

**PROBIÓTICO ATENUA EFEITOS TÓXICOS DO DICROMATO DE
POTÁSSIO EM RATOS**

SORAIA YOUNAN

**PROBIÓTICO ATENUA EFEITOS TÓXICOS DO DICROMATO DE
POTÁSSIO EM RATOS**

SORAIA YOUNAN

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

636.085 2 Younan, Soraia

Y69p

Probiótico atenua efeitos tóxicos do dicromato de potássio em ratos / Soraia Younan. -- Presidente Prudente, 2013. 75 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste: Presidente Prudente, SP, 2013. Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto.

1. Alimentos funcionais. 2. Crômio VI. 3. Desempenho nutricional. 4. Intoxicação. 5. Parâmetros bioquímicos. I. Título.

SORAIA YOUNAN

**PROBIÓTICO ATENUA EFEITOS TÓXICOS DO DICROMATO DE
POTÁSSIO EM RATOS**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 18 de Outubro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Orientador Prof. Dr. Hermann Bremer Neto
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho
Universidade Estadual Paulista – UNESP
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Caliê Castilho
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

DEDICATORIAS

Aos

*Meus filhos João Gabriel e Maria Gabriela e sobrinho Pedro Lucas,
que me deram carinho e amor e compreenderam minha ausência.*

Aos

*Meus pais Elizabeth e Sarkis Younan,
que não me deixaram desistir e sempre me motivaram e apoiaram.*

Ao

*Meu avô José Rodrigues de Lima,
que lá do céu olha por mim.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Hermann Bremer Neto, que esteve ao meu lado nas piores e melhores horas, me estimulou a nunca desistir, chorou e sorriu comigo e ouviu meus desabafos. Orientador que posso designar como um irmão que DEUS me deu de presente. Agradeço a ti Professor pelo grande homem, mestre e sábio e podendo falar, com certeza, que sem você eu não terminaria o meu mestrado. Fica aqui minha gratidão eterna e a formação de uma grande amizade.

Ao meu amigo Gabriel Zanuto Sakita, pessoa de grande valor e inteligência, que dia após dia esteve trabalhando ao meu lado. A você minha eterna amizade.

Aos meus filhos Biel e Bibi e sobrinho Ti que entenderam o meu desafio.

À minha mãe Elizabeth que não me deixou desistir.

Ao meu pai Sarkis que na sua simplicidade se orgulha por mais uma etapa na minha vida.

Aos meus irmãos Sara, Samira e Youssef pelo apoio e companheirismo.

Aos meus cunhados, Jefferson e Rodrigo, que colaboraram e me apoiaram.

Ao senhor Laércio Ferreira Coutinho, caro amigo, que colaborou com nosso experimento.

Aos Funcionários do Laboratório e Biotérios e em especial Sandra, Fátima, Willian, Graziela e Lucas que me acompanharam em todo o projeto.

Aos alunos de graduação da Medicina Marcelo Wainer Motta Abdelnour e Karen Cristine da Silva, pela colaboração em meu experimento.

À Professora Doutora Caliê Castilho pela amizade e ensinamentos.

Aos Professores Doutores da UNESP, José Carlos Silva Camargo Filho e Roselene Rergueiro Lorençoni pela amizade, carinho e apoio prestado.

À minhas amigas Andréa Deschauer Graça, Cláudia Georgette, Claudia Sapia, Fauca Lemos, Maria Clara Pelim Almeida, Marluy Nogueira, pela força e amizade.

À Universidade do Oeste Paulista a aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, pelos anos fecundos.

A todos aqueles que indiretamente me auxiliaram neste trabalho.

A todos o meu muito Obrigado.

*“Eu só posso estar na vida do outro para fazer o bem, para acrescentar,
caso contrário, eu sou completamente dispensável.”*

Padre Fabio de Melo

RESUMO

Probiótico atenua os efeitos tóxicos do dicromato de potássio em ratos

O crômio (Cr) é um elemento relativamente comum e ocupa a 21^a posição no índice de elementos que ocorrem mais comumente na crosta terrestre, ocorrendo na natureza em várias combinações com outras substâncias, podendo apresentar-se na forma de íons com valência 0, +2, +3 ou +6. O Cr +3 (III) é considerado um elemento essencial para o metabolismo humano e animal em pequenas quantidades, inerte e não instável no ambiente, enquanto que o Cr +6 (VI) é muito instável, tóxico e carcinogênico para uma grande variedade de organismos e ocupacionalm e contaminante da água e alimentos. Estima-se que dezenas de milhares de pessoas estão expostas ao crômio VI em todo o mundo, provocando efeitos tóxicos através da indução de radicais livres pela redução do crômio, na presença de redutores celulares e a interação dos radicais livres com as proteínas da membrana e intracelulares, modificando os processos de reabsorção e secreção de diferentes substâncias. Alguns microorganismos vivos, denominados de probióticos, mostraram atividade antioxidante e captadora de radicais livres, o que pode minimizar ou impedir o efeito tóxico de contaminantes, pelo seu efeito benéfico sobre a saúde humana. O termo probiótico é de origem grega e significa “para a vida” sendo definidos como “microorganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios a saúde do hospedeiro”, além de atuar na prevenção de câncer, na modulação de reações alérgicas, na melhoria da saúde e nos níveis sanguíneos de lipídeos. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar diferentes doses de dicromato de potássio, com ou sem probiótico, sobre os parâmetros: desempenho nutricional e perfis glicêmico, lipídico, renal e hepático em ratos Wistar.

Palavras chave: Alimentos funcionais; Crômio VI; Desempenho nutricional; Intoxicação; Parâmetros bioquímicos.

ABSTRACT

Probiotic attenuates the toxic effects of potassium dichromate in rats

Chromium (Cr) is a relatively common element and occupies the 21st position in the index most commonly occurring elements in the earth's crust, occurring in nature in various combinations with other substances, may be in the form of ions with valence 0 + 2, +3 or +6. The Cr +3 (III) is considered an essential element for human and animal metabolism in small quantities, inert and stable in the environment, while the +6 Cr (VI) is very unstable, toxic and carcinogenic to a wide variety of occupational and contaminant organisms and water and food. It is estimated that tens of thousands of people are exposed to chromium VI worldwide, leading to toxic effects by inducing free radicals by the reduction of chromium in the presence of cellular reductants and interaction between free radicals and membrane proteins and intracellular modifying the processes of absorption and secretion of various substances. Some live microorganisms, called probiotics, showed antioxidant activity and scavenging of free radicals, which can minimize or prevent the toxic effect of contaminants, for their beneficial effect on human and animal health. The term probiotic is of Greek origin and means "for life" being defined as "live microorganisms administered in adequate amounts, confer health benefits to the host", besides acting in the prevention of cancer in the modulation of allergic reactions in improving health and blood lipid levels. Thus, the aim of this study was to evaluate different doses of potassium dichromate, with or without probiotic on the parameters: nutritional performance and glycemic, lipid, renal and hepatic profiles in Wistar rats.

Key- words: Chromium VI; Intoxication; Functional foods; Serum parameters; nutritional parameters.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2 OBJETIVOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Crômio.....	15
3.1.1 Características físico-químicas.....	15
3.1.2 Produção e obtenção	15
3.1.3 Uso do produto.....	16
3.1.4 Principais tipos de exposição ocupacionais	16
3.1.5 As concentrações de crômio na natureza	17
3.1.6 No homem e animais.....	17
3.1.7 Toxicinética	20
3.1.8 Forma de atuação e danos à saúde causados por cromato.....	21
3.2 Alimentos Funcionais e Probióticos.....	22
3.2.1 Mecanismos de ação.....	24
3.2.1.1 Exclusão competitiva.....	26
3.2.1.2 Antagonismo direto.....	27
3.2.1.3 Estimulo ao sistema imune.....	28
3.2.1.4 Propriedade anticarcinogênicas	29
3.2.1.5 Neutralização de enterotoxinas	30
3.2.2 Vantagens e limitações	31
REFERÊNCIAS	34
4 ARTIGO CIENTÍFICO	46
ANEXO A - Aprovação do Trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)	69
ANEXO B – Normas de Publicação da Revista Científica a Qual o Artigo Será Submetido	70

1 INTRODUÇÃO

O cromo é um elemento relativamente comum e ocupa a 21ª posição no índice de elementos que ocorrem mais comumente na crosta terrestre (CHWASTOWSKA et al., 2005), podendo ser liberado para o meio ambiente a partir de fontes antropogênicas, pois é amplamente utilizado em processos de fabricação, como curtumes, produção de aço e placas, controle de corrosão, cromato e produção de pigmentos (BARTYZEL; CUKROWSKA, 2011).

Na natureza, o cromo, ocorre em várias combinações com outras substâncias e pode apresentar-se na forma de íons com valência +2, +3 ou +6. Na valência +3, este mineral é considerado um elemento essencial para o metabolismo humano em pequenas quantidades, inerte e não instável no ambiente, enquanto que o Cr^{+6} é muito instável, tóxico e carcinogênico para uma grande variedade de organismos (STASINAKIS THOMAIDIS; LEKKAS, 2003; BREMER NETO, et al., 2005; MUNIZ, OLIVEIRA-FILHO, 2006) e é também um agente oxidante potente e forte irritante do tecido da mucosa, incluindo efeito de acidose metabólica, necrose tubular aguda, insuficiência renal e podendo causar a morte de humanos e animais (SARYAN, REEDY, 1988). Estima-se que dezenas de milhares de pessoas estão expostas ao Cr^{+6} em todo mundo (MARTINEZ-ZAMUDIO; HA, 2011).

Os efeitos tóxicos dos metais pesados e dos compostos de metais são determinados pelo índice de exposição e o alcance com que os metais ou compostos se convertem em uma forma biodisponível, pois os íons livres do metal podem se ligar com a matéria orgânica, reduzindo à quantidade que está biodisponível (MUNIZ; OLIVEIRA-FILHO, 2006).

Estudo realizado demonstrou que doses acima de 10 mg.kg^{-1} de Cr^{+6} na ração de animais afetou o trato gastrointestinal, os rins e o sistema hematológico, além disso, há evidências suficientes de que determinados compostos hexavalentes desse mineral tem efeitos crônicos e carcinogênicos no pulmão, no fígado, nos rins, no trato gastrointestinal e no sistema circulatório (THE INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1988).

Estudos clínicos e epidemiológicos em humanos adultos evidenciaram que a dose oral letal foi de 50 a 70 mg.kg^{-1} de peso corpóreo para Cr^{+6} e as características clínicas mais importantes produzidas depois da entrada por via oral

foram necrose do fígado e dos rins, e contaminação de órgãos vitais, como o coração (MUNIZ, OLIVEIRA-FILHO, 2006).

Referente à forma como atua o Cr^{+6} , este se acumula no túbulo proximal e é nesse local onde provoca o maior efeito tóxico, através da indução de radicais livres pela redução do crômio, na presença de redutores celulares (DARTSCH et al., 1998; SUGIYAMA, 1991) e a interação dos radicais livres com as proteínas da membrana e intracelulares, modificando os processos de reabsorção e secreção de diferentes substâncias nos túbulos renais (KIRSCHBAUM; SPRINKEL; OKEN, 1981).

Alguns microrganismos vivos, definidos como probiótico, mostraram atividade captadora de radicais livres (GETOFF, 2007) e antioxidante (SINGH; GUPTA; GUPTA, 2007), o que pode minimizar ou impedir o efeito tóxico de contaminantes, pelo seu efeito benéfico sobre a saúde humana e dos animais (SALMINEN et al., 1998).

Esses suplementos microbianos, probióticos, introduzidos em quantidades suficientes por via oral, podem beneficiar os seres humanos pelos seus efeitos no trato intestinal (FULLER, 1989; DIMER; GIBSON, 1998; LEE; SALMINEN, 1995) e através de três possíveis mecanismos de atuação, sendo o primeiro deles a supressão do número de células viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos. O espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (SAAD, 2006).

A evolução dos conhecimentos sobre o papel dos componentes fisiologicamente ativos dos alimentos, de fontes vegetais e animais tem mudado o entendimento do papel da dieta sobre a saúde (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2004) e este fato tem aumentado o interesse mundial para melhorar a qualidade da nutrição e reduzir os gastos com saúde animal e humana por meio da prevenção e tratamento de doenças agudas e crônicas, na regulação da microbiota intestinal, como imunomoduladores, inibição da carcinogênese, da melhoria da

qualidade e da expectativa de vida ativa (COPPOLA; GIL TURNES, 2004; STRINGHETA; OLIVEIRA; GOMES, 2007).

Para a avaliação do risco toxicológico em humanos, alguns parâmetros bioquímicos sanguíneos dos animais, como modelo experimental, podem ser utilizados, uma vez que mudanças no sistema hematológico deles podem ter um maior valor preditivo (RAZA et al., 2002; HAYES, 2007).

2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar diferentes doses de dicromato de potássio, com ou sem probiótico, sobre os parâmetros: desempenho nutricional e perfis glicêmico, lipídico, renal e hepático em ratos Wistar.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Crômio

3.1.1 Características físico-químicas

O elemento crômio foi descoberto pela primeira vez e caracterizado pelo químico Frances Nicolas Louis Vauquelin no minério de chumbo vermelho da Sibéria em 1797 (KATZ; SALEM, 1993; COSTA; KLEIN, 2008).

O crômio é um metal branco com massa atômica igual a 51,996 g.mol⁻¹, com ponto de fusão igual a 1.857°C e ponto de ebulição igual a 2.672°C. Os estados de oxidação mais comuns desse mineral são: +2, +3,+6 e as formas mais estáveis são as trivalente e hexavalente, além da elementar (PECHOVA; PAVLATA, 2007).

É um metal de transição, de símbolo Cr, pertencente ao grupo 6B da tabela periódica (SCHAEFER, 2008) e é o 21º metal mais abundante na crosta terrestre, não sendo encontrado livre na natureza, mas combinado a outros elementos, principalmente ao oxigênio (SCHIRMER et al., 2009). Sendo obtido do mineral cromita (FeOCr₂O₃), pode ser encontrado em solos, água, rochas, fauna, flora e até mesmo na poeira vulcânica (BARCELOUX, 1999).

Na forma de dicromato de potássio tem aparência de cristais laranja avermelhados brilhantes apresentando peso molecular de 294.185 g/mol, ponto de fusão a 398°C, ponto de ebulição de 500°C, densidade (g/cm³) de 2.676, insolúvel em álcool e solubilidade em água de 15,1 g/100 g de H₂O a 25°C (HARMEL, 2004; LEWIS, 2007; LIDE, 1998).

3.1.2 Produção e obtenção

Em relação à facilidade de se encontrar o crômio em diferentes valências, a forma trivalente (Cr⁺³) é natural no meio ambiente, enquanto a hexavalente (Cr⁺⁶) e a valência zero (Cr⁰) são produzidas por processos industriais, principalmente na fabricação de ligas metálicas (SCHIRMER et al., 2009).

A partir desse minério, através de diferentes reações químicas são obtidos os principais produtos de crômio (sais, óxido, metal e ligas) (STERN, 1982) e

o Cr^{+6} é tipicamente presente em complexo com sal halóide (cloreto de cromilo) e com oxigênio (trióxido de crômio, cromato e dicromato) (ZHITKOVICH, 2005).

Reações de oxidação e redução podem converter Cr^{+3} para Cr^{+6} e vice-versa. Esses processos dependem do pH, da concentração de oxigênio, da presença de redutores apropriados e de mediadores que podem atuar como ligantes ou catalisadores (KOTÁS; STASICKA, 2000).

O Cromato de sódio, dicromato de sódio e o óxido de crômio (VI) são obtidos diretamente do mineral cromita através de um processo de torrefação alcalino oxidativo (PAGE; LOAR, 2004; ANGER et al., 2005). Os compostos de crômio hexavalente são classificados como agentes oxidantes (COTTON et al., 1999; ANGER et al., 2005). O óxido de crômio (VI) e o dicromato de amônia podem reagir explosivamente quando colocados em contato com materiais orgânicos (O'NEIL et al., 2006; LEWIS, 2007).

3.1.3 Uso do produto

Os principais usos dos compostos de crômio hexavalente incluem metalização, fabricação de pigmentos e corantes, inibidores de corrosão, síntese química, produção de refratários, curtimento de couro e no tratamento da madeira (PAGE; LOAR, 2004; SHANKER et al., 2005; BLADE et al., 2007), assim como na fabricação de ligas como o aço inoxidável e soldagem de fitas magnéticas (GÓMEZ; CALLAO, 2006).

Este elemento é usado em indústrias de galvanoplastia, na fabricação de ligas como o aço inoxidável, em indústrias de corantes e tintas, de curtimento de couro, no tratamento da madeira, soldagem produção de fitas magnéticas, entre outros (GÓMEZ; CALLAO, 2006).

3.1.4 Principais tipos de exposição ocupacionais

Vários são os tipos de exposição ocupacionais ao crômio, através de poeiras (cimento, tintas, coloração de borrachas, cromatos e pigmentos), fumos metálicos (fabricação de ligas e soldagem), ao ácido crômico (cromação e cromatização de metais) e vapor e solução aquosa (curtição) (SINGH; GUPTA; GUPTA, 2007).

3.1.5 As concentrações de crômio na natureza

No ar atmosférico as concentrações de crômio encontradas estão entre 0,002 e 0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$, na água do mar as concentrações encontradas foram menores que 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e nas águas de rios as concentrações estão entre 1 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo que o nível permitido em água potável é de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. No solo, o crômio é encontrado como óxido de crômio, em concentração que varia do nível de traços até 250 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. O teor máximo permitido pela legislação brasileira é de 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para Cr^{+3} e 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para Cr^{+6} (GALVÃO; COREY, 1987).

No ambiente aquático o crômio existe nos estados trivalente (Cr^{+3}) e hexavalente (Cr^{+6}) e exibe diferentes propriedades químicas que estão relacionadas ao seu estado de oxidação (ANDERSON, 1998), além disso, somente essas duas formas são suficientemente estáveis para ocorrer no ambiente (EMSLEY, 1989).

3.1.6 No homem e animais

A possibilidade de considerar o crômio como um mineral essencial à nutrição de organismos vivos se iniciou em 1954, quando foi demonstrado que a síntese de colesterol e ácidos graxos em células de ratos era maior na presença de íons de crômio (UNDERWOOD, 1971).

Foram reportados efeitos do crômio sobre a insulina, demonstrando que esse mineral potencializa sua ação, induzindo uma melhor resposta dos animais em relação ao metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos (PAGE et al 1993; SHIAU; CHEN, 1993; UYANIK; ATASSEVER; OSDAMAR, 2002; DEBSKI et al., 2004; KUÇUKBAY et al., 2006).

Mertz (1969) constata como o crômio é um elemento essencial ao homem, sendo um micronutriente, que atua no metabolismo da glicose, do colesterol e dos ácidos graxos.

Porém, relatos de diversos estudos foram publicados sobre sinais clínicos e sintomas em indivíduos que tiveram ingestão acidental ou intencional aguda de altas doses de compostos de crômio hexavalente, incluindo ácido crômico (FRISTEDT et al., 1965; SARYAN; REEDY, 1988; LOUBIERES et al., 1999), dicromato de potássio (GOLDMAN; KAROTKIN, 1935; PARTINGTON, 1950;

KAUFMAN; DINICOLA; McINTOSH, 1970; SHARMA; SINGHAL; CHUGH, 1978; ISERSON et al., 1983; CLOCHESY, 1984; HANTSON et al., 2005) e dicromato de amônia (REICHELDERFER, 1968; HASAN, 2007). Apresentações clínicas de pacientes após a exposição aguda a altas doses foi similar, independentemente da espécie de composto de cromo hexavalente ingerido, sendo os sintomas descritos: dor abdominal, náusea, vômitos; hematêmese e diarreia com presença de sangue; queimaduras causticas da boca, faringe, esôfago, estômago e duodeno e hemorragia do trato gastrointestinal; anemia, redução da hemoglobina sanguínea, eritrócitos anormais e hemólise intravascular; toxicidade hepática (hepatomegalia, icterícia, bilirrubina sanguínea elevada e atividade das enzimas hepáticas); falência renal (oligúria e anúria); cianose, acidose metabólica, hipotensão e choque. Achados de biópsias de tecidos incluíram degeneração e necrose da gordura hepática e degeneração e necrose dos túbulos renais (REICHELDERFER, 1968; KAUFMAN; DINICOLA; McINTOSH, 1970; SHARMA; SINGHAL; CHUGH, 1978; LOUBIERES et al., 1999).

Baseado na estimativa da quantidade de cromo hexavalente ingerido, o intervalo de doses letais por cromo hexavalente em humanos e de aproximadamente 4,1 a 357 mg de cromo hexavalente/kg de peso (KAUFMAN; DINICOLA; McINTOSH, 1970; ISERSON et al., 1983; CLOCHESY, 1984; SARYAN; REEDY, 1988; LOUBIERES et al., 1999).

Estudos epidemiológicos em populações que residem perto de fontes de resíduos industriais que contenham compostos de cromo hexavalente e são desconhecidamente consumidas através da água de bebida fornecem alguma evidencia de possível associação entre a exposição oral do cromo hexavalente e o câncer (ZHANG; LI, 1987, 1997; BEDNAR; KIES, 1991; EIZAGUIRRE-GARCIA et al., 1999, 2000; FRYZEK et al., 2001; BEAUMONT et al., 2008; KERGER, 2009).

Evidencias de carcinogenicidade em animais foram fornecidas pela National Toxicology Program (2008) em bioensaios conduzidos em ratos e hamsters. Nesse estudo, ratos foram expostos ao dicromato de sódio hidratado na água de bebida por 2 anos, os resultados demonstraram aumento estatisticamente significativo na incidência de papiloma epitelial escamoso e carcinomas da mucosa oral e da língua nos níveis mais altos de exposição (dose média diária de 5,9 e 7,0 mg de cromo hexavalente/kg dia em machos e fêmeas, respectivamente).

National Toxicology Program (2008) também expuseram hamsters ao dicromato de sódio hidratado na água de bebida por 2 anos e observaram aumento estatisticamente significativo na incidência de adenomas e carcinomas no intestino delgado de machos e fêmeas nas doses de $\geq 2,4$ e $\geq 3,1$ mg de crômio hexavalente/kg dia, respectivamente.

Estudos realizados em animais evidenciam que a exposição oral aos compostos de crômio hexavalente produzem efeitos sobre o sistema reprodutivo, incluindo mudanças histopatológicas em órgãos reprodutivos de machos (ZAHID et al., 1990; CHOWDHURY; MITRA, 1995; LI et al., 2001; ARULDHAS et al., 2004, 2005, 2006) e de fêmeas (MURTHY; JUNAID; SAXENA, 1996); alterações espermáticas, incluindo redução na contagem, motilidade e morfologia anormal (ZAHID et al., 1990; SUBRAMANIAN et al., 2006); redução dos níveis de plasma seminal (CHOWDHURY; MITRA, 1995); aumento da duração do ciclo estral (MURTHY; JUNAID; SAXENA, 1996; KANOJIA; JUNAID; MURTHY, 1996, 1998); mudanças no comportamento de acasalamento e redução na fertilidade em machos (BATAINEH et al., 1997).

Efeitos adversos foram observados sobre os tecidos reprodutivos de coelhos machos expostos ao dicromato de potássio por 10 semanas (YOUSEF et al., 2006). Os coelhos receberam doses diárias de 0 e 5 mg de dicromato de potássio/kg por gavagem. Esses pesquisadores relataram que a dose de 5 mg de dicromato de potássio/kg dia equivale a 3,6 mg de crômio hexavalente/kg dia.

Ganho de peso, consumo de ração, pH seminal, contagem espermática, motilidade e morfologia foram analisados semanalmente. Análises de testosterona foi avaliada a cada 2 semanas. No final do experimento, os animais foram sacrificados para colheita dos testículos e do epidídimo para determinar o peso dos mesmos. Foi realizado a colheita do plasma seminal para análise da AST, ALT, Ap, AcP e GST.

Como resultados, esses pesquisados observaram que o peso corporal do grupo que recebeu o dicromato de potássio diminuiu 9% quando comparado com o grupo controle, apesar do consumo médio de ração não ter diferença entre os grupos durante as 10 semanas de tratamento. Além disso, os pesos dos testículos e dos epidídimos tiveram uma redução de 22% no grupo tratado. Os níveis de testosterona no plasma dos animais tratados diminuíram em 21% e as características espermáticas foram reduzidas significativamente ($p < 0,05$). Porém

não foi observada diferença significativa no volume de sêmen ejaculado. A atividade dos fluidos seminais (GST, AST e AcP) foram significativamente reduzida no final do período experimental.

3.1.7 Toxicinética

Enquanto o cromo trivalente é um micronutriente essencial, associado ao metabolismo de glicose, lipídios e proteínas, e cuja ausência está relacionada à diabetes e doenças cardiovasculares, o Cr^{+6} é considerado perigoso para a saúde pública devido às suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas, sendo $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ a concentração máxima permitida em águas destinadas ao consumo humano (ANDERSON, 1998; SHRIVASTAVA et al., 2002; BASHA; MURTHY; JHA, 2008; MORENO et al., 2009; MALKOC; NUHOGLU, 2007).

Todos os metais e seus compostos possuem toxicidade, ou seja, a capacidade inerente que um elemento químico tem para causar efeitos adversos sobre os organismos vivos. O fator-chave é o grau de exposição que afeta o organismo e está relacionada tanto com a quantidade envolvida como com o tempo de exposição (GOYER, 1996).

Os efeitos tóxicos dos metais pesados (cromo) e dos compostos de metais são determinados pelo índice e o alcance com que os metais ou compostos se convertem em uma forma biodisponível. Os íons livres do metal podem ligar-se com a matéria orgânica, reduzindo à quantidade que está biodisponível (MUNIZ; OLIVEIRA-FILHO, 2006).

Em solução aquosa, Cr^{+6} existe principalmente nas formas de cromato (CrO_4^{2-}), dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) e cromato de hidrogênio (HCrO_4^-). Em soluções básicas ocorre a predominância da espécie CrO_4^{2-} e em soluções extremamente ácidas com valores de pH compreendida entre 2 e 6, predominam as espécies HCrO_4^- e $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (OWLAD; AROUA; DAUD, 2010).

Um parâmetro importante em toxicologia é a chamada dose letal 50 (DL50), definida como a quantidade de uma substância química que, quando administrada em uma única dose por via oral, expressa em massa da substância por massa de animal (os mais usados são ratos, camundongos, coelhos, peixes e diversas espécies de macacos), produz a morte de 50% dos mesmos dentro de um período de observação de 14 dias. Conforme os níveis diferenciados de DL50

[Dicromato de Potássio - DL50 = 25 mg.kg⁻¹ (rato, via oral)] as substâncias químicas recebem diferentes classificações quanto ao seu nível de toxicidade, sendo os mais tóxicos o do Grupo I (CHEMDAT, 2005).

3.1.8 Forma de atuação e danos à saúde causados por cromato

Como exemplo da forma hexavalente, o dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) é a forma mais tóxica, sendo rapidamente absorvida pelas células vivas e que ingerida em altas doses pode causar irritações na mucosa gastrointestinal, câncer no trato intestinal, necroses de fígado, nefrite e morte em homens e animais, sendo que os seus efeitos dependerão da dose, da via e do tempo de exposição (CHEMDAT, 2005).

Evidências epidemiológicas sobre a carcinogenicidade dos cromatos em organismos expostos (DE FLORA et al., 1990), tem contribuído para catalogar o dicromato de potássio dentro do Grupo I dos carcinogênicos humanos e como extremamente tóxico (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1990).

Estudo realizado com este elemento mostrou que doses acima de 10 mg.kg⁻¹ de Cr⁶⁺ na ração afetaram o trato gastrointestinal, os rins e o sistema hematológico, além disso, há evidências suficientes de que determinados compostos hexavalentes de cromo são carcinogênicos para animais experimentais e os efeitos crônicos da exposição ao cromo ocorrem no pulmão, no fígado, nos rins, no trato gastrointestinal e no sistema circulatório (THE INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1988).

Algumas investigações *in vitro* e em humanos sobre o Cr(VI) induzir a metilação do DNA foram realizados até agora. Foi relatado que a exposição ao dicromato de potássio foi capaz de induzir a metilação do promotor transgene *gpt* nas células G12 de hamster Chineses (KLEIN et al., 2002).

Um estudo sobre genética e alterações na metilação do DNA de plantas da espécie *Brassica napus* L. mostraram que o dicromato de potássio induz a uma hipermetilação do DNA do genoma na sequencia CCGG e que o efeito foi dose dependente (LABRA et al., 2004). Entretanto, a metilação do gene p16 tem sido frequentemente encontrado em cânceres de pulmão por cromato (KONDO et al., 2006; ALI et al., 2011).

Mais interessantemente, Kondo et al., 2006 descobriram que mais de 80% dos cânceres de pulmão por cromato mostraram repressão da proteína p16. Portanto, foi sugerido que a metilação da p16 está estreitamente associado com o câncer de pulmão por cromato, mas a pergunta é se a metilação da p16 é causada pelo câncer de pulmão por cromato ou se é apenas uma consequência do câncer?

A p16 está localizada no braço do cromossomo 9p e é um gene supressor tumoral. A produção do gene p16 é um inibidor do CDK 4/6, que fosforila resíduos de serina/treonina dos supressores tumorais retinoblasticos (LABRA et al., 2004) e desempenha um importante papel na inibição na progressão do ciclo celular (KONDO et al., 2006; CHIU et al., 2010).

Estudos clínicos e epidemiológicos em humanos adultos evidenciaram que a dose oral letal foi de 50 a 70 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo para cromatos e as características clínicas mais importantes produzidas foram necrose do fígado e dos rins, e contaminação de órgãos vitais, como o coração (MUNIZ, OLIVEIRA-FILHO, 2006).

Referente à forma como atua o crômio, este se acumula no túbulo proximal e é nesse local onde provoca o maior efeito tóxico. O mecanismo de toxicidade se dá através indução de radicais livres pela redução do crômio, na presença de redutores celulares (DARTSCH et al., 1998; SUGIYAMA, 1991), a interação dos radicais livres com as proteínas da membrana e intracelulares, modificando os processos de reabsorção e secreção de diferentes substâncias nos túbulos renais (KIRSCHBAUM; SPRINKEL; OKEN, 1981).

3.2 Alimentos Funcionais e Probióticos

A incidência de câncer e outras enfermidades podem ser minimizadas por meio de bons hábitos alimentares (MORAES; COLLA, 2006), sendo que em meados dos anos 80 surgiu no Japão o termo “alimentos funcionais”, como resultado dos esforços para desenvolver alimentos que possibilitassem a redução dos gastos com saúde pública, considerando a elevada expectativa de vida naquele país (ARAYA; LUTZ, 2003).

Alimentos funcionais também são conhecidos por outros nomes, como nutracêuticos, alimentos terapêuticos e alimentos medicinais e que podem conter um

ou até mesmo uma combinação de componentes que dão desejáveis efeitos fisiológicos no corpo humano (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007).

Uma classe importante de alimentos funcionais são os probióticos, sendo que nos últimos anos o interesse pelo consumo e investigação dos probióticos aumentou substancialmente, acompanhado por uma crescente evidencia clinica e objetivando suportar alguns dos benefícios atribuídos ao uso destes agentes. O seu amplo consumo e potencial terapêutico têm uma longa história sustentada por dados científicos suficientemente sólidos, mas que não evitaram serem vistos durante muito tempo como alternativas terapêuticas e usados no anedotário científico (MATOS; MONTEIRO, 2010).

As bactérias probióticas estão sendo cada vez mais utilizadas no tratamento e prevenção de uma grande variedade de doenças em humanos, como síndromes e diarreias associadas com antibióticos (D'SOUZA et al., 2002; BORODY et al., 2004) e doenças inflamatórias intestinais que ocorrem como consequência de tratamento cirúrgico (GUARNER et al., 2008).

Estudos indicam, também, que a suplementação com probióticos pode exercer uma grande variedade de efeitos benéficos sobre os humanos com respeito à redução de infecções e doenças sazonais e na atenuação dos sintomas e duração das doenças (MORIMOTO et al., 2005; RAO et al., 2009; OELSCHLAEGER, 2010).

O termo probiótico é de origem grega e significa “para a vida” (STEFE; ALVES; RIBEIRO, 2008) sendo definidos como “microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios a saúde do hospedeiro” (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2001; SANDERS, 2003).

Pode-se dizer que a história dos probióticos iniciou-se a mais de 10.000 anos quando eram utilizados para preservação de alimentos. Além disso, médicos do Oriente Médio descreviam formas de leite fermentado, tal como iogurte, para cura de desarranjos estomacais e intestinais. Porém, somente no início do século passou a ser estudado de forma mais racional (GHADBAN, 2002).

Em 1907, um pesquisador russo chamado Elie Metchnikoff, professor do Instituto Pasteur em Paris, demonstrou que a ingestão de leite fermentado melhorava a saúde humana após observar a longevidade de camponeses búlgaros que consumiam basicamente este tipo de alimento (TOURNUT, 1998). Metchnikoff realizou experimento utilizando um microrganismo isolado do leite fermentado

consumido nesta região, o qual denominou de *Bacillus bulgaricus* e que, atualmente é conhecido como *Lactobacillus bulgaricus* (BIOTECNAL, 1999).

A partir daí muitos estudos começaram a ser realizados estudos com o intuito de explicar os efeitos benéficos oriundos da ingestão de produtos fermentados (BUTOLO, 1999), e em 1965, Lilly e Stillwell definiram probióticos como “substâncias secretadas por um microrganismo que estimulam o crescimento de outro”, se contrapondo ao termo antibiótico. Na década de 70, o *Lactobacillus acidophilus* começou a ser utilizado na alimentação animal como uma substância probiótica (GIL DE LOS SANTOS; GIL-TURNES, 2005).

Os microrganismos utilizados como probióticos são usualmente componentes não patogênicos da microbiota intestinal normal, tais como as bactérias ácido lácticas (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*), bactérias do gênero *Bifidobacterium* e leveduras como a *Saccharomyces*. Assim, dentre os probióticos mais utilizados na alimentação humana e animal estão às bactérias ácido lácticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e também, uma levedura não patogênica, a *Saccharomyces* (WILLIAMS, 2010).

Na medicina humana, os probióticos são usados na prevenção e tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo gastrointestinal, como imunomoduladores e também na inibição da carcinogênese (COPPOLA; GIL-TURNES, 2004). Na nutrição animal, os probióticos começaram a ser estudados e posteriormente utilizados como promotores de crescimento devido à grande necessidade de substituição dos antibióticos, pois estes antimicrobianos estão sendo cada vez mais questionados por vários países pela possibilidade de serem tóxicos e/ou carcinogênicos, prejudicando a saúde humana quando seus resíduos estiverem presentes nos produtos de origem animal e também, por ocasionarem problemas de resistência bacteriana tanto nos animais como nos humanos (PENZ JR., 2003).

3.2.1 Mecanismos de ação

O modo de ação dos probióticos não foi ainda completamente esclarecido, embora tenham sido sugeridos vários processos que podem atuar independentemente ou associados (HOLZAPFEL et al., 1998; FOOKS; GIBSON,

2002; COPPOLA; GIL-TURNES, 2004; CHEN; WALKER, 2005; MARCO; PAVAN; KLEEREBEZEM, 2006).

Após a ingestão, o probiótico deve manter sua viabilidade após contato com o ácido gástrico e com os sais biliares. Além de vencer essa barreira química, os probióticos devem se aderir à superfície intestinal onde desempenham suas funções (MARCO; PAVAN; KLEEREBEZEM, 2006).

A ação benéfica do uso de probióticos se faz em duas formas principais, sendo a primeira pela melhora nos índices zootécnicos, maior produtividade, aumento no ganho de peso e melhora na conversão alimentar e segundo, na redução da colonização intestinal por alguns patógenos, como por exemplo, as salmonelas (FULLER; COLE, 1989; CASTRO, 2003).

Outros benefícios atribuídos ao uso dos probióticos, principalmente quando se trata dos Lactobacilos e das Bifidobactérias, pois estas possuem capacidade de elevar o valor nutritivo e terapêutico dos alimentos, o que leva a um aumento dos níveis de vitaminas do complexo B e aminoácidos, além da absorção acrescida de cálcio, ferro e magnésio (ROLFE, 2000; COUDRAY et al., 2005; SNELLING, 2005).

Além disso, os probióticos exercem efeitos pleiotrópicos, incluindo o papel de proteção do trato intestinal onde eles exercem efeitos antimicrobianos diretos por competir com patógenos locais e indiretamente por melhorar as funções de barreira do intestino (NG et al., 2009). Apresentam, também, habilidade de modular o sistema imune das mucosas locais e sistêmicas do hospedeiro (HÖRMANNSPERGER; HALLER, 2010).

Outros possíveis efeitos dos probióticos são a sua atuação na prevenção de câncer, na modulação de reações alérgicas, na melhoria da saúde urogenital de mulheres (KOPP-HOOLIHAN, 2001) e nos níveis sanguíneos de lipídeos (PEREIRA; GIBSON, 2002). Além desses possíveis efeitos, evidências preliminares indicam que bactérias probióticas ou seus produtos fermentados podem exercer um papel no controle da pressão sanguínea. Estudos clínicos e com animais documentaram efeitos anti-hipertensivos com a ingestão de probióticos (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

É provável que o efeito benéfico dos probióticos na modulação de reações alérgicas seja exercido através do desenvolvimento da função de barreira da mucosa. Outra possibilidade é que um estímulo microbiano reduzido durante a

primeira infância resulte em maturação mais lenta do sistema imune, tendo em vista o fato de que foi observado que crianças alérgicas eram menos frequentemente colonizadas por lactobacilos, predominando os coliformes e *Staphylococcus aureus*. Assim sendo, os probióticos são capazes de atenuar a inflamação intestinal e as reações de hipersensibilidade em pacientes com alergia alimentar, funcionando como um meio de prevenção primária da alergia em indivíduos suscetíveis (KOPP-HOOLIHAN, 2001; VAN DE WATER, 2003).

Quanto ao efeito probiótico benéfico sobre a concentração sanguínea de lipídios, apesar de poucos estudos clínicos de curta duração terem sido realizados, todos mostraram que a ingestão de probióticos exerceu influência sobre os lipídios de uma maneira similar, reduzindo os níveis de colesterol total, de colesterol LDL e de triglicérides (KOPP-HOOLIHAN, 2001). As bactérias probióticas fermentam os carboidratos não digeríveis provenientes dos alimentos no intestino. Os ácidos graxos de cadeia curta resultantes dessa fermentação possivelmente causam diminuição das concentrações sistêmicas dos lipídeos sanguíneos, através da inibição da síntese de colesterol hepático e/ou da redistribuição do colesterol do plasma para o fígado (PEREIRA; GIBSON, 2002b).

Entretanto, é importante salientar que diversas outras hipóteses têm sido levantadas e que o efeito real dos probióticos no controle de colesterol ainda é questionável (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

3.2.1.1 Exclusão competitiva

Essa é considerada de extrema importância em virtude da disponibilidade de nutrientes representarem um fator limitante ao crescimento bacteriano. Um dos fatores limitantes para o crescimento bacteriano na luz intestinal é a disponibilidade de nutrientes. A competição é maior no colón distal, onde existe menor quantidade de resíduos alimentares em relação ao colón proximal e intestino delgado. Portanto, o aumento do número de lactobacilos e bifidobactérias não permitiria a proliferação de bactérias consideradas patogênicas para o hospedeiro (FOOKS; GIBSON, 2002; TAMIME, 2002; CHEN; WALKER, 2005).

Jin et al. (1997) relataram diversos estudos em que a alimentação de frangos com *Lactobacillus* resultou em menores números de coliformes no intestino delgado e nos cecos. Pintos “germ-free” tratados com a combinação de *E.coli* e

Lactobacillus foram protegidos de *S. typhimurium* mais efetivamente que com cada organismo isoladamente. O mecanismo envolvido parece ser a aderência dos probióticos a sítios de ligação no epitélio intestinal competindo com outras bactérias. A competição por nutrientes disponíveis é muitas vezes citada como um mecanismo de ação para controlar populações bacterianas, mas não existem evidências para essa proposta.

Segundo Lavermicocca et al. (2005), com a presença das bactérias probióticas no interior do intestino as bactérias patogênicas são excluídas, isso ocorre devido à competição por sítios de ligação (receptores ou pontos de ligação) na mucosa intestinal. Essa exclusão ocorre porque as bactérias patogênicas não conseguem se ligar aos receptores e conseqüentemente elas são excluídas pela competição.

3.2.1.2 Antagonismo direto

Os lactobacilos e as bifidobactérias auxiliam na manutenção de um balanço saudável da flora intestinal, por produzirem compostos orgânicos decorrente da atividade fermentativa, com formação de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e ácido acético, que aumentam a acidez do intestino, inibindo assim, a multiplicação de bactérias com potencial de dano ao epitélio intestinal (FOOKS; GIBSON, 2002).

As bactérias intestinais são capazes de produzir alguns ácidos orgânicos a partir de ingredientes alimentares não absorvidos de forma integral pelo hospedeiro. Desta forma as bactérias do intestino podem produzir ácido propiônico, ácido acético, ácido butírico e láctico, além de peróxido de hidrogênio, os quais são capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos (KURDI et al., 2006). Aparentemente, a ação bacteriostática dos ácidos graxos de cadeia curta é dependente do pH, pois quanto maior a redução desde, maior a quantidade de ácido e efeito antibacteriano mais intenso (LAUGHTON et al., 2006)

Segundo Vélez et al. (2007), as bactérias da microbiota intestinal e/ou componentes dos probióticos podem produzir e liberar compostos como as bacteriocinas ácidos orgânicos, que são ácidos graxos voláteis de cadeia curta (propiônico, acético, butírico, láctico) e os peróxidos de hidrogênio que tem atividade bacteriostática, esses dois ácidos atuam como inibidores do crescimento de bactérias patogênicas. As bacteriocinas são capazes de inibir o crescimento de

patógenos intestinais, pois elas são substâncias antibióticas que agem no local. Atualmente existe várias bacterianas descritas, entre elas temos a reuterina, uma substância de baixo peso molecular, produzida pelo *L. reuteri*. Tanto lactobacilos quanto bifidobactérias são capazes de produzir esses elementos (FOOKS; GIBSON, 2002).

Chateau, Castellanos e Deschamps (1993) isolaram 103 *Lactobacillus* de dois probióticos (DFM) “direct-fed microbial” comerciais e testaram sua capacidade de inibir patógenos; cerca de metade dos isolados inibiram as duas espécies de *Salmonella* e os seis sorotipos de *E.coli* utilizados.

3.2.1.3 Estímulo ao sistema imune

Ao citar os mecanismos de ação das bactérias probióticas, pode-se destacar também, o estímulo ao sistema imune, que ocorre por meio do aumento dos níveis de anticorpos e ativação dos macrófagos, proliferação de celular T e produção de interferon, e relacionar este mecanismo a dois gêneros de bactérias, as *Lactobacillus* e as *Bifidobacterium* (ISOLAURI et al., 2001; MATSUMOTO et al., 2005; PELUSO et al., 2007).

Alguns gêneros de bactérias intestinais como o *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão diretamente relacionados com o aumento da resposta imune. Jin et al. (1997) e Leedle (2000) revisaram o assunto, indicando efeitos no aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon. Os *Lactobacillus* podem ser importantes no desenvolvimento de imunocompetência em animais jovens, principalmente na proteção contra antígenos que causam reações inflamatórias no intestino.

Os probióticos têm sido utilizados para aumentar tanto a imunidade adaptativa quanto a inata através do contato direto com as células epiteliais e imunitárias, ou pela capacidade de modificar a composição e atividade da flora intestinal. Eles exercem efeitos protetores por vários mecanismos imunes e não imunes (LEBEER; VANDERLEYDEN; DE KEERSMAECKER, 2008), exercendo diretamente atividade antimicrobiana contra patógenos (SERVIN, 2004), aumentando a fagocitose (LEBLANC; CASTILLO; PERDIGON, 2010), modificando a produção de diferentes populações de células (LATVALA et al., 2008; VIZOSO

PINTO et al., 2009) ou melhorando a produção de IgA (GALDEANO; PERDIGON, 2006).

Matsuguchi et al. (2003) investigaram os efeitos estimulantes das espécies de *Lactobacillus* em células imune de camundongos. Para isso, foram utilizadas as cepas *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *L. reuteri*. Eles observaram que as células mononucleares dos animais foram induzidas por toas as seis linhagens para a produção de TNF- α em quantidades variáveis.

Chung et al. (2009), trabalhando com cães de sete semanas de idade, testaram a utilização de *Lactobacillus casei* expressando o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) sobre a função imunológica de cães e como resultados, estes pesquisadores observaram que não houve diferença na leucometria global, porém a leucometria específica, IgA e IgG, foi considerada significativamente maior quando comparados com o grupo controle, concluindo que o probiótico potencializou o efeito da vacina.

Em um trabalho recente utilizando diferentes dosagens de probióticos em diferentes fases de criação (inicial, crescimento e terminação) de frangos de corte, Taklime et al. (2012) observaram que a utilização do probiótico teve um efeito significativo sobre a produção de anticorpos contra as doenças mais comuns em aves (Newcastle, Influenza e Bronquite), onde que os grupos tratados com probióticos apresentaram maior produção de anticorpos quando comparados com o grupo controle, evidenciando que o probiótico teve um efeito positivo melhorando o sistema imune por aumentar os níveis de anticorpos sanguíneos aumentando a condição de saúde dos frangos. Além disso, nos animais tratados com probióticos houve um aumento das bactérias *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e diminuição de *Staphylococcus faecium*, concluindo que o probiótico teve um papel significativamente importante no estabelecimento da microbiota benéfica do intestino.

3.2.1.4 Propriedades anticarcinogênicas

O consumo de produtos laticínios fermentados pode oferecer efeito protetor contra adenomas ou carcinomas do cólon (RAFTER, 1995).

As propriedades anticarcinogênicas de certas bactérias podem ser explicadas pela ligação e degradação de pró-carcinogênicos, produção de compostos antimutagênicos, modulação de enzimas pró-carcinogênicas no intestino e supressão de tumores pelo mecanismo de resposta imune (SAARELA et al., 2000).

Porém, alguns estudos sugerem que os agentes probióticos podem estar associados à carcinogênese intestinal. Esta situação clínica é mediada por enzimas bacterianas fecais, que ativam os compostos pró-carcinogênicos em compostos carcinogênicos (GOMES; MALCATA, 2002).

Hirayama e Rafter (2000) e Rafter (2003) sugerem vários mecanismos de atuação, incluindo o estímulo da resposta imune do hospedeiro (por aumentar a atividade fagocitária, a síntese de IgA e a ativação de linfócitos T e B), a ligação e a degradação de compostos com potencial carcinogênico, alterações qualitativas e/ou quantitativas na microbiota intestinal envolvidas na produção de carcinógenos e de promotores, produção de compostos antitumorígenos ou antimutagênicos no cólon (como o butirato), alterações da atividade metabólica da microbiota intestinal, alterações das condições físico-químicas do cólon com diminuição do pH e efeitos sobre a fisiologia do hospedeiro.

Outras evidências também sugerem que os probióticos reduzem a resposta inflamatória (com diminuição das citocinas, da hipersensibilidade e aumento da atividade fagocitária), alteram a atividade de bactérias envolvidas na pró-carcinogênese e na mutagênese (O'MABONY et al., 2001; LEBLANC; PERDIGON, 2005; GAUDIER et al., 2005).

3.2.1.5 Neutralização de enterotoxinas

Uma das propostas é que enterotoxinas produzidas por bactérias patogênicas podem ser neutralizadas por substâncias produzidas por organismos probióticos, embora não existam demonstrações diretas no caso de aves (JIN et al. 1997).

Muita atenção tem sido dada ao papel que um probiótico poderia ter em afetar a ligação de organismo patogênico a parede intestinal e, portanto, na produção de enterotoxinas (FULLER, 1989). A ligação de bactérias patogênicas à superfície da mucosa do hospedeiro e a produção de enterotoxinas na superfície é

atualmente reconhecido como o passo inicial e essencial na patogênese (JONES; RUTTER, 1972). É provavelmente o efeito da ligação e da produção de toxinas que contam para a maior proporção da alta taxa de síntese proteica na parede intestinal.

Segundo Williams et al. (1991), o papel de um micro-organismo probiótico é manter o balanço da microflora entérica em favor de espécies não patogênicas, eliminando as patogênicas. A maior parte das bactérias se adere à superfície intestinal via fímbria bacteriana. O componente da fímbria bacteriana que realmente se adere é lectina. Esta reconhece estruturas específicas de carboidratos na superfície da parede intestinal.

Tanto a *Salmonella* como a *E. coli* se ligam via grupos de manose específicos. Um possível modo de ação para a atividade de um probiótico é a de que um organismo probiótico compete com bactéria patogênica pelos sítios de ligação na superfície intestinal, assim excluindo o patógeno e impedindo a produção de toxinas. Para que isto ocorra, a fímbria da bactéria deve ser similar e reconhecer o mesmo sítio de ligação.

Durante as primeiras semanas de vida do leitão, ocorre uma sucessão de diferentes cepas de *Lactobacillus*, o que indica uma alteração na natureza dos componentes de adesão no intestino (TANNOCK; FULLER; PEDERSEN, 1996).

3.2.2 Vantagens e limitações

Apesar de sua ação não estar completamente esclarecida, estudos citam algumas vantagens e limitações decorrentes do uso dos probióticos. Dentre as vantagens da utilização dos probióticos na alimentação de monogástricos são: auxílio na digestão e absorção de nutrientes (envolvimento na bioquímica intestinal, especialmente em relação à ação sobre os sais biliares); possuem ação inibitória no crescimento de bactérias patogênicas (produção de bacteriocinas que agem inibindo o crescimento de outras bactérias); produzem lactato e acetato que ajudam na redução do pH do meio, exercendo desse modo, ação antibacteriana; produção de metabólitos que inibem bactérias patogênicas; estimula o sistema imunológico através da produção de macrófagos; o combate a células malignas pode ser atribuído a inibição de enzimas pró-carcinogênicas ou a estimulação do sistema imunitário do hospedeiro; restauração da microbiota intestinal após antibioticoterapia. Já no caso dos ruminantes, os probióticos auxiliam no aumento da

digestibilidade da fibra; redução dos níveis de amônia ruminal; maior ingestão de matéria seca; estabilidade nos processos digestivos; antecipação da ruminação em bezerros; redução de diarreias também em bezerros e barreira microbiológica para infecções por patógenos no trato genital de fêmeas.

Os probióticos apresentam algumas características particulares, eles são capazes de se manterem viáveis ao longo do tempo da vida de prateleira do produto alimentício, eles não transportam genes transmissores de resistência a antibióticos e não apresentam propriedades mutagênicas e são anticarcinogênicos e resistem a fagos e ao oxigênio (ROLFE, 2000; SALMINEN; NURMI; GUEIMONDE, 2005; SNELLING, 2005; NICOLAS et al., 2007).

Além disso, a maior vantagem da utilização dos probióticos é por este servir como alternativa ao uso dos promotores de crescimento antibióticos na alimentação animal. Estes suplementos alimentares compostos de culturas definidas ou indefinidas de microrganismos vivos têm a capacidade de se instalarem e proliferarem no trato gastrintestinal, agindo no crescimento e beneficiando a saúde do hospedeiro pelo estímulo as propriedades existentes na microbiota natural, disponibilizando, assim, produtos de maior segurança alimentar para o mercado consumidor, tanto nacional como internacional.

Numerosas vantagens para a saúde são associadas ao uso dos probióticos, principalmente relacionadas às patologias digestivas, urogenitais e também atopia. Devemos levar em consideração que alguns benefícios estão mais bem documentados do que outros. Além disso, o custo-benefício dessa utilização deve ser levantado, pois muitos trabalhos realizados testando esses produtos não destacam essa relação. Os efeitos descritos devem ser limitados às cepas utilizadas em cada estudo e para cada espécie animal e não extrapolados e generalizados (BADARÓ et al., 2009).

Partindo da própria definição, a presença de microrganismos vivos nas preparações probióticas levanta a possibilidade de infecção ou colonização patogênica. Quando ingeridos por via oral, os probióticos são geralmente seguros e bem tolerados, tendo um risco muito baixo de causar infecções (KLIGLER; COHRSEN, 2008) e de propiciar a geração de patógenos mais agressivos e resistentes (BADARÓ et al., 2009). Deve-se destacar que o uso simultâneo de probióticos e antibióticos podem retirar a eficácia de ação dos probióticos (WILLIAMS, 2010).

Os resultados de pesquisas com probióticos, até o momento, são bastante contraditórios quanto à sua eficiência. Essa contradição observada entre os trabalhos justifica-se mediante os dados obtidos em relação à idade do animal, tipo de probiótico utilizado, viabilidade de os microrganismos, no momento, serem agregados às rações e condições de armazenamento delas (ARAÚJO et al., 2000).

Inúmeros fatores podem interferir na resposta dos frangos frente aos probióticos, como, por exemplo, idade do lote, desafio sanitário, tipo de microrganismo, agente anticoccidiano, criação em gaiolas ou piso, entre outros. Além disso, Menten e Pedroso (2005) atentam para o fato de que a composição indicada no rótulo dos probióticos comercializados, quanto à identidade e concentração microbiana, nem sempre é a que compõe o produto. Por isso, estudos envolvendo a utilização de probióticos devem controlar os fatores anteriormente mencionados, para que essa nova tecnologia possa ser utilizada com segurança.

REFERÊNCIAS

- ALI, A. H. et al. Aberrant DNA methylation of some tumor suppressor genes in lung cancers from workers with chromate exposure. **Mol. Carcinog.**, v. 50, p. 89-99, 2011.
- AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association: functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 104, n. 5, p. 814-826, 2004.
- ANDERSON, R. A. J. Chromium, glucose intolerance and diabetes. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 17, n. 6, p. 548-55, 1998.
- ANGER, G. et al. **Chromium compounds**. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim: Wiley Online Library, p. 1-36, 2005. doi:10.1002/14356007.a07_067
- ARAÚJO, L. F. et al. Antibiótico e probiótico para frangos de corte no período de 24 a 41 dias de idade. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., 2000, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SBZ, 2000. p.254.
- ARAYA, H.; LUTZ, M. R. Alimentos funcionales y saludables. **Rev. Chil. Nutr.**, v. 30, n. 1, p. 8-14, 2003.
- ARULDHAS, M. M. et al. Microcanalization in the epididymis to overcome ductal obstruction caused by chronic exposure to chromium - a study in the mature bonnet monkey (*Macaca radiata* Geoffroy). **Reproduction**, v. 128, n. 1, p. 127-137, 2004.
- ARULDHAS, M. M. et al. Chronic chromium exposure-induced changes in testicular histoarchitecture are associated with oxidative stress: study in a non-human primate (*Macaca radiata* Geoffroy). **Hum. Reprod.**, v. 20, p. 10, p. 2801-2813, 2005.
- ARULDHAS, M. M. et al. In vivo spermatotoxic effect of chromium as reflected in the epididymal epithelial principal cells, basal cells, and intraepithelial macrophages of a nonhuman primate (*Macaca radiata* Geoffroy). **Fertil Steril.**, v. 86, suppl. 4, p. 1097-1105, 2006.
- BADARÓ, A. C. L. et al. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana: parte 2. **Revista Nutrir Gerais**, v. 3, p. 2, 2009.
- BARCELOUX, D. G. Chromium. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v. 37, n. 2, p. 173-194, 1999.
- BARTYZEL, A.; CUKROWSKA, E. M. Solid phase extraction method for the separation and determination of chromium(III) in the presence of chromium(VI) using silica gel modified by N,N'-bis(-methylsalicylidene)-2,2-dimethyl-1,3-propanediimine. **Anal. Chim. Acta**, v. 707, n. 1-2, p. 204-9, 2011. doi:10.1016/j.aca.2011.09.023.

BASHA, S.; MURTHY, Z. V. P.; JHA, B. Biosorption of hexavalent chromium by chemically modified seaweed, *Cystoseira indica*. **Chem. Eng. J.**, v. 137, p. 480-488, 2008. doi:10.1016/j.cej.2007.04.038

BATAINEH, H. et al. Effect of long-term ingestion of chromium compounds on aggression, sex behavior and fertility in adult male rat. **Drug. Chem. Toxicol.**, v. 20, n. 3, p. 133–149, 1997.

BEAUMONT, J. J. et al. Cancer mortality in a Chinese population exposed to hexavalent chromium in drinking water. **Epidemiology**, v. 19, n. 1, p. 12-23, 2008.

BEDNAR, C. M.; KIES, C. Inorganic contaminants in drinking water correlated with disease occurrence in Nebraska. **Water Resour. Bull**, v. 27, n. 4, p. 631-635, 1991.

BIOTECNAL. **Manual da equipe técnica Biotecnall**. [S.l.], 1999.

BLADE, L. M. et al. Hexavalent chromium exposures and exposure-control technologies in American enterprise: results of a NIOSH field research study. **J. Occup. Environ. Hyg.**, v. 4, p. 595–618, 2007.

BORODY, T. J. et al. Bacteriotherapy using fecal flora: toying with human motions. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 38, n. 6, p. 475-483, jul. 2004.

BREMER NETO, H. et al. Determinação de rotina do crômio em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5-difenilcarbazida. **Cienc. Rural**, v. 35, p. 691-697. 2005.

BUTOLO, J. E. Uso de aditivos na alimentação de aves: frangos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE AS IMPLICAÇÕES SOCIOECONÔMICAS DO USO DE ADITIVOS NA PRODUÇÃO ANIMAL. **Anais...**Piracicaba: CBNA, p. 85-94, 1999.

CASTRO, J. C. Uso de aditivos e probióticos em rações animais. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, p. 12-18, 2003.

CHATEAU, N.; CASTELLANOS, I.; DESCHAMPS, A. M. Distribution of pathogen inhibition the lactobacillus isolates of a commercial probiotic consortium. **J. Appl. Bacter.**, v. 74, p. 36-40.1993

CHEMDAT. **The Merck chemical database**. Darmstadt: Merck KGaA, 2005.

CHEN, C. C.; WALKER, W. A. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states. **Adv. Pediatr.**, v. 52, p. 77-113, 2005.

CHIU, A. et al. Review of chromium (VI) apoptosis, cell-cycle-arrest, and carcinogenesis. **J. Environ. Sci. Part C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.**, v. 28, p. 188-230, 2010. doi:10.1080/10590501.2010.504980.

CHOWDHURY, A. R.; MITRA, C. Spermatogenic and steroidogenic impairment after chromium treatment in rats. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 33, n. 7, p. 480–484, 1995.

- CHUNG, J. Y. et al. Effect of recombinant lactobacillus expressing canine GM-CSF on immune function in dogs. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 19, n. 11, p. 1401-1407, 2009.
- CHWASTOWSKA, J. et al. Speciation of chromium in mineral waters and salinas by solid-phase extraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 66, p. 1345-1349, 2005.
- CLOCHESEY, J. M. Chromium ingestion: a case report. **J. Emerg. Nurs.**, v. 10, n. 6, p. 281–282, 1984.
- COPPOLA, M. M.; GIL-TUNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, jun./ago., 2004.
- COSTA, M.; KLEIN, C. B. Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans. **Crit. Ver. Toxicol.**, v. 36, n. 2, p. 155 –163, 2008.
- COTTON, F. A. et al. **Advanced Inorganic Chemistry**. 6th. ed. New York: John Wiley & Sons, p.736-752, 1999.
- COUDRAY, C. et al. Dietary inulin intake and age can significantly affect intestinal absorption of calcium and magnesium in rats: a stable isotope approach. **Nutrition Journal**, London, v. 4, n. 29, p. 117-122, 2005.
- CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; VAN DENDER, A. G. F. Packaging system and probiotic dairy foods. **Food Research International**, v. 40, n. 8, p. 951-956, 2007.
- DARTSCH P.C. et al. Investigations on the nephrotoxicity and hepato-toxicity of trivalent and hexavalent chromium compounds. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 71, suppl., p. S40-S45, 1998.
- DEBSKI B. et al. Chromiumyeast supplementation of chicken broilers in an industrial farming system. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 18, p. 47-51, 2004.
- DE FLORA, S. et al. Genotoxicity of chromium compounds: a review. **Mutat. Res.**, v. 238, p. 99-172, 1990.
- LEBLANC, A. M.; CASTILLO, N. A.; PERDIGON, G. Anti-effective mechanisms induced by a probiotic Lactobacillus strain against Salmonella entérica serovar Typhimurium Infection. *Int. J. Food Microbiol.*; v. 138, n. 3, p. 223-231, 2010.
- LEBLANC, A. M.; PERDIGON, G. Reduction of beta-glucuronidase and nitroreductase activity by yoghurt in a murine colon câncer model. *Biocell.*, v. 29, p. 15-24, 2005.
- DIMER, C.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Journal of Dairy Science**, v. 8, p. 473–479, 1998.

D'SOUZA, et al. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhea: meta-analysis. **British Medical Journal**, v. 324, n. 7350, p. 1361-1364, 2002.

EIZAGUIRRE-GARCIA, D. et al. A study of leukaemia in Glasgow in connection with chromium-contaminated land. **Journal of Public Health Medicine**, v. 21, n. 4, p. 435-8, 1999.

EIZAGUIRRE-GARCIA, D. et al. Congenital anomalies in Glasgow between 1982 and 1989 and chromium waste. **Journal of Public Health Medicine**, v. 22, p. 54–58, 2000.

EMSLEY, J. **The Elements**. Cambridge: Oxford University Press, 1989.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, Argentina, 2001. 34 p.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. **Br. J. Nutr.**, v. 88, p. S39-S49, 2002.

FRISTEDT, B. et al. Survival in a case of acute oral chromic acid poisoning with acute renal failure treated by haemodialysis. **Acta Med. Scand.**, v. 177, p. 153–159, 1965.

FRYZEK, J. P. et al. Cancer mortality in relation to environmental chromium exposure. **J. Occup. Environ. Med.**, v. 43, n. 7, p. 635-640, 2001.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, New York, v. 66, p. 356-378, 1989.

FULLER, R.; COLE, E. C. B. **The scientific basis of the probiotic concept in probiotics: theory and applications**. [S.l.]: Chalcombe Publications, 1989. p.1-14.

GALDEANO, C. M.; PERDIGON, G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 13, n. 2, p. 219-226, 2006

GALVÃO, L. A. C.; COREY G. **Cromo**. [S.l.]: Organización Panamericana de la Salud, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, 1987. 66 p.

GAUDIER, E. et al. The VSL#3 probiotic mixture modifies microflora but does not heal chronic dextran-sodium sulfate-induced colitis or reinforce the mucus barrier in mice. **J. Nutr.**, ;v. 135, p. 2753-61, 2005.

GETOFF, N. Anti-aging and aging factors in life: the role of free radicals. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 76, p. 1577-1586, 2007.

GHADBAN, G. S. Probiotics in broiler production: a review. **Arch., Geflugelk.**, v. 66, n. 2, p. 49-58, 2002.

GIL DE LOS SANTOS, J. R.; GIL-TURNES, C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, v. 35, p. 741-747, 2005.

GOLDMAN, M.; KAROTKIN, R. H. Acute potassium bichromate poisoning. **Am. J. Med. Sci.**, v. 189, p. 400–403, 1935.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biotecnologia Alimentar - Boletim de Tecnologia**, v. 101, p. 12–22, 2002.

GÓMEZ, V.; CALLAO, M. P. Chromium determination and speciation since 2000. **Trends Anal. Chem.**, v. 25, p. 1006, 2006.

GOYER, R. A. Toxic effects of metals. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.). **Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons**. New York: McGraw Hill, 1996. p. 691-736.

GUARNER, F. et al. **World Gastroenterology Organization Practice Guideline: Probiotics and Prebiotics**. Munich, Germany: WGO, 2008.

HANTSON, P. et al. Hexavalent chromium ingestion: biological markers of nephrotoxicity and genotoxicity. **Clin Toxicol.**, (Phila), v. 43, n. 2, p. 111–112, 2005.

HARMEL, V. C. **Padronização de um teste de toxicidade crônica com a bactéria luminescente *vibrio fischeri* para análise de qualidade de águas superficiais**. 2004. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau-SC .

HASAN, A. A case report: ammonium dichromate poisoning. **Biomed. Res.**, v. 18, n. 1, p. 35–37, 2007.

HAYES, W. (Ed). **Principles and methods of toxicology**. 5th. ed. New York: Informa Health Care, 2007.

HIRAYAMA, K.; RAFTER, J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 681-6, 2000.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Overview of gut flora and probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 41, p. 85-101, 1998.

HÖRMANNSPERGER, G.; HALLER, D. Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 1, p. 63–73, 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: chromium, nickel, and welding**. Lyons, France, 1990. v.49, p.256.

ISERSON, K. V. et al. Failure of dialysis therapy in potassium dichromate poisoning. **J. Emerg. Med.**, v. 1, n. 2, p. 143–149, 1983.

ISOLAURI, E. et al. Probiotics: effects on immunity. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, n. 4, p. 44–50, 2001.

JIN, L. et al. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poultry Sci. J.**, v. 53, p. 351–368, 1997.

JONES, G. W.; RUTTER, J. M. **Infection and Immunology**, v. 6, p. 918, 1972.

KANOJIA, R. K.; JUNAID, M.; MURTHY, R. C. Chromium induced teratogenicity in female rat. **Toxicol. Lett.**, v. 89, n. 3, p. 207–213, 1996.

KANOJIA, R. K.; JUNAID, M.; MURTHY, R. C. Embryo and fetotoxicity of hexavalent chromium: a long-term study. **Toxicol. Lett.**, v. 95, n. 3, p. 165–172, 1998.

KATZ, S. A.; SALEM, H. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. **J. Appl. Toxicol.**, v. 13, n. 3, p. 217–224, 1993.

KAUFMAN, D. B.; DINICOLA, W.; McINTOSH, R. Acute potassium dichromate poisoning: treated by peritoneal dialysis. **Am. J. Dis. Child.**, v. 119, n. 4, p. 374–376, 1970.

KERGER, B. D. Cancer mortality in Chinese populations surrounding an alloy plant with chromium smelting operations. **J. Toxicol. Environ. Health A**, v. 72, n. 5, p. 329–344, 2009.

KIRSCHBAUM, B. B.; SPRINKEL, F. M.; OKEN, D. E. Proximal tubule brush border alterations during the course of chromate nephropathy. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 58, p. 19–30, 1981.

KLEIN, C. B. et al. Chromate-induced epimutations in mammalian cells. **Environ. Health Perspect.** v. 110, suppl. 5, p. 739–743, 2002.

KLIGLER, B.; COHRSEN, A. Probiotics. **Am. Fam. Physician.**, v. 78, p. 1073–8, 2008.

KONDO, K. et al. The reduced expression and aberrant methylation of p16(INK4a) in chromate workers with lung cancer. **Lung Cancer**, v. 53, p. 295–302, 2006

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v. 101, p. 229–241, 2001.

KOTÁS, J.; STASICKA, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. **Environ. Pollut.**, v. 107, n. 3, p. 263–83, mar. 2000.

KUÇUKBAY, F. Z. et al. Effects of dietary chromium picolinate supplementation on serum glucose, cholesterol, and minerals of rainbow trout (*Onchoryncus mykiss*). **Aquaculture Inter.**, v. 14, p. 259–266, 2006.

- KURDI, P. et al. Mechanism of Growth Inhibition by Free Bile Acids in Lactobacilli and Bifidobacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, n. 5, p. 1979–1986, 2006.
- LABRA, M. et al. Genetic and DNA-methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L. **Chemosphere**, v. 54, p. 1049–1058, 2004.
- LAUGHTON, J. M. et al. Inhibition of expression of a staphylococcal superantigen-like protein by a soluble factor from *Lactobacillus reuteri*. **Microbiology**, v. 152, n. 4, p. 1155-1167, 2006.
- LATVALA, S. et al. Potentially probiotic bacteria induce efficient maturation but differential cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 36, p. 5570-5583, 2008
- LAVERMICOCCA, P. et al. Study of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4233–4240, 2005.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 72, n. 4, p. 728-764, 2008.
- LEE, Y. K.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends Food Science Technology**, v. 6, p. 241-244, 1995.
- LEEDLE, J. Probiotics and DFMs-mode of action in the gastrointestinal tract. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL. **Anais...** Campinas: CBNA, 2000. p. 25-40.
- LEWIS, R. J. **Chromium and compounds**. In: HAWLEY'S condensed chemical dictionary. 15. ed. New York, NY: John Wiley & Sons, 2007.
- LI, H. et al. Effect of Cr(VI) exposure on sperm quality: human and animal studies. **Ann. Occup. Hyg.**, v. 45, n. 7, p. 505–511, 2001.
- LIDE, D. R. (Ed.). **CRC handbook of chemistry and physics**. 79th. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1998. p. 4-8.
- LOUBIERES, Y. et al. Acute, fatal, oral chromic acid poisoning. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v. 37, n. 3, p. 333–336, 1999.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v. 11, p. 1-17, 2001.
- MALKOC, E.; NUHOGLU, Y. Potential of tea factory waste for chromium(VI) removal from aqueous solutions: thermodynamic and kinetic studies. **Sep. Purif. Technol.**, v. 54, p. 291-298, 2007.

- MARCO, M. L.; PAVAN, S.; KLEEREBEZEM, M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 17, p. 204-10, 2006.
- MARTINEZ-ZAMUDIO, R.; HÁ, H. C. Environmental epigenetics in metal exposure. **Epigenetics**, v. 6, p. 820–827, 2011. doi: 10.4161/epi.6.7.16250.
- MATOS, P. M. S.; MONTEIRO, J. M. C. T. **Probióticos**. 2010. 19 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto.
- MATSUGUCHI, T. et al. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, p. 259–266, 2003.
- MATSUMOTO, S. et al. Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina própria mononuclear cells. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 140, n. 3, p. 417–426, 2005.
- MENTEN, J. F. M.; PEDROSO, A. A. Fatores que interferem na eficácia de probióticos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos. **Anais...** Santos: Apinco, 2005. p. 41-52.
- MERTZ, W. Chromium occurrence and function in biological systems. **Physiol. Rev.** v. 49, p.163, 1969.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.
- MORENO, R. A. S. et al. Chromium(III) determination without sample treatment by batch and flow injection potentiometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 634, p. 68-74, 2009.
- MORIMOTO, K. et al. Modulation of natural killer cell activity by supplementation of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in habitual smokers. **Preventive Medicine**, v. 40, n. 5, p. 589–594, 2005.
- MUNIZ, D. H. F.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. **Universitas Ciências da Saúde**, v. 4, n. 1/2, p. 83-100, 2006.
- MURTHY, R. C.; JUNAID, M.; SAXENA, D. K. Ovarian dysfunction in mice following chromium (VI) exposure. **Toxicol. Lett.**, v. 89, n. 2, p. 147–154, 1996.
- NG, S. C. et al. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 15, n. 2, p. 300–310, 2009.
- NICOLAS, P. et al. Extensive horizontal transfer of core genome genes between two *Lactobacillus* species found in the gastrointestinal tract. **BioMed Central Evolutionary Biology**, London, v. 7, n. 141, p. 1-14, 2007.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of sodium dichromate dihydrate (CAS No. 7789-12-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water studies). Washington, DC: National Toxicology Program, 2008. NTP TR 546. Disponível em: http://ntp.niehs.nih.gov/files/546_web_FINAL.pdf. Acesso em:

OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions: a review. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 300, p. 57–62, 2010.

O'MABONY, L. et al. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumor development in IL-10 knockout mice. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 15, p. 1219-25, 2001.

O'NEIL, M. J. et al. **Chromium and compounds**. In: O'NEIL, M.J. et al. (Ed.). THE MERCK index. Whitehouse Station, NJ: Merck, 2006.

OWLAD, M.; AROUA, M. K.; DAUD, W. M. A. W. Hexavalent chromium adsorption on impregnated palm shell activated carbon with polyethyleneimine. **Bioresour. Technol.**, v. 101, p. 5098-5103, 2010.

PAGE, B. J.; LOAR, G. W. **Chromium compounds**. In: KIRK-OTHEMER encyclopedia of chemical technology. New York, NY: John Wiley & Sons, 2004. v. 6, p.526–571.

PAGE, T. G. et al. Effect of chromium picolinate on growth and serum and carcass traits of growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 3, p. 656-662, 1993.

PARTINGTON, C. N. Acute poisoning with potassium bichromate. **Br. Med. J.**, v. 2, n. 4688, p. 1097–1098, 1950.

PECHOVA, A.; PAVLATA, L. Chromium as an essential nutrient: a review. **Veterinarni Medicina**, Brno, Czech Republic, v. 52, n. 1, p. 1-18, 2007.

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

PENZ JR., A. M. A produção animal brasileira frente às exigências dos mercados importadores atuais e futuros. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: SBZ, 2003. CD-ROM.

PEREIRA, D. I. A.; GIBSON, G. R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Critical Rev. Biochem. Molec. Biol.**, v. 37, n. 4, p. 259-281, 2002.

RAFTER, J. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 30, p. 497-502, 1995.

- RAFTER, J. Probiotics and colon cancer. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.**, v. 17, p. 849-59, 2003.
- RAO, A. V. et al. A randomized, double blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. **Gut Pathology**, v. 19, p. 1–6, 2009.
- RAZA, M. et al. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of swiss albino mice. **Sci. Pharma.**, v. 70, p. 135-146, 2002.
- REICHELDERFER, T. E. Accidental death of an infant caused by ingestion of ammonium dichromate. **South Med. J.**, v. 61, p. 96–97, 1968.
- ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition, Bethesda**, v. 130, n. 2, p. 396-402, 2000.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, jan./mar. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v42n1/29855.pdf>.. Acesso em: 04 maio 2013.
- SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197–215, 2000.
- SALMINEN, S. et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **British Journal of Nutrition**, v. 80, p. 147-171, 1998.
- SALMINEN, S.; NURMI, J.; GUEIMONDE, M. The genomics of probiotic intestinal microorganisms. **Genome Biology**, London, v. 6, n. 7, p. 1-4, 2005.
- SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr. Rev.**, New York, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.
- SARYAN, L. A.; REEDY, M. Chromium determinations in a case of chromic acid ingestion. **J. Anal. Toxicol.**, v. 12, n. 3, p. 162–164, 1988.
- SCHAEFER, S. Cromo. Metais de transição. **Tabela periódica online**. 2008. Disponível em: http://www.tabela.oxigenio.com/metais_de_transicao/elemento_quimico_cromo.htm. Acesso em: 12 ago. 2013.
- SCHIRMER, W. N. et al. A química ambiental do cromo e seus compostos. SEMANA DE ENGENHARIA AMBIENTAL, 7., 2009. **Anais...** Irati, 2009
- SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 28, p. 405-440, 2004.
- SHANKER, A.K. et al. Chromium toxicity in plants. **Environ Int.**, v. 31, p. 739–753, 2005.

- SHARMA, B. K.; SINGHAL, P. C.; CHUGH, K. S. Intravascular haemolysis and acute renal failure following potassium dichromate poisoning. **Postgrad. Med. J.**, v. 54, n. 632, p. 414–415, 1978.
- SHIAU, S. Y.; CHEN, M. J. Carbohydrate utilization by tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) as influenced by different chromium sources. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 10, p. 1747-1753, 1993.
- SHRIVASTAVA, R. et al. Effects of chromium on the immune system. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 34, p. 1-7, 2002.
- SINGH, A. K.; GUPTA, V. K.; GUPTA, B. Chromium(III) selective membrane sensors based on Schiff bases as chelating ionophores. **Anal. Chim. Acta**, v. 585, n. 1, p. 171-8, 2007.
- SNELLING, A. M. Effects of probiotics on the gastrointestinal tract. **Current Opinions in Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 18, n. 5, p. 420-426, 2005.
- STASINAKIS, A. S.; THOMAIDIS, N. S.; LEKKAS, T. D. **Anal. Chim. Acta**, v. 478, p. 119, 2003.
- STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos: artigo de revisão. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 3, n. 1, p. 16-33, jan-jun, 2008.
- STERN, R. M. Chromium compounds: production and occupational exposures. In: LANGARD, S. (Ed.). **Biological and environmental aspects of chromium**. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982. p.5.
- STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, T. T.; GOMES, R. C. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 43, n. 2, p. 181-194, 2007.
- SUBRAMANIAN, S. et al. Reproductive toxicity of chromium in adult bonnet monkeys (*Macaca radiata* Geoffrey): reversible oxidative stress in the semen. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 215, p. 237-249, 2006.
- SUGIYAMA, M. Effects of vitamins on chromium (VI): induced damage. **Environmental Health Perspectives**, v. 92, p. 63-70, 1991.
- TAKLIME, S. M. S. M. et al. Study on efficacy of probiotic in broiler chickens diet. **Agricultural Sciences**, v. 3, n. 1, p. 5-8, 2012.
- TAMIME, A. Y. Fermented milks: a historical food with modern applications: a review. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 56, p. S2-S15, 2002.
- TANNOCK, G. W.; FULLER, R.; PEDERSEN, K. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1310, 1996.

THE INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Environmental Health Criteria, Chromium**. Geneva: WHO, 1988. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc001.htm>. Acesso em: 02 ago 2013.

TOURNUT, J. R. Probiotics. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p.179-99.

UNDERWOOD, E. J. Trace elements in human and animal nutrition. 3rd ed. . New York: Academic Press, 1971.

UYANIK, F.; ATASSEVER, A.; OSDAMAR, S. et al. Effects of dietary chromium chloride supplementation on performance, some serum parameters, and immune response in broilers. **Biological Trace Element Research**, v. 90, p. 99-115, 2002.

VAN DE WATER, J. Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria. In: FARNWORTH, E. R. (Ed.). **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.113-144.

VÉLEZ, M. P. et al. Functional analysis of dalanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 11, p. 3595–3604, 2007.

VIZOSO PINTO, M. G. et al. Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. **Int J. Food Microbiol.**, v. 133, p. 86-93, 2009.

WILLIAMS, N. T. Probiotics. **American Journal Health Syst. Pharm.**, v. 67, n. 6, p. 449-58, 2010.

WILLIAMS, P. E. V. et al. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. **J. Anim. Sci.**, v. 69, p. 3016-3026, 1991.

YOUSEF, M. I. et al. Ameliorating effect of folic acid on hexavalent chromium-induced changes in reproductive performance and seminal plasma biochemistry in male rabbits. **Reprod. Toxicol.**, v. 21, n. 3, p. 322–328, 2006.

ZAHID, Z. R. et al. Comparative effects of trivalent and hexavalent chromium on spermatogenesis of the mouse. **Toxicol. Environ. Chem.**, v. 25, p. 131–136, 1990.

ZHANG, J.; LI, X. Chromium pollution of soil and water in Jinzhou. **J. Chinese Prev. Med.**, v. 21, p. 262-264, 1987.

ZHANG, J.; LI, S. Cancer mortality in a Chinese population exposed to hexavalent chromium in water. **J Occ Env Med.**, v. 39, n. 4, p. 315-319, 1997.

ZHITKOVICH, A. Importance of chromium: DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium(VI). **Chem. Res. Toxicol.**, v. 18, p. 3-9, 2005.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Probiótico atenua efeitos tóxicos do dicromato de potássio em ratos

Probiotic attenuate the toxic effects of potassium dichromate in rats

Soraia Younan^{1*}; Gabriel Zanuto Sakita¹; Karen Cristine Silva²; Hermann Bremer-Neto³; Paulo Eduardo Pardo³

1 Discente do Mestrado em Ciência Animal – Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente - SP.

2 Discente da Faculdade Medicina – UNOESTE.

3 Docente Mestrado em Ciência Animal – UNOESTE.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar as alterações dependentes da dose de dicromato de potássio (0, 12, 24 e 36 mg.kg⁻¹ de K₂Cr₂O₇) no parâmetro desempenho nutricional e perfis glicêmico, lipídico, renal e hepático, após suplementação com ou sem probiótico, em ratos Wistar. Oitenta ratos foram randomicamente divididos em oito grupos (n=10): Grupo 1 (dieta basal); Grupo 2 (dieta basal + 12 mg.kg⁻¹ K₂Cr₂O₇); Grupo 3 (dieta basal + 24 mg.kg⁻¹ K₂Cr₂O₇); Grupo 4 (dieta basal + 36 mg.kg⁻¹ K₂Cr₂O₇); Grupo 5 (dieta basal + 0,2% de probiótico); Grupo 6 (dieta basal + 12 mg.kg⁻¹ K₂Cr₂O₇ + 0,2% de probiótico); Grupo 7 (dieta basal + 24 mg.kg⁻¹ K₂Cr₂O₇ + 0,2% probiótico); e Grupo 8 (dieta basal + 36 mg.kg⁻¹ de K₂Cr₂O₇ + 0,2 % de probiótico). O efeito da inclusão ou não do probiótico sobre os parâmetros estudados foi avaliado por meio do ajustamento de retas de

* Mestrado em Ciência Animal, Departamento de Ciências Funcionais, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE. Fone: +55-18-3229-1181, E-mail: soraia_younan@hotmail.com

regressão linear simples, utilizando-se as doses de $K_2Cr_2O_7$ como variável dependente e os coeficientes de regressão e interceptos foram comparados dois a dois pelo teste t de Student. A ingestão oral por 90 dias de doses crescentes de dicromato de potássio produziu diminuição significativa ($P < 0,01$) do desempenho nutricional e alterações significativas ($P < 0,01$) dos perfis lipídicos, glicêmico, renal e hepático. Os resultados sugerem que o probiótico tem efeito benéfico na prevenção a exposição subcrônica ao cromo VI, na forma de dicromato de potássio, evidenciados através da atenuação das alterações dos perfis hepático, renal, glicêmico e lipídico e parâmetros nutricionais em ratos, como modelo experimental.

Palavras-chave: Crômio VI; Intoxicação Subcrônica; Alimentos funcionais; Parâmetros séricos; Parâmetros nutricionais.

ABSTRAT

The aim of this study was to evaluate the dose-dependent changes of potassium dichromate (0, 12, 24 and 36 $mg.kg^{-1}$ of $K_2Cr_2O_7$) in nutritional performance parameter and glycemic, lipid, renal and hepatic profiles after supplementation with or without probiotic, in Wistar rats. Eighty rats were randomly divided into eight groups (n = 10): Group 1 (basal diet), Group 2 (basal diet + 12 $mg.kg^{-1}$ of $K_2Cr_2O_7$), Group 3 (basal diet + 24 $mg.kg^{-1}$ of $K_2Cr_2O_7$); group 4 (basal diet + 36 $mg.kg^{-1}$ of $K_2Cr_2O_7$), Group 5 (basal diet + 0.2% probiotic), Group 6 (basal diet + 12 $mg.kg^{-1}$ of $K_2Cr_2O_7$ + 0.2% of probiotic) and Group 7 (basal diet + 24 $mg.kg^{-1}$ of $K_2Cr_2O_7$ + 0.2% of probiotic) and Group 8 (basal diet + 36 $mg.kg^{-1}$ of $K_2Cr_2O_7$ and+ 0.2% of probiotic). The effect of the inclusion or not of the probiotic on the parameters was evaluated by fitting straight linear regression, using doses of $K_2Cr_2O_7$ as the dependent variable and regression coefficients and intercepts were compared two by two by t-test Student. The oral intake for 90 days of increasing doses of potassium dichromate

produced a significant decrease ($P < 0.01$) in nutritional parameters and lipid, glucose, renal and liver profiles. The results suggest that the probiotic has a beneficial effect in the prevention effect of subchronic exposure to chromium VI, in the form of potassium dichromate, evidenced by attenuation of changes in hepatic, renal, glycemic and lipid profiles and nutritional parameters in rats, as experimental model.

Key words: Chromium VI; Subchronic exposure; Functional foods; Serum parameters; Nutritional parameters

INTRODUÇÃO

O cromo, Cr, é um elemento relativamente comum e ocupa a 21ª posição no índice de elementos que ocorrem mais comumente na crosta terrestre (CHWASTOWSKA et al., 2005), podendo ser liberado para o meio ambiente a partir de fontes antropogênicas, pois é amplamente utilizado em processos de fabricação, como curtimento de couro, produção de aço e placas, controle de corrosão e produção de tintas e pigmentos (BARTYZEL; CUKROWSKA, 2011)

Na natureza o cromo III, Cr^{+3} , é considerado um elemento essencial para o metabolismo humano e animal em pequenas quantidades, já o cromo VI, Cr^{+6} é um potente agente oxidante, muito instável, tóxico, irritante e carcinogênico para humanos e animais (STASINAKIS et al., 2003; BREMER NETO, et al., 2005; MUNIZ, OLIVEIRA-FILHO, 2006).

O Cr^{+6} provoca efeitos agudos e crônicos no pulmão, fígado, rins, trato gastrointestinal e no sistema circulatório (THE INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1988) e são, assim, fortes irritantes do tecido da mucosa,

incluindo efeito de acidose metabólica, necrose tubular aguda, insuficiência renal e morte (SARYAN, REEDY, 1988). Além disso, o Cr^{+6} acumula no túbulo proximal e é nesse local que provoca o maior efeito tóxico, através da indução de radicais livres pela redução do crômio, na presença de redutores celulares (DARTSCH et al., 1998; SUGIYAMA, 1991) e a interação dos radicais livres com as proteínas da membrana e intracelulares, modificando os processos de reabsorção e secreção de diferentes substâncias nos túbulos renais (KIRSCHBAUM; SPRINKEL; OKEN, 1981).

Alguns microrganismos vivos, definidos como probiótico, mostraram atividade antioxidante (SINGH et al., 2007) e captadora de radicais livres (GETOFF, 2007), o que pode minimizar ou impedir o efeito tóxico de contaminantes, pelo seu efeito benéfico sobre a saúde humana (SALMINEN et al., 1998).

Para a avaliação do risco toxicológico em humanos, alguns parâmetros bioquímicos sanguíneos dos animais, como modelo experimental, podem ser utilizados, uma vez que mudanças no sistema hematológico deles podem ter um maior valor preditivo (RAZA et al., 2002; HAYES, 2007).

O objetivo desse estudo foi o de avaliar o efeito do probiótico em *Rattus norvegicus* linhagem Wistar alimentados com dietas contendo doses crescentes de dicromato de potássio, por do desempenho nutricional e de parâmetros bioquímicos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNOESTE, sob o Processo nº 785/11, em 22 de agosto de 2011. Os grupos foram compostos por 10 ratos machos da linhagem Wistar, totalizando 80

animais, recém-desmamados (25 dias de idade), com 50 ± 4 g de peso corporal, provenientes do Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista e mantidos em gaiolas individuais, sob as mesmas condições padrões de iluminação (ciclo claro/escuro de 12/12 horas), temperatura controlada em 22°C, comida e água *ad libitum* (MERUSSE e LAPICHIK, 1996) e por um período experimental de 90 dias.

Os animais foram distribuídos randomicamente em oito grupos: Grupo 1 = ração basal (Ração SupraLab, com níveis de garantia: umidade máx.: 12,5%; proteína bruta mín. de 25%; extrato etéreo mín.: 3%; matéria fibrosa máx.: 18%; matéria mineral máx.: 11%; cálcio máx.: 2%; e fósforo mín.: 0,5%); Grupo 2 = ração basal incorporada com 12 mg.kg⁻¹ de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇, 99,9% de pureza, marca Merck KGaA, Darmstadt, Germany); Grupo 3 = ração basal incorporada com 24 mg.kg⁻¹ de K₂Cr₂O₇; Grupo 4 = ração basal incorporada com 36 mg.kg⁻¹ de K₂Cr₂O₇; Grupo 5 = ração basal incorporada com 0,2% de probiótico (Proenzime[®] produzido pela Empresa Brasileira de Aumento de Produtividade Pecuária – EMBRAUPEC, Paranavaí, PR, Brasil, composto por: *Lactobacillus acidophilus*, 2,220,000,000 de Unidades Formadoras de Colônias (UFC); *Streptococcus faecium* 2,220,000,000 UFC; *Bifidobacterium thermophilum* 2,220,000,000 UFC; e *Bifidobacterium longum* 2,220,000,000 UFC por kg de produto); Grupo 6 = ração basal incorporada com 12 mg.kg⁻¹ de K₂Cr₂O₇ e 0,2% de probiótico; Grupo 7 = ração basal incorporada com 24 mg.kg⁻¹ de K₂Cr₂O₇ e 0,2% de probiótico; e Grupo 8 = ração basal incorporada com 36 mg.kg⁻¹ de K₂Cr₂O₇ e 0,2 % de probiótico.

Análises da água e da ração basal foram realizadas antes e durante o experimento e indicaram que nenhum contaminante, crômio (VI), estava presente e que pudesse interferir ou afetar os resultados do estudo (Bremer et al., 2005).

Foi determinado o desempenho animal, através dos parâmetros do ganho de peso diário, coeficiente de eficiência alimentar, consumo diário da ração e o índice de conversão alimentar, segundo Kaminski et al. (2008).

Após 90 dias de período experimental, os animais foram anestesiados com Tiopental 50 mg.mL⁻¹ (Thiopentax, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda – São Paulo/SP - Brasil), com uma dosagem de 30 mg.Kg⁻¹ de peso vivo, por via intraperitoneal e amostras de sangue foram colhidas por punção intracardíaca e distribuídas em tubos contendo anticoagulante EDTA Sódico com Fluoreto de Sódio e em tubos secos para realização dos parâmetros bioquímicos, sendo então os animais eutanasiados por exsanguinação, conforme Paiva et al. (2005).

Foram analisados os seguintes parâmetros bioquímicos: aspartato aminotransferase (AST ou TGO), alanina transferase (ALT ou TGP), gama-glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALP ou FA), proteínas totais, globulina, albumina, creatinina, glicose, ureia, colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos. Os parâmetros bioquímicos foram dosados através de analisador automatizado BioPLUSS, modelo Bio200F.

O efeito da inclusão ou não do probiótico sobre os parâmetros estudados foi avaliado por técnica que compara regressões lineares simples, utilizando-se as doses de K₂Cr₂O₇ como variável dependente e os coeficientes de regressão e interceptos foram comparados através dos coeficientes angular e linear das mesmas (Ostle & Mensing, 1975). Considerou-se uma diferença estatisticamente significativa quando P<0,01.

DISCUSSÃO

Os detalhes do desempenho nutricional e dos vários parâmetros bioquímicos são apresentados nas Figuras 1, 2, 3 e 4.

Nenhuma mortalidade foi observada nos grupos de animais expostos ao dicromato de potássio incorporado em doses crescentes na ração, durante o período experimental de três meses, estando esses resultados de acordo com os resultados obtidos por NTP (2007) ou nos grupos de animais na qual foi incorporado também o probiótico.

Nos ratos dos grupos na qual foi adicionado a ração basal 12 mg.kg^{-1} , 24 mg.kg^{-1} e 36 mg.kg^{-1} de dicromato de potássio revelaram sintomas clínicos de embotamento atribuíveis a 90 dias de administração de Cr^{6+} , conforme descrito por Priti et al. (2012).

Dois animais do grupo na qual foi adicionado 24 mg.kg^{-1} de dicromato de potássio e quatro no grupo na qual foi adicionado 36 mg.kg^{-1} apresentaram sintomas de apatia, letargia e diarreia, nas quais receberam as maiores doses do dicromato de potássio adicionado na ração. Observações semelhantes foram relatados em ratos por Priti et al. (2012), em seres humanos por Zhang e Li (1987) e em coelhos por Tyl et al. (1991), após a exposição ao Cr^{6+} . Segundo Saryan e Reedy (1988) e Priti et al. (2012) a possível razão para esses sintomas pode ser devido aos efeitos corrosivos e irritantes do sal hexavalente na mucosa gastrointestinal. Muniz e Oliveira-Filho (2006) relatam que em animais a administração de doses orais acima de 10 mg.kg^{-1} de Cr^{6+} , incorporadas na dieta, afetam o trato gastrointestinal, os rins e o sistema hematológico e em humanos adultos as características clínicas mais importantes produzidas foram necrose do fígado e dos rins, e contaminação de órgãos vitais, como o coração.

Os grupos que receberam administrados na ração doses crescentes de Cr^{+6} e incorporado 0,2% de probiótico, Proenzime[®], não apresentaram sintomas de embotamento, apatia, letargia e ou diarreia, indicando que esse produto protegeu a mucosa gastrointestinal dos efeitos corrosivos e irritantes do crômio. Segundo Brochers et al. (2009), o papel das bactérias probióticas na melhoria da imunidade pode ser explicada através da atividade de desintoxicação desses microorganismos, pois existe agora evidências substanciais de que podem proporcionar benefícios modulando as funções imunológica, antipatogênica e anti-inflamatória (ADOLFFSSON et al., 2004), possivelmente influenciando as funções metabólica, imunológica e protetora no cólon (ROBERFROID et al. 1995).

O desempenho foi medido através dos fatores consumo, ganho de peso e eficiência alimentar. Os animais com o aumento da dose do dicromato de potássio tiveram uma diminuição significativa ($P < 0,01$) no consumo, o que também foi observado em ratos por Mclachlan et al. (2006), Soudani et al. (2010), Oliveira et al. (2010) e Priti et al. (2012) e em coelhos por Tyl et al. (1991), porém expostos a outras dosagens.

Os grupos de animais suplementados somente com probiótico tiveram um consumo de ração significativamente maior ($P < 0,01$) do que o grupo controle, o que foi também observado por Anukam et al. (2005) alimentados com uma ração contendo lactobacilos, porém alguns trabalhos relatam que o probiótico não ter efeito sobre o consumo (FERNANDES, 2001; RANASINGHE et al., 2013) e mesmo com a adição do dicromato de potássio na ração em doses crescentes o consumo manteve-se ainda significativamente maior ($P < 0,01$), do que nos grupos de animais na qual foi adicionado somente dicromato de potássio.

A inclusão na ração de doses crescentes do dicromato de potássio fez com também os grupos de animais tivessem um ganho de peso diário significativamente menor ($P < 0,01$ em relação ao grupo controle, o que também foi relatada por De Lucca et al. (2009), Rao et al. (2009), Matos et al. (2009) e Staniek et al. (2010).

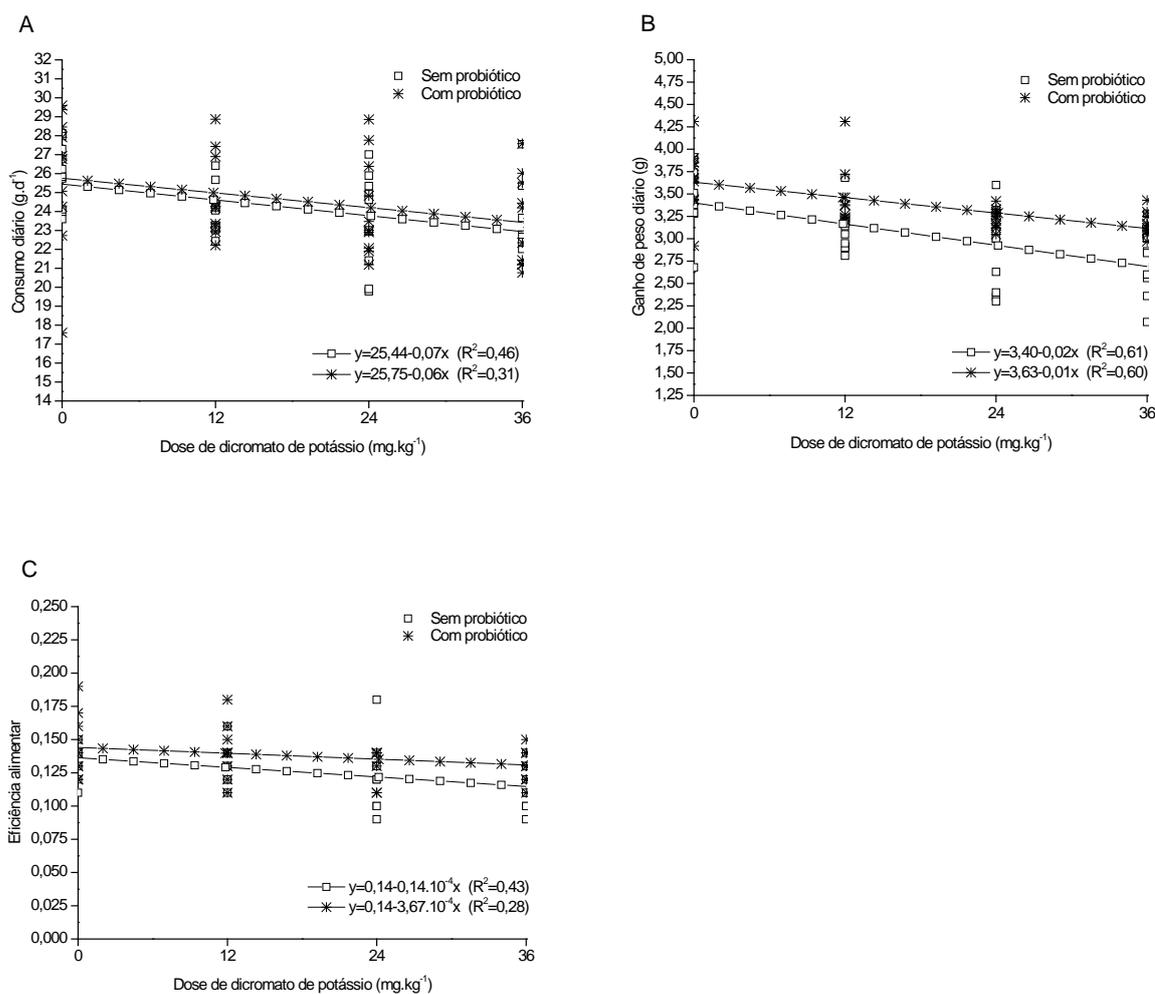


Figura 1. Alterações dependentes da dose de dicromato de potássio (0, 12, 24 e 36 mg.kg⁻¹) no desempenho, após suplementação sem (□--□) ou com probiótico (*--*), em ratos machos. Parâmetros nutricionais: A – Consumo diário; B – Ganho de peso diário; C – Eficiência alimentar.

O probiótico quando incorporado nas dietas, tanto basal quanto contendo doses crescentes de dicromato de potássio, resultou em ganho de peso quando comparado aos grupos controle ou com a incorporação somente do

dicromato de potássio. Kuo et al. (2013) relatam que o probiótico, por si só, não é um fator determinante para o aumento do peso corporal, porém com base em pesquisas laboratoriais em humanos e animais. Abdul-Rahman et al. (2011), levantaram a hipótese de que a alimentação fornecida *ad libitum* de probióticos pode ter efeitos benéficos sobre a ingestão de alimentos e o peso corporal. Outra evidência, os probióticos são utilizados como promotores de crescimento devido à sua capacidade para suprimir o crescimento e atividade de crescimento de microflora patogênica e de aumentar a absorção de nutrientes através da produção de enzimas digestivas, Fuller e Gibson (1997). Similar observação a esse estudo, quanto a diminuição do peso corporal, foi relatada por Tyl et al., (1991) e Viñol et al., (2012) em ratos machos e fêmeas, na qual foi administrado o cromo hexavalente.

Todos os grupos suplementados com dicromato de potássio em doses crescentes tiveram uma perda linear e significativa ($P < 0,01$) da eficiência alimentar, quando comparado com os grupos suplementados com probiótico, segundo Kozasa (1989), pois os probióticos são selecionados visando melhorar também o crescimento e a eficiência alimentar dos animais, contribuindo para a melhoria e manutenção da flora intestinal bem equilibrada, evitando transtornos gastrintestinais e outras doenças (LAVERMICOCCA, 2006).

No presente estudo quando os animais foram alimentados com ração incorporada com doses crescentes de dicromato de potássio, ocorreu um aumento linear e significativo ($P < 0,01$) nos valores de AST, ALT, AKP e GGT em relação aos grupos controle e que recebeu somente o probiótico. Esses resultados também foram observados em humanos (KAUFMAN et al., 1970) e em ratos (ACHARYA et al., 2001; PRITI et al., 2012) para AST e ALT, porém esses autores não obtiveram os mesmos resultados quanto ao parâmetro GGT. As análises dos parâmetros

sanguíneos dos animais podem ser traduzidas para avaliação de risco em humanos, uma vez que mudanças no sistema hematológico ter um maior valor preditivo para a toxicidade humana (RAZA et al., 2002; HAYES, 2007).

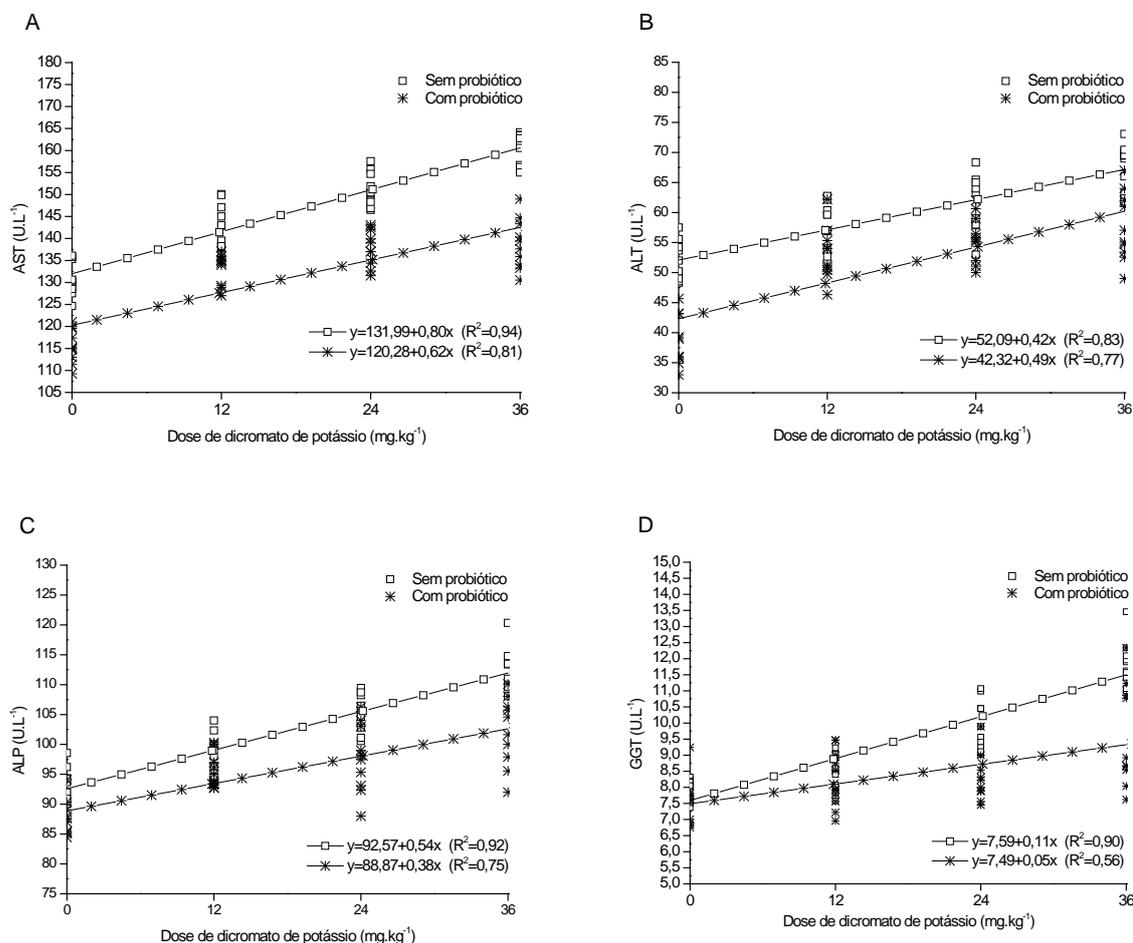


Figura 2. Alterações dependentes da dose de dicromato de potássio (0, 12, 24 e 36 mg.kg^{-1}) no perfil hepático, após suplementação sem (□--□) ou com probiótico (*--*), em ratos machos. Parâmetros séricos: A - AST; B - ALT; C - ALP; D - GGT.

O grupo de animais que recebeu uma ração basal acrescida de probiótico teve influência significativa ($P<0,01$) nos valores menores dos parâmetros AST, ALT, AKP e GGT, quando comparados com os resultados do grupo controle. Funções do coração e fígado foram também avaliados por Islam et al. (2004) e Mustari e Ahmad (2011) e obtiveram resultados semelhantes em relação aos parâmetros AST e ALT, em ratos suplementados com probiótico. Segundo eles o

parâmetro bioquímico AST este amplamente distribuído em vários órgãos, tais como o coração e músculos esqueléticos, bem como o fígado, enquanto o ALT existe principalmente no fígado. ALT, AST e albumina são geralmente utilizados como marcadores de dano hepático (RAZA et al., 2002; HAYES, 2007).

Segundo Abd El-Ghany et al. (2012), a inclusão na ração de ratos de bebidas lácticas contendo lactobacilos e estreptococos mostraram diferentes efeitos sobre a lesão hepatocelular indicada pela liberação de enzimas hepáticas e a diminuição do dano hepatocelular foi indicada pela diminuição da liberação do parâmetro bioquímico ALT. Segundo Diya et al. (2001), isto pode ser devido, em parte, através da redução da translocação bacteriana e por efeitos estimuladores da mucosa intestinal, sendo a alteração da microflora intestinal que influencia a barreira intestinal. O probiótico nesse estudo, quando incorporado junto ao dicromato de potássio em doses crescentes fez com os parâmetros AST, ALT, AKP e GGT tivessem um aumento menor e significativo ($P < 0,01$) em relação aos grupos que tiveram a incorporação de doses crescentes somente de dicromato de potássio, indicando que o probiótico preservou as suas funções hepáticas.

O aumento dos níveis de creatinina e uréia nesse estudo é devido à bem conhecida nefrotoxicidade do crômio hexavalente e também foi detectada por outros autores: Wuet al (2001), Pedraza-Chaverri et al. (2005), Fátima et al. (2005), Fátima e Mahmood (2007), Lin et al (2009), Soudani et al (2010) e Vihol et al. (2012) em ratos e Verschoor et al., (1988) em trabalhadores de galvanização. Segundo eles esses parâmetros aumentam de maneira secundária na doença renal.

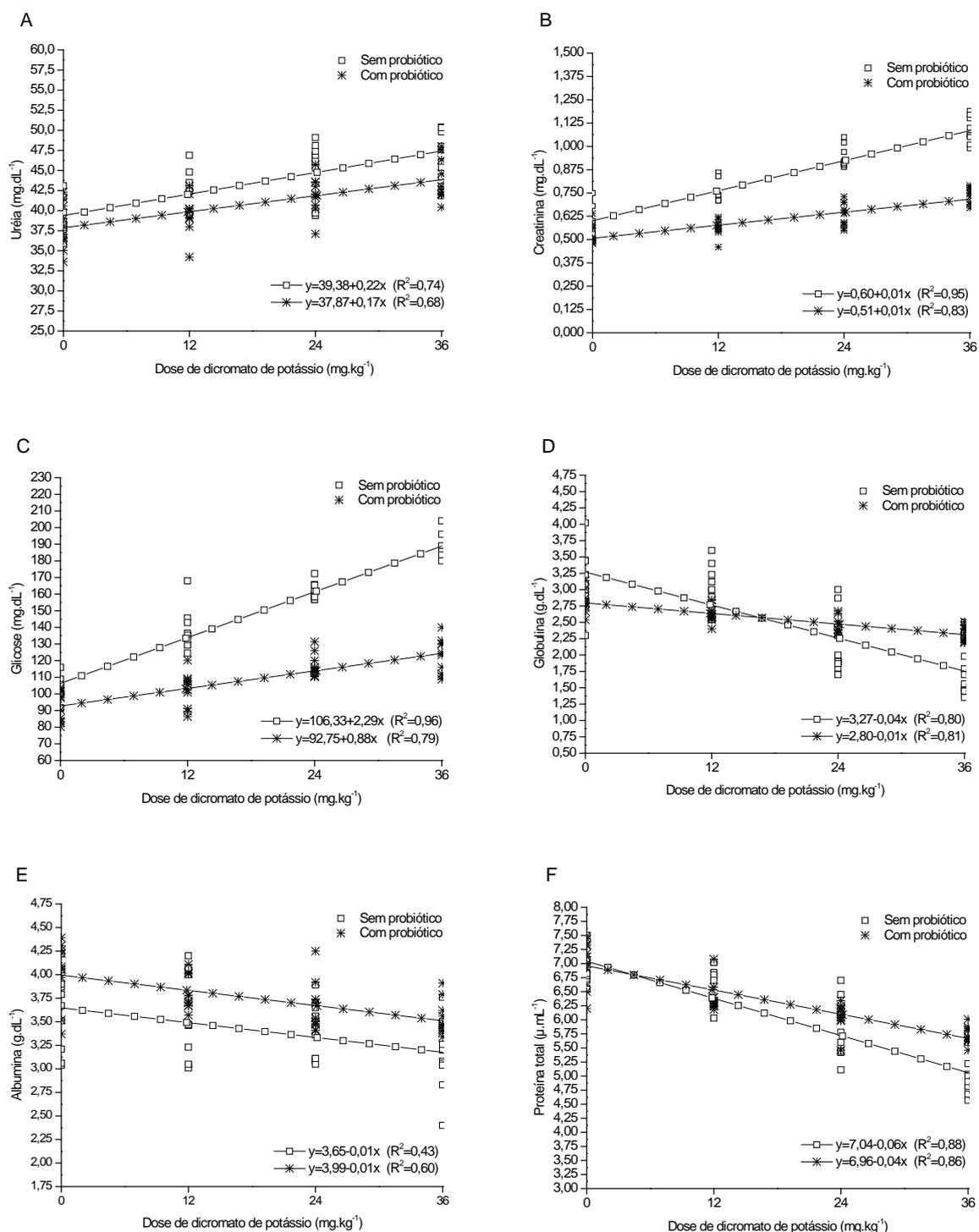


Figura 3. Alterações dependentes da dose de dicromato de potássio (0, 12, 24 e 36 mg.kg⁻¹) no perfil renal e glicêmico, após suplementação sem (□--□) ou com probiótico (*---*), em ratos machos. Parâmetros séricos: A - Uréia; B - Creatinina; C - Glicose; D - Globulina; E - Albumina; F - Proteína total.

Ranganathan et al. (2009; 2010) e Mustari et al. (2011) não encontraram diferença significativa no parâmetro creatinina entre o grupo controle e

probiótico, porém nesse estudo foi significativa essa diferença ($P < 0,01$), o que corrobora com os resultados de McCain et al. (2011).

Os grupos de animais que tiveram incorporado o probiótico na ração tiveram um aumento significativamente menor ($P < 0,01$) nos parâmetros sanguíneos creatinina e uréia em relação aos grupos que foram alimentados com rações contendo somente doses crescentes de dicromato de potássio, o que corrobora com os resultados obtidos por McCain et al. (2011). Esses resultados, segundo Palmquist (2006), podem ser explicados, pois o probiótico faz com que a creatinina e a uréia passem da corrente sanguínea para o trato gastrointestinal, com base numa diferença do gradiente de concentração, ajudando a diminuir a concentração da creatinina e uréia do sangue e segundo Ranganathan et al. (2006; 2009; 2010), para que se possa ter resultado na diminuição desses parâmetros, os animais devem ser tratados por um período maior do que dois meses, o que ocorreu nesse estudo. Ainda segundo eles, estudos preliminares sobre os efeitos da suplementação de probiótico em doença renal em humanos têm mostrado resultados bastante promissores.

Nesse estudo os resultados de proteína sérica total e albumina tiveram também uma redução significativa ($P < 0,01$) com a inclusão em doses crescentes de dicromato de potássio na ração, o que também foi observado por Glaser et al. (1990) e Pedraza-Chaverri et al. (2005). A redução da proteína sérica total e albumina de soro, induzido por tratamento com dicromato pode ser devido a vários fatores, como anormalidades na função hepática e renal (VIHOL et al., 2012).

A inclusão do probiótico nas rações fez com que os resultados dos parâmetros séricos da proteína total e globulina apresentassem uma redução significativa ($P < 0,01$) em relação aos grupos de animais que receberam somente o

dicromato de potássio em doses crescentes, indicando a capacidade do probiótico de reduzir a toxicidade induzida pelo Cr^{+6} , talvez devido as atividades antioxidante, descrita por Singh et al., (2007), captadora de radicais livres, descrita por VIBHA, (2004) e na melhoria da imunidade através da atividade de desintoxicação das bactérias probióticas (BORCHERS et al., 2009).

Os grupos de animais na qual foi adicionada doses crescentes de dicromato de potássio teve um aumento significativo ($P < 0,01$) nos níveis de glicose no soro sanguíneo, o que também foi observado em ratos por Kim e Na (1991) e Gupta et al. (2009). O dicromato de potássio, como fonte de crômio para os animais nesse experimento, desempenha um papel importante no metabolismo da glicose e do colesterol e é essencial para o homem e animais, pois promove a ação da insulina nos tecidos do corpo, para que o corpo possa utilizar os açúcares, proteínas e gorduras, além disso, a microflora intestinal tem um papel significativo a desempenhar na desintoxicação e eliminação dos metais prejudiciais do corpo (UPRETI et al., 2004), o que pode explicar a ação do probiótico que fez com que os níveis de glicose no sangue fossem significativamente inferiores ($P < 0,01$), mesmo nos grupos que foi adicionado somente o dicromato de potássio.

O dicromato de potássio induziu um aumento significativo ($P < 0,01$) e dose dependente nos parâmetros bioquímicos LDL, TG e colesterol, bem como diminuição do nível HDL e segundo Kantola et al. (1998), Kojima et al. (2004) e Gupta et al. (2008) esses resultados podem ser devido a alterações na expressão de genes de algumas enzimas hepáticas, como inibidores da HMG-CoA redutase (hidroxi-metil-glutaril-CoA), o qual por sua vez comprime a expressão do gene do receptor de LDL. Além disso, o nível de colesterol elevado no soro pode ser devido a uma disfunção hepática.

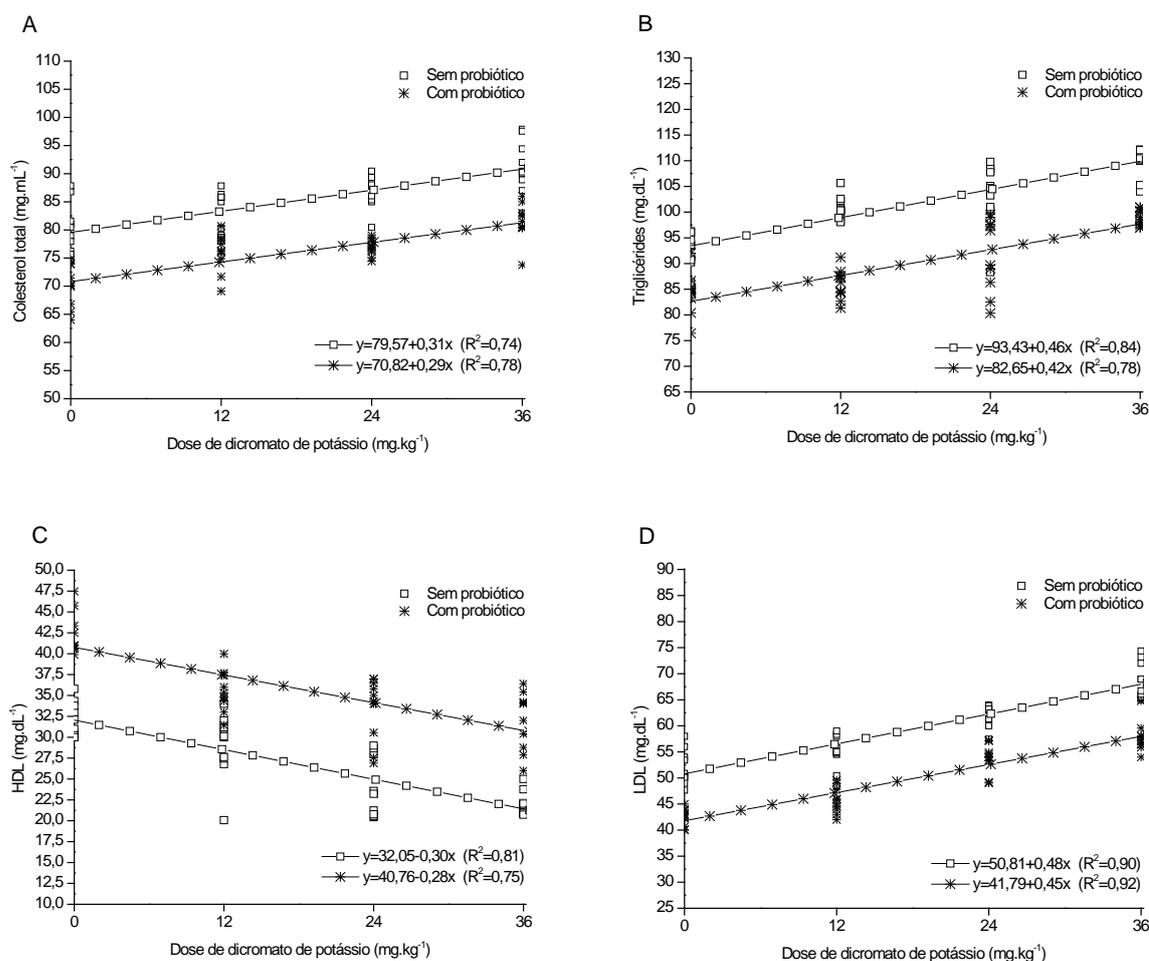


Figura 4. Alterações dependentes da dose de dicromato de potássio (0, 12, 24 e 36 mg.kg⁻¹) no perfil lipídico, após suplementação com probiótico em dosagens 0% (□--□) ou 0,2% (*--*) em ratos machos. Parâmetros séricos: A - Colesterol; B - Triglicérides; C - HDL; D - LDL.

A suplementação do probiótico induziu uma diminuição significativa ($P<0,01$) e linear no soro dos parâmetros bioquímicos LDL, TG e colesterol, bem como diminuição do nível no soro de HDL, estando de acordo com Mustari e Ahmad (2011) em ratos e Guyton (1971) em seres humanos. Outros autores diferem dos resultados obtidos nesse experimento e Esses diferem dos resultados apresentados por, que afirmou que triglicerídeos, HDL e LDL e colesterol não foram diferentes entre o grupo controle e tratado com probiótico (JOY, 1997; KWON et al., 2002).

CONCLUSÃO

A ingestão oral por 90 dias de doses crescentes de dicromato de potássio produziu sinais clínicos de toxicidade, assim como diminuição do desempenho e alteração dos perfis lipídicos, glicêmico e hepático. A inclusão do probiótico na microflora reduziu os efeitos nos parâmetros estudados, indicando que ele pode ser utilizado para desintoxicar e ou impedir a ação desse mineral, porém, outros estudos deverão ser realizados para determinar os microorganismos mais apropriados para minimizar e ou impedir a ação desses poluentes nos homens e animais.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O presente estudo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), segundo protocolo de aprovação nº 785/2011.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GHANY, M.A.; MOTAWEE, M.M.; EL-KEWAWY, H.E.M. Biological effects of yoghurt with rosemary on injured liver rats. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.6(3), p.525-532, 2012.
- ABDUL-RAHIM, A.J.; TAHA, A. Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on Lipid Profile of Diabetic Rats. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v.4, n.4, p.199-204, 2011.
- ABDUL-RAHMAN, A.A.; AHMED, M.M.M.; AMAL, H.M.; HADIL, F.A. Effect of feeding probiotics on rats' immunity and health conditions during pregnancy. **Food and Nutrition Science**, v.2, p.96-104, 2011.
- ACHARYA, S.; MEHTA, K.; KRISHNAN, S.; RAO, C.V. A subtoxic interactive toxicity study of ethanol and chromium in male Wistar rats. **Alcohol**, v.23, p.99-108, 2001.

ADOLFFSSON, O.; MEYDANI, S.N.; RUSSEL, R.M. Yogurt and gut function. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.80, p.245–256, 2004.

ANUKAM, K.C.; OSAZUMA, E.O.; REID, G. Improved appetite of pregnant rats and increased birth weight of newborns following feeding with probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus fermentum* RC-14. **J. Appl. Res.**, v.5(1), p.46-52, 2005.

BARTYZEL, A.; CUKROWSKA, E.M. Solid phase extraction method for the separation and determination of chromium(III) in the presence of chromium(VI) using silica gel modified by N,N'-bis(-methylsalicylidene)-2,2-dimethyl-1,3-propanediimine. **Anal. Chim. Acta**, v.707, n.1-2, p.204-9, 2011. doi:10.1016/j.aca.2011.09.023.

BORCHERS, T.A; CARLO, S; FREDERICK J.M.; CARL, L.K.; GERSHWIN, M.E. Probiotics and Immunity. **Journal of Gastroenterology**, v.44(1), p.26-46, 2009.

BREMER NETO, H.; GRANER, C.A.F.G.; PEZZATO, L.E.; PADOVANI, C.R. Determinação de rotina do cromo em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5-difenilcarbazida. **Cienc. Rural**. v.35, p.691-697, 2005.

CHWASTOWSKA, J. et al. Speciation of chromium in mineral waters and Salinas by solid-phase extraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v.66, p.1345-1349, 2005.

DARTSCH P. C., HILDENBRAND S., KIMMEL R., SCHMAHL F. W. 1998. Investigations on the nephrotoxicity and hepato-toxicity of trivalent and hexavalent chromium compounds. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, 71(Suppl): S 40-S 45.

De LUCCA, R.C.; DUTREY, P.L.; VILLARINO, M.E.; UBIOS, A.M. Effect of different doses of hexavalent chromium on mandibular growth and tooth eruption in juvenile Wistar rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.61, n.4, p.347-352, 2009.

DIYA, A.; SIV, A.; GORAN, M. Effects of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on bacterial translocation and liver injury in an acute liver injury model. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.213-220, 2001.

FATIMA, S.; ARIVARASU, N.A.; BANDAY, A.A.; YUSUFI, A.N.K.; MAHMOOD, R. Effect of potassium dichromate on renal brush border membrane enzymes and phosphate transport in rats. **Human Exp. Toxicol.**, v.24, p.631-631, 2005.

FATIMA, S.; MAHMOOD, R. Vitamin C attenuates potassium dichromate -induced nephrotoxicity and alterations in renal brush border membrane enzymes and phosphate transport in rats. **Clin. Chim. Acta**, v.386, p.94-99, 2007.

FERNANDEZ, M.L. Guinea pigs as models for cholesterol and lipoprotein metabolism. **J. of Nutr.**,v.131(1), p.10-20, 2001.

FULLER, R.; GOBSON, G.R. Modification of the intestinal flora using probiotics and prebiotics. **Scandinavian J. Gastroenterology**, v.32 (Supplement 222), p.28-31, 1997.

GETOFF, N. Anti-aging and aging factors in life: The role of free radicals. **Radiat. Phys. Chem.**, v.76, p.1577-1586, 2007.

GLASER, U.; HOCHRAINER, D.; STEINHOFF, D. Investigation of Irritating Properties of Inhaled Cr (VI) With Possible Influence on Its Carcinogenic Action. In: **Environmental Hygiene II**, Seemayer, N.O. and W. Hadnagy, (Eds.). Springer-Verlag, New York, p.239-245, 1990.

GUPTA AD, DAS SN, DHUNDASI SA, DAS KK. Effect of garlic (*Allium sativum*) on heavy metal (nickel II and chromium VI) induced alteration of serum lipid profile in male albino rats. **Int. J. Environ. Res. Public. Health**, v.5, p.289–293, 2008.

GUPTA, A.D.; DHARA, P.C.; DHUNDASI, S.A.; DAS, K.K. Effect of garlic on subchronic exposure of heavy metal (nickel II and chromium VI) on blood glucose level and hepatic antioxidant status in male albino rats. **J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.**, v.20(1), p. 89–97, 2009.

GUYTON, R.A. Effect of probiotic on lipid profile. **International Dairy Journal**, v.3, p.70, 1971.

HAYES, W. (ed): **Principles and Methods of Toxicology**, 5th Edition, 2007, Informa Health care, New York, NY.

ISLAM, M.W.; RAHMAN, M.M.; KABIR, S.M.L.; KAMRUZZAMAN, S.M.; ISLAM, M.M. Effect of probiotics supplementation on growth performance and certain haemato-biochemical parameters in broiler chickens. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**. v.2, p.39-43, 2004.

JOY, A.D.; SAMUEL, J.J.. Effect of probiotic supplementation on the performance of broiler. **J. Vet. Anim. Sci.**, v.28(1), p.10-14, 1997.

KANTOLA, T.; KIVISTO, K.T.; NEUVONEN, P.J. Grapefruit juice greatly increases serum concentration of lovastatin and lovastatin acid. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.63, p.397–402, 1998.

KAUFMAN, D.B.; DINICOLA, W.; MCINTOSH, R. Acute potassium dichromate poisoning: Treated by peritoneal dialysis. **Am. J. Dis. Child.**, v.119, p.374-376, 1970.

KIM, E.; NA, K.J. Effect of sodium dichromate on carbohydrate metabolism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.110(2), p.251–258, 1991.

KIRSCHBAUM, B.B.; SPRINKEL, F.M.; OKEN, D.E. Proximal tubule brush border alterations during the course of chromate nephropathy. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.58, p.19-30, 1981.

KOJIMA, M.; MASUI, T.; NEMOTO, K.; DEGAWA, M. Lead nitrate induced development of hypercholesterolemia in rats; Sterol independent gene regulation of hepatic enzymes responsible for cholesterol homeostasis. *Toxicol. Lett.*, v.154, p.35–44. 2004.

KOZASA, M. Probiotics for animal use in Japan. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v.8(2), p.517-531, 1989.

KUO, S-M.; MERHIGE, P.M.; HAGEY, L.R. The effect of dietary prebiotics and probiotics on body weight, large intestine indices, and fecal bile acid profile in wild type and IL10^{-/-} mice. *PLoS ONE*, v.8, n.3, p.e60270, 2013.

KWON, B.; KIM, Y.B.; LEE, J.-H.; LEE, H.J.; CHUNG, D.K.; JI, G.E. Analysis of sugars and α -glycosidase activity during soymilk fermentation by bifidobacteria. *Food Science and Biotechnology*, v.11(4), p.389–391, 2002.

LAVERMICOCCA, P. Highlights on new food research. *Digestive and Liver Disease*, v.38(Suppl. 2), p.S295–S299, 2006.

LIN, C.C.; WU, M.L.; YANG, C.C.; GER, J.; TSAI, W.J.; DENG, J.F. Acute severe chromium poisoning after exposure to hexavalente chromium. *J. Chin. Med. Assoc.*, v.72, n.4, p.219-221, 2009.

MATOS, R.C.; VIEIRA, C.; MORAIS, S.; de LOURDES, P.M.; PEDROSA, J. Nephrotoxicity effects of the wood preservative chromium copper arsenate on mice: Histopathological and quantitative approaches. *Journal of Trace Elements on Medicine and Biology*, v.23, n.3, p.224-230, 2009.

MCCAIN, S.; ALLENDER, M.C.; SCHUMACHER, J.; RAMSAY, E. The effects of a probiotic on blood urea nitrogen and creatinine concentrations in large felids. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.42(3), p.426-429, 2011.

MCLACHLAN, J.A.; SIMPSON, E.; MARTIN, M. Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. v.20(1), p.63-75, 2006.

MERUSSE, J.L.B., LAPICHICK, V.B.V. Instalações e equipamentos. In: COMISSÃO DE ENSINO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. *Manual para técnicos em bioterismo*. 2. ed. São Paulo: EPM, 1996. p.15-25.

MUNIZ, D.H.F.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. *Universitas: Ciências da Saúde*, v.4, n.1/2, p.83-100, 2006.

MUSTARI, A.; AHMAD. N. Effects of probiotics on serum biochemical parameters in rats. *Bangl. Vet.* v.28 (2), p.70–74, 2011.

NTP. **NTP technical report on the toxicity studies of sodium dichromate dihydrate (CAS No. 7789-12-0) administered in drinking water to male and female F344/N rats and B6C3F1 mice and male BALB/c and am3-C57BL/6 mice.**

Washington, DC: National Toxicology Program. Toxicity Report Series Number 72. 2007. Available online at http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/ST_rpts/TOX72.pdf (accessed January 29, 2013).

OLIVEIRA, H.; SPANO, M.; GUEVARA, M.A.; SANTOS, T.M. Evaluation of in vivo reproductive toxicity of potassium dichromate in male mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v.62(4), p.391-404, 2010.

OSTLE, B.; MENSING, R.W. **Statistics in research**. 3.ed. Ames : Iowa State University, 1975. 596p.

PAIVA, F.P.; MAFFILI, V.V.; SANTOS, A.C.S. Curso de manipulação de animais de laboratório. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador – BA, maio 2005. Disponível em: http://www.cpqgm.fiocruz.br/arquivos/bioterio_apostila.pdf

PALMQUIST, R. A preliminary clinical evaluation of Kibow Bioticst, a probiotic agent, on feline azotemia. **J. Am. Holistic Vet. Med. Assoc.** v.24, p.23–27, 2006.

PEDRAZA-CHAVERRI, J.; BARRERA, D.; MEDINA-CAMPOS, O.N.; CARVAJAL, R.C.; HERNANDEZ-PANDO, R. Time course study of oxidative and nitrosative stress and antioxidant enzymes in K₂Cr₂O₇-induced nephrotoxicity. **BMC Nephrol.**, v.6. p.6-4, 2005.

PRITI, D.V.; JATIN, P.; RASESH, D.V.; JIGNESH, M.P.; GHODASARA, D.J.; JOSHI, B.P.; PRAJAPATI, K.S. Effects of Sodium Dichromate on Haemato-biochemical Parameters in Wistar Rats. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v.7, p.58-63, 2012.

RANASINGHE, J.G.S.; SILVA, S.S.P.; HERATH, N. Changes of Serum Lipids and Proteins during Probiotics Feeding and Its Exposure. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v.3(1), p.1-5, 2013.

RANGANATHAN, N.; FRIEDMAN, E.A.; TAM, P.; RAO, V.; RANGANATHAN, P.; DHEER, R. Probiotic dietary supplementation in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease: a 6-month pilot scale trial in Canada. **Curr. Med. Res. Opin.** v.25, p.1919–1930, 2009.

RANGANATHAN, N.; PATEL, B.; RANGANATHAN, P.; MARCZELY, J.; DHEER, R.; PECHENYAK, B.; DUNN, S.R.; VERSTRAETE, W.; DECROOS, K.; MEHTA, R.; FRIEDMAN, E.A. In vitro and in vivo assessment of inraintestinal bacteriotherapy in chronic kidney disease. **ASAIO J.** v.52, p.70–79, 2006.

RANGANATHAN, N.; RANGANATHAN, P.; FRIEDMAN, E.A.; JOSEPH, A.; DELANO, B.; D.; GOLDFARB, P.; TAM, A.V.; RAO, E.; ANTEYI, AND C. G. MUSSO. Pilot study of probiotic dietary supplementation for promoting healthy kidney function in patients with chronic kidney disease. **Adv. Ther.** v.27, p.634–647, 2010.

RAO, A.V. et al. A randomized, double blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. **Gut Pathology**, v.19, p.1–6, 2009.

RAZA, M.; AL-SHABANAH, O.A.; EL-HADIYAH, T.M.; AL-MAJED, A.A. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of swiss albino mice, **Sci. Pharma.**, v.70, p.135-146, 2002.

ROBERFROID, M.B.; BORNET, F.; BOULEY, C.; CUMMINGS, J.H. Colonic microflora: nutrition and health. Summary and conclusion of an international life science institute (ILSI) [Europe] workshop held in Barcelona, Spain. **Nutr. Rev.** v.53, p.127–130, 1995.

SALMINEN, S.; BOULEY, C.; BOUTRON-RUAULT, M.C.; CUMMINGS, J.H.; FRANCK, A.; GIBSON, G.R.; ISOLAURI, E.; MOREAU, M.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **British Journal of Nutrition**. v.80, p.147-171, 1998.

SARYAN, L.A.; REEDY, M. Chromium determinations in a case of chromic acid ingestion. **J. Anal. Toxicol.**, v.12, p.162-164, 1988.

SINGH, N.K.; KUMAR, A.; SINHA, P.R. Chemopreventive effect of probiotic curd (curd) contains *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis in rats. **Int. J. of Probiotics and Prebiotics**, v.2(7), p.195–202, 2007.

SOUDANI, N.; SEFI, M.; AMARA, I.B.; BOUDAWARA, T.; ZEGHAL, N. Protective effects of selenium (Se) on chromium VI induced nephrotoxicity in adult rats. **Ecotoxicol. Environm. Safety**. v.73(4), p.671-678, 2010.

STANIEK, H.; KOSTRZEWSKA-POCZEKAJ, M.; ARNDT, M.; SZYFTER, K. Genotoxicity assessment of chromium (III) propionate complex in the rat model using the comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, n.1, p.89-92, 2010.

STASINAKIS, A.S.; THOMAIDIS, N.S.; LEKKAS, T.D. **Anal. Chim. Acta**, v.478, p.119, 2003.

SUGIYAMA, M. Effects of vitamins on chromium (VI) - induced damage. **Environmental Health Perspectives**, v.92, p.63-70, 1991.

THE INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Environmental Health Criteria, 1 Chromium**. Geneva: WHO, 1976. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc001.htm>>. Acesso em: 02 fev 2007.

TYL, R.W.; MARR, M.; MEYERS, C.B. **Developmental toxicity evaluation of chromic acid administered by gavage to CD-1 mice**. Research Triangle Institute, Research Triangle Park, NC 27709, Study No. 60C-4808-10/20. November 12. MRID 420998-01, 1991.

UPRETI, R.K.; SHRIVASTAVA, R.; CHATURVEDI, U.C. Gut microflora & toxic metals: Chromium as a model. **Indian J. Med. Res.**, v.119, p.49-59, 2004.

VERSCHOOR, M.A.; BRAGT, P.C.; HERBER, R.F.; ZIELHUIS, R.L.; ZWENNIS, W.C. Renal function of chrome-plating workers and welders. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v.60, p.67-70, 1988.

VIBHA. **Effect of standard lactobacilli on cardiovascular disease risk factors for their potential application as probiotics.** PhD thesis, NDRI (Deemed University) Karnal, India., 2004.

VIHOL, P.D.; PATEL, J.; VARIA, R.D.; PATEL, J.M.; GHODASARA, D.J.; JOSHI, B.P.; PRAJAPATI, K.S. Effects of sodium dichromate on haemato-biochemical parameters in Wistar rats. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, v.7(1), p. 58-63, 2012.

WU, Y.F.; WU, W.Y.; KUO, H.W.; LIU, C.S.; WANG, R.Y.; LAI, J.S. Effect of genotoxic exposure to chromium among electroplating workers in Taiwan. **Sci. Total Environm.**, v.279, n.1-3, p.21-28, 2001.

ZHANG, J.D.; LI, X.L. Chromium pollution of soil and water in Jinzhou. **Chinese J. Prev. Med.**, v.21, p.262-264, 1987.

ANEXO A – Aprovação do Trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).

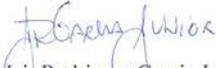


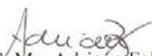
Coordenadoria Central de Pesquisa
Comissão de Ética no Uso de Animais

PARECER FINAL

Declaramos para os devidos fins que o Protocolo de Pesquisa intitulado “**O EFEITO DO DICROMATO DE POTÁSSIO E DO PROBIÓTICO NO DESEMPENHO E PARÂMETROS SÉRICOS EM RATTUS NOVERGICUS LINHAGEM WISTAR**” cadastrado na CEUA e na CCPq sob nº 785/11 (on line), tendo como pesquisador(a) responsável o(a) **Prof. Dr. HERMANN BREMER NETO**, o Docente Participante Prof. Dr. PAULO EDUARDO PARDO, a mestranda SORAIA YOUNAN COLUNA e os(as) acadêmicos(as) FERNANDO ALMEIDA SILVA e VIVIANE MARIA CODOGNOTO, foi avaliado e **APROVADO** nas duas instâncias da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente-SP, em reunião realizada em 19 de agosto de 2011.

Presidente Prudente, 22 de agosto de 2011.


Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq


Prof. Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA – UNOESTE

ANEXO B – Normas de Publicação da Revista Científica a qual o artigo será submetido

REVISTA CIÊNCIA RURAL

ISSN: 0103-8478

Normas para publicação

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar**

parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests ***Tribolium confusum*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Tenebrio molitor*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Sitophilus granarius*** (Coleoptera: Curculionidae) and ***Plodia interpunctella*** (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores).

Resposta de ***Sitophilus oryzae*** (L.), ***Cryptolestes ferrugineus*** (Stephens) e ***Oryzaephilus surinamensis*** (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural** , Santa Maria (Cidade opcional), v. 38,

n. 8, p.2103-2108, nov. 2008 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

- 13.** Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).
- 14.** Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.
- 15.** Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.
- 16.** Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.