

**EFEITO DO PROBIÓTICO APÓS TOXICIDADE HEPÁTICA DO DICROMATO DE  
POTÁSSIO EM RATOS**

**REINALDO CAMACHO BEZERRA**

**EFEITO DO PROBIÓTICO APÓS TOXICIDADE HEPÁTICA DO DICROMATO DE POTÁSSIO**  
**EM RATOS**

**REINALDO CAMACHO BEZERRA**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo

636.085  
B574

Bezerra, Reinaldo.

Efeito do probiótico após toxicidade hepática do dicromato de potássio em ratos / Reinaldo Camacho Bezerra. -- Presidente Prudente, 2014.

67 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -- Universidade do Oeste Paulista – Unoeste: Presidente Prudente, SP, 2014.

Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo.

1. Probióticos. 2. Dicromato de Potássio. 3. Intoxicação. I. Título.

**REINALDO CAMACHO BEZERRA**

**EFEITO DO PROBIÓTICO APÓS TOXICIDADE HEPÁTICA 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 obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 21 de Março de 2014.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente – SP

---

Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente – SP

---

Prof. Dr. Vander Bruno Santos  
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios  
Presidente Prudente – SP

## DEDICATÓRIAS

Aos

*Meus pais; Luzia Camacho Ortiz Bezerra e Moisés Aparecido Bezerra, que me deram a vida e todas as oportunidades de crescer como ser humano e profissional.*

As

*Minhas irmãs; Renata Camacho Bezerra e Fernanda Aparecida Camacho Bezerra, que sempre estiveram ao meu lado, me motivando e apoiando sempre que possível.*

Ao

*Meu amigo e irmão Marcos Oliveira Santos, pelas oportunidades e conselhos ao longo de nossa amizade.*

Ao

*Meu amigo e irmão Fernando Borges Ferreira, companheiro de trabalho e grande incentivador, que fez todo o possível para que mais essa qualificação fosse concluída.*

A

*Minha Amiga e Professora Dra. Gisele Alborghetti Nai, que demonstrou um carinho enorme em ajudar durante a pesquisa, com seus conhecimentos infinitos e palavras de incentivo.*

Ao

*Meu Orientador Professor Doutor Paulo Eduardo Pardo, amigo de todos os momentos. Por confiar na pesquisa e orientar de forma eximia.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo, que esteve ao meu lado em todos os momentos, não medindo esforços para que eu pudesse concluir a pesquisa.*

*A Professora Dra. Gisele Alborghetti Nai, que nunca mediu esforços para orientar e aconselhar durante a pesquisa.*

*A Professora Dra. Cecilia Braga Lapozi, por contribuir com sua experiência e inteligência durante o processo de qualificação.*

*Ao Prof. Dr. Rogério Giuffrida, pelas orientações e contribuições frente as análises estatísticas.*

*Aos Funcionários do Laboratório e Biotério em especial Willian, Graziela e Lucas que acompanharam todo o processo experimental.*

*Aos Alunos de Graduação da Medicina Marcelo Wainer Motta Abdelnour e Karen Cristine da Silva, pela colaboração durante o experimento.*

*Ao Prof. Dr. Vander Bruno Santos, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios*

*Presidente Prudente – SP, por ter aceito o convite como banca examinadora e contribuir com seus conhecimentos durante a defesa.*

*A Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, e a todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, pelos anos fecundos.*

A todos, meu Obrigado eterno.

*“Nas grandes batalhas da vida,  
O primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”*

***Mahatma Gandhi***

## RESUMO

### **Efeito do probiótico após toxicidade hepática do dicromato de potássio em ratos**

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<sup>-1</sup>) no tecido hepático, após suplementação com probiótico em dosagens 0 ou 0,2%, em 90 ratos machos. A ingestão oral por 90 dias de doses crescentes de dicromato de potássio produziu sinais clínicos de toxicidade frente a análise histopatológica ( $p < 0,05$ ) e atividades séricas enzimáticas ( $p < 0,05$ ), dos marcadores de função hepática. A inclusão do probiótico na dieta 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 e suas dosagens, para minimizar e/ou impedir a ação desses xenobióticos nos homens e animais.

**Palavras-chave:** Crômio VI; Intoxicação; Alimentos funcionais; Atividade sérica enzimática; Histopatologia; Ratos.

## ABSTRACT

### **The effects of probiotic after hepatic toxicity of potassium dichromate in rats**

This work aims to evaluate the alterations, depending on the dose of potassium dichromate (0, 12, 24 and 36 mg.km<sup>-1</sup>), in liver tissue after supplementation with probiotic at dosages 0 or 0.2% in 90 male rats. Oral ingestion done for 90 days of increasing amounts of potassium dichromate produced clinical signs of toxicity compared to histopathological analysis ( $p < 0.05$ ), and seric enzymatic activities ( $p < 0.05$ ), markers of hepatic function. The inclusion of probiotics to the diet reduced the effects on the studied parameters, indicating that it can be used to detoxify and/or prevent the action of the mineral, however other studies should be conducted to determine the most appropriate microorganisms and their dosages to minimize and/or to prevent the action of these xenobiotics in humans and animals.

**Keywords:** Chromium VI; Intoxication; Functional food; Seric enzymatic activity; Histopathology; Rats.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	11
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1 Crômio.....	12
3.1.1 Características físico-químicas.....	12
3.1.2 Produção e obtenção.....	12
3.1.3 Uso do produto.....	13
3.1.4 Principais tipos de exposição ocupacionais.....	13
3.1.5 As concentrações de crômio na natureza.....	13
3.1.6 No homem e animais.....	14
3.1.7 Toxicinética.....	15
3.1.8 Forma de atuação e danos à saúde causados por cromato.....	16
3.2 Alimentos Funcionais e Probióticos.....	18
3.2.1 Mecanismos de Ação.....	20
3.2.1.1 Exclusão competitiva.....	22
3.2.1.2 Antagonismo direto.....	23
3.2.1.3 Estímulo ao sistema imune.....	24
3.2.1.4 Propriedades anticarcinogênicas.....	25
3.2.1.5 Neutralização de enterotoxinas.....	26
3.2.2 Vantagens e limitações.....	27
REFERÊNCIAS.....	29
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	40
ANEXO A – Aprovação do trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).....	60
ANEXO B – Normas de Publicação da Revista Científica a qual o artigo foi submetido.....	61

## 1 INTRODUÇÃO

O cromo (Cr) é um elemento que ocorre naturalmente, e em abundância na crosta terrestre (WITT, et al 2013), sendo um dos elementos essenciais que desempenham papel no metabolismo de glicose e lipídeos, podendo existir em vários estados de valência, porém o Cr (III)  $\text{Cr}^{+3}$  e Cr (VI)  $\text{Cr}^{+6}$  são as formas de maior significado biológico (ASLAM, et al 2013).

Na natureza, o  $\text{Cr}^{+3}$  em pequenas quantidades é considerado um elemento essencial para a vida humana (NEILL, et al 2012). Já o  $\text{Cr}^{+6}$ , segundo a (UNITED STATES. Environmental Protection Agency (2003) não ocorre naturalmente, sendo considerado um contaminante, proveniente de fontes antropogênicas. Vindo a ser classificado como potente agente oxidante, muito instável, tóxico, irritante e carcinogênico para humanos e animais (STASINAKIS; THOMAIDIS; LEKKAS, 2003; BREMER NETO, et al., 2005; MUNIZ; OLIVEIRA-FILHO, 2006).

O dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) é a forma mais tóxicas do cromo (VI) (FUJIKAWA, 2002; SEDMAN et al., 2006), onde a administração do Cr ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) em animais de experimento causa toxicidade nos pulmões, fígado, rins, intestino e pele, e tem sido classificado como agente tóxico e metal carcinogênico (SELLAMUTHU et al. 2011).

Alguns microorganismos vivos, definidos como probióticos, mostraram atividade antioxidante (SINGH; GUPTA; GUPTA, 2007) e captadora de radicais livres (GETOFF, 2007), o que pode minimizar e/ou impedir o efeito tóxico de contaminantes. Dessa forma os probióticos podem ser definidos como suplementos alimentares que contém microorganismos vivos, que administrados em quantidades adequadas, produzem efeitos benéficos para saúde do hospedeiro (ALMEIDA, et al. 2013).

As bactérias do ácido láctico são as principais representantes dos probióticos em alimentos e produtos farmacêuticos e dentre essas podemos incluir muitas espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e ainda alguma cepas não patogênicas da *Escherichia coli* (PARDO; REIS, 2008; ALMEIDA, et al. 2013).

## 2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de proteção hepática do probiótico em ratos, alimentados com rações contendo doses crescentes de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ).

## 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<sup>-1</sup>, 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 trivalentes 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 o oxigênio (SCHIRMER et al., 2009). Sendo obtido do mineral cromita (FeOCr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 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/cm<sup>3</sup>) de 2.676, insolúvel em álcool e solubilidade em água de 15,1 g/100 g H<sub>2</sub>O a 25°C (HARMEL, 2004; LEWIS, 2007; LIDE, 2008).

#### 3.1.2 Produção e obtenção

Em relação à facilidade de se encontrar o crômio em diferentes valências, a forma trivalente (Cr<sup>+3</sup>) é natural no meio ambiente, enquanto a hexavalente (Cr<sup>+6</sup>) e a valência zero (Cr<sup>+0</sup>) 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, óxidos, metal e ligas) (STERN, 1982)

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

Reações de oxidação e redução podem converter  $\text{Cr}^{+3}$  para  $\text{Cr}^{+6}$  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 (KÓTAS, 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 (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 de aço inoxidável e soldagem de fitas magnéticas, entre outros (GÓMEZ; GALLAO, 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 de soldagem), ao ácido de crômio (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  $\text{ug.m}^{-3}$ , na água do mar as concentrações encontradas foram menores que 1  $\text{ug.L}^{-1}$  e nas águas de rios as concentrações estão entre 1 e 10  $\text{ug.L}^{-1}$ , sendo que o nível permitido em água potável é de 50  $\text{ug.L}^{-1}$ . No solo, o crômio é

encontrado como óxido de crômio, em concentração que varia o nível de traços até 250 mg.Kg<sup>-1</sup> para Cr<sup>+6</sup> (GALVÃO; COREY, 1987).

No ambiente aquático o crômio existe nos estados (Cr<sup>3</sup>) e hexavalente (Cr<sup>6</sup>) 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 maior na presença de íons de crômio (UNDERWOOD, 1971).

Foram relatados 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 et al., 2002; DEBSKI et al., 2004; KUÇUKBAY et al., 2006).

Mertz (1969) constatou que 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 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; KAROTKIM, 1935; PARTINGTON, 1950; KAUFMAN; DINICOLA; McINTOSH, 1970; SHARMA; SINGHAL; CHUCH, 1978; ISERSON, 1983; CLOCHESY, 1984; HANTSON et al., 2005) e dicromato de amônia (REICHELDERFER, 1968; HASAN, 2007). Apresentações clínicas de pacientes após exposição aguda a altas doses foi similar, independente da espécie de composto de crômio 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, hemólise intravascular; toxicidade hepática (hepatomegalia, icterícia, bilirrubina sanguínea elevada e aumento das atividades das enzimas hepáticas); falência renal (oligúria e anúria); cianose, acidose metabólica, hipotensão e choque. Achados de biópsia de tecidos incluíram degeneração gordurosa e necrose hepática e degeneração e necrose dos túbulos renais (REICHELDERFER et al., 1999).

Baseado na estimativa da quantidade de cromo hexavalente ingerido, o intervalo de doses letais por cromo hexavalente em humanos é de aproximadamente 4,1 a 357 mg de cromo hexavalente/kg de peso (KAUFMAN; DINICOLA; McINTOSH, 1970; ISERSON, 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 evidência de possível associação entre 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 et al., 2009).

Evidências de carcinogenicidade em animais foram fornecidas pela National Toxicology Program (NTP, 2008) em bioensaios conduzidos em ratos e hamsters. Nesse estudo, ratos foram expostos ao dicromato de sódio hidratado na água de beber 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 de 5,9 e 7,0 mg de cromo hexavalente/Kg dia em machos e fêmeas, respectivamente).

NTP (2008) também expôs hamsters ao dicromato de sódio hidratado na água em 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 cromo hexavalente/kg dia, respectivamente.

### **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  $\text{Cr}^{+6}$  é considerado perigoso para a saúde pública devido as 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; BACHA et al., 2008).

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 pesados ou compostos de 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,  $\text{Cr}^{+6}$  existe principalmente em formas de cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ), dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) e cromato de hidrogênio ( $\text{HCrO}_4^-$ ). Em solução básica ocorre a predominância da espécie  $\text{CrO}_4^{2-}$  e em soluções extremamente ácidas com valores de pH compreendida entre 2 e 6, predominam as espécies  $\text{HCrO}_4^-$  e  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  (OWLAD et al., 2010).

Um dos parâmetros importantes 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 –  $\text{DL50} = 25 \text{ mg.Kg}^{-1}$  (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 ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) 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 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 10mg.kg<sup>-1</sup> de Cr<sup>+6</sup> na ração afetaram o trato gastrointestinal, os rins e o sistema hematológico, além disso, há evidências suficientes de que determinados compostos hexavalentes de crômio são carcinogênicos para animais experimentais e os efeitos crônicos da exposição ao crômio ocorrem no pulmão, no fígado, nos rins, no trato gastrointestinal e no sistema circulatório (THE INTERNATIONAL PROGRAME ON CHEMICAL SAFETY, 1988).

Algumas investigações *in vitro* e em humanos sobre o Cr<sup>+6</sup> induzir a metilação do DNA foram realizados. Foi relatado que a exposição ao dicromato de potássio foi capaz de induzir a metilação do gene promotor *trngene 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 no genoma da sequência 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., ALI et al., 2011).

Mais interessantemente, Kondo et al., 2006 descobriram que mais de 80% dos cânceres de pulmão por cromato mostraram supressão da proteína p16. Portanto foi sugerido que a metilação da p16 está estreitamente associada 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 CDK4/6, 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 70mg.kg<sup>-1</sup> 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 cromo, 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 cromo, na presença de redutores celulares (DARTSCH et al., 1998; SUGIYAMA, 1991), a interação dos radicais livres com as proteínas das membranas e intracelulares modificando os processos de reabsorção e secreção de diferentes substâncias nos túbulos renais (KIRSCHBAUM et al., 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 a 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 et al., 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 evidência clínica e objetivando suportar alguns dos benefícios atribuídos ao uso destes agentes. O seu amplo consumo e potencial terapêutico tem 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 (RAO et al, 2009; OELSCHLAEGER, 2010).

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

Pode se dizer que história dos probióticos iniciou-se há 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 uma forma mais racional (GHADBAN, 2002).

Em 1907, um pesquisador russo chamado Elie Metchnikoff, professor do Instituto Paster em Paris, demonstrou que a ingestão de leite fermentado melhora a saúde humana após observar longevidade dos 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 com *Lactobacillus bulgaricus* (BIOTECNAL, 1999).

A partir daí muitos estudos começaram a ser realizados com o intuito de explicar os efeitos benéficos oriundos da ingestão de produtos fermentados (BUTOLO, 1999), e em 1965, Lily e Stilwell 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 geralmente 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 *Saccharomyces*. Assim dentre os probióticos mais utilizados na alimentação humana e animal estão às bactérias ácidos 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 de 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 em 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 e GIL-TURNES, 2004; CHEN; WALKER, 2005).

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 de 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 uma aumento nos 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 ao 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 dos hospedeiro (HORMANNSPERGER; HALLER, 2010).

Outros possíveis efeitos dos probióticos são a sua atuação na prevenção do 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 fundamental no controle da pressão sanguínea. Estudos clínicos e com animais documentaram efeitos anti-hipertensivos com a ingestão de probiótico (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 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 cólon distal, onde existe menor quantidade de resíduos alimentares em relação ao cólon 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; TAMINE, 2002; CHEN; WALKER, 2005).

Jin et al. (1997) relataram diversos estudos em que a alimentação de frangos com *Lactobacillus* resultou em menor número 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 de aderência dos probióticos a sítios de ligação no epitélio intestinal competindo com outras bactérias. A competição por nutrientes disponíveis é muitas vezes citada como 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 a 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 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 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 dos intestinos 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 deste, maior é 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 probióticos podem produzir e liberar compostos como as bacteriocinas ácidos orgânicos, que são ácidos graxos voláteis de cadeia curta (propiônico, acético, butírico, lácteo) 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 bacterionas descrita, entre elas temos a reuterina, uma substância de baixo peso molecular, produzida pelo *L. reuteri*. Tanto lactobacilos quanto bifidobactérias são capazes de produzir esses elemento (FOOKS; GIBSON, 2002).

Chateau et al. (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 celular T e a produção de interferon, e relacionar este mecanismo a dois gêneros de bactérias, as *Lactobacillus* e as *Bifidobactérium* (ISOLAURI et al., 2001; PELUSO et al., 2007).

Alguns gêneros de bactérias intestinais como o *Lactobacillus* e *Bifidobactérium* estão diretamente relacionados com o aumento da resposta imune. Jin et al. (2997) e Leedle (2000) revisaram o assunto, indicando efeitos no aumento da produção anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de célula 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 tem 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 de atividade da flora intestinal. Eles exercem efeitos protetores por vários mecanismos imunes e não imunes (LEBEER et al., 2008), exercendo diretamente atividade antimicrobiana contra patógenos (SERVIN, 2004), aumentando a fagocitose (De LeBLANC; CASTILLO; PERDIGON, 2010; VIZOSO PINTO et al., 20096) 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 utliizados 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 todas as seis linhagens para a produção de TNF-a em quantidades variáveis.

Chung et al., (2009), trabalhando com cães de setes 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 resultado, 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 de controle, concluindo que o probiótico potencializou o efeito da vacina.

Em um trabalho recente utilizando diferentes dosagens de probióticos em diferentes fases de criação (inicia, crescimento e terminação) de frangos de corte, Taklimi 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 de controle, evidenciando que o probiótico teve um efeito positivo melhorando os 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 nos 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 agentes probióticos podem estar associados a 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 fagocitárias, a síntese do 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 nas condições físico-químicas do cólon com a diminuição do pH e efeitos sobre a fisiologia do hospedeiro.

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

### **3.2.1.5 Neutralização de enterotoxinas**

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

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

Segundo Williams et al. (1991), o papel de um microrganismo probiótico é manter o balanço da microflora entérica em favor de espécies não patogênicas, eliminando as patogênicas. A maior parte das bactérias se adere a superfície intestinal via fimbria bacteriana. O componente da fimbria 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 atividade de um probiótico é a de que um organismo probiótico compete com bactérias 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 do intestino (TANNOCK et al., 1996).

### 3.2.2 Vantagens e limitações

Apesar de sua ação não estar completamente esclarecida, estudam citam algumas vantagens e limitações decorrentes do uso de probióticos. Dentre as vantagens da utilização de 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 dos hospedeiros; 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 antibiótico e não apresentam propriedades mutagênicas e são anticarcinogênicos e resistem a fagos de oxigênio (ROLFE, 2000; SALMINEN; NURMI; GUEIMONDE, 2005; SNELLING, 2005; NICOLAS et al., 2007).

Além disso, a maior vantagem da utilização de 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 gastrointestinal, 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 (SALMINEN; NURMI; GUEIMONDE, 2005; NICOLAS et al., 2007).

Numerosas vantagens para saúde são associadas ao uso de probióticos, principalmente relacionadas às patologias digestivas, urogenitais e também atopia. Devemos levar em consideração que alguns benefícios estão mais bem documentados do que os 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; COHRSSSEN, 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 do probióticos (WILLIANS, 2010).

## 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.
- ALMEIDA, L.E. et al. Utilização de probiótico sobre o ganho de peso em bovinos da raça nelore. **Colloquium Agrariae**, v.9, n.1. 2013.
- ANDERSON, R.A.J. Chromium, glucose intolerance and diabetes. *J. Am. Coll. Nutr.*, v.17, n.6, p.548-55,1998.
- ARAYA, H.; LUTZ, M. R. Alimentos funcionales e saludables. **Rev. Chil. Nutr.**, v. 30,n. 1, p. 8-14, 2003.
- ASLAM, M. et al. Nephroprotective Effects os Methanolic Extract of Peucedanum grandeagainst Acute Renal Failure Induced by Potassium dichromate in rats. **International Journal of Pharmaceutical Science and Drug Research**. V.5(2), p.45-49,2013.
- BADARÓ, A. C. L. et al. Alimentos probióticos: aplicações como promotores de saúde humana: parte 2. **Revista Nutrir Gerais**, v. 3, p .2, 2009.
- BALAKRISHNAN, R. et al. antioxidant activity of coated probiotic lactobacillus casei on chromium (vi) induced oxidative stress in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India. Section B: Biological Sciences**, p. 1-6, 2013.
- BARCELOUX, D.G. Chromium. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v.37, n.2, p.173-194,1999.
- 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.
- 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.I.], 1999.
- BLADE, L.M. et al. Hexavalent chromium exposures-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 de crômio em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado a 1,5-difenilcarbazida. **Ciência Rural**. V.35,p.691-697, 2005.

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

CASTRO J. C. Uso de aditivos probióticos em rações animais. In: FERREIRA, C.M. et al. (Org.). **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 comercial probiotic consortium. **J. Appl. Bacter.**, v. 74, p. 36-40, 1993.

ChemDAT, The Merck Chemical Database, Merck KGaA: Darmstadt, 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

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.

CLOCHESY, 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: a reposta 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 ins humans. **Crist. Ver. Toxicol.**,v.36, n.2,p.155-163,2008.

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.

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

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.

De FLORA, S. et al. Genotoxicity of chromium compounds: a review. **Mutat. Res.**,v.238, p.99-172, 1990.

De 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.

De MORENO de LEBLANC, A.; PERDIGON, G. Reduction of beta-glucuronidase and nitroreductase activity by yoghurt in a murine colon cancer model. **Biocell.**, v.29, p.15-24, 2005.

DEBSKI, B. et al. Chromiumyast supplementation of chicken in and indultrial farming system. **J. Trace**.

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. **Jornaul of Public Health Medicine**, v. 22, p. 54-58, 2000.

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

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

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

FRISTEDT, B. et al. Survival in a case of a cute oral chomic acid poisoning with acute renal failure trated 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.

FUJIKAWA, E.S. **Incorporação do resíduo “serragem cromada” em materiais de construção civil**. 2001.80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2002. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>. Acesso em: 15 de Jul., 2013.

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

FULLER, R; COLE, E. C. B. **The scientific bases of the Probiotic concept in probiotics: theory and applicantions**. [S.I.]: Chalcombe Publicantions, 1989. p.1-14.

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

GALVÃO, L.A.C.; COREY, G. Cromo – **Centro Panamericano de Ecologia Humana y Salud**. P.66, 1987.

- GAUDIER, E. et al. The VSL#3 probiotic mixture modifies microflora but doses 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, JR.; GIL-TURNES.C. Probióticos em avicultura. **Ciência Rural**, v.35, p.741-747, 2005.
- GOLDMAN, M.; KARATKIN, 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 Gastrointestinal 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.**, v. 43, n. 2, p. 111-112, 2005.
- HARMEL, V.C. **Padronização de um teste de toxicidade crônica com a bactéria luminescente vibrio fisheri para análise de qualidade de águas superficiais**. 2004. 100f. 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.
- 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.
- HORMANNSPENGER, 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: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1990. v. 49, p. 256.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Overall evaluation of carcinogenicity to humans.** Lists of IARC evaluation. List available, mixture and exposures available to date. Disponível em: <http://www.cie.iarc.fr/monoeval/crthall.html>. Acesso em: 20 jul. 2013.

IERSON, K.V. 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.

KATS, 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.; OLKEN, 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, 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.

KOTAS, J.; STASICKA, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of speciation. **Environ. Pollut**, v.107, n.3, p.263-241, 2000.

KUCUKBAY, F.Z. et al. Effects os dietary chromium picolinate supplementation on serum glucose, cholesterol, and minerals of rainbow trout (*Onchoriyncus 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**, Whashington, v. 188, n. 5, p. 1979-1986, 2006.

LABRA, M. et al. Genect 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 superantigenlike protein by a solute factor from *Lactobacillus reuteri*. **Microbiology**, v. 152, n. 4, p. 1155-1167, 2006.

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. **Amplified and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4233-4240, 2005.

LEBBER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECHER, S. C. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 72, n. 4, p. 728-764, 2008.

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**. Ins: Hawley's condensed chemical dictionary. 152. Ed. New York, NY: Jhon Wiley & Sons, 2007.

LIDE, D.R. Chromium. In: Lide, D.R., ed. **CRC handbook of chemistry and physics**. 79<sup>th</sup> ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1998. p. 4-8.

LILLY, D. M.; STILWELL, R. H. Probiotics growth promoting factors produced by micro-organisms. **Science**, v. 147, p. 447-748, 1965.

LOUBIERES, Y. et al. Acute, fatal oral chromic acid poisoning. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v. 37, n. 3, p. 333-336,1999.

MATOS, P. M. S.; MONTEIRO, J. M. C. T. **Probióticos**. 2010. 10f. 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 necroses fator alpha-inducing activities in macrophages though Toll-like receptor 2. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, p. 259-266, 2003.

MARCO, M. L.; PAVAN, S.; KLEEREBEZEM, M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 17, p. 204-10, 2006.

MERTZ, W. Chromium occurrence and function in biological systems. **Physiol. Rev.**, v. 49, p.163, 1969.

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: Ciência e Saúde.**, v.4, n.1. p.83-100, 2006.

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.

NEILL, L. et al. State of Science of Hexavalent Chromium in Drinking Water. **Water research foundation.** 2012.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. **NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of sodium dichromate dehydrate (CAS No. 7789-12-0) in F344-N rats and B6C3F1 mice: drinking water studies.** Washington, DC: National Toxicology Program; NTP TR 546, 2008. Disponível em: [http://ntp.niehs.nih.gov/files/546\\_web\\_FINAL.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/files/546_web_FINAL.pdf). Acesso em: 21 de Jun, 2013.

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.

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.** Whitehouse Station, NJ: Merck & Co. Inc., 2006.

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

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-Othmer encyclopedia of chemical technology. New York, NY; John Wiley & Sons, v.6, p.526-571, 2004.

PAGE, T.G. et al. Effects 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.

PAMPLONA, R.; COSTANTINI, D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 301, p. R843-R863, 2011.

- PARDO, P. E; REIS, L. S. L. S. Nutrientes e Nutracêuticos em Grandes Animais. In: ANDRADE, S.F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. Capítulo 29, p.808-814. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Rocha Ltda., 2008.
- 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. Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences. Brno, Czech Republic, 52 (1): 1-18, 2007.
- PELUSO, L. et al. Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei B2 1060 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. **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. Probiotics and colon cancer. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.**, v. 17, p. 849-59, 2003.
- RAFTER, J. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 30, p. 497-502, 1995.
- 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.
- REICHELDERFER, T. E. Accidental death of 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.
- SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.
- 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.

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

SCHAEFER, S. Cromo In metais de transição. Tabela periódica online. 2008.  
Disponível em:  
<[http://www.tabela.oxigenio.com/metais\\_de\\_transicao/elemento\\_quimico\\_cromo.htm](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. **VII Semana de Engenharia Ambiental**, campus Irati, junho 2009.

SEDMAN, R. M.; BEAUMMONT, J.; McDONALD, T. A.; KROWECH, G.; HOWD, R. Review of Evidence Regarding the Carcinogenicity of Hexavalente Chromium in Drinking Water. **Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology**.v.24, p 155-182, 2006.

SELLAMUTHU, R; UMBRIGHT, C; CHAPMAN, R; LEONARD, S. Transcriptomics evaluation of hexavalent Chromium toxicity Human. **Journal Carcinogene e Mutagene**.v.2, no.1, p. 1-18, 2011.

SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Review**., v. 28, n. 4, 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.; CHUCH, 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.1447-1753, 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, 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 B.V. 1982. P5.

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.

TAMINE, A. Y. Fermented milks: a historical food with modern applications: a review. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 56, p. 1310, 1996.

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.html>>. 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.

US EPA (U.S. Environmental Protection Agency). (2003). **National primary drinking water regulations**. 40CFR141.62. Disponível em: [http://edocket.access.gpo.gov/cfr\\_2003/julqtr/40cfr141.62.htm](http://edocket.access.gpo.gov/cfr_2003/julqtr/40cfr141.62.htm). Acesso em: 10 de Janeiro, 2014.

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 bacteria**. In: FARNWORTH, E.R., (ed.) Handbook of fermented functional foods. Boca Raton: CRC Press, p.113-144, 2003

UNITED STATES. Environmental Protection Agency. **National primary drinking water regulations**. 2003. 40CFR141.62. Disponível em: <[http://edocket.access.gpo.gov/cfr\\_2003/julqtr/40cfr141.62.htm](http://edocket.access.gpo.gov/cfr_2003/julqtr/40cfr141.62.htm)>. Acesso em: 10 Jan. 2014.

UNDERWOOD, E.J. **Trace elements in human animal nutrition**. 3.ed. New York: Academic Press, 1971. p.424.

VAN DE WATER, J. **Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products that contain lactic 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 *Lactovacillus rhamnosus* GG. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 133, p. 86-93, 2009.

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.

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

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

#### 4. ARTIGO CIENTÍFICO

##### **Efeito do probiótico após toxicidade hepática do dicromato de potássio em ratos**

Effect of probiotic after hepatic toxicity of potassium dichromate in rats

**Reinaldo Camacho Bezerra<sup>1</sup>; Karen Cristine Silva<sup>2</sup>; Paulo Eduardo Pardo<sup>3</sup>; Gisele Alborghetti Nai<sup>3</sup>; Hermann Bremer-Neto<sup>3</sup>; Rogério Giuffrida<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Discente do Mestrado em Ciência Animal – Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente – SP.

<sup>2</sup> Discente da Faculdade de Medicina de Presidente Prudente (FAMEPP) – UNOESTE.

<sup>3</sup> Docente do 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<sup>-1</sup>) no tecido hepático, após suplementação com probiótico em dosagens 0 ou 0,2%, em 80 ratos machos. A ingestão oral por 90 dias de doses crescentes de dicromato de potássio produziu sinais clínicos de toxicidade frente a análise

---

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

histopatológica ( $p < 0,05$ ) e atividades séricas enzimáticas ( $p < 0,05$ ), dos marcadores de função hepática. A inclusão do probiótico na dieta 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 e suas dosagens, para minimizar e/ou impedir a ação desses xenobióticos nos homens e animais.

**Palavras-chave:** Crômio VI; Intoxicação; Alimentos funcionais; Atividade sérica enzimática; Histopatologia; Ratos.

#### **ABSTRAT**

This work aims to evaluate the alterations, depending on the dose of potassium dichromate (0, 12, 24 and 36 mg.km<sup>-1</sup>), in liver tissue after supplementation with probiotic at dosages 0 or 0.2% in 80 male rats. Oral ingestion done for 90 days of increasing amounts of potassium dichromate produced clinical signs of toxicity compared to histopathological analysis ( $p < 0.05$ ), and seric enzymatic activities ( $p < 0.05$ ), markers of hepatic function. The inclusion of probiotics to the diet reduced the effects on the studied parameters, indicating that it can be used to detoxify and/or prevent the action of the mineral, however other studies should be conducted to determine the most appropriate microorganisms and their dosages to minimize and/or to prevent the action of these xenobiotics in humans and animals.

**Keywords:** Chromium VI; Intoxication; Functional food; Seric enzymatic activity; Histopathology; Rats.

## INTRODUÇÃO

O crômio (Cr) é um elemento que ocorre naturalmente, e em abundância na crosta terrestre (WITT, et al 2013), sendo um dos elementos essenciais que desempenham papel no metabolismo de glicose e lipídeos, podendo existir em vários estados de valência, porém o Cr (III)  $\text{Cr}^{+3}$  e Cr (VI)  $\text{Cr}^{+6}$  são as formas de maior significado biológico (ASLAM, et al 2013).

Na natureza, o  $\text{Cr}^{+3}$  em pequenas quantidades é considerado um elemento essencial para a vida humana (NEILL, et al 2012). Já o  $\text{Cr}^{+6}$ , segundo a *Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos* (2003) não ocorre naturalmente, sendo considerado um contaminante, proveniente de fontes antropogênicas. Vindo a ser classificado como 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 dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) é a forma mais tóxicas do crômio (VI) (FUJIKAWA, 2002; SEDMAN et al., 2006), onde a administração do Cr ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) em animais de experimento causa toxicidade nos pulmões, fígado, rins, intestino e pele, e tem sido classificado como agente tóxico e metal carcinogênico (SELLAMUTHU et al. 2011).

Alguns microorganismos vivos, definidos como probióticos, mostraram atividade antioxidante (SINGH et al., 2007) e captadora de radicais livres (GETOFF, 2007), o que pode minimizar e/ou impedir o efeito tóxico de contaminantes. Dessa forma os probióticos podem ser definidos como suplementos alimentares que contém microorganismos vivos, que administrados em quantidades adequadas, produzem efeitos benéficos para saúde do hospedeiro (ALMEIDA, et al. 2013).

As bactérias do ácido lático são as principais representantes dos probióticos em alimentos e produtos farmacêuticos e dentre essas podemos incluir muitas espécies de

*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e ainda alguma cepas não patogênicas da *Escherichia coli* (PARDO & REIS, 2008; ALMEIDA, et al. 2013).

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de proteção hepática do probiótico em *ratos* Wistars, alimentados com rações contendo doses crescentes de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ).

## MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 80 ratos albinos da linhagem Wistar, machos jovens, com 21 a 25 dias, e 30 a 45g de peso corporal. Os animais foram oriundos de ninhadas de fêmeas que também receberam dieta basal na quantidade de 30 gramas/animal/dia. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, sob as mesmas condições de padrão de iluminação (ciclo claro/escuro de 12/12 horas) e com temperatura em torno de 23°C (MERUSSE & LAPICHIK, 1996).

O experimento teve duração de 97 dias, sendo 7 dias para adaptação ao manejo, e 90 dias aos tratamentos. A ingestão média diária da ração de cada rato foi de 30 gramas. Onde a distribuição dos animais nos grupos, está representada na Tabela 1 e a Tabela 2 descreve a composição da dieta empregada.

**Tabela 1.** Representação das dietas ofertadas aos diferentes grupos durante o experimento.

Grupos	Nº de animais	Crômio	Probiótico	Característica
<b>G1</b>	10	<i>Ausente</i>	<i>Ausente</i>	<i>Controle</i>
<b>G2</b>	10	12 mg.kg <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	<i>Ausente</i>	<i>Agressão</i>
<b>G3</b>	10	24 mg.kg <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	<i>Ausente</i>	<i>Agressão</i>
<b>G4</b>	10	36 mg.kg <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	<i>Ausente</i>	<i>Agressão</i>

<b>G5</b>	10	<i>Ausente</i>	0,2 % Probiótico	<i>Controle</i>
<b>G6</b>	10	12 mg.kg <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0,2 % Probiótico	<i>Agressão/Tratamento</i>
<b>G7</b>	10	24 mg.kg <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0,2 % Probiótico	<i>Agressão/Tratamento</i>
<b>G8</b>	10	36 mg.kg <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0,2 % Probiótico	<i>Agressão/Tratamento</i>

**Tabela 2.** Fabricantes dos compostos utilizados para confecção das dietas.

<b>Componentes</b>	<b>Fabricante – Procedência</b>
<b>Dieta Basal</b>	Ração SupraLab. Brasil.
<b>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (12, 24 e 36 mg.kg<sup>-1</sup>)</b>	Aldrich Chemical Company Inc.; Milwaukee, Wisconsin – USA.
<b>Probiótico 0,2 %</b>	Proenzyme <sup>®</sup> produzido por Empresa Brasileira de Aumento de Produtividade Pecuária – EMBRAUPEC, Paranavaí, PR – Brasil.

As dietas sólidas e hídras foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental.

Após o período experimental, os animais foram anestesiados com Tiopental (Thiopentax, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. – São Paulo/SP - Brasil), na dose de 30mg/kg de peso vivo, por via intraperitoneal, e amostras de sangue de todos os ratos foram colhidas por punção intracardíaca, e depositadas em tubos secos para realização dos parâmetros bioquímicos conforme preconizado (PAIVA et al, 2005). Foram determinados os seguintes marcadores de função hepática: Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), Fosfatase Alcalina (ALP) e Gama Glutamiltransferase (GGT). Os parâmetros bioquímicos foram dosados através do analisador automatizado bioPLUS, modelo Bio200F. Após coleta das amostras de sangue, os animais foram eutanasiados, por injeção de 2mg/kg de Tiopental (Thiopentax Cristália – Produtos Químicos Farmacêutico Ltda. – São Paulo/SP - Brasil). Após a abertura da parede abdominal, foi colhido o fígado para análise histopatológica, o qual foi fixado em solução de formol a 10% (Cinética Industrial Química, São Paulo, Brasil) durante 24 horas à temperatura ambiente. Após a fixação, desidratação e

diafanização, as peças foram incluídas em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticas, São Paulo, Brasil) e seccionadas em espessura de 4 µm, os quais foram corados com hematoxilina-eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil). A análise histopatológica foi cega e realizada por um avaliador (GAN) utilizando-se microscópio óptico comum (NIKON Labophot, Japão) e avaliou-se os seguintes parâmetros, com seus respectivos escores: Congestão Tecidual (0=Ausente, 1=Leve, 2=Moderada e 3=Intensa), Intensidade do Infiltrado Inflamatório (0=Ausente, 1=Leve, 2=Moderada e 3=Intensa), Necrose (0=Ausente, 1=Focal, 2=Em saca bocada e 3=Em Ponte), Colestase (0=Ausente e 1=Presente); Esteatose Microvesicular (0=Ausente, 1=Focal, 2=Difusa) e Macrovesicular (0=Ausente, 1=Focal, 2=Difusa), Células de Kupffer (0=Normal, 1=Aumentada e 2=Muito Aumentada) e Neoplasia (0= Ausente, 1=Benigna e 2=Maligna) .

As comparações estatísticas para a análise histopatológica foram realizadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido dos contrastes de Dunn para comparação entre grupos adotando significância de  $p < 0,05$ . Já as comparações estatísticas das atividades séricas enzimáticas foram realizadas pelo teste não paramétrico de Levene seguido de ANOVA com contrastes de Tukey ou Games-Howell adotando significância de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Durante 90 dias de experimento não houve nenhum caso de morte entre os animais, estando estes resultados de acordo com os obtidos por NTP (National Toxicology Program) (2007).

No presente estudo, os animais que tiveram adição à ração basal de 12 mg.kg<sup>-1</sup>, 24 mg.kg<sup>-1</sup> e 36 mg.kg<sup>-1</sup> de dicromato de potássio revelaram sinais clínicos de embotamento atribuídos a 90 dias de exposição ao Cr<sup>+6</sup>, conforme descrito por Priti et al. (2012).

Dois animais do grupo (G3) na qual foi adicionado 24 mg.kg<sup>-1</sup> de dicromato de potássio sem adição de probiótico e quatro no grupo (G4) na qual foi adicionado 36 mg.kg<sup>-1</sup> apresentaram sintomas de apatia, letargia e diarreia, corroborando com os relatos em ratos por Priti et al. (2012), em seres humanos por Zhang & Li (1987) e em coelhos por Tyl et al. (1991), após a exposição ao Cr<sup>+6</sup>. Segundo Saryan & 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.

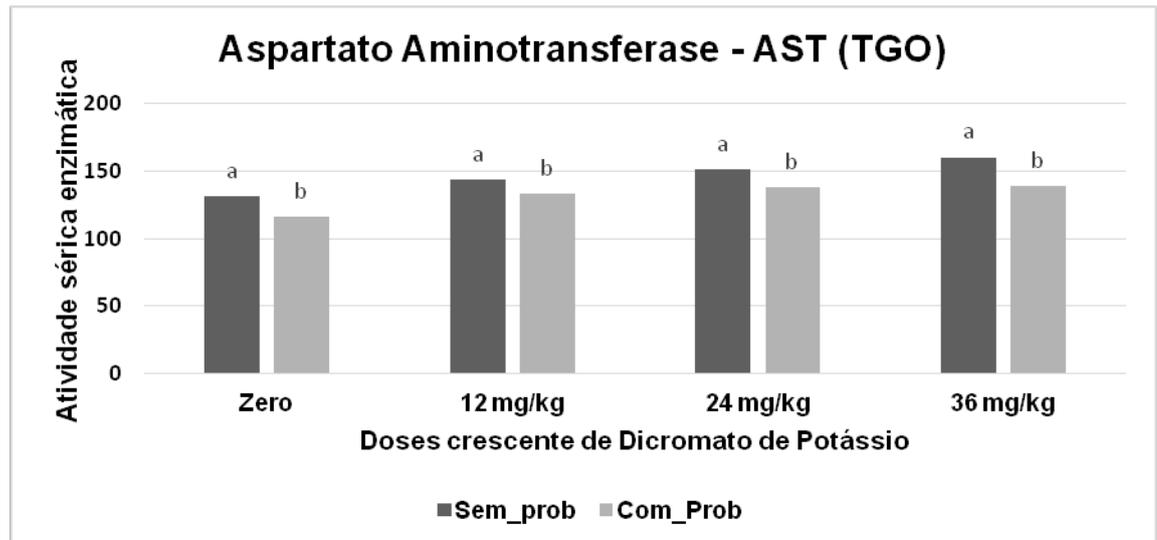
Os grupos que receberam doses crescentes de Cr<sup>+6</sup>, incorporado a 0,2% de probiótico Proenzime<sup>®</sup>, não apresentaram sintomas de embotamento, apatia, letargia e ou diarreia, indicando que esse produto diminuiu a absorção do Cr (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) e protegeu a mucosa gastrointestinal dos efeitos corrosivos e irritantes do crômio.

Os resultados das análises das atividades séricas enzimáticas de função hepática (AST, ALT, FA ou ALP e GGT) estão apresentados nas Figuras 1 a 4, enquanto a análise histopatológica tem sua representação expressa na Figura 5.

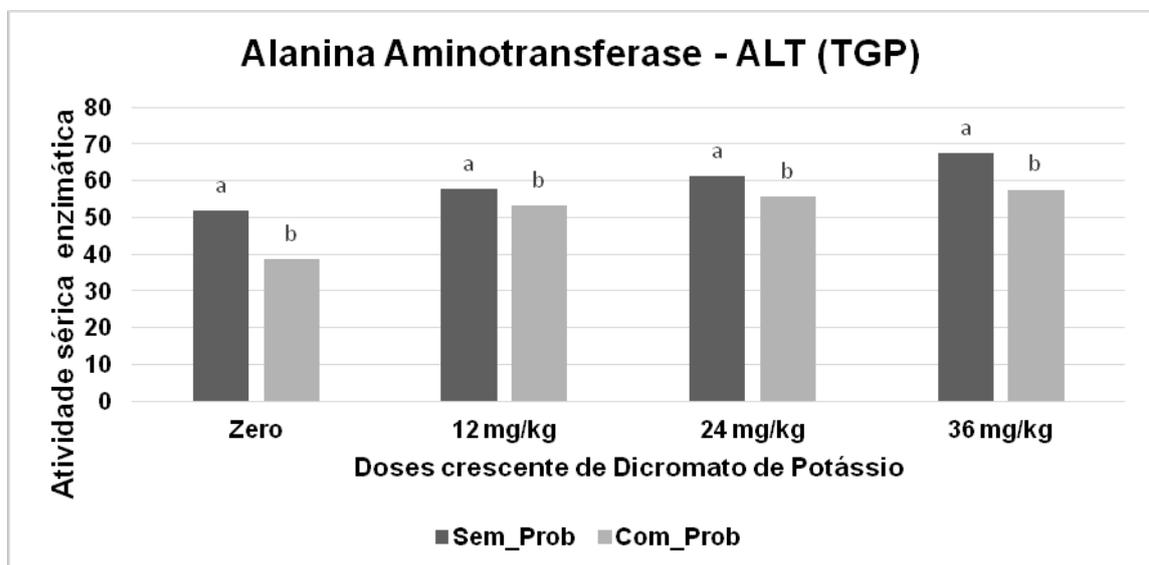
Segundo Brochers et al. (2009), o papel das bactérias probióticas na melhora da imunidade, pode ser explicada por meio da atividade de desintoxicação desses microorganismos, pois agora existe evidências substanciais de que podem proporcionar benefícios modulando as funções imunológica, antipatogênica e anti-inflamatória (ADOLFSSON et al, 2004), possivelmente influenciando as funções metabólica, imunológica e protetora do cólon (ROBERFROID et al. 1995).

No presente estudo, quando os animais receberam dietas com ração incorporada a doses crescentes de dicromato de potássio, ocorreu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos valores de AST, ALT, ALP e GGT conforme as figuras de 1 a 4 em relação ao grupo controle, que recebeu somente probiótico. Esses resultados reportam os observados em ratos por Acharya et al. (2001) para AST e ALT, porém esse estudo não obteve os mesmos resultados quanto ao parâmetro GGT, possivelmente pelo menor tempo de experimento.

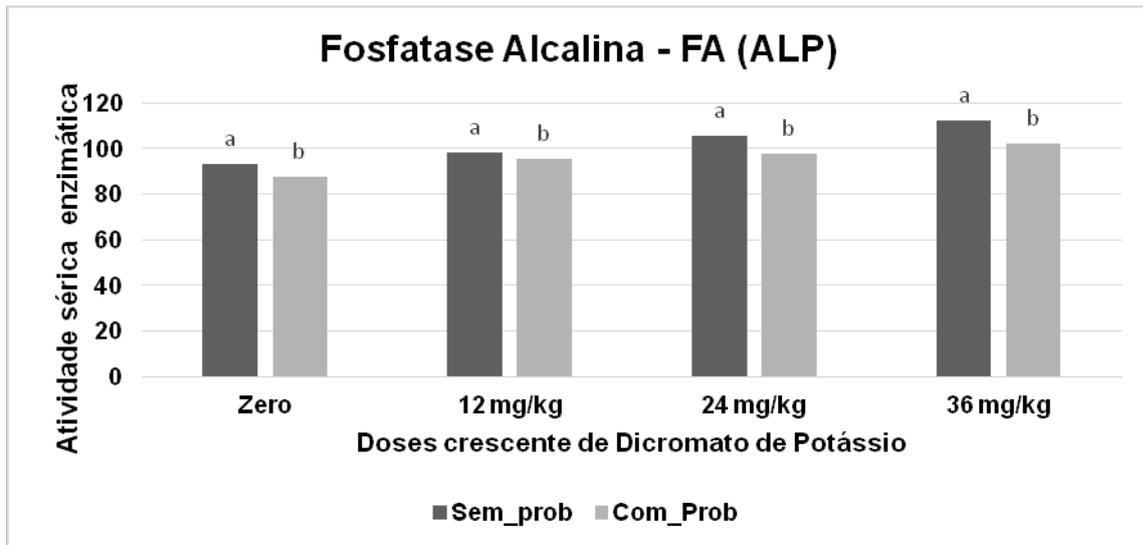
Funções do coração e fígado foram também avaliados por Islam et al. (2004) e Mustari & Ahmad (2011) e obtiveram resultados semelhantes ao nossos em relação aos parâmetros AST e ALT, em ratos suplementados com probiótico. Segundo eles o parâmetro bioquímico AST está amplamente distribuído em vários órgãos, tais como o coração e músculos esqueléticos, bem como no fígado, enquanto o ALT existe principalmente no fígado. A ALT e AST são geralmente utilizados como marcadores de dano hepático (RAZA et al., 2002; HAYES, 2007).



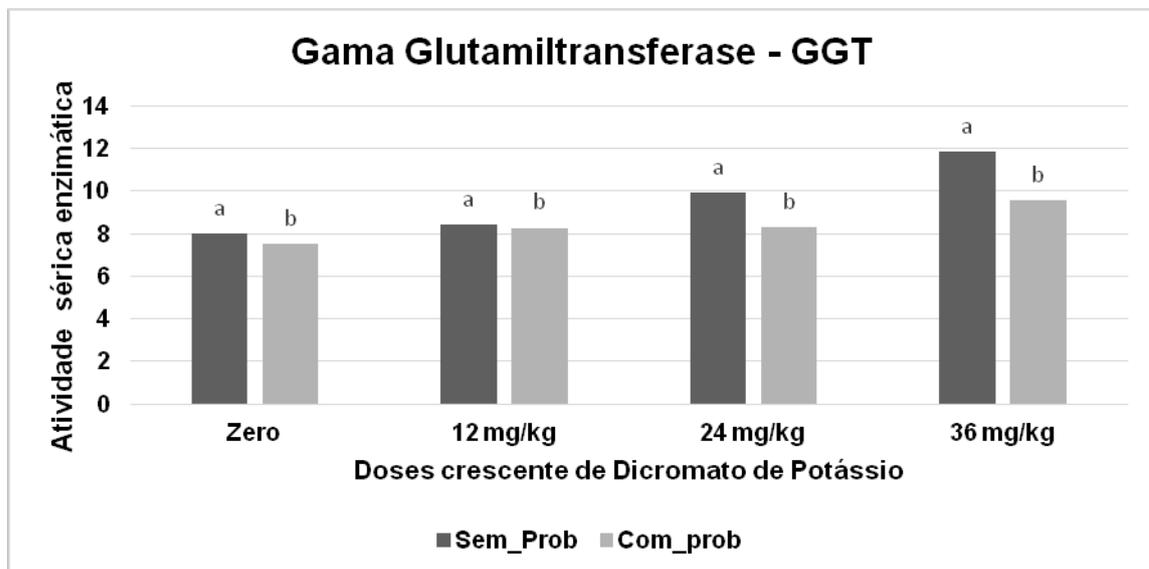
**Figura 1.** Atividade sérica AST nas diferentes doses. Resultados com diferentes sobrescritos diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.** Atividade sérica ALT nas diferentes doses. Resultados com diferentes sobrescritos diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Atividade sérica ALP nas diferentes doses. Resultados com diferentes sobrescritos diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Atividade sérica GGT nas diferentes dietas. Resultados com diferentes sobrescritos diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

Na análise histopatológica, em relação ao infiltrado inflamatório, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 5B), assim como para necrose

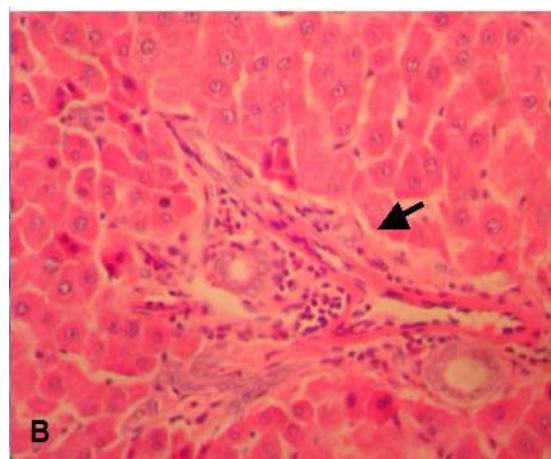
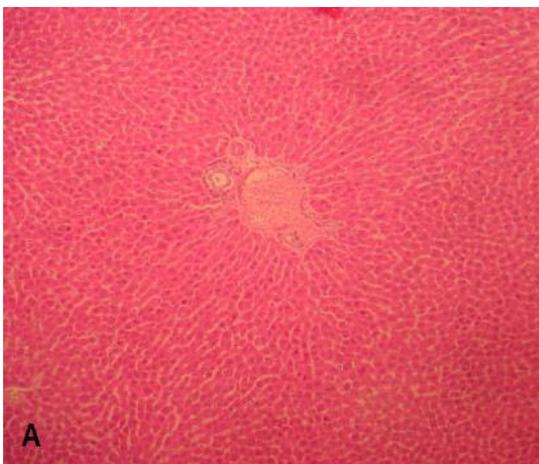
hepatocelular ( $p>0,05$ ) (Figuras 5D). Estes resultados não corroboram com o estudo de Soudani (2013), que obteve resultados significativos ( $p<0,05$ ) para esses parâmetros, fato possivelmente explicado pela maior dosagem de dicromato de potássio utilizada em seu trabalho.

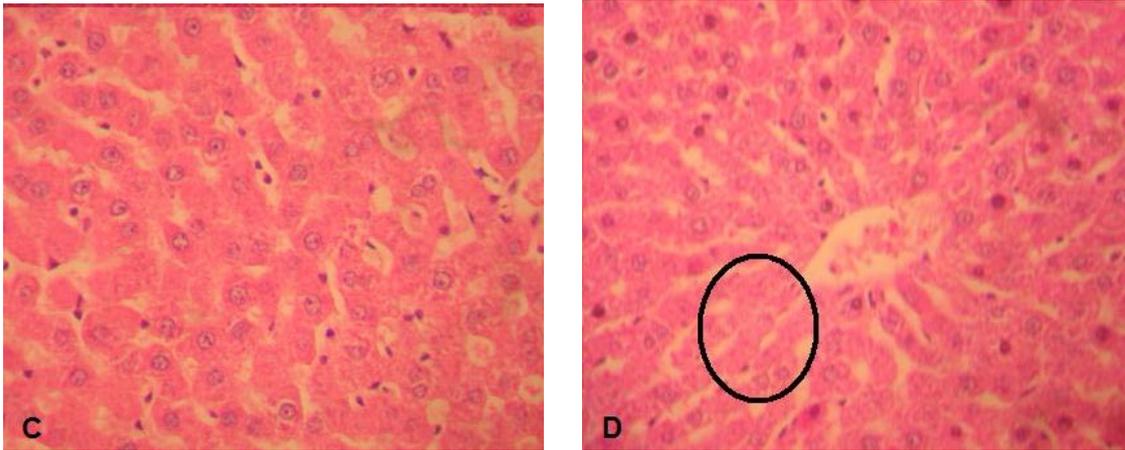
Com relação a congestão tecidual, houve um aumento significativo ( $p<0,05$ ) para os grupos que tiveram dieta acrescida de dicromato de potássio em doses crescentes (12, 24 e 36  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) fato que corrobora o estudo de Balakrishnan (2013). Porém, quando ocorreu a adição de 0,2% de probiótico na dieta acrescida de doses crescentes de dicromato de potássio (12, 24 e 36  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) os resultados não foram compatíveis, existindo um aumento significativo no grau de congestão de leve para moderada, fato possivelmente explicado por uma maior atividade de biotransformação hepática.

Em relação a esteatose hepática os resultados foram significativos ( $p<0,05$ ), existindo um aumento no grau de esteatose dos grupos com dietas crescentes de dicromato de potássio (12, 24 e 36  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) e para os grupos com dieta crescente de dicromato de potássio acrescida de 0,2% de probióticos (Figuras 5C e 5D). Esses resultados não concordam com o estudo de Xu et al. (2012), pois em seu estudo a utilização do probiótico diminuiu significativamente o grau de esteatose hepática, fato que pode ser explicado pela forma de indução a esteatose hepática, que no estudo de Xu et al. (2012) foi através de dieta rica em lipídeos. No parâmetro células de Kupffer também foram obtidos resultados significativos ( $p<0,05$ ) (Figura 5C), sendo observadas diferenças entre os grupos com doses crescentes de dicromato de potássio (12, 24 e 36  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) e doses crescentes de dicromato de potássio acrescido de 0,2% de probiótico, sugerindo um aumento as resposta imune do organismo frente as agressões realizadas pelo dicromato de potássio assim como a estimulação produzida pelos probióticos. Estes resultados corroboram o estudo de SORIANO (2009), que demonstrou que a utilização de probióticos realiza a modulação da resposta imune do organismo mediante às alterações na flora intestinal do hospedeiro, aumentando assim a capacidade de resposta do organismo frente as agressões.

Para o parâmetro colestase também não houve aumento significativo ( $p>0,05$ ) entre os grupos estudados, mesmo existindo aumento significativo ( $p<0,05$ ) da atividade sérica enzimática para GGT, fato possivelmente explicado pelo período de 90 dias de exposição ao dicromato de potássio realizado em nosso estudo.

Nenhum dos animais expostos ao dicromato de potássio apresentaram neoplasia, fato que não corrobora com os estudos da *The Internacional Programme On Chemical Safety* (1998), que relata em seus estudos que doses acima de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  produz efeitos carcinogênicos para animais experimentais, e os efeitos crônicos da exposição ao crômio ocorrem no fígado e nos rins. Fato possivelmente explicado pelo tempo de exposição ao crômio realizado em nosso estudo. Os resultados da análise histopatológica, estão representados na Tabela 3 por médias de todos escores dos parâmetros avaliado.





**Figura 7.** Fotomicroscopia do fígado. A – Fígado normal, sem aumento de células de Kupffer – animal do grupo G1 (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x). B – Foco inflamatório (seta) e ausência de aumento de células de Kupffer – animal do grupo G2 (Hematoxilina-eosina, aumento de 400x). C – Esteatose microvesicular difusa e aumento de células de Kupffer – animal do grupo G3 (Hematoxilina-eosina, aumento de 400x). D – Foco de necrose hepatocítica (círculo), esteatose microvesicular e ausência de aumento de células de Kupffer – animal do grupo G4 (Hematoxilina-eosina, aumento de 400x).

**Tabela 3.** Tabela de média dos escores das análises histopatológicas.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
<b>Congestão Tecidual</b>	0 <sup>aa</sup>	1 <sup>ab</sup>	1 <sup>ab</sup>	1,5 <sup>ab</sup>	1 <sup>aa</sup>	2 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>
<b>Intensidade do Infiltrado Inflamatório</b>	0,5 <sup>aa</sup>	0,1 <sup>aa</sup>	0 <sup>aa</sup>	0 <sup>aa</sup>	0 <sup>aa</sup>	0 <sup>aa</sup>	0 <sup>aa</sup>	0 <sup>aa</sup>
<b>Necrose</b>	0 <sup>aa</sup>	0 <sup>aa</sup>	0 <sup>aa</sup>	0,3 <sup>aa</sup>	0 <sup>aa</sup>	0 <sup>aa</sup>	0 <sup>aa</sup>	0 <sup>aa</sup>
<b>Colestase</b>	0 <sup>aa</sup>	0 <sup>aa</sup>						
<b>Esteatose Micro. e Macrovesicular</b>	0 <sup>aa</sup>	2 <sup>ab</sup>	1,6 <sup>ab</sup>	1,5 <sup>ab</sup>	0,7 <sup>ab</sup>	1,8 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>	2 <sup>ab</sup>
<b>Células de Kuppfer</b>	0,1 <sup>aa</sup>	0 <sup>aa</sup>	0,8 <sup>ab</sup>	0,6 <sup>ab</sup>	0,9 <sup>ab</sup>	1 <sup>ab</sup>	0,9 <sup>ab</sup>	0 <sup>aa</sup>
<b>Neoplasia</b>	0 <sup>aa</sup>	0 <sup>aa</sup>						

Resultados com diferentes sobrescritos diferem significativamente.

## CONCLUSÃO

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 devem ser realizados para determinar os microorganismos mais apropriados para minimizar e/ou impedir a ação desses poluentes em seres humanos e animais.

## COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O presente estudo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), segundo protocolo de aprovação nº784/2012.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, S. et al. A subtoxic interactive toxicity study of ethanol and chromium in male Wistar rats. **Alcohol**, v.23, p.99-108, 2001.
- ADOLFFSSON, O. et al. Yogurt and gut function. **Am. J. Clin. Nutr.** v.80, p.245–256, 2004.
- US EPA (U.S. Environmental Protection Agency). (2003). **National primary drinking water regulations.** 40CFR141.62. Disponível em: [http://edocket.access.gpo.gov/cfr\\_2003/julqtr/40cfr141.62.htm](http://edocket.access.gpo.gov/cfr_2003/julqtr/40cfr141.62.htm). Acesso em: 10 de Janeiro, 2014.
- ASLAM, M. et al. Nephroprotective Effects of Methanolic Extract of Peucedanum grande against Acute Renal Failure Induced by Potassium dichromate in rats. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**; v. 5 (2) p. 45-49, 2013.
- BAGCHI, D. et al. Cytotoxic and oxidative mechanisms of different forms of different forms of chromium. **Toxicology**. 2002, v. 180, p. 5-22, 2002.

BALAKRISHNAN, R. et al. Antioxidant Activity of Coated Probiotic Lactobacillus casei on Chromium (VI) Induced Oxidative Stress in Rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, p. 1-6, 2013.

BARTYZEL, A; CUKROWSKA, W. M. Solid phase extraction method for the separation and determinatios of chromium (III) in the presence of chromium (VI) using silica gel modified by N, N'-bis(methylsalicylidene)-2,2dimethyl-1,3-propanediimine. **Anal. Chim. Acta**, v.707, n.1-2, p. 209, 2011. Doi:10.1016/j.aca.2011.09.023.

BEZERRA, R. C. et al. Utilização de probiotico sobre o ganho de peso em bovinos da raça nelore. **Colloquium Agrariae**, v.9, n.1. 2013.

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 de crômio em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado a 1,5-difenilcarbazida. **Ciência Rural**. v.35, p.691-697, 2005.

CARVALHO, W. L. et al. Mecanismo da intoxicação do fígado de ratos causada pelo gossipol. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 339-344, 2013.

CHEMDAT, The Merck Chemical Database, Merck KGaA: Darmstadt, 2005.**chromium. Toxicology**, v. 180, p. 5-22, 2002.

CHWASTOWKA, 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.

COSTA, M. P.; BALTHAZAR, C. F.; PINTO, R. V. Leite fermentado: Potencial alimento funcional. **Bioesfera, Centro Científico Conhecer**. V.9; n.16; p. 1387, 2013.

FREINBICHLER, W., et al. Highly reactive oxygen species: detection, formation and possible functions. **Cellular and Molecular Life Science**. 2011, Vol. 68, p. 2067-2079, 2011.

FUJIKAWA, E. S. **Incorporação do resíduo “serragem cromada” em materiais de construção civil**. 2002. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2002. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>. Acesso em: 15 Julho, 2013.

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

GUILLOUZO, A. Liver cell models in *in vitro* toxicology. **Environ. Health Perspect.**, Washington, n. 106, p. 511-532, 2013.

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

HOPKIN, M. **Probiotic bacteria health boon: Gut-friendly bugs don't have to be alive to boost immune system**. 03 February Nature Science update Monday, February 23 <http://www.nature.com/nsu/040202/040202-1.html>. 2004.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Overall evaluation of carcinogenicity to humans. Lists of IARC evaluation. List available, mixture and exposures available to date. <http://www.cie.iarc.fr/monoeval/crthall.html>. Acesso em: 20 de Julho, 2013.

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.

LOPES, A. C. F. **Formação de radicais livres induzida por cromo trivalente ( $\text{Cr}^{3+}$ ) e hexavalente ( $\text{Cr}^{6+}$ )**. 139 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana). Departamento de Nutrição. Universidade de Brasília. Brasília, 2013.

MARROCO, J. **Análise Estatística** – com utilização do SPSS. 3 ed. Lisboa: Símbolo, p. 824, 2007.

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: Ciência e 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, p.70–74, 2011.

NEILL, L. et al. State of the Science of Hexavalent Chromium in Drinking Water. **Water research foundation**. 2012.

NTP. National Toxicology Program technical report on the toxicity studies of sodium dichromate dehydrate (CAS Nº 7789-12-0) administered in drinking water to male and female F344/N rats and B6C3F1 mice and male BALB/c and am 3-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](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/ST_rpts/TOX72.pdf)>. Acesso em: 28 de julho, 2013.

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](http://www.cpqgm.fiocruz.br/arquivos/bioterio_apostila.pdf)>. Acesso em: 22 Julho de 2013.

PAMPLONA, R.; COSTANTINI, D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. V. 301, pp. R843-R863, 2011.

PARDO, P. E; REIS, L. S. L. S. Nutrientes e Nutracêuticos em Grandes Animais. In: ANDRADE, S.F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. Capítulo 29, p.808-814. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Rocha Ltda., 2008.

PRITI, D. V. et al. Effects of Sodium Dichromate on Haemato-biochemical Parameters in Wistar Rats. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v.7, p.58-63, 2012.

RAZA, M. et al. 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. et al. 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. et al. Functional food science and gastrointestinal 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. **Journal Anal Toxicology**. v.12, p.162-164, 1988.

SEDMAN, R. M.; BEAUMMONT, J.; McDONALD, T. A.; KROWECH, G.; HOWD, R. Review of Evidence Regarding the Carcinogenicity of Hexavalente Chromium in Drinking

Water. **Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology**.v.24, p 155-182, 2006.

SELLAMUTHU, R; UMBRRIGHT, C; CHAPMAN, R; LEONARD, S. Transcriptomics evaluation of hexavalent Chromium toxicity Human. **Journal Carcinogene e Mutagene**.v.2, no.1, p. 1-18, 2011.

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, 171-8, 2007.

SORIANO, G. Probióticos, prebióticos y simbióticos en las enfermedades hepáticas. **Gastroenterología y hepatología**, v. 32, n. 1, p. 40, 2009.

SOUDANI, N. et al. Toxic effects of chromium (VI) by maternal ingestion on liver function of female rats and their suckling poups. **Enviromental**. v.28, n.1, p.11-20, 2013.

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

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: 15 de novembro, 2013.

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.

WITT, K. L. et al. Nephroprotective Effects of Methanolic Extract of Peucedanum grande against Acute Renal Failure Induced by Potassium dichromate in Rats. **Toxicologic Pathology**, v. 41, p. 326-342, 2013.

XU, R.Y. et al. Supplementation with probiotics modifies gut flora and attenuates liver fat accumulation in rat nonalcoholic fatty liver disease model. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 50, n. 1, p. 72, 2012.

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

## ANEXOS

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



UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA  
**UNOESTE**  
PRESIDENTE PRUDENTE · SP

**Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**  
Tel: 18 3229 2077 / 2078 / 2079  
E-mail: posgrad@unoeste.br  
[www.unoeste.br](http://www.unoeste.br)

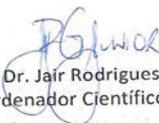
---

Campus I Rua José Bongiovani, 700 · Cidade Universitária · CEP 19050 920 · Presidente Prudente SP · Tel| Fax: 18 3229 1000  
Campus II Rodovia Raposo Tavares, Km 572 · Bairro Limoeiro · CEP 19067 175 · Presidente Prudente SP · Tel| Fax: 18 3229 2000

### DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o acadêmico **REINALDO CAMACHO BEZERRA**, mestrando do curso de CIÊNCIA ANIMAL, é participante do projeto intitulado “**TOXICIDADE HEPÁTICA, RENAL E INTESTINAL DO DICROMATO DE POTÁSSIO EM RATOS ALBINOS DA LINHAGEM WISTAR**”, sob orientação do Prof. PAULO EDUARDO PARDO, e com participação de Profa. ANA CRISTINA MESSAS, Profa. GISELE ALBORGHETTI NAI, prof. HERMANN BREMER NETO, SORAIA YOUNAN COLUNA e YSLLA FERNANDA FITZ BALO MERIGUETI cadastrado com o número de protocolo **784** na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) da Universidade do Oeste Paulista. Na presente data o referido projeto está em desenvolvimento.

Presidente Prudente, 25 de novembro de 2013.



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

**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** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **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.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

**5. A nota** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **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.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

**6.** Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista [www.scielo.br/cr](http://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.; ULRICHS, 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](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.