281,57		
	ID	Hipótese	44487,721	33	1348,113	4,788	,000
		Erro	9010,309	32	281,57		

gl-graus de liberdade

Segundo a ANOVA (tabela 33), apenas o efeito da variabilidade dentro do grupo provocada pelos indivíduos exerce efeito significativo nos valores deste lípido.

Dados os resultados quer da estatística descritiva, quer da ANOVA (note-se que os valores de p estão longe de serem significativos), não foram realizados mais testes para esta variável. Resume-se que, as pequenas flutuações encontradas nos valores de triacilgliceróis não foram provocadas nem pelo período, nem pelo tratamento, mas sim pela variabilidade dos indivíduos dentro de cada grupo

### 3.2. INGESTÃO ALIMENTAR

Na tabela 34 estão os parâmetros de localização e de dispersão das variáveis da ingestão alimentar. O *baseline*, o período 1 e o período 2, correspondem às avaliações da ingestão alimentar realizadas nas semanas 0, 4 e 9, respectivamente.

**Tabela 34**  
Descritiva das variáveis da ingestão alimentar

Grupo			Kcal	Prot (g)	Prot %	Gord (g)	Gord %	HC (g)	HC %	Álc (g)	Álc %
A	<i>Baseline</i>	N	19	19	19	19	19	19	19	19	19
		Mínimo	862	28	9	16	16,0	126	34,0	0	0
		Máximo	2543	119	26	101	42,0	447	70,0	23	10
		Média	1509	66	18	48	28,4	206	53,1	2	1
		Desvio Padrão	477	25	5	24	8,6	82	11,9	5	2
Período 1	N	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
	Mínimo	795	37	11	20	17,3	104	41,1	0	0	
	Máximo	2700	119	24	125	41,8	354	68,4	33	16	
	Média	1638	78	19	50	26,6	224	52,5	3	1	
	Desvio Padrão	444	22	4	24	6,7	60	7,8	8	4	
Período 2	N	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
	Mínimo	607	31	10	11	15,6	76	36,0	0	0	
	Máximo	3428	197	27	161	42,4	600	70,6	23	6	
	Média	1781	87	20	56	27,9	237	50,5	3	1	
	Desvio Padrão	855	43	5	34	7,2	131	9,9	7	2	
B	<i>Baseline</i>	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15
		Mínimo	643	24	10	4	6,0	101	40,0	0	0
		Máximo	4021	98	27	127	39,0	796	79,0	8	4

	Média	1641	67	18	46	25,7	256	56,1	1	0
	Desvio Padrão	911	23	6	27	9,3	187	12,5	2	1
Período 1	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	Mínimo	995	42	13	21	17,1	116	25,7	0	0
	Máximo	2570	127	27	85	38,6	359	69,2	37	15
	Média	1464	70	20	48	28,2	190	50,1	4	1
	Desvio Padrão	461	22	4	23	7,3	65	10,1	10	4
Período 2	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	Mínimo	929	32	11	21	17,9	114	38,0	0	0
	Máximo	2529	109	29	62	39,6	395	71,2	28	12
	Média	1467	70	20	42	26,5	204	52,2	3	1
	Desvio Padrão	402	23	5	13	7,0	80	9,1	8	4

Kcal- quilocalorias; Prot (g)-proteínas (gramas); Prot %-proteínas (percentagem); Gord. (g)- gordura (gramas); Gord %- gordura (percentagem); HC (g)- hidratos de carbono (gramas); HC %- hidratos de carbono (percentagem); Álcool (g)- álcool (gramas); Álcool %- álcool (percentagem).

Para testar a normalidade destas variáveis nestes três períodos, o Teste One-Sample Kolmogorov-Smirnov foi efectuado nestes três momentos (tabela 35).

**Tabela 35**  
Teste One-Sample Kolmogorov-Smirnov – Ingestão Alimentar

Grupo	Período		Kcal	Prot (g)	Prot%	Gord (g)	Gord%	HC (g)	HC%	Álc (g)	Álc%
A	Baseline	N	19	19	19	19	19	19	19	19	19
		Kolmogorov-Smirnov Z	,670	,575	,482	,566	,679	,808	,611	2,230	2,241
		Valor - p	,761	,896	,974	,906	,745	,531	,849	,000	,000
	Período 1	N	19	19	19	19	19	19	19	19	19
		Kolmogorov-Smirnov Z	,548	,661	,680	,764	,665	,954	,656	2,252	2,235
		Valor - p	,925	,774	,744	,604	,768	,323	,783	,000	,000
	Período 2	N	19	19	19	19	19	19	19	19	19
		Kolmogorov-Smirnov Z	,740	,911	,576	,927	,625	,694	,520	1,824	1,830
		Valor - p	,643	,377	,895	,356	,829	,722	,949	,003	,002
B	Baseline	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15
		Kolmogorov-Smirnov Z	,891	,555	,565	,921	,611	,907	,698	2,073	2,073
		Valor - p	,405	,917	,907	,365	,849	,383	,714	,000	,000
	Período 1	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15
		Kolmogorov-Smirnov Z	,874	,788	,694	1,117	,803	,665	,534	1,714	1,728
		Valor - p	,430	,564	,720	,165	,540	,769	,938	,006	,005
	Período 2	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15
		Kolmogorov-Smirnov Z	,633	,531	,494	,518	,761	,997	,681	1,970	1,978
		Valor - p	,818	,941	,968	,951	,609	,273	,742	,001	,001

Kcal- quilocalorias; Prot (g)-proteínas (gramas); Prot %-proteínas (percentagem); Gord. (g)- gordura (gramas); Gord %- gordura (percentagem); HC (g)- hidratos de carbono (gramas); HC %- hidratos de carbono (percentagem); Álcool (g)- álcool (gramas); Álcool %- álcool (percentagem).

Da análise da tabela anterior, pode-se constatar que apenas o álcool não tem uma distribuição normal.

Para averiguar se existiram diferenças entre a ingestão alimentar do grupo A e do grupo B, foi efectuado o Teste T para Amostras não Relacionadas para cada uma das variáveis, no *baseline*, no período 1 e no período 2 (tabelas 36, 37, 38). As diferenças entre a ingestão alcoólica de cada grupo foram verificadas através do Teste de Mann-Whitney (tabela 39).

**Tabela 36**

Teste T para Amostras não Relacionadas – Ingestão alimentar no *baseline* (grupo A e grupo B)

		Teste de Levene da igualdade de variâncias		Teste t-Student					
		F	Valor-p	t	g.l.	Valor-p	Diferença das médias	Intervalo de Confiança da diferença das médias a 95%	
								Limite inferior	Limite superior
Kcal ( <i>Baseline</i> )	Assume igualdade de variâncias	4,490	,042	-,545	32	,590	-131,912	-625,066	361,242
	Não assume igualdade de variâncias			-,508	19,999	,617	-131,912	-673,174	409,349
Prot (g) ( <i>Baseline</i> )	Assume igualdade de variâncias	,052	,821	-,040	32	,968	-,337	-17,369	16,695
	Não assume igualdade de variâncias			-,041	31,303	,968	-,337	-17,188	16,515
Prot % ( <i>Baseline</i> )	Assume igualdade de variâncias	1,113	,299	-,140	32	,890	-,263	-4,096	3,570
	Não assume igualdade de variâncias			-,137	27,265	,892	-,263	-4,206	3,680
Gord (g) ( <i>Baseline</i> )	Assume igualdade de variâncias	,188	,668	,314	32	,755	2,740	-15,012	20,493
	Não assume igualdade de variâncias			,309	27,896	,760	2,740	-15,426	20,906
Gord % ( <i>Baseline</i> )	Assume igualdade de variâncias	,148	,703	,883	32	,384	2,7333	-3,5703	9,0369
	Não assume igualdade de variâncias			,875	29,006	,389	2,7333	-3,6560	9,1227
HC (g) ( <i>Baseline</i> )	Assume igualdade de variâncias	6,081	,019	-1,040	32	,306	-49,526	-146,509	47,456
	Não assume igualdade de variâncias			-,958	18,224	,351	-49,526	-158,090	59,038
HC % ( <i>Baseline</i> )	Assume igualdade de variâncias	,050	,824	-,702	32	,488	-2,9561	-11,5295	5,6173



HC% (Período 1)	Assume igualdade de variâncias	,127	,723	,775	32	,444	2,3731	-3,86682	8,6130
	Não assume igualdade de variâncias			,752	25,944	,459	2,373	-4,1162	8,8625

Kcal- quilocalorias; Prot (g)-proteínas (gramas); Prot %-proteínas (percentagem); Gord. (g)- gordura (gramas); Gord %- gordura (percentagem); HC (g)- hidratos de carbono (gramas); HC %- hidratos de carbono (percentagem); Álcool (g)- álcool (gramas); Álcool %- álcool (percentagem).

No período 1, os dois grupos também não apresentaram diferenças significativas na ingestão alimentar (tabela 37).

**Tabela 38**

Teste T para Amostras não Relacionadas – Ingestão alimentar no período 2 (grupo A e grupo B)

		Teste de Levene da igualdade de variâncias		Teste t-Student					Intervalo de Confiança da diferença das médias a 95%	
		F	Valor-p	t	g.l.	Valor-p (bilateral)	Diferença das médias	Limite inferior	Limite superior	
Kcal (Período 2)	Assume igualdade de variâncias	4,968	,033	1,312	32	,199	314,6933	-173,8275	803,211	
	Não assume igualdade de variâncias			1,418	26,787	,168	314,6933	-140,9232	770,309	
Prot.(g) (Período 2)	Assume igualdade de variâncias	2,932	,097	1,363	32	,183	16,7509	-8,2903	41,7921	
	Não assume igualdade de variâncias			1,460	28,284	,155	16,7509	-6,7396	40,2413	
Prot % (Período 2)	Assume igualdade de variâncias	,712	,405	,440	32	,663	,7435	-2,6956	4,18271	
	Não assume igualdade de variâncias			,433	28,084	,668	,7435	-2,7702	4,25731	
Gord.(g) (Período 2)	Assume igualdade de variâncias	3,128	,086	1,458	32	,155	13,61754	-5,41122	32,64631	
	Não assume igualdade de variâncias			1,598	23,878	,123	13,61754	-3,97271	31,20780	
Gord % (Período 2)	Assume igualdade de variâncias	,161	,691	,554	32	,584	1,3573	-3,6343	6,3491	
	Não assume igualdade de variâncias			,556	30,613	,582	1,35734	-3,6240	6,3388	
HC (g) (Período 2)	Assume igualdade de variâncias	2,423	,129	,845	32	,405	32,5158	-45,9094	110,9410	
	Não assume igualdade de variâncias			,893	30,260	,379	32,5158	-41,8146	106,8462	
HC % (Período 2)	Assume igualdade de variâncias	,106	,747	-,514	32	,611	-1,70297	-8,45526	5,049z	

	Não assume igualdade de variâncias			-,519	31,198	,607	-1,7029	-8,39365	4,9877
--	--	--	--	-------	--------	------	---------	----------	--------

gl-graus de liberdade

Kcal- quilocalorias; Prot (g)-proteínas (gramas); Prot %-proteínas (percentagem); Gord. (g)- gordura (gramas); Gord %- gordura (percentagem); HC (g)- hidratos de carbono (gramas); HC %- hidratos de carbono (percentagem); Álcool (g)- álcool (gramas); Álcool %- álcool (percentagem).

Todas as variáveis da ingestão alimentar são comparáveis também no período 2 (tabela 38).

Podemos concluir que, quanto à ingestão alimentar (calorias, proteínas, hidratos de carbono e gorduras), não houve diferenças entre os grupos A e B, no *baseline*, no período 1 e no período 2.

Para o álcool foi então utilizado o Teste Mann-Whitney (tabela 39), como alternativa ao Teste T para Amostras não Relacionadas <sup>(80)</sup>.

**Tabela 39**  
Teste de Mann-Whitney- Álcool

	Álc (g) ( <i>Baseline</i> )	Álc % ( <i>Baseline</i> )	Álc (g) (Período 1)	Álc % (Período 1)	Álc (g) (Período 2)	Álc % (Período 2)
Mann-Whitney U	136,500	136,500	130,000	131,000	127,500	129,000
Z	-,423	-,423	-,704	-,647	-,736	-,663
Valor - p	,672	,672	,482	,517	,462	,508

Álc (g)- álcool (gramas); Álcool %- álcool (percentagem).

Os dois grupos são comparáveis quanto à variável álcool.

Com o objectivo de traçar eventuais relações entre a ingestão alimentar e os resultados do estudo, a tabela 40 e a tabela 41 apresentam as correlações entre as variáveis da ingestão alimentar com distribuição normal e os parâmetros do estudo (correlações de Pearson – tabela 40) e entre o álcool e os parâmetros do estudo (correlação de Spearman – tabela 41) <sup>(80)</sup>.

**Tabela 40 – Correlações de Pearson- Ingestão alimentar e parâmetros do estudo**

		Período	Colesterol	LDL	HDL	Triacilgliceróis
Kcal	Correlação de Pearson	<i>Baseline</i>	,029	,059	,064	-,200
		Período 1	,110	,067	,015	,220
		Período 2	,139	,092	,000	,329
	Valor-p	<i>Baseline</i>	,872	,739	,718	,256
		Período 1	,535	,707	,932	,212
		Período 2	,434	,605	,999	,058
Prot (g)	Correlação de Pearson	<i>Baseline</i>	-,128	-,124	,118	-,311
		Período 1	-,039	-,051	,075	-,047
		Período 2	,123	,057	,108	,088
	Valor-p	<i>Baseline</i>	,471	,484	,506	,074
		Período 1	,825	,773	,675	,791
		Período 2	,490	,749	,544	,621
Prot %	Correlação de Pearson	<i>Baseline</i>	-,241	-,283	,098	-,166
		Período 1	-,217	-,167	-,018	-,379(*)
		Período 2	-,016	-,061	,191	-,239
	Valor-p	<i>Baseline</i>	,170	,105	,580	,347
		Período 1	,218	,344	,921	,027
		Período 2	,928	,731	,279	,174
Gord (g)	Correlação de Pearson	<i>Baseline</i>	-,037	,058	-,077	-,294
		Período 1	,287	,300	-,154	,314
		Período 2	,238	,212	,069	,212
	Valor-p	<i>Baseline</i>	,837	,745	,665	,092
		Período 1	,100	,085	,386	,071
		Período 2	,176	,229	,697	,230
Gord %	Correlação de Pearson	<i>Baseline</i>	-,128	-,066	-,044	-,258
		Período 1	,445(**)	,499(**)	-,237	,321
		Período 2	,181	,205	,164	-,022
	Valor-p	<i>Baseline</i>	,472	,710	,803	,140
		Período 1	,008	,003	,178	,064
		Período 2	,306	,245	,355	,900
HC (g)	Correlação de Pearson	<i>Baseline</i>	,086	,079	,100	-,075
		Período 1	,027	-,074	,189	,189
		Período 2	,031	-,011	-,073	,388(*)
	Valor-p	<i>Baseline</i>	,629	,655	,572	,672
		Período 1	,879	,678	,286	,284
		Período 2	,861	,949	,683	,023
HC %	Correlação de Pearson	<i>Baseline</i>	,211	,181	-,013	,281
		Período 1	-,145	-,232	,286	-,015
		Período 2	-,148	-,150	-,206	,138
	Valor-p	<i>Baseline</i>	,230	,304	,941	,107
		Período 1	,412	,186	,101	,933
		Período 2	,403	,396	,244	,435

\*\* A correlação é significativa ao nível de 0,01

\* A correlação é significativa ao nível de 0,05

Kcal- quilocalorias; Prot (g)-proteínas (gramas); Prot %-proteínas (percentagem); Gord. (g)- gordura (gramas); Gord %- gordura (percentagem); HC (g)- hidratos de carbono (gramas); HC %- hidratos de carbono (percentagem); Alc (g)- álcool (gramas); Alc %- álcool (percentagem).

A tabela 40 indica que:

- A correlação entre a ingestão de proteínas ( em percentagem) e os níveis séricos de triacilgliceróis no período 1 foi significativa ( $p=0,027$ ), negativa e baixa ( $-0,379$ ) (inferior a 0,4) <sup>(83)</sup>;
- A correlação entre a ingestão de gordura ( em percentagem) e os níveis séricos de colesterol no período 1, foi significativa ( $p=0,008$ ), positiva e moderada ( $0,445$ ) (entre 0,4 e 0,69) <sup>(83)</sup>;
- A correlação entre a ingestão de gordura (em percentagem) e os níveis séricos de LDL no período 1, foi significativa ( $p=0,003$ ), positiva e moderada ( $0,499$ );
- A correlação entre a ingestão de hidratos de carbono (em gramas) e os níveis séricos de triacilgliceróis no período 2, foi significativa ( $p=0,023$ ), positiva e baixa ( $0,388$ ).

**Tabela 41**  
Correlação de Spearman- Álcool e parâmetros do estudo

	Correlação de Spearman	Período	Colesterol	LDL	HDL	Triacilgliceróis
Álc (g)	Coeficiente de correlação	<i>Baseline</i>	-,112	-,068	,007	-,062
		Período 1	-,231	-,182	-,049	-,194
		Período 2	,177	,163	,040	,132
	Valor-p	<i>Baseline</i>	,527	,704	,967	,730
		Período 1	,189	,303	,782	,271
		Período 2	,316	,356	,824	,456
Álc %	Coeficiente de correlação	<i>Baseline</i>	-,112	-,068	,007	-,062
		Período 1	-,242	-,193	-,050	-,206
		Período 2	,170	,153	,048	,136
	Valor-p	<i>Baseline</i>	,527	,704	,967	,730
		Período 1	,168	,273	,777	,243
		Período 2	,337	,387	,789	,443

Álc (g)- álcool (gramas); Álc %- álcool (percentagem).

As correlações entre o álcool e os parâmetros do estudo não tiveram significado estatístico ( $p>0,01$ ) (tabela 41).

Com a finalidade de verificar se a ingestão alimentar entre os indivíduos com colesterolémia inferior ou igual a 190 mg/dl e os indivíduos com colesterolémia

superior a 190 mg/dl foi diferente, foi aplicado o Teste T para Amostras Relacionadas (tabela 42), que compara as médias destes dois subgrupos dentro do mesmo grupo, antes da intervenção e em cada um dos períodos <sup>(80)</sup>.

Tabela 42

Teste T para Amostras Relacionadas por subgrupo e por período – Ingestão alimentar

	Colesterol (subgrupo)	Diferenças dos pares		Teste t para amostras emparelhadas		
		Média	Desvio Padrão	t	g.l.	Valor-p
Kcal ( <i>Baseline</i> ) - Kcal (Período 1)	Até 190	12,976	575,445	,093	16	,927
	Mais de 190	-,435	461,360	-,004	16	,997
Kcal (Período 1) - Kcal (Período 2)	Até 190	-38,118	579,077	-,271	16	,790
	Mais de 190	-124,318	624,363	-,821	16	,424
Prot (g) ( <i>Baseline</i> ) - Prot (g) (Período 1)	Até 190	-9,224	29,388	-1,294	16	,214
	Mais de 190	-7,400	24,267	-1,257	16	,227
Prot (g) (Período 1) - Prot (g) (Período 2)	Até 190	-3,118	36,232	-,355	16	,727
	Mais de 190	-6,824	30,187	-,932	16	,365
Prot % ( <i>Baseline</i> ) - Prot % (Período 1)	Até 190	-1,858	7,212	-1,062	16	,304
	Mais de 190	-1,419	4,630	-1,264	16	,224
Prot % (Período 1) - Prot % (Período 2)	Até 190	,116	4,051	,118	16	,907
	Mais de 190	-1,027	5,044	-,839	16	,414
Gord (g) ( <i>Baseline</i> ) - Gord (g) (Período 1)	Até 190	-1,615	20,132	-,331	16	,745
	Mais de 190	-1,851	22,878	-,334	16	,743
Gord (g) (Período 1) - Gord (g) (Período 2)	Até 190	-,412	30,025	-,057	16	,956
	Mais de 190	-1,706	30,909	-,228	16	,823
Gord % ( <i>Baseline</i> ) - Gord % (Período 1)	Até 190	,893	8,793	,419	16	,681
	Mais de 190	-1,117	10,283	-,448	16	,660
Gord % (Período 1) - Gord % (Período 2)	Até 190	-1,450	9,339	-,640	16	,531
	Mais de 190	1,559	8,431	,762	16	,457
HC (g) ( <i>Baseline</i> ) - HC (g) (Período 1)	Até 190	24,071	149,995	,662	16	,518
	Mais de 190	14,776	78,955	,772	16	,452
HC (g) (Período 1) - HC (g) (Período 2)	Até 190	-10,000	82,340	-,501	16	,623
	Mais de 190	-16,941	97,114	-,719	16	,482
HC % ( <i>Baseline</i> ) - HC % (Período 1)	Até 190	3,364	15,618	,888	16	,388
	Mais de 190	2,544	13,306	,788	16	,442
HC % (Período 1) - HC % (Período 2)	Até 190	,309	11,048	,115	16	,909
	Mais de 190	,202	11,345	,073	16	,942
	Mais de 190	-,718	1,824	-1,623	16	,124

g.l.- graus de liberdade

Kcal- quilocalorias; Prot (g)-proteínas (gramas); Prot %-proteínas (percentagem); Gord. (g)- gordura (gramas); Gord %- gordura (percentagem); HC (g)- hidratos de carbono (gramas); HC %- hidratos de carbono (percentagem); Alc (g)- álcool (gramas); Alc %- álcool (percentagem).

Os resultados da tabela 42 mostram-nos que a ingestão alimentar entre os dois subgrupos não sofreu alterações significativas em nenhum dos dois períodos consecutivos considerados, logo ela não afecta os resultados obtidos nos parâmetros do estudo, relativamente aos indivíduos com colesterolémia inicial inferior ou igual a 190 mg/dl e superior a 190 mg/dl.

### 3.3. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS

O peso, o IMC e a percentagem de gordura corporal foram determinados antes e depois da intervenção, ou seja, nas semanas 0 e 10, logo a estatística descritiva para estas variáveis é referente apenas ao *baseline* e ao período 2 (tabela 43).

**Tabela 43**  
Descritiva das Características Antropométricas

			Peso	IMC	Percentagem de gordura
Grupo A	<i>Baseline</i>	N	19	19	19
		Mínimo	47,1	18,2	17,2
		Máximo	74,6	29,5	38,3
		Média	62,6	24,6	31,2
		Desvio Padrão	8,4	3,5	6,3
	Período 2	N	19	19	19
		Mínimo	48,3	18,6	18,4
		Máximo	77,1	30,3	39,2
		Média	63,4	24,9	31,6
		Desvio Padrão	8,9	3,6	6,1
Grupo B	<i>Baseline</i>	N	15	15	15
		Mínimo	48,5	18,0	17,9
		Máximo	81,8	29,7	40,6
		Média	64,0	24,9	32,3
		Desvio Padrão	9,8	3,4	6,4
	Período 2	N	15	15	15
		Mínimo	48,2	17,7	16,2
		Máximo	82,6	30,1	40,8
		Média	63,8	24,9	31,9
		Desvio Padrão	10,6	3,8	7,2

As alterações das características antropométricas são mínimas em ambos os

grupos:

- No grupo A, o peso, o IMC e a percentagem de gordura passaram de 62,6 kg, 24,6 e 31,2% (valores médios) para 63,4 kg, 24,9 e 31,6, respectivamente;
- No grupo B, estas variáveis diminuíram ligeiramente de 64 kg, 24,9 e 32,3 para 63,8 kg, 24,9 e 31,9, respectivamente (tabela 42).

Dadas estas ligeiras diferenças, no Teste T para Amostras não Relacionadas não foram encontrados resultados significativos, pelo que este teste não foi apresentado.

Com o objectivo de verificar se alterações do peso e da percentagem de gordura corporal, determinados no *baseline* (semana 0) e depois do período 2 (semana 10), influenciaram os parâmetros do estudo, foram construídos modelos de regressão linear (tabela 44).

**Tabela 44**  
Modelos de regressão linear- características antropométricas e parâmetros do estudo

	R	R <sup>2</sup>
a Variável independente: Alterações da Gordura (Período 2/ <i>Baseline</i> ) b Variável dependente: Alterações do Colesterol (Período 2/ <i>Baseline</i> )	,181	,033
a Variável independente:, Alterações da Gordura (Período 2/ <i>Baseline</i> ) b Variável dependente: Alterações das LDL (Período 2/ <i>Baseline</i> )	,092	,008
a Variável independente: Alterações da Gordura (Período 2/ <i>Baseline</i> ) b Variável dependente: Alterações das HDL (Período 2/ <i>Baseline</i> )	,404	,163
a Variável independente: Alterações da Gordura (Período 2/ <i>Baseline</i> ) b Variável dependente: Alterações dos Triacilglicéris (Período 2/ <i>Baseline</i> )	,023	,001
a Variável independente: Alterações do Peso(Período 2/ <i>Baseline</i> ) b Variável dependente: Alterações do Colesterol (Período 2/ <i>Baseline</i> )	,059	,004
a Variável independente: Alterações do Peso(Período 2/ <i>Baseline</i> ) b Variável dependente: Alterações das LDL (Período 2/ <i>Baseline</i> )	,039	,002
a Variável independente: Alterações do Peso(Período 2/ <i>Baseline</i> ) b Variável dependente: Alterações das HDL (Período 2/ <i>Baseline</i> )	,090	,008
a Variável independente: Alterações do Peso(Período 2/ <i>Baseline</i> ) b Variável dependente: Alterações dos Triacilglicéris (Período 2/ <i>Baseline</i> )	,063	,004

R-coeficiente de correlação de Pearson; R<sup>2</sup>-coeficiente de determinação

Pela análise dos coeficientes de correlação e de determinação, podemos concluir que as relações entre as características antropométricas avaliadas no *baseline* e no fim do período 2, e os parâmetros do estudo (*baseline* e fim do

período 2) são maioritariamente fracas ( $R$  menor que 0,4) <sup>(83)</sup>.

De salientar que estas regressões não avaliam as correlações entre as características antropométricas e os parâmetros do estudo, que possam ter ocorrido devido a eventuais alterações do *baseline* para o período 1 e do período 1 para o período 2. Não foi possível determinar estas correlações porque as características antropométricas apenas foram medidas nas semanas 0 e 10.

Na tabela 45, através da significância (valor-p), podemos concluir que apenas as alterações da percentagem de gordura corporal influenciaram os valores das HDL ( $p=0,018$ ), se bem que a tabela anterior (tabela 44) confirma-nos que essa é uma correlação moderada ( $R=0,404$ ).

**Tabela 45**

Coefficientes dos modelos de regressão- características antropométricas e parâmetros do estudo

		Coefficientes não estandardizados		t	Valor-p
		B	Erro Padrão		
Alterações do Colesterol (Período 2/ <i>Baseline</i> )	(Constante)	-3,280	2,576	-1,273	,212
	Alterações da Gordura (Período 2/ <i>Baseline</i> )	,530	,508	1,042	,305
Alterações das LDL (Período 2/ <i>Baseline</i> )	(Constante)	-4,559	2,987	-1,526	,137
	Alterações da Gordura (Período 2/ <i>Baseline</i> )	,308	,589	,523	,605
Alterações das HDL (Período 2/ <i>Baseline</i> )	(Constante)	-5,270	2,605	-2,023	,051
	Alterações da Gordura (Período 2/ <i>Baseline</i> )	1,284	,514	2,499	,018
Alterações dos Triacilgliceróis (Período 2/ <i>Baseline</i> )	(Constante)	3,379	8,660	,390	,699
	Alterações da Gordura (Período 2/ <i>Baseline</i> )	-,218	1,708	-,128	,899
Alterações do Colesterol (Período 2/ <i>Baseline</i> )	(Constante)	-3,369	2,670	-1,262	,216
	Alterações do Peso(Período 2/ <i>Baseline</i> )	,364	1,079	,337	,738
Alterações das LDL (Período 2/ <i>Baseline</i> )	(Constante)	-4,365	3,060	-1,426	,164
	Alterações do Peso(Período 2/ <i>Baseline</i> )	-,273	1,237	-,220	,827
Alterações das HDL (Período 2/ <i>Baseline</i> )	(Constante)	-5,341	2,896	-1,844	,074
	Alterações do Peso(Período 2/ <i>Baseline</i> )	,597	1,171	,510	,613
Alterações dos Triacilgliceróis (Período 2/ <i>Baseline</i> )	(Constante)	3,982	8,828	,451	,655
	Alterações do Peso(Período 2/ <i>Baseline</i> )	-1,266	3,569	-,355	,725

Resume-se que, as alterações nas características antropométricas pouco ou

nada influenciaram os resultados obtidos nos parâmetros do estudo.

#### 3.4. FUNCIONAMENTO INTESTINAL , ACTIVIDADE FÍSICA E ADESÃO

De acordo com o observado, a tolerância aos produtos foi boa. Das 34 mulheres, 15 (44%), 8 do grupo A e 7 do grupo B, referiram um funcionamento intestinal mais regular durante as 9 semanas do estudo, quer com o produto teste, quer com o controlo, ou seja, quer no período 1, quer no período 2. Destas 15, 5 indicaram obstipação na semana de *washout*. As restantes 19 mulheres (56%) não notaram qualquer diferença no funcionamento intestinal. Não foram observados efeitos indesejáveis.

Quanto aos comportamentos habituais (actividade física, alimentação, etc.), todas as participantes mencionaram a inexistência de alterações durante o período de estudo.

A adesão aos produtos foi razoável. Dos 41 indivíduos que iniciaram o estudo, apenas 5 foram excluídos nas primeiras semanas por “não adesão”: 3, porque não gostaram dos produtos e 2 porque não consumiram as 3 unidades por dia.

#### 3.5. OCORRÊNCIAS NÃO PREVISTAS

Das 34 mulheres que concluíram o estudo, uma fez antibioterapia durante 6 dias devido a uma infecção urinária, mas manteve o consumo das 3 unidades diárias e outra não consumiu os produtos durante uma semana, logo após o *washout*, porque foi de viagem. Ambas pertenciam ao grupo A . A primeira encontrava-se no período do produto teste (período 1) e a segunda no período do produto de referência (período 2) .

#### 4. DISCUSSÃO

Este estudo demonstra que o leite fermentado com *L. acidophilus* 145 e *B. longum* BB536, quando comparado com o iogurte (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*), reduz de modo significativo as LDL nos indivíduos com colesterolemia inicial superior a 190 mg/dl. Através da ANOVA obteve-se um valor de p estatisticamente significativo ( $p=0,014$ ) para os indivíduos com colesterol superior a 190 mg/dl em ambos os grupos. Os decréscimos ocorridos estiveram na ordem dos 16% para o grupo A ( $p=0,003$ ) e 12,5% para o grupo B ( $p=0,05$ ).

O colesterol total (CT) também diminuiu nos indivíduos com mais de 190 mg/dl ( $p=0,008$  na ANOVA), mas ao distribuir estes indivíduos pelos dois grupos, verificou-se que esta alteração foi significativa apenas no grupo A (de 222 para 191 mg/dl com valor de  $p=0,001$ ) (de 217 para 198 mg/dl com  $p=0,089$  no grupo B).

Nos indivíduos com colesterol inicial até 190 mg/dl, o CT aumentou no grupo A, nos dois períodos de tratamento e no grupo B no período 2, ou seja, no período do produto teste. Já os níveis de LDL também aumentaram no grupo A, mas diminuíram no grupo B, em ambos os períodos. Nenhuma destas alterações verificadas neste subgrupo (colesterol inferior ou igual a 190 mg/dl), teve significado estatístico.

Simultaneamente à redução das LDL verificou-se uma diminuição das HDL nos dois grupos. Esta alteração, a única significativa para todos os indivíduos segundo a ANOVA ( $p$  do tratamento= $0,037$ ;  $p$  do período= $0,015$ ), não esteve relacionada nem com a colesterolemia inicial dos participantes nem com o produto teste, já que foi observada em todos os indivíduos, antes da divisão por

subgrupos e também após o consumo do produto de referência. De salientar que no grupo A a redução ocorreu após o consumo do produto teste ( $p < 0,01$ ) e após o consumo do produto de referência ( $p = 0,003$ ), enquanto que no grupo B apenas foi verificada após o consumo do produto de referência ( $p = 0,001$ ) ( $p = 0,773$  após o consumo do produto teste).

Calculando a relação LDL/HDL, geralmente utilizada como um índice de aterogenicidade<sup>(38)</sup>, verificou-se que no grupo A durante o período do produto teste (período 1), os indivíduos com 190 mg/dl ou menos de colesterol inicial, tiveram um acréscimo de 19% e os indivíduos com mais de 190 mg/dl, uma redução de 2%, enquanto que no grupo B no período 2 (período teste), a relação LDL/HDL diminuiu em ambos os subgrupos, 3,4% nos indivíduos com colesterol até 190 mg/dl e 12,4% nos com mais de 190 mg/dl.

As alterações dos triacilgliceróis ao longo do estudo foram negligenciáveis, em ambos os grupos.

De notar que na análise das alterações de todos os lípidos, a variabilidade entre os indivíduos de cada grupo teve sempre um efeito relevante ( $p < 0,01$ ), o que significa que as diferenças entre os indivíduos dentro do mesmo grupo influenciaram os resultados. Isto já era de esperar e não invalida os resultados obtidos na ANOVA.

Ao analisar a ingestão alimentar, avaliada pela Recordação das 24 Horas Precedentes no *baseline* (semana 0), no fim do período 1 (semana 4) e no fim do período 2 (semana 9), constatou-se que não houve diferenças significativas entre a ingestão de calorias, proteínas, hidratos de carbono, gordura e álcool dos dois grupos nestes três períodos e que as correlações entre estes nutrientes e os parâmetros do estudo foram fracas ( $R$  entre 0,2 e 0,39) ou moderadas ( $R$  entre

0,4 e 0,69)<sup>(83)</sup>, embora significativas em alguns casos, nomeadamente entre a percentagem de proteínas e os triacilgliceróis no período 1 ( $R=-0,379$ ), a percentagem de gordura e o colesterol total no período 1 ( $R=0,445$ ), a percentagem de gordura e as LDL no período 1 ( $R=0,499$ ) e os hidratos de carbono (gramas) e os triacilgliceróis no período 2 ( $R=0,388$ ).

No que respeita à ingestão alimentar entre os dois subgrupos, também não foram encontradas diferenças significativas no *baseline*, no período 1 e no período 2. Pode-se concluir que a ingestão alimentar não afectou os resultados obtidos.

Os modelos de regressão e os coeficientes de correlação entre as características antropométricas determinadas por bioimpedância e os lípidos, no *baseline* (semana 0) e após o período 2 (semana 10), mostram que a única relação significativa é entre a percentagem de gordura corporal e as HDL ( $p=0,018$ ), sendo uma relação positiva e moderada ( $R=0,404$ ). Todas as outras relações são fracas ( $R<0,4$ ) e não têm significado estatístico, pelo que se pode afirmar que as alterações das características antropométricas também não afectaram os parâmetros do estudo.

Durante as 9 semanas do estudo, 44% da amostra referiu um funcionamento intestinal mais regular, caracterizado por um aumento da frequência fecal com ambos os produtos, o teste e o de referência, e 56% não notou qualquer diferença. Todos os participantes mencionaram manter a actividade física habitual.

Os decréscimos nas LDL e no colesterol total encontrados neste estudo são corroborados por estudos anteriores com o *L. acidophilus* e o *B. longum*, alguns dos quais com metodologia semelhante<sup>(37-40)</sup>.

Schaafsma e col. (1998) demonstraram, através dum RCT com delineamento cruzado e dupla ocultação, que um leite fermentado com as bactérias habituais do iogurte, com o *L. acidophilus* (DN112.053 e DN112.096) e com adição de fruto-oligossacáridos, provocou uma redução de 4,4% no CT e 5,4% nas LDL, numa amostra de 30 indivíduos do sexo masculino, durante 3 semanas, quando comparado com a mesma quantidade (375 g por dia) de um iogurte tradicional. Não foi apurado, contudo, se este efeito foi devido ao *L. acidophilus*, aos fruto-oligossacáridos ou a ambos. Os níveis das HDL e dos TG permaneceram inalterados durante as semanas do estudo <sup>(38)</sup>.

Liong e Shah (2005) demonstraram que a remoção de colesterol *in vitro* era otimizada pela fermentação do *L. acidophilus* ATCC4962 na presença de manitol, fruto-oligossacáridos e inulina e que, quer a remoção de colesterol, quer a produção de ácidos gordos saturados de cadeia curta, parecem estar associadas ao crescimento e são altamente influenciadas pelos prebióticos <sup>(85,86)</sup>.

Ashar e Prajapati (2000) avaliaram o efeito hipocolesterolémico de um leite fermentado com *L. acidophilus* V<sub>3</sub>, através dum estudo paralelo de 3 semanas, e concluíram que o consumo de 200 ml por dia do produto teste reduziu em 41% as LDL e em 21% o CT no grupo de indivíduos com colesterolémia inicial de 2,0-2,2 g/l, efeito este comparável ao de alguns medicamentos (simvastatina e lovastatina). No entanto, para além de não ter sido feito controlo por placebo nem ocultação, cada um dos 4 grupos da amostra tinha um número de indivíduos relativamente baixo (n entre 2 a 9). As HDL não sofreram alterações em nenhum dos grupos e os TG aumentaram no grupo com colesterol total inferior a 2,0g/l. <sup>(37)</sup>.

Num outro estudo paralelo mas controlado por placebo e com ocultação, um leite magro fermentado com as bactérias do iogurte e com o *B. longum* BL1, foi comparado com o iogurte tradicional em 32 sujeitos do sexo masculino. Após o consumo de 300 ml por dia durante 4 semanas, foi verificada uma redução no CT em metade dos indivíduos que apresentavam um colesterol superior a 240 mg/dl. Neste mesmo trabalho de Xiao e col. (2003), o *B. longum* também foi investigada no Rato sob a forma de um pó liofilizado, e mostrou-se eficaz em reduzir o CT, as LDL e os TG, em relação ao produto controlo <sup>(40)</sup>.

Um decréscimo de 2,9% no CT foi verificado após a análise combinada de 2 estudos de Anderson e col. <sup>(39)</sup>. No primeiro, um estudo com desenho paralelo e com a duração de 3 semanas, um leite fermentado com *L. acidophilus* L1 de origem humana provocou uma diminuição de 2,4% nos níveis de CT numa amostra de 29 sujeitos, em comparação com um leite fermentado com *L. acidophilus* ATCC43211 de origem suína. No segundo estudo, um RCT com desenho cruzado e dupla ocultação, o CT reduziu 3,2% apenas no 1º período de tratamento em 40 indivíduos de ambos os sexos, após o consumo de 200 ml por dia durante 4 semanas de um leite fermentado com *L. acidophilus* L1. Em ambos os estudos, o produto teste não alterou de modo significativo os níveis de TG. No primeiro estudo as HDL diminuíram significativamente, quer no grupo do LF *L. acidophilus* L1, quer no grupo do LF *L. acidophilus* ATCC <sup>(39)</sup>.

Alguns estudos em animais também confirmam os efeitos observados no presente trabalho <sup>(57,87)</sup>. Sibel e col. (1997) concluíram que o iogurte acidófilo, produto da fermentação do leite pelo *S. thermophilus* e pelo *L. acidophilus*, quando comparado com o iogurte tradicional, diminuiu as concentrações de CT e das LDL, no Rato, sem afectar as HDL e os TG <sup>(87)</sup>. O efeito hipocolesterolémico

do *L. acidophilus* (ATCC 43121) conjuntamente com o cálcio também foi demonstrado no suíno, quer a nível do CT, quer das LDL, sem alterar as HDL <sup>(57)</sup>.

Por outro lado, há estudos no Homem que não suportam estes resultados (44,46-48).

De Roos e col. (1999) conduziram um estudo paralelo controlado aleatoriamente por placebo, no qual 78 sujeitos consumiram 500 ml de iogurte (placebo) ou iogurte com *L. acidophilus* L1 por dia, durante 6 semanas. Não encontraram alterações significativas nas concentrações plasmáticas de CT, LDL, HDL e TG ao longo das 6 semanas <sup>(46)</sup>.

Nos estudos de Larsen e col. (2000) e Lewis e Burmeister (2005) os efeitos nos lípidos do *L. acidophilus* também foram irrelevantes, seja adicionado ao iogurte, seja sob a forma de cápsulas <sup>(44,48)</sup>. No segundo estudo ficou, no entanto, comprovada a eficácia *in vitro* desta bactéria (*L. acidophilus* LA-1) em reduzir o colesterol do meio <sup>(48)</sup>.

Kiessling e col. (2002) investigaram o efeito do consumo a longo prazo (21 semanas) de um iogurte suplementado com *L. acidophilus* 145, *B. longum* 913 e 1% de oligofrutose em 29 mulheres, e concluíram que o produto teste não provocou alterações no CT nem nas LDL, mas aumentou as HDL. Este efeito não foi associado às bactérias nem à oligofrutose, mas sim ao consumo a longo prazo do iogurte <sup>(47)</sup>.

De realçar que as diferentes metodologias utilizadas nos estudos tornam as comparações difíceis e inconsistentes (ver tabela 1).

Os factores que poderão estar na origem dos resultados obtidos no presente estudo são as estirpes de *L. acidophilus* e *B. longum* existentes no produto teste.

Estudos *in vitro* demonstram que as bactérias ácido-lácticas têm a capacidade para assimilar e ligar-se ao colesterol e aos ácidos biliares a nível intestinal <sup>(40)</sup> e que o *L. acidophilus* e o *B. longum* captam colesterol na membrana celular. Isto resulta numa inibição da absorção intestinal de colesterol e na redução dos seus níveis séricos <sup>(36,40,50,52,59)</sup>.

A promoção da excreção dos ácidos biliares devido à desconjugação dos sais biliares é outro mecanismo sugerido <sup>(35,36,38,40,49)</sup>. Klaver e van der Meer propuseram que o colesterol coprecipita com os ácidos biliares desconjugados <sup>(55)</sup>. Sabe-se que os níveis séricos de colesterol diminuem quando a reabsorção intestinal de ácidos biliares diminui, devido à promoção do catabolismo do colesterol a nível hepático <sup>(35,36,40,53-55,59)</sup>.

A capacidade para sobreviver à passagem pelo tracto gastrointestinal, nomeadamente a tolerância ao ácido e à bÍlis, parecem ser fundamentais para que o efeito ocorra *in vivo* <sup>(36,40,52,88)</sup>.

O *B. longum* (BL1) tem a capacidade de sobreviver no suco gástrico artificial a um pH de 3,0 por 1,5 a 2 horas. No estômago, as bactérias entram em contacto com valores de pH que variam entre 2,0 a 8,0, dependendo dos alimentos ingeridos. Esta bactéria também sobrevive a concentrações relativamente elevadas de bÍlis por 5 a 16 horas, que é o tempo normal de passagem dos alimentos pelo intestino delgado. <sup>(40,52)</sup>. Esta estirpe possui também uma forte actividade da hidrolase dos sais biliares. Assim o efeito hipocolesterolémico provocado por esta bactéria deve-se provavelmente à ligação ao colesterol e aos ácidos biliares e à desconjugação <sup>(40)</sup>.

Por outro lado, o *S. thermophilus* e o *L. bulgaricus*, os dois microrganismos mais importantes utilizados na produção do iogurte e que constituíram as

bactérias do produto controlo neste estudo, têm uma baixa tolerância aos sais biliares e ao pH ácido, e uma preferência selectiva por açúcares <sup>(40,44,87)</sup>.

Estudos no Homem sobre o efeito dos leites fermentados nas concentrações de colesterol são, no entanto, ambíguos. O consumo do leite fermentado no Homem, nem sempre tem efeitos similares ao consumo no animal, devido a diferenças do metabolismo entre espécies <sup>(40)</sup>.

Harrison e Peat (1975) propuseram que a introdução de culturas vivas de *L. acidophilus* no intestino do recém-nascido pode ter um efeito hipocolesterolémico <sup>(89)</sup>. Estudos recentes de Gilliland e col. mostraram que algumas estirpes de *L. acidophilus*, ao crescerem em condições anaeróbias e na presença da bÍlis, condições encontradas no intestino delgado, assimilam colesterol, parte do qual é incorporado na membrana celular <sup>(39,49,53,56)</sup>. As estirpes de *L. acidophilus* estudadas por estes autores também desconjugam os ácidos biliares, interrompendo a circulação enterohepática <sup>(39,53,57,61)</sup>. Os ácidos biliares livres podem precipitar na presença de colesterol e na presença de cálcio, o que promove a eliminação dos ácidos biliares nas fezes e a diminuição das concentrações séricas de colesterol <sup>(39,53,57,61)</sup>. Assim, à medida que aumenta a actividade da hidrolase dos sais biliares no intestino delgado, há uma maior "chamada" de colesterol para o intestino <sup>(39)</sup>.

Outra possibilidade, geralmente pouco referenciada pelos investigadores, é que os ácidos biliares livres são absorvidos por difusão passiva, tendo um *feedback* negativo na síntese de colesterol e de ácidos biliares <sup>(39)</sup>.

De todas as estirpes de *L. acidophilus*, a estirpe L-1, geralmente utilizada em produtos comerciais holandeses, parece ser uma das mais eficazes em reduzir o colesterol sérico <sup>(46)</sup>.

A variabilidade apresentada pelas espécies em relação às taxas de sobrevivência à passagem pelo intestino, pode ajudar a explicar a ambiguidade dos resultados encontrados nos estudos <sup>(52)</sup>. Os mecanismos de acção exactos permanecem desconhecidos.

Neste estudo não se sabe até que ponto os efeitos observados a nível das LDL e do CT estão dependentes da dose e do tempo. O efeito a longo prazo tem sido investigado por alguns autores, mas os resultados permanecem equívocos <sup>(43,44,47,90)</sup>.

Kiessling e col. (2002) estudaram o consumo durante 21 semanas. Não encontraram efeitos no CT e nas LDL, apenas um aumento significativo das HDL <sup>(47)</sup>. Larsen e col (2000) verificaram uma redução significativa nas LDL de 8,4% com um consumo durante 8 semanas, mas apenas no grupo de indivíduos com excesso de peso que consumiu o Gaio ® <sup>(44)</sup>. Bertolami e col. (1999) descobriram uma redução de 6% nas LDL após 8 semanas de consumo do Gaio ® mas, nem todos os sujeitos responderam da mesma forma e nalguns o CT aumentou. Parece que os indivíduos hipercolesterolémicos foram os que mais beneficiaram deste efeito. <sup>(43)</sup> Num outro estudo de Richelsen e col (1996), a redução verificada com o produto teste (Gaio ®) foi similar à observada com o placebo, após a ingestão durante 6 meses <sup>(90)</sup>.

São necessários mais estudos que esclareçam a dependência do efeito hipocolesterolémico do tempo de consumo. De realçar que, para haver uma diminuição do risco de aterosclerose, a redução do colesterol tem que se manter por 6 meses a 1 ano <sup>(43)</sup>.

Uma outra questão é se os efeitos observados no presente ensaio são específicos apenas para a amostra do estudo, ou seja, mulheres com uma idade média de 35 anos e com níveis de colesterol normais ou ligeiramente elevados.

Bazzare e col. (1983) demonstraram que o iogurte era hipocolesterolémico para mulheres mas não para homens. Contudo, segundo Richelsen e col (1996), é pouco provável que haja uma diferença de resposta consoante o sexo <sup>(43,90)</sup>. De qualquer forma, a extrapolação e generalização dos resultados para outras amostras não são correctas.

Neste trabalho foi verificada uma redução significativa nos níveis séricos das HDL, não específica do produto teste. Algumas investigações corroboram este efeito <sup>(40,87,91,92)</sup>. De salientar que níveis plasmáticos baixos de HDL podem aumentar indirectamente o risco cardíaco <sup>(93)</sup>.

Akalin e col (1997) verificaram uma redução nas HDL, em ratos alimentados com um leite inoculado com *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, mas sem significado estatístico <sup>(87)</sup>. Resultados semelhantes foram encontrados por Xiao e col. (2003) em Ratos alimentados com um leite fermentado com *B. longum* BL1, ou seja, uma redução ligeira, mas não significativa das HDL. <sup>(40)</sup>.

As alterações das HDL e das LDL obtidas neste estudo acompanham, em parte, o aumento ou a diminuição do CT verificados nos grupos e subgrupos. Segundo Xiao e col (2003), quando isto ocorre, as estirpes actuam mais por promoção da excreção de colesterol e ácidos biliares do que por influência na síntese hepática de colesterol <sup>(40)</sup>.

Tendo em conta que alguns autores demonstraram uma correlação positiva entre a ingestão de gordura láctea e as HDL <sup>(47,94,95)</sup>, sugerindo como responsáveis os ácidos gordos saturados láurico (C12:0) e mirístico (C14:0)

presentes neste tipo de gordura <sup>(94)</sup>, também podemos especular que a redução das HDL verificada neste trabalho, foi provocada pela diminuição da gordura láctea devido ao consumo dos leites fermentados magros (produto teste e produto de referência) em substituição dos consumidos habitualmente pelos participantes.

Por outro lado, podemos todavia contra-argumentar que a eventual diminuição da gordura láctea também seria a responsável pela diminuição das LDL e do CT. Mas, se assim fosse, as alterações nestes lípidos teriam ocorrido quer com o produto teste, quer com o produto de referência, já que ambos tinham baixo teor de gordura. Como neste trabalho as reduções das LDL e do CT ocorreram apenas com o produto teste, podemos eliminar esta hipótese, pelo menos no que respeita a estes lípidos e concluir que o efeito foi provocado pelas bactérias.

Quanto às HDL, olhando para a ingestão alimentar e partindo do princípio que a avaliação efectuada no *baseline* dá-nos a conhecer a alimentação dos participantes antes do início do estudo, podemos concluir que estas ilações não são verdadeiras, porque não houve correlações significativas entre a ingestão alimentar e as HDL antes do início do estudo e no período 1 ou 2. Logo, à partida, a percentagem de gordura láctea não sofreu alterações significativas, nem influenciou os resultados deste estudo.

O presente ensaio foi conduzido com o objectivo de verificar o efeito dum leite fermentado com *L. acidophilus* e *B. longum* nos níveis séricos dos lípidos. O produto teste e o produto de referência tinham uma composição semelhante, com a mesma quantidade de gordura láctea e de proteína e quantidades muito próximas de hidratos de carbono e energia. A única diferença era o tipo de bactérias: *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* no produto referência e *L. acidophilus* e *B. longum* no produto teste.

Os resultados deste estudo indicam que o produto teste reduz significativamente as LDL nos indivíduos com mais de 190 mg/dl de colesterol. Não existe uma explicação óbvia para o efeito ocorrer apenas nos sujeitos com mais de 190 mg/dl de colesterol <sup>(40)</sup>.

Uma provável justificação é a genotipia da apoproteína E dos participantes. A influência da alimentação nos lípidos plasmáticos poderá estar dependente do genótipo para esta apoproteína <sup>(38,93,96-99)</sup>. Segundo Schaafsma e col. (1998) e van Vlijmen e col (1994) os indivíduos homozigóticos para a apo E<sub>3</sub> são mais sensíveis aos lípidos da alimentação do que os não homozigóticos <sup>(38,100)</sup>. Sendo assim, os indivíduos com mais de 190 mg/dl de colesterol seriam os mais sensíveis aos lípidos da alimentação, logo os que mais beneficiariam deste efeito. No entanto, Schaafsma e col (1998) avaliaram este parâmetro da genotipia e concluíram a ausência de diferenças entre os indivíduos homozigóticos e não homozigóticos tratados com um LF com *L. acidophilus* <sup>(38)</sup>. Para outros autores, os sujeitos com o alelo apo E<sub>4</sub> são os mais reactivos à dieta <sup>(93,101,102)</sup>. Actualmente os efeitos da variação genética são ainda conflituosos <sup>(96,101)</sup>. Weggemens e col (2001) concluíram que o genótipo apo E por si só, é de pouca utilidade na identificação dos sujeitos que respondem à alimentação <sup>(101)</sup>.

Nos indivíduos com mais de 190 mg/dl de colesterol também foi demonstrada uma redução do CT, mas apenas no grupo A, apesar de no grupo B, o valor de p estar próximo do significativo (p=0,089).

Muitos factores poderão ter contribuído para as diferentes respostas dos indivíduos do grupo B: o menor número de sujeitos (n=8) deste grupo em relação ao grupo A (n=9), a variabilidade interindividual provocada nomeadamente pela influência dos diferentes estilos de vida, alguma variabilidade interindividual a

nível da colonização intestinal das bactérias <sup>(44)</sup>, a nível da resposta dos lípidos plasmáticos aos alimentos <sup>(96)</sup>, e da adesão dos participantes aos produtos <sup>(39,40)</sup>.

De salientar que a variabilidade na eficácia também acontece usualmente com os agentes hipolipemiantes. <sup>(40,103)</sup>.

No presente estudo a adesão aos produtos foi avaliada por questionário. Os participantes eram questionados sobre o número de unidades consumidas e era feito um reforço para o consumo dos produtos, sempre que vinham à consulta. De um modo geral, os produtos foram bem aceites e consumidos na quantidade exigida, se bem que, a única garantia era, contudo, a palavra dos participantes. A avaliação da adesão por questionário também foi utilizada noutros estudos <sup>(38,40,43)</sup>.

De Roos e col (1999) avaliaram a adesão ao tratamento pela adição de lítio aos produtos e respectiva recuperação na urina <sup>(46)</sup>. No estudo de Larsen e col (2000) os participantes faziam um teste de adesão de 2 em 2 semanas, através do consumo do produto teste ou do de referência enriquecidos com <sup>13</sup>C-acetato, seguido por um teste respiratório <sup>(44)</sup>. O teste de adesão através do lítio é melhor que o utilizado por Larsen e col (2000), já que pode demonstrar em qualquer altura, através das análises urinárias, se a "não-adesão" influenciou os resultados. Este tipo de teste deveria ser utilizado em futuros estudos com leites fermentados, de modo a garantir o consumo dos produtos <sup>(44)</sup>.

Neste estudo a ingestão alimentar foi avaliada pela Recordação das 24 horas Precedentes, aplicada a cada indivíduo antes do estudo, no fim do período 1 e no fim do período 2. Optou-se por este método por ser rápido, de fácil administração, sem custos, de boa adesão e apropriado para comparar grupos de sujeitos, especialmente no que diz respeito a macronutrientes. Tem ainda a vantagem de

permitir um elevado grau de especificidade e flexibilidade na descrição dos alimentos e na análise dos dados <sup>(69,70)</sup>. Por outro lado, esta avaliação pode não fornecer uma estimativa fiável da ingestão alimentar individual, devido à variação do dia-a-dia. Isto poderá não influenciar a média entre grupos de sujeitos, mas poderá subestimar a variação da ingestão interindividual. Este problema pode ser minimizado pela realização de múltiplas Recordações das 24 horas Precedentes em dias não consecutivos <sup>(69,70)</sup>. Neste estudo, o ideal seria então, a realização de múltiplas avaliações no mesmo indivíduo, em cada uma das fases, isto é, antes da intervenção, durante o período 1 e durante o período 2. Isto não foi feito porque dificultaria a adesão e a administração do método.

De Roos e col (1999) também utilizaram a Recordação das 24 horas <sup>(46)</sup>. Alguns estudos utilizaram como método os registos alimentares (administração directa) <sup>(39,44,48,47)</sup> e outros não fizeram qualquer avaliação da ingestão alimentar <sup>(37,38,40,43)</sup>.

Grande parte das participantes deste estudo reportou um aumento da frequência fecal, quer com o produto teste, quer com o controlo. Resultados similares foram encontradas noutros estudos com produtos lácteos <sup>(40,61)</sup>. No estudo de Xiao e col., este efeito foi verificado essencialmente no grupo do produto teste, um iogurte com *B. longum* BL1 <sup>(40)</sup>. A capacidade dos probióticos em aliviar a obstipação é debatível e pode ser um efeito específico de determinadas estirpes. É recomendável a realização de mais estudos que explorem este efeito <sup>(2)</sup>.

No presente estudo não foi avaliada a quantidade de ácidos gordos de cadeia curta nas fezes e no plasma, nem a quantidade fecal de bactérias. Alguns estudos

fizeram esta determinação com o objectivo de elucidar um provável mecanismo de acção para os efeitos observados <sup>(47,61,85-87)</sup>.

## 5. CONCLUSÕES

A hipótese deste estudo era que o leite fermentado com *L. acidophilus* e *B. longum* reduz os lípidos plasmáticos de mulheres com níveis normais ou ligeiramente elevados de colesterol plasmático. Os resultados demonstram que o consumo de 375 g por dia deste produto reduz as LDL quando comparado com o iogurte tradicional, nas mulheres com os níveis séricos iniciais de colesterol superiores a 190 mg/dl.

A redução destas lipoproteínas foi significativa para as mulheres com mais de 190 mg/dl de colesterol de ambos os grupos, encontrando-se na ordem dos 16% para o grupo A ( $p=0,003$ ) e 12,5% para o grupo B ( $p=0,05$ ), com uma diminuição média de 14,3%.

O colesterol total também diminuiu significativamente com o produto teste, mas apenas nos indivíduos com mais de 190 mg/dl de colesterol do grupo A ( $p=0,001$ ).

Nem todos os indivíduos responderam da mesma forma aos produtos. Nas mulheres com o colesterol inicial inferior ou igual a 190 mg/dl, o CT aumentou, quer com o produto teste, quer com o controlo. Estes aumentos não foram, contudo, significativos.

Simultaneamente a estas alterações, verificou-se um decréscimo das HDL em ambos os grupos, independente da colesterolémia inicial dos participantes. Esta alteração foi verificada não só com o produto teste mas também com o de referência.

Os triacilgliceróis não sofreram alterações significativas ao longo do estudo.

Tudo indica que as bactérias do produto teste são as responsáveis por estes efeitos, mas os mecanismos de acção exactos estão ainda por esclarecer. Parece que o *L. acidophilus* e o *B. longum* diminuem a absorção intestinal de colesterol quer pela desconjugação enzimática dos sais biliares, quer por assimilação do colesterol e respectiva incorporação na membrana celular.

Algumas questões que permanecem por responder são se estes efeitos são sustentáveis a longo prazo, até que ponto dependem da quantidade de produto utilizada e se são específicos das estirpes bacterianas e da amostra deste estudo.

Apesar de haver cada vez mais estudos que sugerem que as bactérias probióticas podem alterar favoravelmente os lípidos séricos, é necessária mais investigação baseada em RCT, que esclareçam estas questões e que utilizem diferentes estirpes bacterianas, outras vias de administração (não só leites fermentados mas também culturas liofilizadas), testes de adesão adequados e um maior tamanho amostral. Só assim se poderá estabelecer de forma inequívoca o papel das bactérias probióticas no tratamento das hiperlipidemias e na redução do risco para as principais causas de morte dos países ocidentais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Schrezenmeir J, Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(2) Suppl: 361S-364S.
- (2) World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Joint FAO/WHO Working Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: report of a joint WHO/FAO expert consultation. Córdoba, Argentina; 2001.
- (3) Sanders ME. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J Nutr.* 2000; 130 Suppl: 384S-390S.
- (4) Scheinbach S. Probiotics: functionality and commercial status. *Biotechnol Adv.* 1998; 16(3): 581-608.
- (5) Heller KJ. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(2) Suppl: 374S-379S.
- (6) Dairy and Food Culture Technologies. Probiotic Definitions: adapted from Sanders M.E. Probiotics: considerations for human health. *Nutr Rev.* 2003; 61: 91-99. Disponível em: [http://www.mesanders.com/Probiotic definitions.htm](http://www.mesanders.com/Probiotic%20definitions.htm).
- (7) Martins F, Pinho O, Ferreira IMPLVO. Alimentos funcionais: conceitos, definições, aplicações e legislação. *Rev de Aliment Hum.* 2004; 10(2): 67-78.
- (8) Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Matto J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol.* 2000; 84: 197-215.
- (9) Holzapfel W, Haberer P, Geisen R, Bjorkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(2) Suppl: 365S-373S.
- (10) Halsted CH. Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin?. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77(4) Suppl: 1001S-1007S.
- (11) Vanderhoof JA. Probiotics: future directions. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(6) Suppl: 1152S-1155S.
- (12) Roberfroid MB. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71(6) Suppl: 1682S-1687S.

- (13) De Jong N, Ocke MC, Branderhorst HA, Friele R. Demographic and lifestyle characteristics of functional food consumers and dietary supplement users. *Br J Nutr.* 2003; 89(2): 273-281.
- (14) Mombelli B, Gismondo MR. The use of probiotics in medical practice. *Int J Antimicrob Ag.* 2000; 16: 531-536.
- (15) Hoerr RA, Bostwick EF. Biactive proteins and probiotic bacteria: modulators of nutritional health. *Nutrition.* 2000; 16(7/8): 711-713.
- (16) Lin DC. Probiotic as functional foods. *Nutr Clin Pract.* 2003; 18(6): 497-506.
- (17) Isolauri E. Probiotics in human disease. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(6) Suppl: 1142S-1146S.
- (18) Ishibashi N, Yamazaki S. Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(2) Suppl: 465S-470S.
- (19) Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, *et al.* Demonstration of safety of probiotics – a review. *Intern J Food Microbiol.* 1998; 44: 93-106.
- (20) World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a joint FAO/WHO Working Group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada; 2002.
- (21) Saavedra JM. Clinical applications of probiotic agents. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(6) Suppl: 1147S-1151S.
- (22) Marteau P, Boutron-Ruault MC. Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. *Br J Nutr.* 2002; 87 Suppl 2: S153-S157.
- (23) Marteau PR. Probiotics in clinical conditions. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2002; 22(3): 255-273.
- (24) Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Pediatrics.* 2005; 115(1): 5-9.
- (25) Salminen SJ, Gueimonde M, Isolauri E. Probiotics that modify disease risk. *J Nutr.* 2005; 135: 1294-1298.
- (26) Gill HS, Guarner F. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J.* 2005; 71(4): 1745-1753.

- (27) Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci.* 2002; 15(1): 1-9.
- (28) De Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71(2): 405-411.
- (29) Kramer HJ, Schlieger F, Harder H, Singer MV. Probiotic as therapeutic agents in irritable bowel syndrome. *Z Gastroenterol.* 2005; 43(5): 467-471.
- (30) Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, *et al.* Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr.* 1998; 80 Suppl 1: S147-S171.
- (31) Cremonini F, Di Caro, Covimo M, Armuzzi A, Gabrielli M, Santarelli L, *et al.* Effect of different probiotic preparations on anti-*Helicobacter pylori* therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97(11): 2744.
- (32) Wang KY, Li SN, Liu CS, Perng DS, Su YC, Wu DC, *et al.* Effects of ingesting *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80(3): 737-741.
- (33) Saavedra JM, Tschernia A. Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. *Br J Nutr.* 2002; 87 Suppl 2: S241-S246.
- (34) Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(2) Suppl: 444S-450S.
- (35) St-Onge M-P, Farnworth ER, Jones PJ. Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71(3): 674-681.
- (36) Pereira DIA, Gibson GR. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit Rev in Biochem Mol Biol.* 2002; 37(4): 259-281.
- (37) Ashar MN, Prajapati JB. Verification of hypocholesterolemic effect of fermented milk on human subjects with different cholesterol levels. *Folia Microbiol.* 2000; 45(3): 263-268.

- <sup>(38)</sup> Schaafsma G, Meuling WJA, van Dokkum W, Bouley C. Effects of a milk product fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added on blood lipids in male volunteers. *Eur J Clin Nutr.* 1998; 52: 436-440.
- <sup>(39)</sup> Anderson JW, Gilliland SE. Effect of fermented milk (yoghurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J Dairy Sci.* 1999; 18(1): 43-50.
- <sup>(40)</sup> Xiao JZ, Kondo S, Takahashi N, Miyaji K, Oshida K, Hiramatsu A, *et al.* Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in Rats and Healthy adult male volunteers. *J Am Coll Nutr.* 2003; 86: 2452-2461.
- <sup>(41)</sup> Tholstrup T, Hoy C-E, Andersen LN, Christensen DK, Sandstrom B. Does fat in milk, butter and cheese affect blood lipids and cholesterol differently?. *J Am Coll Nutr.* 2004; 23(2): 169-176.
- <sup>(42)</sup> Fukushima M, Nakano M. Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on a fat and cholesterol enriched diet. *Br J Nutr.* 1996; 76(6): 857-67.
- <sup>(43)</sup> Bertolami MC, Faludi AA, Batlouni M. Evaluation of the effects of a new fermented milk product (Gaio) on primary hypercholesterolemia. *Eur J Clin Nutr.* 1999; 53: 97-101.
- <sup>(44)</sup> Larsen LA, Raben A, Haulrik N, Hansen AS, Manders M, Astrup A. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. *Eur J Clin Nutr.* 2000; 54: 288-297.
- <sup>(45)</sup> Larsen LA, Bell ML, Grunwald GK, Astrup A. The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies. *Eur J Clin Nutr.* 2000; 54: 856-860.
- <sup>(46)</sup> De Roos NM, Schouten G, Katan MB. Yoghurt enriched with *Lactobacillus acidophilus* does not lower blood lipids in healthy men and women with normal to borderline high serum cholesterol levels. *Eur J Clin Nutr.* 1999; 53: 277-280.
- <sup>(47)</sup> Kiessling G, Schneider J, Jahreis G. Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *Eur J Clin Nutr.* 2000; 56: 843-849.
- <sup>(48)</sup> Lewis SJ, Burmeister S. A double-blind placebo-controlled study of the effects of *Lactobacillus acidophilus* on plasma lipids. *Eur J Clin Nutr.* 2005; 59(6): 776-780.
- <sup>(49)</sup> Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T. Cholesterol removal from media by lactococci. *J Dairy Sci.*

2002; 85: 3182-3188.

(50) Liong MT, Shah NP. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *J Dairy Sci.* 2005; 88: 55-66.

(51) Mital BK, Garg SK. Anticarcinogenic, hypocholesterolemic, and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*. *Crit Rev Microbiol.* 1995 ; 21(3) : 175-214.

(52) Pereira DIA, Gibson GR. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(9): 4689-4693.

(53) Brashears MM, Gilliland SE, Buck LM. Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. *J Dairy Sci.* 1998; 81: 2103-2110.

(54) Tabas I. Cholesterol in health and disease. *J Clin Invest.* 2002; 110: 583-590.

(55) Klaver FA, van der Meer R. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugation activity. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59(4): 1120-1124.

(56) Buck LM, Gilliland SE. Comparisons of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. *J Dairy Sci.* 1994; 77: 2925-2933.

(57) De Rodas BZ, Gilliland SE, Maxwell CV. Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diet. *J Dairy Sci.* 1996; 79: 2121-2128.

(58) Noh DO, Kim SH, Gilliland SE. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J Dairy Sci.* 1997; 80: 3107-3113.

(59) Dambekodi PC, Gilliland SE. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. *J Dairy Sci.* 1998; 81: 1818-1824.

(60) Wolever TM, Spadafora P, Eshuis H. Interaction between colonic acetate and propionate in humans. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53(3): 681-687.

(61) St-Onge MP, Farnworth ER, Savard T, Chabot D, Mafu A, Jones PJH. Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. *BMC Complement Altern Med.* 2002; 2(1): 1-9.

- (62) Serviço Nacional de Saúde, Direcção Geral da Saúde. Programa Nacional de Prevenção e Controlo de Doenças Cardiovasculares. Ministério da Saúde; 2003.
- (63) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 2001; 285(19): 2486-2497.
- (64) European Society of Cardiology, Third Joint Task Force of European and other Societies on CVD Prevention in Clinical Practice. European guidelines on CVD prevention in clinical practice: update version; 2003.
- (65) Willet W. Diet and coronary heart disease. In: Nutritional Epidemiology. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Oxford: Oxford University Press; 1998. Cap. 17, p. 414-66.
- (66) Margetts BM, Rouse IL. Experimental studies: clinical trials, field trials, community trials, and intervention studies. In: Margetts BM, Nelson M, editors. Design concepts in nutritional epidemiology. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1997. Cap. 16, p.415-37.
- (67) Last JM. Um Dicionário de Epidemiologia. 2<sup>a</sup> ed. Lisboa: Departamento de Estudos e Planeamento da Saúde; 1995. *Washout* phase; p. 200.
- (68) Bates CJ, Thurnham DI, Bingham SA, Margetts BM, Nelson M. Biochemical markers of nutrient intake. In: Margetts BM, Nelson M, editors. Design concepts in nutritional epidemiology. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1997. Cap. 7, p.170-240.
- (69) Buzzard M. 24-Hour dietary recall and food record methods. In: Willet W, editor. Nutritional Epidemiology. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Oxford: Oxford University Press; 1998. Cap. 4, p. 50-73.
- (70) Nelson M, Bingham SA. Assessment of food consumption and nutrient intake. In: Margetts BM, Nelson M, editors. Design concepts in nutritional epidemiology. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1997. Cap. 6, p.123-69.
- (71) Marques M, Pinho O, de Almeida MVD. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto. Manual de quantificação de alimentos. Porto; 1996.
- (72) Camacho MR. Cozinha madeirense. 2<sup>a</sup> ed. Funchal: Governo Regional da Madeira; 1990.

- (73) MicroDiet: base de dados nutricional [programa informático]. Versão 1.1. MicroDiet plus for Windows; 2000.
- (74) National Health and Nutrition Examination Survey. Anthropometry Procedures Manual; 2002 revised Jan.
- (75) World Health Organization Regional Office for Europe [*homepage*]. WHO; 2004 [citado em 2004 Nov 1]. Disponível em: [www.euro.who.int/nutrition/20030507\\_1](http://www.euro.who.int/nutrition/20030507_1).
- (76) Pi-Sunyer FX. The medical risks of obesity. *Obes Surg.* 2002; 12 Suppl 1: 6S-11S.
- (77) National Institutes of Health Technology Assessment Conference Statement. Bioelectrical Impedance Analysis in Body Composition Measurement. NHI Technol Assess Statement; 1994 Dec 12-14.
- (78) Willet W. Anthropometric measures and body composition. In: *Nutritional Epidemiology*. New York, Oxford: Oxford University Press; 1998. Cap. 10, p. 244-72.
- (79) MALTRON. Maltron Operating Manual BF-900/BF-906: using the medically proven principal of Bioelectrical Impedance Analysis. United Kingdom: Maltron International Ltd; 1998.
- (80) Pereira A. *SPSS Guia Prático de Utilização: Análise de Dados para Ciências Sociais e Psicologia*. 2ª ed. Lisboa: Edições Sílabo Lda; 1999.
- (81) SPSS: statistical package for the social sciences [programa informático]. Versão 13.0. SPSS Inc; 2004. Requisitos do sistema: Windows 98, 2000, Me ou NT4.0.
- (82) Montgomery DC. *Design and Analysis of Experiments*. 4<sup>th</sup> ed. New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Weinheim: John Wiley and Sons; 1997.
- (83) Pestana MH, Gageiro JN. *Análise de dados para ciências sociais – a complementaridade do spss*. 3ª ed. Lisboa: Edições Sílabo Lda; 2003.
- (84) Cochran WG, Cox GM. *Experimental Designs*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley and Sons; 1957.
- (85) Liong MT, Shah NP. Optimization of cholesterol removal, growth and fermentation patterns of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 in the presence of mannitol, fructo-oligosaccharide and inulin: a response surface methodology approach. *J Appl Microbiol.* 2005; 98(5): 1115-1126.

- <sup>(86)</sup> Liong MT, Shah NP. Optimization of cholesterol removal by probiotics in the presence of prebiotics by using a response surface method. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(4): 1745-1753.
- <sup>(87)</sup> Akalin AS, Gonç S, Duzel S. Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice. *J Dairy Sci.* 1997; 80: 2721-2725.
- <sup>(88)</sup> Derek KW, Gilliland SE. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci.* 1992; 76: 956-961.
- <sup>(89)</sup> Harrison VC, Peat G. Serum cholesterol and bowel flora in the new born. *Am J Clin Nutr.* 1975; 28(12): 1351-1355.
- <sup>(90)</sup> Richelsen B, Kristensen K, Pedersen SB. Long-term (6 months) effect of a new fermented milk product on the level of plasma lipoproteins – a placebo-controlled and double blind study. *Eur J Clin Nutr.* 1996; 50(12): 811-815.
- <sup>(91)</sup> Danielson AD, Peo ER, Shahani KM, Lewis AJ, Whalen PJ, Amer MA. Anticholesterolemic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *J Anim Sci.* 1989; 67(4): 966-974.
- <sup>(92)</sup> De Smet I, De Boever P, Verstraete W. Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. *Br J Nutr.* 1998; 79(2): 185-194.
- <sup>(93)</sup> Semenkovich CF. Nutrient and genetic regulation of lipoprotein metabolism. In: Williams and Wilkins, editors. *Modern nutrition in health and disease.* 9<sup>th</sup> ed. Baltimore, Philadelphia, London, Paris, Bangkok, Hong Kong, Munich, Sydney, Tokyo, Wrocław;1999. Cap. 74, p. 1191-1198.
- <sup>(94)</sup> Temme EH, Mensink RP, Hornstra G. Comparison of the effects of diets enriched in lauric, palmitic, or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men. *Am J Clin Nutr.* 1996; 63(6): 897-903.
- <sup>(95)</sup> Smedman AE, Gustafsson IB, Berglund LG, Vessby BO. Pentadecanoic acid in serum as a marker for intake of milk fat: relations between intake of milk fat and metabolic risk factors. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69(1): 22-29.
- <sup>(96)</sup> Masson LF, McNeill G, Avenell A. Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77(5): 1098-1111.
- <sup>(97)</sup> Dreon DM, Fernstrom HA, Miller B, Krauss RM. Apolipoprotein E isoform phenotype and LDL subclass response to a reduced-fat diet. *Arterioscler Thromb Vas Biol.* 1995; 15: 105-111.

- <sup>(98)</sup> Dreon DM, Krauss RM. Diet-gene interactions in human lipoprotein metabolism. *J Am Coll Nutr.* 1997; 16(4): 313-324.
- <sup>(99)</sup> Cobb MM, Teitlebaum H, Risch N, Jekel J, Ostfeld A. Influence of dietary fat, apolipoprotein E phenotype, and sex on plasma lipoprotein levels. *Circulation.* 1992; 86: 849-857.
- <sup>(100)</sup> van Vlijmen BJ, van den Maagdenberg AM, Gijbels MJ, van der Boom H, HogenEsch H, Frants RR, et al. Diet-induced hyperlipoproteinemia and atherosclerosis in apolipoprotein E3- Leiden transgenic mice. *J Clin Invest.* 1994; 93(4): 1403-1410.
- <sup>(101)</sup> Weggemans RM, Zock PL, Ordovas JM, Pedro-Botet J, Katan MB. Apoprotein E genotype and the response of serum cholesterol dietary fat, cholesterol and cafestol. *Atherosclerosis.* 2001; 154(3): 547-555.
- <sup>(102)</sup> Lopez-Miranda J, Ordovas JM, Mata P, Lichtenstein AH, Clevidence B, Judd JT, et al. Effect of apolipoprotein E phenotype on diet-induced lowering of plasma low density lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res.* 1994; 35: 1965-1975.
- <sup>(103)</sup> Lees AM, Mok HY, Lees RS, McCluskey MA, Grundy SM. Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis.* 1977; 28(3): 325-338.

## Anexo 1



## Anexo 2



## Anexo 3

# OLYMPUS

## CHOLESTEROL

Português

<b>OSR6116</b>	4 x 22,5 ml	R1
<b>OSR6216</b>	4 x 45 ml	R1
<b>*OSR6516</b>	4 x 109 ml	R1

### Fim a que se destina

Ensaio de cor enzimático para a determinação quantitativa do colesterol no soro e plasma humanos em analisadores OLYMPUS. Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.

\*Cholesterol reagent OSR6516 para utilização apenas nos sistemas AUZ700 e AU5400.

### Resumo<sup>1</sup>

O colesterol é sintetizado de modo permanente em todo o organismo e é um componente essencial das membranas das células e lipoproteínas e é igualmente um precursor para a síntese de hormonas esteróides e ácidos biliares.

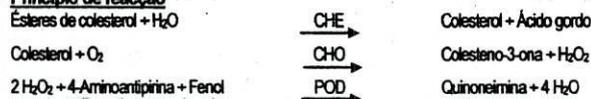
O valor preditivo individual da concentração total de colesterol relativamente ao risco coronário é reduzido. O colesterol é sobretudo transportado em duas classes de lipoproteínas (LDL e HDL), as quais desempenham um papel contraditório na patogénese das perturbações de lípidos. Por conseguinte, a concentração de colesterol total proporciona apenas um valor de base que indica-se devem ser levadas a cabo mais investigações laboratoriais do metabolismo de lipoproteínas (HDL, LDL e triglicéridos).

### Princípio do ensaio<sup>2</sup>

O reagente de Olympus Cholesterol utiliza um método enzimático para medir o colesterol no soro e plasma humanos. Neste procedimento, os ésteres de colesterol numa amostra são hidrolisados por colesterol esterase (CHE). O colesterol livre produzido é oxidado por colesterol oxidase (CHO) para colesterol-3-ona com a produção simultânea de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o qual acopla oxidativamente com 4-aminocantipirina e fenol na presença de peroxidase (POD) para produzir um cromóforo.

O corante vermelho de quinoneína pode ser medido espectrofotometricamente a 540/600nm como um aumento na absorção.

### Princípio de reacção



### Conteúdo, composição do reagente no ensaio

Concentração final de ingredientes reactivos:	
Tampão de fosfato (pH 6.5)	103 mmol/l
4-Aminocantipirina	0,31 mmol/l
Fenol	5,2 mmol/l
Colesterol esterase	≥ 0,2 kU/l (3,3 µkat/l)
Colesterol oxidase	≥ 0,2 kU/l (3,3 µkat/l)
Peroxidase	≥ 10,0 kU/l (166,7 µkat/l)
Conservante	

### Precauções e avisos

Tenha as precauções normais necessárias para manusear todos os reagentes de laboratório. Para evitar a possível acumulação de compostos de azida, lave os canos de esgoto com água após a eliminação de um reagente não diluído. Elimine os materiais residuais em conformidade com as normas locais. Folha de dados de segurança disponível para utilizadores profissionais mediante solicitação.

### Preparação do reagente

O reagente está pronto a ser utilizado e pode ser colocado directamente no interior do instrumento.

### Armazenamento e estabilidade

O reagente é estável, enquanto não for aberto, até à data de validade mencionada quando armazenado a 2...8°C. Depois de aberto, o reagente armazenado dentro do instrumento é estável durante 30 dias.

### Espécime<sup>3</sup>

Soro e EDTA ou plasma heparinizado. As amostras ictericas devem ser evitadas. O plasma não é recomendado utilizando anticoagulantes tais como oxalato, citrato ou fluoreto. Separe o soro das células dentro de 2 horas. O colesterol no soro é estável durante 5-7 dias quando armazenado a 2...8°C.

### Procedimento de ensaio

Consulte o Guia do Utilizador adequado e as Folhas de Definição do Instrumento que o acompanha para obter instruções de ensaio específicas do analisador.

### Calibragem

Olympus System Calibrator Cat. No. 66300. O valor de colesterol do calibrador é aferido em conformidade com o Material de Referência da Norma (SRM) do National Institute of Standards and Technology (NIST), 909b Nível 1. Calibre o ensaio ao fim de cada 30 dias, ou quando ocorrer o seguinte: Alteração no número do lote do reagente ou mudança significativa nos valores de controlo; Execução de manutenção preventiva de grande escala no analisador ou substituição de uma peça crítica.

### Controlo de qualidade

Podem ser utilizados Olympus Controls Cat. No. ODC0003 e ODC0004 ou outros materiais de controlo com valores determinados por este sistema Olympus.

### Cálculo

Os analisadores Olympus calculam automaticamente a concentração de colesterol de cada amostra. Os níveis totais de colesterol no plasma devem ser corrigidos multiplicando o resultado obtido por 1,03 para serem equivalentes aos níveis do soro do colesterol total.<sup>4</sup>

### Intervalos de referência<sup>5</sup>

Colesterol total:	
< 5,2 mmol/l (200 mg/dl)	Desejável
5,2 - 6,2 mmol/l (200 - 239 mg/dl)	Limite elevado
≥ 6,2 mmol/l (240 mg/dl)	Elevado

Os valores esperados podem variar com a idade, sexo, dieta e localização geográfica. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores esperados de acordo com as boas práticas laboratoriais.

### Características de desempenho específicas

Os dados incluídos nesta secção são representativos do desempenho dos sistemas Olympus. Os dados obtidos no seu laboratório podem ser diferentes destes valores.

### Linearidade

O ensaio é linear dentro de um intervalo de concentração entre 0,5 - 18,0 mmol/l (20 - 700 mg/dl).

### Precisão

Os seguintes dados foram obtidos num AU600 utilizando 3 pools de soro analisados durante 10 dias.

n = 60	Intervalo de concentrações			Total	
	Média, mmol/l	DP	CV%	DP	CV%
3,07	0,03	0,91	0,03	1,06	
5,92	0,04	0,72	0,09	1,45	
11,18	0,08	0,72	0,13	1,13	

### Sensibilidade

O nível mais baixo detectável no soro num analisador AU600 foi estimado a 0,07 mmol/l. O nível mais baixo detectável representa o nível mais mensurável de colesterol que pode ser distinguido de zero. É calculado como a média absoluta mais três desvios padrão de 20 réplicas de uma amostra sem analito.

### Comparação de métodos

Foram utilizadas amostras de soro do paciente para comparar este ensaio do Olympus Cholesterol OSR6116 no AUZ700 relativamente a outro ensaio de colesterol disponível comercialmente. Os resultados da análise de regressão linear foram os seguintes:

$$y = 1,017x - 0,031 \quad r = 0,996 \quad n = 511 \quad \text{Amplitude da amostra} = 1,32 - 12,20 \text{ mmol/l}$$

### Substâncias que interferem

Resultados de estudos efectuados para avaliar a susceptibilidade do método a interferências foram os seguintes:

Ascorbato: Interferência inferior a 10% até 8 mg/dl de ascorbato  
Ictericia: Interferência inferior a 10% até 8 mg/dl ou 137 µmol bilirubina  
Hemólise: Interferência inferior a 10% até 5 g/l de hemoglobina  
Lipemia: Interferência inferior a 3% até 1000 mg/dl Intralipid<sup>®</sup>

Consulte Young<sup>®</sup> para mais informações sobre substâncias que interferem.

### Notas de rodapé da folha de definições

# Utilizador definido      = Valor predefinido do analisador  
† Olympus System Calibrator Cat. No.: 66300  
\* Valores definidos para funcionar em unidades SI (mmol/l). Para funcionar em mg/dl multiplicar por 38,7.

### Símbolos

Os seguintes símbolos são utilizados na etiquetagem dos Olympus System Reagents.

	Fabricante		Limites de temperatura
	Dispositivo clínico de diagnóstico <i>In Vitro</i>		Conteúdo
	Consulte as instruções de utilização		

### BIBLIOGRAFIA

- Riesen WF. Lipid Metabolism. In: Thomas L, ed. Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998:167 - 169.
- Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem 1974;20:470-475.
- Tietz NW, ed. Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed. W.B. Saunders Company 1995:130pp.
- Current status of blood cholesterol measurement in clinical laboratories in the United States: a report from the Laboratory Standardization Panel of the National Cholesterol Education Program. Clin Chem 1988;34:193-201.
- National cholesterol education program expert panel. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285:2486-2497.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACCPress, 2000.

Fabricado e distribuído por: Olympus Diagnostica GmbH (Irish Branch), Lismeehan, O'Callaghan's Mills, Co. Clare, Ireland. Tel: +353 85 6831100.  
Fabricado para: Novadia, Rua Santos Pousada, 552, 4430-287, Oliveira do Douro, Portugal.

# OLYMPUS

## LDL-CHOLESTEROL

Português

<b>OSR6183</b>	4 x 27 ml	R1
	4 x 9 ml	R2
<b>OSR6283</b>	4 x 51,3 ml	R1
	4 x 17,1 ml	R2

### Fim a que se destina

Ensaio de cor enzimático para a determinação quantitativa do colesterol LDL no soro e plasma humano em analisadores OLYMPUS. Apenas para diagnóstico *in vitro*.

### Resumo<sup>1,2,3</sup>

O colesterol LDL (LDL C) constitui a maior parte da molécula LDL, formada através da acção da lipoproteína lipase no VLDL. O colesterol LDL desempenha um papel preponderante no desenvolvimento de cardiopatia coronária (CHD), com inúmeros estudos epidemiológicos demonstrativos das suas propriedades aterogénicas. De todas as variáveis de lipídios e lipoproteínas, o colesterol LDL é o que possui a mais forte associação com a mortalidade por doenças coronárias (estudo GRIPS), com uma combinação de níveis altos de colesterol LDL e níveis de triglicéridos elevados, constituindo um quadro de especial alto risco. A avaliação do colesterol LDL fornece o reconhecimento prematuro do risco da aterosclerose e pode ser usada para determinar a resposta à terapia com drogas reductoras de lipídios.

Os elevados níveis de colesterol LDL estão associados ao risco acrescido de doenças cardiovasculares e hiperlipidemia familiar. Reduzidos níveis de colesterol LDL podem ser registados em situações de má absorção e má nutrição.

Em 1988 o National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel (NCEP-ATP) desenvolveu diversas recomendações para o diagnóstico e tratamento de doentes com hipercolesterolemia. Estas recomendações definiram o colesterol LDL como o objectivo primário da terapia.

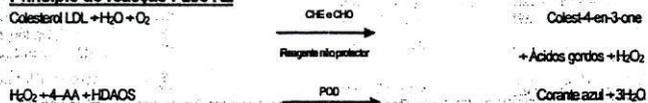
A actualização de 2001 destas normas (NCEP-ATP III) dá um adicional destaque aos aspectos da melhor identificação do risco e ao tratamento mais eficaz na redução dos níveis de colesterol.

### Princípio de ensaio<sup>4</sup>

Um agente protector em R1 protege o LDL das reacções enzimáticas. Todas as lipoproteínas não DLL (HDL, VLDL, CM) são decompostas através da reacção com colesterol esterase (CHE) e colesterol oxidase (CHO). O peróxido de hidrogénio produzido por esta reacção é decomposto por catalase em R1.

Quando o R2 é adicionado, o reagente protector é libertado do LDL e a catalase é inactivada pela azida de sódio. O LDL pode ser agora quantificado pelo sistema CHOPAP.

### Princípio de reacção Fase R2



### Conteúdo, composição do reagente no ensaio

Concentração final de ingredientes reactivos:	
Colesterol esterase	3,7 IU/ml
Colesterol oxidase	3,7 IU/ml
Peroxidase	4,9 IU/ml
Azida de sódio	0,1 %
Tampão de Good (pH 6,8)	25 mmol/l
4-aminocaprina	0,8 mmol/l
Catalase	743 IU/ml
HDAOS	0,47 mmol/l
Detergentes	

### Precauções e avisos

Avisos de perigo e frases de risco:  
Reagente R2. Nocivo, contém azida de sódio. R22 Nocivo se ingerido.  
Frases de segurança:  
S36, S60. Utilizar vestuário de protecção adequado. Este material e a sua embalagem devem ser eliminados como material residual perigoso.

Elimine os materiais residuais em conformidade com as normas locais.  
Para evitar a possível acumulação de compostos de azida, lave os canos de esgoto com água após a eliminação de um reagente não diluído.  
Para mais informações, consulte as Folhas de Dados de Segurança.

### Preparação do reagente

Os reagentes estão prontos a ser utilizados e podem ser colocados directamente no interior do instrumento.

### Armazenamento e estabilidade

Os reagentes são estáveis, enquanto não forem abertos, até à data de validade mencionada se armazenados a 2...8°C. Depois de abertos, os reagentes armazenados dentro do instrumento permanecem estáveis durante 30 dias.  
A cor do R1 pode mudar para verde claro quando armazenado no interior do analisador. Tal não afecta o desempenho do reagente.

### Espécime<sup>5</sup>

Soro e plasma heparinizado; Estável durante 7 dias quando armazenado a 2...8°C e durante 1 dia quando armazenado a 15...25°C

### Procedimento de ensaio

Consulte o Guia do Utilizador adequado e a Folha de Definições do Instrumento em anexo para instruções de ensaio específicas do analisador.

### Calibragem

Olympus LDL-Cholesterol Calibrator ODC0012.  
O calibrador é aferido de acordo com o método de referência do colesterol LDL US CDC (Centre for Disease Control).  
Recalibrar a análise todos os 30 dias e executar com o reagente em branco todos os 7 dias, ou quando ocorrer o seguinte:  
Alteração no frasco do reagente ou mudança significativa nos valores de controlo;  
Execução de manutenção preventiva de grande escala no analisador ou substituição de uma peça crítica.

### Controlo de qualidade

Podem ser utilizados soros HDL/LDL-Cholesterol Control ou outros materiais de controlo com valores determinados por este método.

Cada laboratório deve estabelecer a sua própria frequência de controlo. Contudo, as boas práticas laboratoriais sugerem que os controlos sejam executados todos os dias em que forem medidas amostras de doentes e sempre que for realizada a calibragem/impeza.

Os resultados obtidos por qualquer laboratório individual podem variar relativamente ao valor médio determinado. Por conseguinte, recomenda-se que cada laboratório estabeleça valores de referência de controlo específicos do analito e intervalos com base em vários dias de acordo com os respectivos requisitos. Os referidos valores de referência devem enquadrar-se nas correspondentes gamas aceitáveis indicadas na documentação relevante do produto.

Se forem detectadas quaisquer tendências ou mudanças repentinhas nos valores, reveja todos os parâmetros de operação. Cada laboratório deve estabelecer normas para acção correctiva a executar se os controlos não recuperarem dentro dos limites especificados.

### Cálculo

Os analisadores Olympus calculam automaticamente a concentração de colesterol LDL de cada amostra.

### Intervalos de referência<sup>6</sup>

<2,6 mmol/l (100 mg/dl)	Ótimo
2,6-3,3 mmol/l (100-129 mg/dl)	Quase ótimo / Acima de ótimo
3,4-4,1 mmol/l (130-159 mg/dl)	Limite elevado
4,1-4,9 mmol/l (160-189 mg/dl)	Elevado
≥ 4,9 mmol/l (190 mg/dl)	Muito elevado

Os valores esperados podem variar de acordo com a idade, sexo, tipo de amostra, dieta e localização geográfica. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores esperados de acordo com as boas práticas laboratoriais.

### Características de desempenho específicas

Os dados incluídos nesta secção são representativos do desempenho dos sistemas Olympus. Os dados obtidos no seu laboratório podem ser diferentes destes valores.

#### Linearidade

O ensaio é linear com uma concentração entre 0,26 - 10,3 mmol/l (10 - 400 mg/dl).

#### Precisão

Os seguintes dados foram obtidos num AU640 utilizando 3 pools de soro analisados durante 10 dias.

n = 60	Intervalo de concentrações			Total	
Média mmol/l	SD	CV%	SD	CV%	
1,57	0,04	2,26	0,04	2,71	
2,63	0,04	1,36	0,06	2,34	
3,70	0,07	1,76	0,10	2,68	

#### Sensibilidade

O nível mais baixo detectável no soro num analisador AU640 foi estimado a 0,012 mmol/l.

O nível mais baixo detectável representa o nível mais baixo mensurável de colesterol LDL que pode ser distinguido a partir de zero. É calculado como a média absoluta mais três desvios standard de 20 réplicas de uma amostra sem análise.

#### Comparação de métodos

Foram utilizadas amostras de soro do doente para comparar esta análise Olympus LDL-Cholesterol no AU600 com outros ensaios de colesterol LDL disponíveis comercialmente. Os resultados da análise de regressão linear foram os seguintes:

$y = 0,912x + 0,328$	$r = 0,966$	$n = 134$	Amplitude da amostra = 1,461 - 4,054 mmol/l
----------------------	-------------	-----------	---

#### Substâncias que interferem

Os resultados de estudos efectuados para avaliar a susceptibilidade do método a interferências foram os seguintes:

Icteric: Interferência inferior a 5% até 40 mg/dl ou 684 µmol/l bilirubina

Hemolise: Interferência inferior a 5% até 5 µl de hemoglobina

Ascorbato: Interferência inferior a 3% até 20 mg/dl de ascorbato

Triglicéridos: Interferência inferior a 10% até 11,3 mmol/l de triglicéridos

Consulte Young<sup>7</sup> para mais informações sobre substâncias que interferem.

#### Limitações

Quando os triglicéridos numa amostra ultrapassam 11,3 mmol/l (1 000 mg/dl), dilua a amostra numa solução salina, repita o ensaio e multiplique o resultado pelo factor de diluição.

Amostras de doentes com hiperlipoproteinemia do Tipo III produzem resultados discrepantes relativamente ao método de referência (tendência +30%).<sup>8</sup>

Misturas de lipídios artificiais, conforme incluído em algumas soluções para infusões intravenosas (ex.: Intralipid<sup>®</sup>), podem interferir com este reagente. Amostras de doentes a quem sejam administradas estas misturas de lipídios não devem ser analisadas relativamente ao colesterol LDL utilizando este ensaio.

A transferência deste Olympus LDL-Cholesterol Reagent para o Olympus Lipase Reagent pode traduzir-se em valores de lipase elevados. Consulte os Parâmetros de Contaminação.

#### Notas de rodapé da folha de definições

# Definido pelo utilizador      \* Valor predefinido do analisador

† Olympus System Calibrator Cat. No. ODC0012

\*\* Valores definidos para funcionar em unidades SI (mmol/L). Para funcionar em mg/dl multiplicar por 38,7.

‡ Executar com o reagente em branco todos os 7 dias

#### Símbolos

Os seguintes símbolos são utilizados na etiquetagem dos Olympus System Reagents.

	Fabricante		Proteger da luz
	Dispositivo clínico de diagnóstico <i>In Vitro</i>		Conteúdo
	Consulte as instruções de utilização		
	Limites de temperatura		

#### BIBLIOGRAFIA

- Cremer P, Nagel D, Mann H, Labrot B, Müller - Berninger R, Elster H, et al. Ten year follow-up results from the Goettingen Risk, Incidence and prevalence study (GRIPS). 1. Risk factors for myocardial infarction in a cohort of 5790 men. *Atherosclerosis* 1997; 129 (2): 221-230.
- National cholesterol education program. Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel II). NIH Publication No. 93-3095, 1995.
- Nalio HK, Strong JP, Scott MG et al. Atherogenesis: current topics on etiology and risk factors. *Clin Chem* 1995; 41 (1): 132-133.
- Miki Y. A homogeneous assay for the selective measurement of LDL-cholesterol in serum. *Enzymatic selective protection method*. *Clin Lab* 1999; 45:398-401.
- Ehret W, Hill W, Schmitz Y, Topfer G, Wessner H, Zawta B, et al. Use of Anticoagulants in Diagnostic Laboratory Investigations and Stability of Blood, Plasma and Serum Samples. *WHODIL/LAB/99.1 Rev.2:26pp*.
- National cholesterol education program expert panel. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285:2486-2497.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5<sup>th</sup> ed. AACCC Press, 2000.
- Esteban-Salan M, Guimón-Bardesi A, de La Muela-Luzueta JM, Azcarate-Ania MN, Pascual-Usandizaga P, Amoroso-De-Río E. Analytical and clinical evaluation of two homogeneous assays for LDL-cholesterol in hyperlipidemic patients. *Clin Chem* 2000; 46(8 Pt 1): 1121-31.

Fabricado e distribuído por: Olympus Diagnostica GmbH (Irish Branch), Lismeehan, O'Callaghan's Mills, Co. Clare, Ireland. Tel: +353 65 6831100.  
Fabricado para: Novadia, Rua Santos Pousada, 552, 4430-287, Oliveira do Douro, Portugal.



# OLYMPUS

Português

## HDL-CHOLESTEROL

<b>OSR6187</b>	4 x 27 ml	R1
	4 x 9 ml	R2
<b>OSR6287</b>	4 x 51,3 ml	R1
	4 x 17,1 ml	R2
<b>OSR6587</b>	4 x 111 ml	R1
	4 x 40 ml	R2

### Fim a que se destina

Ensaio de cor enzimático para a determinação quantitativa do colesterol HDL no soro e plasma humano em analisadores OLYMPUS. Apenas para diagnóstico *in vitro*.

Reagente HDL-Cholesterol OSR6587 para utilização apenas nos sistemas AU2700 e AU5400.

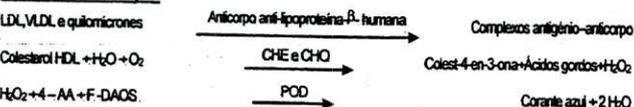
### Resumo<sup>1</sup>

Aproximadamente 25% do total de colesterol do soro é transportado na fracção de HDL. Inúmeros estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram uma forte associação inversa entre o colesterol HDL e a incidência da doença das artérias coronárias. Foi proposto que a ingestão e o transporte do colesterol do tecido periférico para o fígado age como um factor protector contra o desenvolvimento de placas arterioscleróticas. Por conseguinte, a determinação do colesterol HDL é essencial para a interpretação das determinações do colesterol individuais. O colesterol HDL baixo consiste num factor de risco independente da concentração total de colesterol e constitui um prognóstico altamente fiável do risco de doença das artérias coronárias. A medição do colesterol HDL é utilizada no reconhecimento precoce do risco de aterosclerose, podendo também ser utilizada na monitorização de indivíduos durante o tratamento com medicamentos redutores de lipídios.

### Princípio de ensaio

Anticorpo anti-apolipoproteína-β-humana em R1 liga-se às lipoproteínas, excepto HDL (LDL, VLDL e quilomícrons). Os complexos antigénio-anticorpo formam reacções enzimáticas em bloco quando é adicionado R2. O colesterol HDL é quantificado através da presença de um sistema de cromogénio enzimático.

### Princípio de reacção



### Conteúdo, composição do reagente no ensaio

Concentração final de ingredientes reactivos:

Anticorpo lipoproteína-β-anti-humana	Variável
Colesterol esterase (CHE)	0,8 IU/ml
Colesterol oxidase (CHO)	4,4 IU/ml
Peroxidase (POD)	1,7 IU/ml
Ascorbato oxidase	2,0 IU/ml
Tampão de Good (pH 7,0)	30 mmol/l
N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxi-4-fluoroanilina (F-DAOS)	0,20 mmol/l
4-Aminocaprolina	0,67 mmol/l
Conservante	
Detergente	

### Precauções e avisos

Tenha as precauções normais necessárias para manusear todos os reagentes de laboratório. Elimine os materiais residuais em conformidade com as normas locais.

### Preparação do reagente

Os reagentes estão prontos a ser utilizados e podem ser colocados directamente no interior do instrumento.

### Armazenamento e estabilidade

Os reagentes são estáveis, enquanto não forem abertos, até à data de validade mencionada se armazenados a 2...8°C. Depois de abertos, os reagentes armazenados dentro do instrumento permanecem estáveis durante 30 dias. A cor do R2 pode mudar para verde claro quando armazenado no interior do analisador. Tal não afecta o desempenho do reagente.

### Espécime

Soro e plasma heparinizado (jejum e após ingestão de alimentos); Estável durante 7 dias quando armazenado a 2...8°C e durante 2 dias quando armazenado a 15...25°C.

### Procedimento de ensaio

Consulte o Guia do Utilizador adequado e a Folha de Definições do Instrumento em anexo para instruções de ensaio específicas do analisador.

### Calibragem

Olympus HDL-Cholesterol Calibrator ODC0011.

O calibrador é aferido de acordo com o método de referência do colesterol HDL do US CDC (Centre for Disease Control).

Recalibrar a análise todos os 30 dias e executar com o reagente em branco todos os 7 dias, ou quando ocorrer o seguinte:

Alteração no frasco do reagente ou mudança significativa nos valores de controlo;

Execução de manutenção preventiva de grande escala no analisador ou substituição de uma peça crítica.

### Controlo de qualidade

Pode ser utilizado Soro Olympus HDL-Cholesterol Control ODC0005 ou outros materiais de controlo com valores determinados por este método.

Cada laboratório deve estabelecer a sua própria frequência de controlo. Contudo, as boas práticas laboratoriais sugerem que os controlos sejam executados todos os dias em que forem medidas amostras de doentes e sempre que for realizada a calibragem/imperza.

Os resultados obtidos por qualquer laboratório individual podem variar relativamente ao valor médio determinado. Por conseguinte, recomenda-se que cada laboratório estabeleça valores de referência de controlo específicos do analito e intervalos com base em vários ciclos de acordo com os respectivos requisitos. Os referidos valores de referência devem enquadrar-se nas correspondentes gamas aceitáveis indicadas na documentação relevante do produto.

Se forem detectadas quaisquer tendências ou mudanças repentinas nos valores, reveja todos os parâmetros de operação. Cada laboratório deve estabelecer normas para acção correctiva a executar se os controlos não recuperarem dentro dos limites especificados.

### Cálculo

Os analisadores Olympus calculam automaticamente a concentração de colesterol HDL de cada amostra.

### Normas do National Cholesterol Education Program (NCEP) (Programa nacional de educação para o colesterol)<sup>2</sup>

<1,03 mmol/l (<40 mg/dl)

Colesterol HDL baixo (importante factor de risco para doença da artéria coronária)

≥1,55 mmol/l (≥60 mg/dl)

Colesterol HDL elevado (factor de risco "negativo" para doença das artérias coronárias)

### Características de desempenho específicas

Os dados incluídos nesta secção são representativos do desempenho dos sistemas Olympus. Os dados obtidos no seu laboratório podem ser diferentes destes valores.

### Linearidade

O ensaio é linear com uma concentração entre 0,05 - 4,65 mmol/l (2 - 180 mg/dl).

### Precisão

Os seguintes dados foram obtidos num AU640 utilizando 3 pools de soro analisados durante 10 dias.

Média mmol/l	Intervalo de concentrações		Total	
	SD	CV%	SD	CV%
0,69	0,006	0,85	0,013	1,92
1,09	0,007	0,62	0,018	1,69
2,08	0,013	0,61	0,027	1,32

### Sensibilidade

O nível mais baixo detectável num analisador AU640 foi calculado a 0,002 mmol/l.

O nível mais baixo detectável representa o nível mais baixo mensurável de colesterol HDL que pode ser distinguido a partir de zero. É calculado como a média absoluta mais três desvios standard de 20 réplicas de uma amostra sem analito.

### Comparação de métodos

Foram utilizadas amostras de soro do doente para comparar esta análise Olympus HDL-Cholesterol OSR6187 no AU640 com outros ensaios de colesterol HDL disponíveis comercialmente. Os resultados da análise de regressão linear foram os seguintes:

y = 1,212x + 0,080	r = 0,993	n = 200	Amplitude da amostra = 0,31 - 2,54 mmol/l
--------------------	-----------	---------	---

### Substâncias que interferem

Os resultados de ensaios efectuados para avaliar a susceptibilidade do método a interferências foram os seguintes:

Ascorbato:	Interferência inferior a 3% até 20 mg/dl de ascorbato
Bilirrubina:	Interferência inferior a 3% até 40 mg/dl ou 684 μmol/l bilirrubina
Hemólise:	Interferência inferior a 3% até 5 g/l de hemoglobina
Lipemia:	Interferência inferior a 10% até 900 mg/dl "Intralipid"

\* Não foi observada qualquer interferência significativa em amostras com triglicéridos nativos até 11,3 mmol/l (1 000 mg/dl), contudo, existe uma correlação fraca entre a lipemia e a concentração de triglicéridos - consultar limitações da secção.

Consulte Young4 para mais informações sobre substâncias que interferem.

### Limitações

Quando os triglicéridos numa amostra ultrapassam 11,3 mmol/l (1 000 mg/dl), dilua a amostra numa solução salina, repita o ensaio e multiplique o resultado pelo factor de diluição.

### Notas de rodapé da folha de definições

# Definido pelo utilizador

\* Valor predefinido do analisador

† Olympus HDL-Cholesterol Calibrator Cat. N.º ODC0011

\*\* Valores definidos para funcionar em unidades SI (mmol/l). Para funcionar em mg/dl multiplicar por 38,7.

‡ Executar com o reagente em branco todos os 7 dias

### Símbolos

Os seguintes símbolos são utilizados na etiquetagem dos Olympus System Reagents.

	Fabricante		Proteger da luz
	Dispositivo clínico de diagnóstico In Vitro		Conteúdo
	Consulte as instruções de utilização		
	Limites de temperatura		

### BIBLIOGRAFIA

- Riesen WF. Lipid metabolism. In: Thomas L, ed. Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998:171-173.
- Ehret W, Heil W, Schmitt Y, Töpfer G, Wisser H, Zawta B, et al. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2:26pp.
- National cholesterol education program expert panel. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285:2486-2497.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5ª ed. AACCPress, 2000.

Fabricado e distribuído por: Olympus Diagnostica GmbH (Irish Branch), Lismeehan,

O'Callaghan's Mills, Co. Clare, Ireland. Tel +353 65 6831100.

Fabricado para: Novadia, Rua Santos Pousada, 552, 4430-287, Oliveira do Douro, Portugal.



# OLYMPUS

Português

## TRIGLYCERIDE

OSR6133

4 x 50 ml

R1

4 x 12,5 ml

R2

### Fim a que se destina

Ensaio de cor enzimático para a determinação quantitativa de triglicéridos no soro e plasma humanos em analisadores OLYMPUS. Apenas para diagnóstico *in vitro*.

### Resumo<sup>1,2</sup>

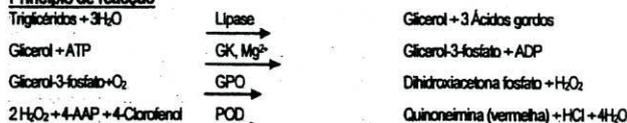
As medições de triglicéridos são utilizadas no diagnóstico e no tratamento de doentes com pancreatite aguda e crónica, diabetes mellitus, nefrose, obstrução biliar extra-hepática e outras doenças que envolvam o metabolismo de lipídios ou várias perturbações endócrinas.

Clinicamente, as análises de triglicéridos são utilizadas para ajudar a classificar várias perturbações de lipoproteínas genéticas e metabólicas, bem como na avaliação de factores de risco de aterosclerose e doença da artéria coronária.

### Princípio de ensaio<sup>3,4,5</sup>

Este procedimento Olympus Triglyceride baseia-se numa série de reacções enzimáticas acopladas. Os triglicéridos da amostra são hidrolizados através de uma combinação de lipases microbianas para proporcionar glicerol e ácidos gordos. O glicerol é fosforilado através de trifosfato de adenosina (ATP) na presença de glicerol quinase (GK) para produzir glicerol-3-fosfato. O glicerol-3-fosfato é oxidado através de oxigénio molecular na presença de GPO (glicerol fosfato oxidase) para produzir peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e dihidroacetona fosfato. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é utilizado para acoplar oxidativamente p-clorofenol e 4-aminoantipirina (4-AAP) catalizada por peroxidase (POD) para proporcionar um corante vermelho com um máximo de absorção a 500 nm. O aumento da absorção a 520/600 nm é proporcional ao teor de triglicéridos da amostra.

### Princípio de reacção



### Conteúdo, composição do reagente no ensaio

Concentração final de ingredientes reactivos:

Tampão PIPES (pH 7,5)	50 mmol/l	Lipases	1,5 kU/l (25 µkat/l)
Mg <sup>2+</sup>	4,6 mmol/l	Glicerol quinase	0,5 kU/l (8,3 µkat/l)
4-Clorofenol	5,4 mmol/l	Peroxidase	0,98 kU/l (16,3 µkat/l)
4-Aminoantipirina	0,25 mmol/l	Ascorbato oxidase	≥ 2 kU/l (33 µkat/l)
ATP	1,4 mmol/l	Glicerol-3-fosfato oxidase	1,23 kU/l (20,5 µkat/l)
Conservante			

### Precauções e avisos

Tenha as precauções normais necessárias para manusear todos os reagentes de laboratório.

Para evitar a possível acumulação de compostos de azida, lave os canos

de esgoto com água após a eliminação de um reagente não diluído.

Elimine os materiais residuais em conformidade com as normas locais.

### Preparação do reagente

Os reagentes estão prontos a ser utilizados e podem ser colocados directamente no interior do instrumento.

### Armazenamento e estabilidade

Os reagentes são estáveis, enquanto não forem abertos, até à data de validade mencionada se armazenados a 2...8°C. Depois de abertos, os reagentes armazenados dentro do instrumento permanecem estáveis durante 30 dias.

### Espécime<sup>1</sup>

Soro e EDTA ou plasma heparinizado.

Deve ser evitado plasma que utilize anti-coagulantes tais como fluoreto, citrato e oxalato.

Devem ser evitadas amostras altamente ictericas.

Separar das células dentro de um período de 2 horas.

Evitar a utilização de tubos de vácuo com tampões com revestimento de glicerol.

Estável durante 5-7 dias quando armazenado a 2...8°C.

### Procedimento de ensaio

Consulte o Guia do Utilizador adequado e as Folhas de Definição do Instrumento que o acompanha para obter instruções de análise específicas do analisador.

### Calibragem

Olympus System Calibrator Cat. No. 66300.

O valor de triglicéridos fornecido no folheto do pacote do calibrador é aferido em conformidade com o Método de referência de espectrometria de massa na diluição de isotópos.

Recalibrar a análise ao fim de 30 dias ou quando ocorrer o seguinte:

Alteração no número do lote do reagente ou mudança significativa nos valores de controlo;

Execução de manutenção preventiva de grande escala no analisador ou substituição de uma peça crítica.

### Controlo de qualidade

Podem ser utilizados Olympus Controls Cat. No. ODC0003 e ODC0004 ou outros materiais de controlo com valores determinados por este sistema Olympus.

### Cálculo

Os analisadores Olympus calculam automaticamente a concentração de triglicéridos de cada amostra.

### Intervalos de Referência<sup>1</sup>

Normal	< 1,70 mmol/l (150 mg/dl)
Limite elevado	1,70 - 2,25 mmol/l (150 - 199 mg/dl)
Elevado	2,26 - 5,64 mmol/l (200 - 499 mg/dl)
Muito elevado	≥ 5,65 mmol/l (500 mg/dl)

Os valores esperados podem variar de acordo com a idade, sexo, dieta e localização geográfica. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores esperados de acordo com as boas práticas laboratoriais.

### Características de desempenho específicas

Os dados incluídos nesta secção são representativos do desempenho dos sistemas Olympus. Os dados obtidos no seu laboratório podem ser diferentes destes valores.

#### Linearidade

O ensaio é linear com uma concentração entre 0,1 - 11,3 mmol/l (10 - 1 000 mg/dl).

#### Precisão

Os seguintes dados foram obtidos num AU600 utilizando 4 pools de soro analisados durante 10 dias.

n = 60	Intervalo de concentrações		Total	
Média, mmol/l	SD	CV%	SD	CV%
0,51	0,01	1,37	0,01	1,81
0,81	0,01	1,07	0,01	1,58
1,92	0,01	0,64	0,05	2,80
10,56	0,06	0,53	0,12	1,13

#### Sensibilidade

O nível mais baixo detectável no soro num analisador AU600 foi estimado a 0,02 mmol/l.

O nível mais baixo detectável representa o nível mais baixo mensurável de triglicéridos que pode ser distinguido do zero. É calculado como a média absoluta mais três desvios standard de 20 réplicas de uma amostra sem análise.

#### Comparação de métodos

Foram utilizadas amostras de soro do doente para comparar esta análise Olympus Triglyceride OSR6133 no AU600 com outros ensaios de triglicéridos disponíveis comercialmente. Os resultados da análise de regressão linear foram os seguintes:

y = 1,022x - 0,067	r = 0,997	n = 110	Amplitude da amostra = 0,6 - 6,6 mmol/l
--------------------	-----------	---------	---

#### Substâncias que interferem

Resultados de estudos efectuados para avaliar a susceptibilidade do método a interferências foram os seguintes:

Ascorbato: Interferência inferior a 5% até 20 mg/dl de ascorbato

Ictericia: Interferência inferior a 10% até 16 mg/dl ou 274 µmol/l bilirubina

Hemólise: Interferência inferior a 10% até 5 g/l de hemoglobina

Consulte Young<sup>6</sup> para mais informações sobre substâncias que interferem.

#### Limitações

Nota: As metodologias enzimáticas GPO de triglicéridos estão sujeitas a fortes interferências negativas das amostras de doentes com níveis de triglicéridos extremamente elevados<sup>4</sup>. Embora estas amostras tenham uma aparência extremamente lipémica e possuam tipicamente níveis de triglicéridos superiores a 20 mmol/l, os resultados podem ser relatados de forma errada como se situando na gama linear da análise. São fornecidos Parâmetros de Verificação de Dados para se poder identificar amostras extremamente lipémicas reveladoras deste fenómeno. Se a cinética de reacção de um ensaio apresentar características de uma destas amostras com níveis de triglicéridos elevados, o resultado da análise será assinalado (F, Z, @ ou &). Amostras extremamente lipémicas em circunstâncias muito raras podem iludir os Parâmetros de Verificação de Dados, pelo que devem ser habitualmente diluídas na proporção de 1 parte de amostra para 4 partes de solução salina antes da realização da análise e multiplicar os resultados por 5.

#### Notas de rodapé da folha de definições

# Utilizador definido      n Valor predefinido do analisador

† Olympus System Calibrator Cat. No.: 66300

\* Valores definidos para funcionar em unidades SI (mmol/l). Para funcionar em mg/dl multiplicar por 88,5.

#### Símbolos

Os seguintes símbolos são utilizados na etiquetagem dos Olympus System Reagents.



Fabricante



Limites de temperatura



Dispositivo clínico de diagnóstico *In Vitro*



Conteúdo



Consulte as instruções de utilização

#### BIBLIOGRAFIA

- Tietz NW, ed. Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1995:610-611.
- Riesen WF. Lipid metabolism. In: Thomas L, ed. Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998:169-171.
- Jacobs NJ, Van Denmark PJ. Arch Biochem Biophys 1960;88:250-255.
- Koditschek LK, Umbreit WW. Alpha-glycerophosphate oxidase in streptococcus faecium F 24. J Bacteriol 1969;98:1063-1068.
- Trinder P. Ann Clin Biochem, 1969; 6:24-27.
- National Cholesterol Education Program Expert Panel. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285:2486-2497.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, AACC, 5th ed. AACC Press, 2000.
- Shepherd MD, Whiting MJ. Falsely low estimation of triglycerides in lipemic plasma by the enzymatic triglyceride method with modified Trinder's chromogen. Clin Chem 1990;36:325-329.

Fabricado e distribuído por: Olympus Diagnostica GmbH (Irish Branch), Lismeehan, O'Callaghan's Mills, Co. Clare, Ireland. Tel.: +353 65 6831100.

Fabricado para: Novada, Rua Santos Pousada, 562, 4430-287 Oliveira do Douro, Portugal.



## Anexo 4

**FOLHA DE INFORMAÇÃO AO PARTICIPANTE NO ESTUDO:**  
**“Efeito de um leite fermentado nos lípidos plasmáticos de indivíduos com os valores normais ou elevados de colesterol plasmático”**

Eu, Sara Isabel Oliveira de Castro e Andrade, nutricionista dos Centros de Saúde Dr. Rui Adriano Ferreira de Freitas, de Santo António, de São Roque e do Monte, a frequentar o 2º ano do Mestrado em Nutrição Clínica, pretendo realizar um trabalho de investigação que tem como objectivo conhecer o efeito de um leite fermentado nos níveis sanguíneos de colesterol.

**FUNDAMENTAÇÃO:** Os leites fermentados são considerados alimentos probióticos, o que significa que incorporam microorganismos vivos e que, quando consumidos em quantidades suficientes, produzem efeitos benéficos para a saúde e bem-estar, para além dos efeitos nutricionais habituais.

Vários estudos comprovam os benefícios dos leites fermentados, especialmente na função gastrointestinal. Acredita-se que estes alimentos possam ser utilizados na prevenção e tratamento de algumas doenças gastrointestinais, tais como, intolerância à lactose, gastroenterites, síndrome do cólon irritável, entre outras.

No entanto, o efeito nos níveis de colesterol sanguíneo não está comprovado, o que se deve, em parte, à pouca investigação que é feita nesta área. Os estudos mais recentes registam melhorias dos níveis desta gordura o que significa que estes alimentos poderão ter um papel na prevenção e tratamento das doenças cardíacas. Sendo estas doenças uma das principais causas de morte, estes alimentos poderão representar uma importante medida de promoção da saúde pública.

O produto que vai ser investigado neste trabalho é um leite fermentado (vulgarmente conhecido por iogurte) com dois tipos de bactérias pouco estudadas pela comunidade científica, mas de venda livre e já comercializado no mercado português.

Este trabalho de investigação tem como finalidade investigar o efeito deste produto nos níveis de colesterol e triglicéridos no sangue. Para tal, foi projectado um estudo experimental, que compreende as seguintes fases:

□ 1ª Fase:

Nesta fase é pedido ao participante do estudo para ir a uma consulta médica, na qual será avaliado o estado geral de saúde, medida a tensão arterial e feito o pedido de análises de urina e de sangue.

Será também efectuada uma consulta de nutrição, na qual o participante será pesado e avaliado através da bioimpedância (método para avaliar a quantidade de gordura e de massa isenta de gordura existente no organismo, através da passagem de corrente eléctrica de baixa intensidade; este método não provoca dor).

A colheita de urina e a 1ª colheita de sangue são feitas nesta 1ª fase.

□ 2ª Fase - Fase da intervenção:

Esta fase tem a duração de 9 semanas. Durante este período o participante deverá consumir diariamente 3 unidades de leite fermentado, de 125g cada, o que corresponde ao peso e tamanho do vulgar iogurte. Estas quantidades serão fornecidas pelo Centro de Saúde, o que significa que o participante não terá qualquer tipo de despesa.

Durante estas 9 semanas o participante deverá manter a sua alimentação habitual e será acompanhado numa consulta semanal de nutrição.

Ao fim de 4 semanas do início da 2ª fase, é feita a 2ª colheita de sangue.

□ 3ª Fase

É a última fase do estudo. Será feita uma última consulta de nutrição, na qual o participante será pesado e avaliado através da bioimpedância.

Nesta fase é feita a última colheita de sangue.

As colheitas de sangue e de urina feitas durante estas 3 fases, têm como objectivo avaliar o estado geral de saúde e determinar os valores de gordura (colesterol e triglicéridos) no sangue, para, no final, fazer a comparação dos respectivos valores e tirar a conclusão sobre o efeito do leite fermentado em estudo.

As consultas de nutrição e a consulta médica realizar-se-ão no Centro de Saúde da área de residência do participante. Este, será informado com antecedência das respectivas datas.

Os únicos desconfortos previstos para o participante serão as colheitas de urina (1) e de sangue (3) e a deslocação ao Centro de Saúde.

Os leites fermentados têm sido consumidos durante séculos sem registo de efeitos indesejáveis aparentes. Porém qualquer sintoma anormal de distensão abdominal, gases, náuseas ou diarreia, deverá ser imediatamente comunicado ao investigador.

Todos os dados fornecidos pelo participante são confidenciais, pelo que é garantido o anonimato.

A participação neste estudo é voluntária e o participante tem o direito de retirar o seu consentimento em qualquer altura do estudo, sem que, com isso, possa sofrer qualquer tipo de represália.

O participante poderá não obter benefícios directos ao participar neste estudo mas estará a contribuir para um conhecimento mais actualizado e correcto de um produto que poderá reduzir o colesterol no sangue e prevenir as principais causas de morte da nossa sociedade.

Informo que me comprometo a respeitar os princípios éticos de confidencialidade e integridade em todo o processo.

No caso de ser necessário poderá contactar-me para o domicílio profissional: Centro de Saúde Dr. Rui Adriano Ferreira de Freitas – tel.: 291764700; Centro de Saúde de Santo António – tel.:291742042; Centro de Saúde do Monte – tel.: 291784880; Centro de Saúde de São Roque – tel.: 291705410.

Se decidir participar, agradeço antecipadamente a sua colaboração, apresentando os melhores cumprimentos.

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

A Nutricionista

---

(Sara Andrade)

## Anexo 5



REGIÃO AUTÓNOMA DA MADEIRA  
SERVIÇO REGIONAL DE SAÚDE, E.P.E.

Exma. Senhora  
Sara Isabel Oliveira de Castro e Andrade  
Centros de Saúde da Zona Urbana II -  
Centro de Saúde da Nazaré  
Av. do Colégio Militar  
9000-135 FUNCHAL

Serviço Regional de Saúde, E.P.E

**SAÍDA**

S.0409981 / 5 2004/08/06

Sua referência                      Sua comunicação                      N/Ofício  
Assunto: **Pedido de autorização para a realização de um estudo**

Relativamente a V/carta, de 29/04/2004, para a realização de estudo intitulado "Efeito de um produto lácteo fermentado com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* nos lípidos plasmáticos de homens e mulheres com valores normais ou ligeiramente aumentados de colesterol plasmático", estudo este que será a sua Tese de Mestrado em Nutrição Clínica, informo V. Ex<sup>a</sup>. de que o mesmo foi autorizado nos termos do Parecer da Comissão de Ética n.º 27 de 04/08/2004, que abaixo transcrevemos:

"A CES/HCF (composta por: Dr. Edward Richard Rushworth Maul, Médico e Presidente; Dr. Silvío José Teixeira Sousa, Jurista; Dr. Ricardo Jorge Figueira Silva Santos, Médico; Dr. Carlos Miguel Pestana, Médico; Dra. Inês Porto Ribeiro, Farmacêutica; Isabel Maria dos Santos Carvalho Gomes da Silva, Enfermeira e José Manuel de Freitas, Teólogo ) na sua reunião de 30 de Julho de 2004, decidiu por unanimidade dar parecer favorável ao pedido acima identificado, por não levantar qualquer problema de ordem ética".

Com os meus cumprimentos,

O Vogal do Conselho de Administração

José Carlos da Costa Perdigão

F.A.

## Anexo 6

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO NO  
TRABALHO DE INVESTIGAÇÃO

“Efeito de um leite fermentado nos lípidos plasmáticos de indivíduos com os valores normais ou elevados de colesterol plasmático”

A natureza e a proposta de participação no trabalho de investigação foram-me explicadas. Tive oportunidade de fazer perguntas que me foram respondidas. Compreendo que posso retirar este consentimento em qualquer altura.

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

O participante

\_\_\_\_\_

Assinatura:  participante;  pais;  representante legal;  outro \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Se não for o participante:

Nome: \_\_\_\_\_ Grau de parentesco \_\_\_\_\_

BI: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Arquivo de Identificação de : \_\_\_\_\_

Morada: \_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----

Confirmo que expliquei ao  participante;  pais;  representante legal;  outro \_\_\_\_\_, de forma adequada e inteligível sobre: avaliação antropométrica, avaliação da composição corporal por bioimpedância, avaliação da ingestão alimentar e monitorização dos níveis sanguíneos de colesterol.

Ciente das implicações éticas inerentes ao desenvolvimento deste estudo experimental, comprometo-me a assegurar o consentimento do participante e o seu direito de recusa, privacidade e anonimato.

Todas as questões foram respondidas e o doente concordou em participar.

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

A Nutricionista

\_\_\_\_\_

100720

LWS