



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO



Efeito dos oligossacarídeos FOS e GOS na microbiota intestinal e pH do conteúdo cecal de ratas Wistar em desenvolvimento

Glauca Carielo Lima

Nutricionista

Campinas, SP
2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO



Efeito dos oligossacarídeos FOS e GOS na microbiota intestinal e pH do conteúdo cecal de ratas Wistar em desenvolvimento

Glaucia Carielo Lima

Nutricionista

Orientador: Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre em Alimentos e Nutrição

Campinas, SP
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

L628e Lima, Glaucia Carielo
Efeito dos oligossacarídeos FOS e GOS na microbiota intestinal e no pH do conteúdo cecal de ratas Wistar em desenvolvimento / Glaucia Carielo Lima. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Mário Roberto Maróstica Junior
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Prebióticos. 2. Frutooligosacarídeos. 3. Galactooligosacarídeos. 4. Microbiota intestinal. 5. Intestino. I. Maróstica Junior, Mário Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Effect of oligosaccharides FOS and GOS on the intestinal pH and microbiota of the young female Wistar rats

Palavras-chave em inglês (Keywords): Prebiotics, Frutooligosaccharides, Galactooligosaccharides, Intestinal microbiota, Intestine

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Mário Roberto Maróstica Junior

Claudia Cardoso Netto

Rosângela dos Santos

Data da defesa: 01/04/2011

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

"Por mais árdua que seja a luta, por mais distante que um ideal se apresente, por mais difícil que seja a caminhada, existe sempre uma maneira de vencer: a nossa Fé."

Agradeço

Ao meu orientador Mário por me conduzir durante este trabalho, pela confiança demonstrada e por se mostrar tão compreensivo e atencioso nos meus momentos de dificuldade.

À Claudia pela contribuição na escrita do projeto, sugestões e correções e disponibilidade para responder minhas inúmeras dúvidas.

À Rosângela pelas correções e sugestões neste trabalho e pela produção do GOS usado neste estudo.

À Cibele pela disponibilidade em me ensinar e ajudar nas análises microbiológicas, por ter dividido muitas das experiências do seu trabalho comigo e também por me levar para preciosos momentos de doação ao próximo.

À Susana pelo auxílio no LEB e fora dele; pela amizade e carinho com que sempre me tratou dentro e fora da Unicamp.

À querida Alice, com quem partilho minhas alegrias, dores, dúvidas, sonhos, experiências e intensa amizade. Você também é meu porto seguro, amiga!

Às amigas Paula e Izabela pelo apoio, incentivo e ajuda durante o mestrado e por me proporcionarem dias muito mais alegres quando estamos juntas! Meninas, sabem o que eu acho? ...

À Lidi (rapinha) que acompanha meus passos desde a faculdade e está sempre por perto para me ajudar e acolher.

À Vivian, com quem partilhei os desafios deste projeto, pelo companheirismo, preocupação e ajuda durante o trabalho.

À Cinthia, pela amizade, ajuda em muitos pontos deste trabalho; por me dar seus sábios conselhos, me fazer enxergar este trabalho com “outros olhos” e partilhar comigo sua experiência.

À Nathália pelas conversas descontraídas nos intervalos de nossos trabalhos, pela atenção em meus momentos de dificuldade durante estes dois anos e amizade construída ao longo deste tempo;

À Anne e Nathália, por muitas vezes resgatarem minhas ratinhas “fugitivas”. E como elas fugiam!

À amável Maria Inês, pelas preciosas dicas e ensinamentos no laboratório.

Às minhas colegas de república: Ju, Dany e Klécia, por compreenderem meu mau humor nos “dias ruins” e pelos momentos agradáveis que passamos juntas em casa.

À Profa. Glaucia e seus alunos – em especial ao Gustavo Molina - por diversas vezes cederem seu laboratório para que eu fizesse parte de nossas análises.

Ao Prof. Lancelotti por ceder seu laboratório e me ensinar detalhes importantes para a análise microbiológica.

Ao Prof. Nilo que me deu a oportunidade de vivenciar a experiência da docência e com quem aprendi muitas coisas a respeito desta vocação.

À Soely pelos ensinamentos no laboratório no início deste trabalho.

Aos demais técnicos do Depan, Yara, Chico, Lia, Carla, Eliana, que gentilmente me atenderam todas as vezes que precisei.

À Cidinha, Marta, Fátima, Val, que nos atendem com tanta presteza e carinho.

À Marine, estagiária dedicada, com quem dividi muitas horas em laboratório.

Aos amigos do Carmo, que sempre vibraram com cada conquista minha e entenderam minha ausência nos encontros da turma.

À minha família adorada, querida Merinha, tios, tias e primos pelo carinho e torcida.

Aos meus irmãos Luciano, Daniel e Julia, por serem meus grandes amigos, me apoiarem sempre e muitas vezes terem se sacrificado para que eu pudesse estudar.

À Tia Celina, pelo amor, orações e toda dedicação que tem por mim.

Em especial, aos meus queridos pais, Gláucio e Lêla, que dedicaram tanto de sua vida para que eu e meus irmãos estudássemos. Pelo exemplo de vida, educação e valores que me ensinaram, vocês sempre serão meus maiores mestres! Espero, um dia, conseguir retribuir tudo isso...

Banca Examinadora

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida em / /
por Gláucia Carielo Lima aprovado pela comissão julgadora em / / .

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior
(Orientador)

Profa. Dra. Claudia Cardoso Netto
(Membro)

Profa. Dra. Rosângela dos Santos
(Membro)

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(Membro)

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
(Membro)

Sumário

Resumo	xiii
Summary	xv
1) Introdução.....	1
2) Revisão Bibliográfica.....	2
2.1) Prebióticos.....	2
2.2) Galactooligossacarídeos (GOS) e Frutooligossacarídeos (FOS).....	5
2.3) Obtenção dos prebióticos FOS e GOS.....	9
2.4) Aplicações dos prebióticos FOS e GOS na indústria de alimentos	13
2.5) Microbiota intestinal e reações de fermentação no intestino grosso.....	16
2.6) Os micro-organismos Bifidobacterium e Lactobacillus.....	21
2.7) Ação dos prebióticos no intestino.....	22
3) Objetivos.....	26
3.1) Objetivo Geral.....	26
3.2) Objetivos Específicos.....	26
4) Material e Métodos.....	27
4.1) Oligossacarídeos FOS e GOS.....	27
4.1.1) Obtenção dos prebióticos.....	27
4.2) Ensaio biológico.....	28
4.2.1) Formulação de dietas.....	28
4.3) Conteúdo cecal.....	30
4.3.1) Análise de pH cecal.....	30
4.3.2) Análise microbiológica.....	31
5) Delineamento Estatístico.....	32

6) Resultados e Discussão.....	33
6.1) Ensaio biológico.....	33
6.2) pH do conteúdo cecal.....	34
6.3) Microbiota intestinal.....	36
7) Conclusão.....	41
8) Referências Bibliográficas.....	42
9) Anexo.....	51

Lista de Figuras

Figura 1	Os prebióticos como fatores bifidogênicos e os mecanismos de atuação dos probióticos	3
Figura 2	Estrutura química dos principais dos frutooligossacarídeos	6
Figura 3	Processo de obtenção de inulina e oligofrutose (FOS) de raízes de chicória	10
Figura 4	Processo de produção industrial de galactooligossacarídeos	12
Figura 5	Reações de prebióticos e probióticos com a microbiota intestinal	17
Figura 6	Efeito das dietas nos valores de pH do conteúdo cecal	34

Lista de Tabelas

Tabela 1. Ocorrência natural de oligofrutose em alguns alimentos.....	7
Tabela 2. Composição do FOS (P95 Beneo Orafiti) utilizado no presente estudo.....	27
Tabela 3. Composição do GOS utilizado no presente estudo.....	27
Tabela 4. Composição da dieta AIN-93G (Reeves et al., 1993) contendo 12% de proteína (Goena et al., 1989) e modificada de acordo com os tratamentos propostos.	29
Tabela 5. Evolução ponderal dos animais alimentados com dietas contendo FOS, GOS e FOS + GOS.....	33
Tabela 6. Efeito das dietas nos níveis de <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i> (CFU log 10) do conteúdo cecal.....	37

Resumo

Muitos estudos tem demonstrado que o consumo acumulado de galactooligossacarídeo (GOS) e frutooligossacarídeo (FOS) pode trazer benefícios significativos para a saúde, relacionados com a sua resistência à digestão, sendo utilizados como substrato pelas bactérias intestinais, em especial as bifidobactérias. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos de alteração de pH e microbiota (contagem de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*) no intestino grosso de ratas Wistar após o consumo dos oligossacarídeos não digeríveis (ONDs) FOS e GOS. Foram confeccionadas quatro dietas baseadas na AIN93G para roedores utilizando os ONDs em substituição parcial à sacarose para os grupos experimentais. Desta forma, o experimento contou com quatro grupos experimentais, sendo: grupo Controle, grupo FOS, grupo GOS e grupo FOS + GOS. O ensaio biológico contou com 32 animais divididos em grupos de 8 animais cada, mantidos em gaiolas separadas, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura e umidade controladas, durante o período de 90 dias. O consumo de dieta e o ganho de peso foram monitorados. Ao final do experimento, os animais foram sacrificados por decapitação, seu ceco retirado para coleta de material para análises posteriores de pH e microbiota intestinal. A análise de pH foi realizada por meio de peagômetro digital (TEC 5MP, Tecnal) e a análise de microbiota, a partir de diluições do conteúdo fecal e inoculação em meios de cultura específicos. Todas as placas foram incubadas em câmaras de anaerobiose contendo sistema gerador de anaerobiose Anaerogen (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) durante 24 - 48 horas a 37°C. Os resultados foram expressos na forma do logaritmo decimal das unidades formadoras de colônia/g material (Log_{10} UFC). Para a análise estatística, foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0. A análise de variância (ANOVA) foi realizada e os dados paramétricos foram analisados por meio do teste de Tukey, a 5% de significância e os não paramétricos por teste de Dunnett. Os resultados obtidos demonstraram um abaixamento do pH intestinal nos grupos que consumiram FOS e FOS + GOS e aumento da contagem de *Bifidobacterium* no conteúdo cecal dos grupos FOS, GOS e FOS + GOS e aumento de *Lactobacillus* dos grupos FOS e FOS + GOS.

Palavras-chave: Prebióticos; frutooligossacarídeos; galactooligossacarídeos; microbiota intestinal; intestino.

Summary

Effect of oligosaccharides FOS and GOS on the intestinal pH and microbiota of the young female Wistar rats

Many studies have shown that consumption of galactooligosaccharide (GOS) and fructooligosaccharides (FOS) can bring significant benefits to health. NDC are used as substrate by intestinal bacteria, especially bifidobacteria, as these compounds are resistance to digestion. The aim of this study was to evaluate the effects in pH and microbiota (specifically for *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* growth) in the large intestine of Wistar rats after consumption of non-digestible oligosaccharides (NDOs) FOS and GOS. Four different diets were produced, based on the AIN93G formula for rodents, using NDOs in partial replacement of sucrose by prebiotics FOS and GOS for the experimental groups. Thus, the experiment had four experimental groups, as described: Control group, FOS group, GOS group and FOS + GOS group. For the 'in vivo' experiment, the 32 animals were divided into groups of 8 animals each. The rats were kept in separate cages under light / dark cycles of 12 hours, with controlled temperature and humidity during 90 days. The diet consumption and weight gain were monitored. At the end of the experiment, the animals were killed by decapitation, their cecum removed to collect material for further analysis of pH and intestinal microbiota. The pH analysis was performed using digital pH meter (TEC 5MP Tecnal) and analysis of microbiota from dilutions of fecal contents and inoculation on specific culture media. All plates were incubated in anaerobic chambers containing anaerobic generation system Anaerogen (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) for 24-48 hours at 37 °C. The results were expressed as the logarithm of colony forming units / g material (Log_{10} CFU). For statistical analysis, GraphPad Prism 5.0 was used. The analysis of variance (ANOVA) was performed and parametric data were analyzed using the Tukey test at 5% significance and the nonparametric by Dunnett's test. The results showed a lowering of intestinal pH in the groups consuming FOS and FOS + GOS and increased count of *Bifidobacterium* in the cecal contents of the groups FOS, GOS and FOS + GOS and increase of *Lactobacillus* in the groups FOS and FOS + GOS.

Keywords: Prebiotics, Fructooligosaccharides, Galactooligosaccharides, Intestinal Microbiota, Intestine

1 Introdução

Os prebióticos são oligossacarídeos, que alteram a composição ou o metabolismo da microbiota intestinal de forma benéfica. É esperado, portanto, que prebióticos exerçam alguns dos efeitos na saúde de um modo semelhante aos probióticos, enquanto ao mesmo tempo, sejam mais baratos, tragam menor risco e sejam de mais fácil incorporação na dieta do que os probióticos (Venter, 2007).

A maioria dos estudos envolvendo oligossacarídeos prebióticos tem sido realizada com inulina, seus derivados frutooligossacarídeos (FOS), e galactooligossacarídeos (GOS). Embora muitas outras bactérias sejam capazes de crescer com esses substratos, a maioria das investigações demonstra que eles favorecem, principalmente, o crescimento de bifidobactérias e, em menor grau, de lactobacilos (Saulnier *et al.*, 2009).

Embora a literatura que trata da importância dos prebióticos na saúde ainda não seja tão extensa quanto a dos probióticos, evidências consideráveis mostram que o consumo acumulado de GOS e FOS pode trazer benefícios significativos para a saúde, especialmente em relação ao seu poder de diminuir o número de células tumorais, a influência sobre o metabolismo lipídico e a absorção de alguns minerais - em especial, o Cálcio – efeitos antiinflamatórios e imunes, além de seu tão mencionado efeito bifidogênico (Macfarlane *et al.*, 2008).

Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de FOS, GOS e a associação dos dois oligossacarídeos no crescimento de micro-organismos dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e pH do conteúdo cecal de ratas Wistar.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Prebióticos

Um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que afeta benéficamente uma ou mais funções no corpo, além de fornecer adequados efeitos nutricionais, de uma maneira que seja relevante para o bem-estar e saúde do indivíduo ou, ainda, a redução do risco de uma doença (Roberfroid, 2001). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alimentos funcionais são aqueles que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos por meio da atuação de um nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento, manutenção e em outras funções normais do organismo humano (Brasil, 1999).

Ainda, de acordo com a ANVISA, o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais, além de atuar em funções nutricionais básicas, irá desencadear efeitos benéficos à saúde e deverá ser também seguro para o consumo, sem supervisão médica (Brasil, 1999).

Carboidratos fermentáveis entram no cólon, onde estarão disponíveis para a fermentação pelas bactérias, favorecendo a produção de ácidos graxos de cadeia curta. Estes, por sua vez, estão associados à redução do risco de desenvolver distúrbios gastrointestinais, câncer retal e doenças cardiovasculares. Assim, a atenção se volta para estratégias alimentares que promovam este fenômeno, melhorando a saúde e prevenindo estas patologias (Wong e Jenkins, 2007). Neste contexto, devido a seus supostos efeitos benéficos, os prebióticos - assim como os probióticos - foram considerados ingredientes alimentares funcionais (Cashman, 2006) (figura 1). No Brasil, a

ANVISA também coloca os probióticos e os prebióticos FOS e inulina na lista de alimentos com propriedade funcional comprovada (Brasil, 1999).



Figura 1- Os prebióticos como fatores bifidogênicos e os mecanismos de atuação dos probióticos (Adaptado de Saad, 2006).

Probióticos são micro-organismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Saad, 2006). Um prebiótico é um ingrediente ou componente alimentar não digerível que altera a composição bacteriológica do intestino, não pela adição de micro-organismos, mas por estimular seletivamente o crescimento e / ou atividade de um número limitado de bactérias e, portanto, beneficiar a saúde do hospedeiro (Gibson et

al., 2004). Estes compostos têm sido considerados importantes devido à crescente convicção de que existe uma relação positiva entre saúde do hospedeiro e uma microbiota intestinal equilibrada (Cashman, 2006). São substâncias que estão se tornando uma alternativa para os probióticos, uma vez que estes podem ser difíceis de tratar em alguns gêneros alimentícios, mas cujos benefícios para a saúde, em termos de prevenção de diarreia e imunomodulação, estão se tornando cada vez mais bem estabelecidos. Além disso, prebióticos como a inulina, atualmente muito usada, e seus derivados FOS são relativamente baratos de serem produzidos ou extraídos de fontes vegetais (Bhatia e Rani, 2007).

Há muitos carboidratos que não são digeríveis, portanto, chamados de fibras dietéticas. Entretanto, de acordo, com Gibson *et al.* (2004), além de ser um oligossacarídeo não-digerível, estimular seletivamente o crescimento e / ou atividade metabólica da microbiota intestinal, outras características devem existir para que este ingrediente alimentar seja considerado um prebiótico:

- Não pode ser hidrolisado ou absorvido no trato gastrointestinal superior;
- Deve alterar a microbiota colônica a favor de uma composição mais favorável para a saúde do indivíduo;
- Deve induzir efeito luminal ou sistêmico que seja benéfico para a saúde do organismo hospedeiro;
- Deve ser fermentado por bactérias no intestino grosso;
- Deve melhorar as condições associadas tanto com a constipação intestinal quanto à diarreia;
- Deve ser capaz de resistir a pH e condições de ação enzimática encontradas no estômago e intestinos humanos.

Um número de carboidratos se enquadra nessa categoria dos prebióticos, incluindo certas fibras e amido resistente, mas os prebióticos mais amplamente descritos são os oligossacarídeos não digeríveis. Estes são carboidratos de baixo peso molecular com grau de polimerização entre 2-10, que chegam ao cólon normalmente inalterados e podem, então, funcionar como um substrato para a microbiota deste local (Bhatia e Rani, 2007).

A validação do efeito prebiótico deve ser conduzida por meio de ensaios *in vivo*, por meio de estudos de intervenção nutricional apropriados nas espécies-alvo (humanos e animais), devido às mais diversas interações possíveis entre o indivíduo e o alimento (Gibson *et al.*, 2004).

Atualmente, os dois tipos de ONDs considerados prebióticos mais utilizados pelas indústrias de alimentos são os frutanos e os galactooligosacarídeos (GOS) (Roberfroid, 2007).

2.2 Galactooligosacarídeos (GOS) e Frutooligosacarídeos (FOS)

Quimicamente, os frutanos do tipo inulina são cadeias lineares de carboidratos consistindo principalmente, se não exclusivamente, de ligações β -(2 \rightarrow 1)-frutossil-frutose, podendo conter uma molécula inicial de α -D-glicose. O grau de polimerização (GP) desses ONDs fica entre 2 e 60 com média igual a 12 e, normalmente, dez por cento das suas cadeias presentes tem GP entre 2 (F2) e 5 (GF4). A hidrólise parcial dessas cadeias produz oligofrutoses, que são uma mistura de moléculas de glicopiranosil-(frutofuranosil)n-1-frutose (GpyFn) e frutopiranosil-(frutofuranosil)n-1-frutose (FpyFn), nas quais o GP varia entre 2 e 7 com média de 4. Quando esses frutanos possuem GP de no máximo 10, também podem ser chamados de frutooligosacarídeos (FOS) (Roberfroid, 2005). FOS é o nome comum dado aos oligômeros de frutose que são

compostos de 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil nistose (GF4) (figura 2), em que as unidades de frutossil (F) são ligadas na posição β - 2,1 da sacarose, o que os distingue de outros oligômeros (Passos e Park, 2003).

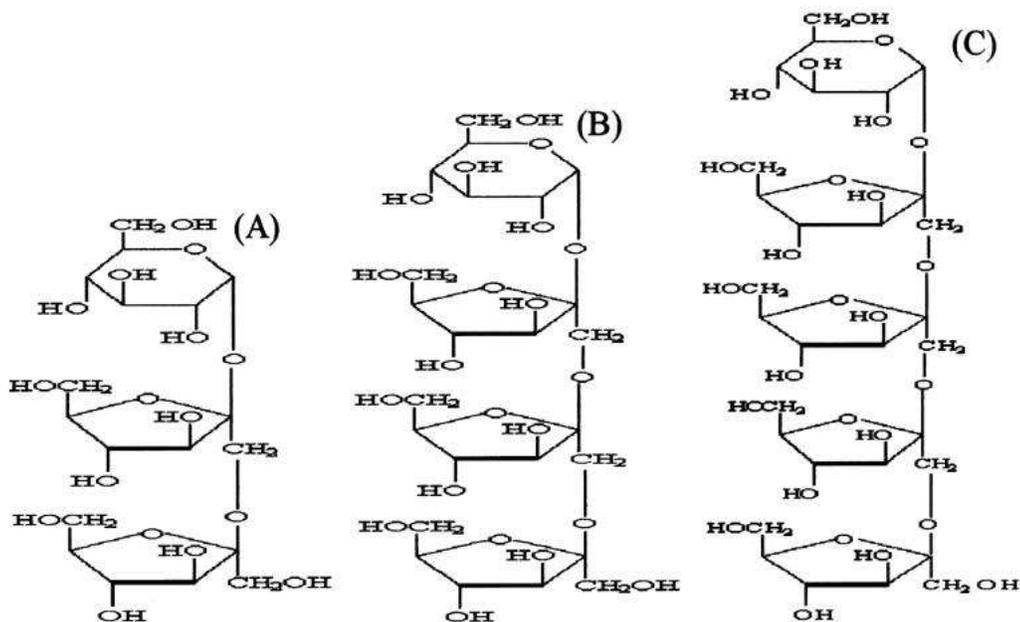


Figura 2: Estrutura química dos principais frutoligossacarídeos: 1-kestose(A), nistose (B) e frutofuranosil-nistose (C) (Passos e Park, 2003).

Os FOS são encontrados em muitos alimentos vegetais. Cebola, banana, alho, aspargo, alho-porro, alcachofra, chicória (Gibson *et al.*, 2004) e yacon (Goto *et al.*, 1995) são alguns exemplos. No entanto, os níveis em que estão presentes nestes alimentos são demasiadamente baixos para exercer efeito significativo como prebiótico. A tabela 1 mostra a quantidade de oligofrutose presente em alguns alimentos.

Tabela 1. Ocorrência natural de oligofrutose em alguns alimentos (adaptado de Roberfroid *et al.*, 1993).

Fonte	Oligofrutose (%)
Banana	0.3 - 0.7
Centeio	0.5 - 1
Alho-porro	2.5 - 8
Trigo	1 - 4
Alho	3.5 - 6.5
Raízes de chicória	8 -11
Aspargo	2 - 3
Alcachofra de Jerusalém	12 - 15
Cebola	1.1 - 7.5
Dente - de - leão	9.5 - 12

Embora não exista DRIs para estes oligossacarídeos, estudos indicam que pelo menos 4 g / dia, mas de preferência mais de 8 g / dia de FOS seriam necessários para elevar de forma significativa a quantidade de bifidobactérias no intestino humano (Manning e Gibson, 2004). Segundo Gibson *et al.* (2004), doses eficazes de oligossacarídeos estão na faixa de 5-10 gramas / dia para adultos saudáveis. Doses inferiores a 5 gramas são, geralmente, considerados ineficazes. Bouhnik *et al.* (1999) concluíram que 10 g/dia é a dose ótima e bem tolerada de FOS, capaz de aumentar significativamente as bifidobactérias em humanos saudáveis, sem, entretanto, causar desconfortos gastrointestinais como flatulência e diarreia.

Geralmente, os ONDs são bem tolerados por indivíduos saudáveis. Algumas vezes, a intolerância se dá devido ao efeito osmótico (ocorre um aumento de água no cólon) e/ou fermentação causada pelos prebióticos. Os sintomas de intolerância incluem dor abdominal, inchaço, flatulência e, em último caso, quando administrado em doses muito altas – geralmente, acima de

40 g/dia – diarreia. A tolerância depende também de outros fatores, como: tipo e tamanho da cadeia do oligossacarídeo, condições no momento do consumo (sintomas de intolerância são mais comuns quando os prebióticos são ingeridos no período de jejum) e fatores individuais, tais como capacidade de absorção, motilidade intestinal, sensibilidade intestinal e presença de síndrome do intestino irritável (Venter, 2007; Marteau, 2001; Coussement, 1999). De fato, a dose tolerável difere de pessoa para pessoa. Muitos indivíduos podem consumir doses maiores que 10 ou 20 g/dia e não sentir desconforto algum, enquanto outros apresentarão sintomas de desconforto com pequenas doses do prebiótico (Coussement, 1999).

GOS é o termo usado para um grupo de carboidratos composto por oligogalactose com algumas moléculas de lactose e glicose. Os galactooligossacarídeos (GOS) são produzidos pelo tratamento enzimático da lactose pela β -galactosidase com atividade de transgalactosilação, na qual produz 4'- ou 6' - galactosilactose, oligossacarídeos de cadeia longa, dissacarídeos transgalactosilados e oligossacarídeos não redutores (MacFarlane *et al.*, 2008).

GOS possuem um grau de polimerização (GP) entre 2 e 10 com uma glicose terminal, sendo compreendidos de di-, tri-, tetra- ou de pentassacarídeos, consistindo principalmente em unidades de galactose ligadas à lactose. Geralmente, estes compostos contêm entre 24 e 55% de galactooligossacarídeos e pequenas amostras de lactose, glicose e galactose (MacFarlane *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009). Oligossacarídeos GOS semelhantes ocorrem naturalmente no leite humano e são apontados como um dos fatores que protegem bebês contra a patogenicidade de bactérias intestinais. Na literatura, os termos transoligosacarídeos (TOS) e

transgalactooligossacarídeos (TGOS) ocorrem como sinônimos de GOS (Niittynen *et al.*, 2007).

Devido à conformação β das ligações de seus monômeros, ambos os oligossacarídeos (FOS e GOS) são resistentes à hidrólise pelas enzimas do trato gastrointestinal, as quais possuem especificidade para quebrar ligações α -glicosídicas. Por isso, são classificados como oligossacarídeos não digeríveis (Roberfroid, 2005; Mussatto e Mancilha, 2007).

2.3 Obtenção dos prebióticos FOS e GOS

As espécies de plantas que contêm frutanos são encontradas em famílias mono e dicotiledôneas, como Liliaceae, Amaryllidaceae, Gramineae e Compositae. Como citadas anteriormente, muitas espécies vegetais são fontes de frutano. No entanto, apenas algumas são adequadas para aplicações na indústria. As duas espécies atualmente utilizadas pela indústria para a produção de frutanos (principalmente inulina) pertencem a Compositae: alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) e chicória (*Cichorium intybus*), sendo esta última, de longe, a mais utilizada (Kaur e Gupta, 2002).

Sobre a chicória é interessante ressaltar que, dependendo do estágio de seu desenvolvimento, podemos obter inulina ou FOS, sendo este último formado após hidrólise da inulina pela enzima, após o surgimento da inflorescência, que ocorre no período em que a raiz já se desenvolveu completamente (Kaur e Gupta, 2002).

Os FOS são produzidos em escala comercial por meio de duas técnicas, que resultam em dois produtos finais sutilmente diferentes. A primeira delas envolve a hidrólise enzimática parcial da inulina usando uma endo-inulinase (EC 3.2.1.7), resultando em uma mistura de $F_{py}F_n$ e $G_{py}F_n$ com grau de

polimerização que varia de 2 a 7 com uma média de 4 unidades. Após a purificação e evaporação do produto, obtém-se o xarope de oligofrutose. Para a produção de oligofrutose em pó, utiliza-se o processo de secagem por spray dryer (Figura 3). A mistura resultante é comercializada como Raftilose, produzida pela Orafti Ltda, da Bélgica, ou como Frutafit, produzida pela Imperial-Suikner Unie, da Holanda (Passos e Park, 2003).

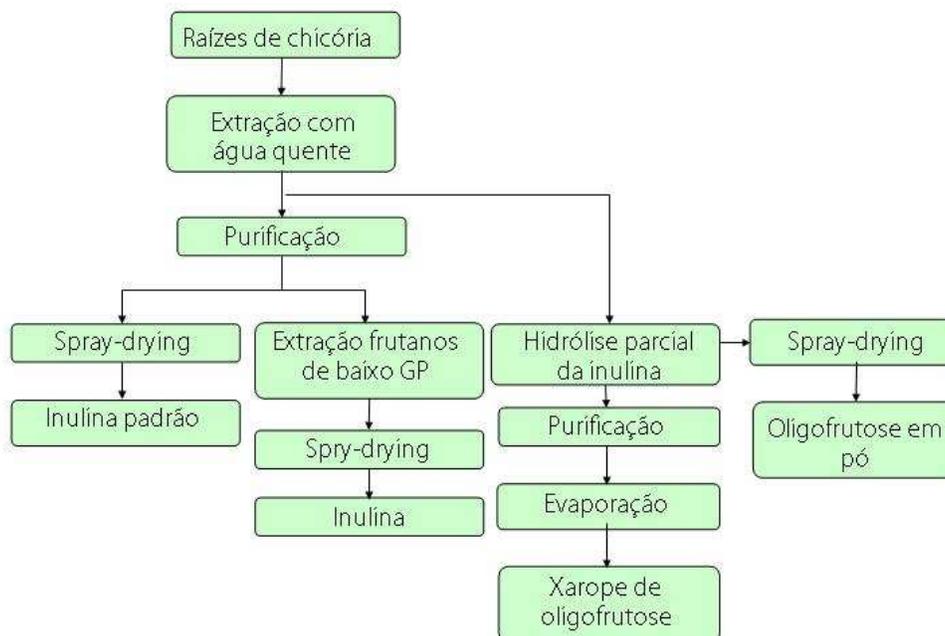


Figura 3: Processo de obtenção industrial de inulina e oligofrutose (FOS) de raízes da chicória (Adaptado de Franck, 2002).

A segunda forma de obtenção dos FOS é a partir da sacarose por meio de síntese enzimática (transfrutossilacção), usando a enzima β -frutosidase do fungo *Aspergillus Niger*. No composto resultante, o GP varia de 2 a 4 com média 3,6; e todos os oligômeros são $G_{py}F_n$. (Roberfroid, 2005). O produto preparado por reação de transfrutossilacção em resíduos de sacarose é produzido pela Meiji Seika Ltda (Tóquio, Japão), e comercializado como Neosugar, Profeed, Meioligo, ou Nutraflora. O Actilight também é produzido

desta maneira, sendo comercializado na Europa pela Béghin Meiji Industries (Crittenden e Playne, 1996).

Os GOS são produzidos comercialmente a partir da lactose, tendo como fonte o leite de vaca, por meio da reação de transgalactosilação. A transgalactosilação ocorre devido à atividade da enzima β -galactosidase (EC 3.2.1.23), a qual pode ser obtida por diversas leveduras e fungos basidiomicetos, em especial, o *Sporobolomyces singulares*, *Sterigmatomyces eliviae*, *Aspergillus oryzae* e *Scopulariopsis sp.* A β -galactosidase é uma enzima hidrolítica (lactose \rightarrow glicose + lactose) muito utilizada pela indústria alimentícia, principalmente pela de laticínios, já que a busca por alimentos com baixo teor de lactose têm crescido, devido a um aumento na incidência de indivíduos com intolerância a lactose. A β -galactosidase atua ainda como um catalisador da reação de transgalactosilação, na qual a lactose serve como doador de unidades de galactosil e um acceptor para a fórmula de di, tri e outros GOS maiores (Macfarlane *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009).

O rendimento da produção de GOS a partir da lactose por meio da ação da β -galactosidase, não ultrapassa a marca de 50%, ou seja, partindo de uma solução com 600g/L de lactose é possível obter por volta de 315g/L de GOS. Isto acontece devido ao fato de que durante a síntese do GOS, ocorre a degradação da enzima e a liberação dos monossacarídeos que podem atuar como inibidores da reação. Uma das alternativas para se conseguir maiores rendimentos seria a utilização de fatores que favorecessem um aumento da taxa de síntese e/ou que diminuíssem a taxa de degradação da enzima (Macfarlane *et al.*, 2008).

A atividade de água da solução pode ser outro fator que interfere no rendimento da síntese, uma vez que quando o acceptor de unidades galactosil é a água, há um aumento no número de moléculas de galactose livre. Uma

alternativa para este tipo de problema seria a utilização de solventes orgânicos, para diminuir a atividade de água (Macfarlane *et al.*, 2008).

A variação na temperatura é outro parâmetro que pode ser utilizado para aumentar o rendimento da síntese, entretanto deve-se avaliar a resistência térmica da enzima, devido à possibilidade de ocorrer à reação de Maillard entre os aminoácidos laterais da enzima com os açúcares redutores liberados na hidrólise (Sako, Matsumoto, Tanaka, 1999).

Com base no rendimento apresentado acima, os produtos disponíveis no mercado geralmente, são misturas de diversos oligossacarídeos (mais de 55%), lactose (~20%), glicose (~20%), e uma pequena quantidade de galactose, podendo ser encontrados na forma líquida ou em pó (Sako, Matsumoto, Tanaka, 1999). A figura 4 ilustra o processo de produção industrial dos galactooligossacarídeos.

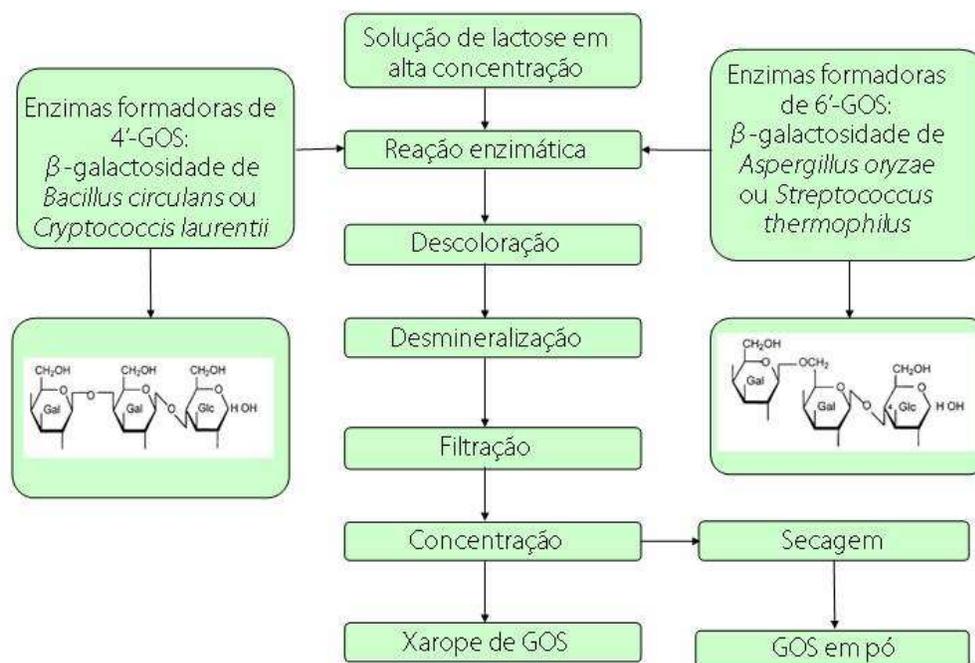


Figura 4: Processo de produção industrial de galactooligossacarídeos (Adaptado de Sako, Matsumoto, Tanaka, 1999).

Os GOS são muito estáveis a condições adversas de pH e temperatura. Resistem a 160 °C por 10 min em pH neutro ou a 120 °C por igual tempo em pH 3. Em pH 2 chegam a resistir até a 100 °C por 10 min. Nesta condição a degradação da lactose seria superior a 50%. Estes oligossacarídeos são bastante estáveis, também, quando armazenados por longos prazos em temperatura ambiente, mesmo em condições ácidas. É sugerido que GOS sejam mais estáveis que FOS (Sako, Matsumoto, Tanaka, 1999).

2.4 Aplicações dos prebióticos FOS e GOS na indústria de alimentos

A utilização dos prebióticos pela indústria de alimentos é bastante ampla. Em função de possuírem cadeias de diferentes tamanhos, frutanos de cadeia curta – conhecidos como FOS ou oligofrutose - e a inulina são aplicadas com finalidades distintas em alimentos, e proporcionam tanto a melhoria da qualidade organoléptica como uma composição nutricional mais balanceada (Wang, 2009).

A utilização de FOS com sucesso na indústria de alimentos se deve a inúmeras propriedades. São compostos resistentes a processos térmicos (pasteurização, por exemplo), suportando temperatura superior a 140 °C; suportam pH acima de 3, não cristalizam, não precipitam, nem deixam sabor residual. Além disso, tratando-se de carboidratos não-redutores, não participam da Reação de Maillard (Bornet, 1994).

Os FOS possuem propriedades funcionais similares às do açúcar ou xaropes de glicose, porém apresentam as vantagens de conferir menos calorias (1- 1,5 cal/g) e outros benefícios nutricionais. É mais solúvel do que o açúcar (sua solubilidade em água atinge 80% a temperatura de 25° C) e apresenta de 30 a 50% de seu poder adoçante (Bornet, 1994; Franck, 2002)

Esses compostos são utilizados como agentes de corpo e redutores da sinerese em produtos lácteos, umectantes em produtos de panificação, para diminuir o ponto de congelamento de sobremesas congeladas, conferir crocância a biscoitos com baixo teor de gordura e como ligante em barras de cereais. Frequentemente, FOS também são empregados em combinação com edulcorantes de alto poder adoçante para substituir o açúcar, resultando em um perfil adoçante bem balanceado, e para mascarar o sabor residual do aspartame e acessulfame-K (Kaur e Gupta, 2002). Também é importante ressaltar que os frutanos não são cariogênicos, uma vez que não são utilizados pela bactéria *Streptococcus mutans*, responsável pela geração de cáries (Franck, 2002; Mussatto e Mancilha, 2007).

O uso de frutanos do tipo inulina ou FOS como fibra em alimentos, muitas vezes, leva a uma melhoria do sabor e textura do produto. Quando usado em produtos de panificação e cereais, estes ingredientes apresentam vantagens em comparação com tradicionais fibras dietéticas. Inulina e FOS dão mais crocância e expansão para salgadinhos extrusados e cereais, além de aumentar sua vida de prateleira. Sua solubilidade permite a incorporação de fibras em sistemas aquosos, tais como bebidas e produtos lácteos (Franck, 2002). Entretanto, em bebidas como refrigerantes ou em alimentos que apresentem alta acidez e longa vida de prateleira, não é conveniente o uso destes compostos, uma vez que eles se hidrolizam em frutose nesses meios (Coussement, 1999).

Além dessas aplicações, os frutanos, como a inulina e FOS, são cada vez mais utilizados como ingredientes prebióticos em alimentos industrializados com alegação de propriedades funcionais (Mussatto e Mancilha, 2007).

Os GOS, em função de sua alta estabilidade em condições ácidas e de altas temperaturas, podem ser aplicados sem se decompor em grande variedade de alimentos. Esses carboidratos são utilizados como adoçantes em produtos lácteos, pães, geléias, produtos de confeitaria e bebidas. Durante a fermentação de leveduras e no assamento de pães, os GOS não são hidrolisados, resultando em um pão de excelente textura e sabor (Macfarlane et al., 2008). O valor calórico é similar ao de FOS, sendo calculado em 1.73 cal/g (Sako, Matsumoto, Tanaka, 1999).

Outra aplicação do GOS na indústria alimentícia é como substituto de gorduras, devido a sua capacidade de estabilizar emulsões, gerando características de textura e “mouthfeel” (sensação tátil na boca) de interesse. Desta forma, uma opção para a obtenção de iogurtes com menor teor de gordura e açúcares e maior teor de fibra solúvel seria a adição de GOS (Macfarlane et al., 2008).

A doçura dos GOS é consequência da liberação de resíduos de glicose e galactose após a hidrólise da lactose, pela enzima β -galactosidase, favorecendo uma diminuição da concentração de lactose, o que pode ser desejável em alimentos para pacientes com intolerância à lactose (Macfarlane et al., 2008).

Atualmente, tanto os GOS como os FOS também são utilizados em fórmulas infantis, visando mimetizar os efeitos benéficos de oligossacarídeos naturalmente presentes no leite humano. Esses oligossacarídeos são compostos principalmente de ácido siálico, N-acetilglucosamina, L-fucose, D-glicose, e D-galactose, e induzem um aumento do número de bifidobactérias e redução de bactérias potencialmente patogênicas em lactentes, além de estarem associados com a melhora da resposta imune e menor risco de infecções e diarreia (Sherman et al., 2009).

2.5 Microbiota intestinal e reações de fermentação no intestino grosso

O trato digestivo humano abriga uma enorme e diversificada população de micro-organismos, principalmente bactérias. A região mais densamente colonizada é o cólon, com aproximadamente 10^{12} UFC por grama de conteúdo colônico. De fato, a quantidade de bactérias do cólon representa cerca de 95% das células vivas do corpo humano (Cummings e Macfarlane, 1997).

Já foram identificados mais de 50 gêneros e acima de 400 espécies de microrganismos em fezes humanas. Destes, os que se encontram em maior número são anaeróbios, incluindo bacteróides, bifidobactéria, eubactéria, estreptococos e lactobacilos, enquanto que outros como enterobactérias, também podem ser encontrados em proporção reduzida. Geralmente os bacteróides (incluindo aqueles que utilizam polissacarídeos) são mais numerosos e podem compreender mais de 30% do total (Gibson e Roberfroid, 1995).

Um desequilíbrio na microbiota intestinal normal pode resultar em uma proliferação de micro-organismos potencialmente patogênicos. As conseqüências são reações inflamatórias agudas que causam diarreia e, algumas vezes, vômitos, e estão associadas com bactérias e vírus, incluindo *E. coli*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, *shigella sp.*, *Yersinia sp.* e protozoários, especialmente, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium parvum*. Bactérias também podem estar associadas a doenças crônicas do cólon. Por exemplo, *C. difficile* tem sido considerado o agente primário causador de colite pseudomembranosa (Casci, Rastall e Gibson, 2007).

Entretanto, bifidobactérias e lactobacilos são considerados constituintes da microbiota intestinal que proporcionam efeitos benéficos para o hospedeiro.

Neste sentido, torna-se um ramo cada vez mais popular das ciências nutricionais a terapia com pré e probióticos, no intuito de modular a microbiota intestinal humana (Preidis e Versalovic, 2009). (Figura 5)



Figura 5- Reações de prebióticos e probióticos com a microbiota intestinal (Adaptado de Puupponen-Pimiä *et al.*, 2002)

A microbiota intestinal é capaz de modificar uma série de substâncias fornecidas, principalmente, pela dieta, que não podem ser digeridas no intestino delgado e estão disponíveis para a fermentação pela microbiota colônica. Estas incluem o amido resistente, não-amiláceos (fibra dietética), oligossacarídeos, proteínas e aminoácidos (Tuohy *et al.*, 2005; Manning e Gibson, 2004).

Fibras solúveis e insolúveis são fermentadas em graus variados. No entanto, as fibras insolúveis (por exemplo, ligninas, celulose e algumas

hemiceluloses), que são resistentes a fermentação colônica, podem levar consigo substrato de carboidratos fermentáveis, incluindo os amidos e açúcares, embora seu papel principal seja aumentar a massa fecal. As fibras solúveis (por exemplo, pectinas, gomas, mucilagens, algumas hemiceluloses, bem como os frutanos) são geralmente mais completamente fermentadas, com pouco efeito no aumento da massa fecal (Wong e Jenkins, 2007).

Os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são, primariamente, bactérias fermentadoras de carboidratos, enquanto outros grupos, como bacteróides e clostridia são fermentadores proteolíticos e de aminoácidos. Os produtos da fermentação de carboidratos, principalmente os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são benéficos para a saúde do hospedeiro, enquanto que os da fermentação de proteínas e aminoácidos, que incluem a amônia, fenóis, indóis, tióis, aminas e sulfetos não são (Macfarlane *et al.*, 2006).

Lactobacilos podem ajudar na digestão da lactose em indivíduos intolerantes a esse nutriente, reduzir a constipação infantil e diarreia, ajudar a resistir à proliferação e translocação de micro-organismos patogênicos, como *Salmonella*, prevenir diarreia do viajante e ajudar a aliviar a síndrome do intestino irritável. Bifidobactérias estimulam o sistema imunológico, além de produzir vitaminas do complexo B, inibir o crescimento de patógenos, reduzir níveis de amônia e de colesterol no sangue e ajudar a restaurar a microbiota normal após períodos de terapia com antibiótico (Manning e Gibson, 2004).

Os principais produtos finais do processo de fermentação microbiana no intestino grosso, em termos quantitativos ou em termos de sua importância na fisiologia, são os AGCC, principalmente acetato, propionato e butirato. Eles podem ser metabolizados mais sistêmica ou localmente para proporcionar a geração de energia para o hospedeiro. Esses metabolitos são formados predominantemente a partir de polissacarídeos, oligossacarídeos, precursores

de proteínas, peptídeos e glicoproteína (Cummings e Macfarlane 2002, Fooks *et al.*, 1999). Devido a esta produção de AGCC, o valor do pH intestinal é reduzido (7,0-7,5 para 6,0-6,5) (Roberfroid *et al.*, 1993; Macfarlane *et al.*, 2006).

Em função da redução do pH luminal, ocorre a formação um ambiente inóspito aos microrganismos patogênicos, estímulo da produção de mucina, estímulo de células imunes do GALT (tecido linfóide associado ao intestino) por interações diretas ou por induzirem a produção de citocinas pelas células epiteliais, aumento na absorção de minerais catiônicos, indiretamente (Preidis e Versalovic, 2009) e diminuição da solubilidade dos ácidos biliares (Wong e Jenkins, 2007). Além disso, estes AGCC são a principal fonte de acetil-coenzima A para a síntese de lipídios e constituição da membrana celular, necessários para a manutenção da integridade das células da mucosa (Cummings e Macfarlane, 2002).

Portanto, a produção de AGCC é um dos mais importantes processos fisiológicos mediados por micro-organismos no cólon. A maioria destes metabolitos é absorvida pelo intestino, permitindo o armazenamento de energia do alimento não digerido no intestino superior (Méier, 2009).

A produção de AGCC é determinada por uma série de fatores, incluindo o número e composição da microbiota presente no cólon, tipo de substrato e tempo de trânsito intestinal. Em geral, a concentração dos principais AGCC presentes nas fezes (acetato, propionato, butirato) encontra-se na razão molar 60:20:20, respectivamente. A absorção destes no ceco e no cólon é um processo muito eficiente, com apenas 5-10% sendo excretados nas fezes. Estes ácidos contribuem com 80% do consumo energético dos colonócitos e com 5 -10% do total do consumo energético do indivíduo hospedeiro (Wong e Jenkins, 2007).

Dois mecanismos propostos de absorção são: 1) difusão dos AGCC protonados e 2) troca aniônica. Uma vez absorvidos, os AGCC são metabolizados em 3 principais locais no corpo: 1) nas células do epitélio do ceco e cólon, onde o butirato é usado como principal substrato para a produção de energia; 2) células do fígado que metabolizam butirato e propionato, utilizando-os para gliconeogênese, sendo 50 -70% de acetato também utilizado no mesmo local; 3) nas células musculares que produzem energia a partir da oxidação do acetato residual (Wong e Jenkins, 2007).

Muitos estudos constataram que o butirato estimula a proliferação de criptas em amostras de biópsia retiradas do ceco de humanos saudáveis. Os mecanismos pelos quais AGCC podem influenciar a proliferação celular não são conhecidos. Um possível fator pode ser o seu efeito sobre o fluxo sanguíneo da mucosa (Méier, 2009; Cook e Sellin, 1998). O butirato atua também como um verdadeiro substrato anti-inflamatório que inativa a ação de transcrição intracelular de fatores, tais como o fator nuclear-kB (NF-kB) e, conseqüentemente, impede a síntese e liberação de mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Méier, 2009).

Muitos fatores nutricionais, microbiológicos e fisiológicos afetam as reações de fermentação no intestino grosso, especialmente, o tempo de trânsito no cólon. Outros fatores relacionados que influenciam as reações metabólicas da microbiota e os tipos de AGCC que são formados no intestino incluem o envelhecimento, a atividade do sistema neuroendócrino, estresse, secreções pancreáticas, produção de muco, doenças, drogas e terapia antibiótica (Macfarlane *et al.*, 2008).

Do ponto de vista microbiológico, a composição química, forma física e quantidade de substrato disponível também afeta significativamente os produtos finais de fermentação, que são ainda mais dependentes dos tipos e

números de diferentes populações de bactérias no intestino, bem como competição e interações de cooperação entre diferentes grupos de bactérias da microbiota (Hopkins *et al.*, 2001).

2.6 Os micro-organismos *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*

As *Bifidobacterium* foram isoladas pela primeira vez por Tissier no final do século XIX. São, em geral, micro-organismos gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase-negativos e anaeróbicos. Existem mais de 10 espécies de *Bifidobacterium* de origem humana, dentre as quais se destacam *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum* (Teshima, 2001).

Morfologicamente podem ser encontrados nas formas de bacilos curtos e curvados, bacilos com a forma de bastonete e bacilos bifurcados (pleomórficos, que variam do formato uniforme ao ramificado, bifurcados em forma de Y ou V, espatulados ou em forma de clava) (Tannock, 1999).

São micro-organismos capazes de utilizar a galactose, a frutose e a lactose, além da glicose, como fontes de carbono. A temperatura ótima para seu crescimento é entre 37 e 41°C e os valores de pH entre 6 e 7 (Teshima, 2001).

As bifidobacterias pertencem à classe das actinobactérias e são caracterizadas pelo seu elevado conteúdo de guanina e citosina, que varia, em termos molares de 54 a 67%. São organismos heterofermentativos, que produzem ácidos acético e láctico na proporção molar de 3:2 a partir de 2 moles de hexose, sem produção de CO₂, exceto durante a degradação do gluconato. A enzima chave desta via metabólica fermentativa é a frutose-6-fosfato fosfocetolase, a qual pode por isso ser usada como marcador

taxonômico na identificação do gênero, sem permitir, entretanto, a diferenciação entre as espécies (Sgorbati *et al.*, 1995).

Os *Lactobacillus* foram isolados pela primeira vez em 1900 a partir de fezes de lactentes amamentados com leite materno. São bacilos Gram positivos, regulares e não esporulados. Possuem morfologia celular variando de bacilos longos e finos até, algumas vezes, como bacilos curvados e pequenos. A forma cocobacilar também é comum, ocorrendo, muitas vezes, a formação de cadeias curtas. Não é comum terem motilidade e não são redutores de nitrato (Fooks e Gibson, 2002).

Existem mais de 50 espécies de *Lactobacillus reconhecidas*, sendo que se destacam as *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum* e *L. brevis*. As condições ótimas para o crescimento destes micro-organismos são temperatura entre 35 a 40°C e pH de 5,5-6,0 (Fooks e Gibson, 2002).

2.7 Ação dos prebióticos no intestino

Embora muitas bactérias sejam capazes de fermentar ONDs, como os FOS e os GOS, a maioria das investigações demonstram que estes carboidratos favorecem o crescimento, principalmente, dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Assim, ao alterarem a composição e a funcionalidade da microbiota, os prebióticos desempenham um papel fundamental na saúde do hospedeiro, não só por facilitar a exclusão competitiva de patógenos em potencial, mas também por modular o sistema imunológico (Saulnier *et al.*, 2009).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* promovem uma melhor digestão da lactose favorecendo os indivíduos intolerantes a esse nutriente, favorecem a regularização do trânsito intestinal, aumentam a resistência tanto à proliferação

como à translocação de micro-organismos patogênicos (ex: *Salmonella*), dentre outros efeitos benéficos. Já as bactérias do gênero *Bifidobacterium* estimulam o sistema imunológico, produzem vitaminas do complexo B, inibem o crescimento de patógenos, reduzem os níveis séricos de amônia e de colesterol e ajudam a restaurar a microbiota normal após períodos de terapia com antibiótico (Manning e Gibson, 2004).

Em estudos avaliando os efeitos gastrointestinais de fórmulas infantis suplementados com uma mistura de FOS e GOS, usados na dieta diária de lactentes saudáveis, os autores observaram fezes mais regulares e mais suaves, sem diarreia e uma menor frequência de sintomas relatados associados à constipação intestinal, bem como o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos (Moro *et al.*, 2002; Bakker-Zierikzee *et al.*, 2005; Moro *et al.*, 2006). Cherbut *et al.* (2003) verificaram que processos inflamatórios foram diminuídos, significativamente, em ratos com colite induzida, com a suplementação de FOS durante quinze dias. Os autores atribuíram este efeito ao fato deste oligossacarídeo aumentar o crescimento de bactérias ácido lácticas e, conseqüentemente, a produção de butirato.

Um dos efeitos mais importantes dos prebióticos é fortalecer a resistência do hospedeiro aos patógenos invasores e evitar episódios de diarreia. Além disso, dados experimentais que sustentam o efeito de prebióticos e vários ensaios clínicos humanos recentes indicam que estes compostos podem auxiliar na prevenção e tratamento de doenças gastrointestinais e sistêmicas (Chen e Walker, 2005).

Outro benefício dos prebióticos inclui aliviar a constipação. Estudos demonstraram que o oligossacarídeo isomaltoseoligossacarídeo se mostrou eficaz para tratar a constipação de pacientes em hemodiálise e idosos. O

mesmo efeito foi observado, quando se tratou de galactooligossacarídeo (Teuri e Korpela, 1998; Chen e Walker, 2005).

Em estudo avaliando os efeitos gastrointestinais de cereais infantis suplementados com frutooligossacarídeos (FOS), usados como um complemento a dieta diária de lactentes saudáveis, os autores observaram fezes mais regulares e mais suaves, sem diarreia, bem como uma menor frequência de sintomas relatados associados à constipação intestinal, tais como fezes duras ou períodos prolongados sem defecação (Moore *et al.*, 2007).

Moro *et al.* (2002) demonstraram que o aumento de bifidobactérias foi dose-dependente, após um período de 28 dias de alimentação, visto que o número desses micro-organismos foi maior no grupo de crianças alimentadas com 0,8 g / dl GOS / FOS em relação ao grupo alimentado com 0,4 g / dl GOS / FOS. Essas mudanças, associadas a uma redução do pH das fezes e uma modificação do padrão de AGCC, em última análise, resultou em uma composição da microbiota intestinal mais parecida com a de bebês amamentados com leite humano quando comparados com aqueles alimentados com fórmulas infantis sem adição de prebióticos. Em nascidos pré-termos, Kapiki *et al.* (2006) também observaram crescimento de bifidobactérias e a redução de micro-organismos patógenos - *Escherichia coli* e *Enterococcus* - além do aumento da frequência das fezes, no grupo alimentado com fórmula suplementada com baixa dose de FOS. Os mesmos efeitos em nascidos pré-termos haviam sido observados por Boehm *et al.* (2002).

Além destes efeitos citados, a mistura de GOS/FOS (9:1) em fórmulas para lactentes também tem demonstrado efeito imunomodulador, beneficiando o perfil de imunoglobulinas em recém-nascidos de alto risco para alergia (Moro *et al.*, 2006; Vos *et al.*, 2006; van Hoffen *et al.*, 2009). Um estudo recente

observou que fórmula infantil suplementada com prebióticos FOS, GOS e oligossacarídeos derivados de pectina (PAO) diminuiu o risco de dermatite atópica em bebês no primeiro ano de vida (Grüber *et al.*, 2010). Ainda, Bruzzese *et al.* (2008) observaram que a administração de GOS/FOS (9:1) reduziu a incidência de infecções intestinais e respiratórias em bebês saudáveis durante o primeiro ano de vida.

Cherbut *et al.* (2003) verificaram que processos inflamatórios foram diminuídos, significativamente, em ratos com colite induzida, com a suplementação de FOS durante quinze dias. Os autores atribuíram este efeito ao fato deste oligossacarídeo aumentar o crescimento de bactérias ácido lácticas e, conseqüentemente, a produção de butirato.

Estes prebióticos também podem desempenhar um importante papel no aumento da absorção de minerais, como demonstrado em estudos com modelos animais (Bruzzese *et al.*, 2006). Chonan *et al.* (2001) observaram um aumento na absorção intestinal de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em ratos alimentados com GOS. Chonan *et al.* (1995) já haviam observado o efeito de GOS na absorção de Ca e na prevenção de perda óssea em ratas Wistar ovariectomizadas. Os animais alimentados com GOS tiveram maior absorção de Ca e maior mineralização óssea do que aqueles alimentados com dieta controle. No mesmo estudo, foi observado, também, um efeito hipocolesterolêmico de GOS.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da adição de oligossacarídeos FOS e GOS isolados e a mistura dos dois na dieta de ratas Wistar em fase de crescimento com ênfase na alteração de pH e modulação da microbiota do conteúdo cecal.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento de ratas Wistar alimentadas com dietas adicionadas de FOS, GOS e mistura FOS + GOS ao longo de 90 dias.
- Determinar pH do conteúdo cecal utilizando peagômetro digital.
- Quantificar as colônias de bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* nas amostras de conteúdo cecal.

4 Material e Métodos

4.1 Oligossacarídeos FOS e GOS

4.1.1 Obtenção dos prebióticos

Os frutooligossacarídeos (FOS) - P95 Beneo Orafti utilizados foram fornecidos pela empresa ORAFTI (Bélgica), obtidos através da hidrólise parcial da inulina, com grau de polimerização (DP) 2~8 e grau Brix de 50º, apresentando a composição descrita na Tabela 2:

Tabela 2. Composição do FOS (P95 Beneo Orafti) utilizado no presente estudo.

Componente	%
Oligofrutose	95%
Glicose + Frutose + Sacarose	5%

Os galactooligossacarídeos (GOS) utilizados foram fornecidos pelo Laboratório de Bioaromas da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), com grau Brix de 55º, apresentando a composição descrita na Tabela 3:

Tabela 3. Composição do GOS utilizado no presente estudo.

Componente	%
Galactooligossacarídeos	28%
Lactose	50%
Galactose	15%
glicose	7%

4.2 Ensaio biológico

O ensaio biológico foi realizado no Laboratório de Ensaaios Biológicos (LEB), DEPAN-FEA-Unicamp. Foram utilizadas 32 ratas da raça Wistar de 21 dias (recém-desmamadas) provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB). As ratas foram acondicionadas em gaiolas individuais, com temperatura (20-22°C) e umidade (40-50%) controladas, incluindo ciclo claro/escuro de 12 horas e acesso a alimento e água *ad libitum*. O consumo de ração foi monitorado a cada dois dias e o ganho de peso, semanalmente.

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais de 8 animais cada e receberam dieta AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993) como controle. Os animais foram mortos por decapitação após 90 dias. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp, sob o Protocolo nº 2077-1 (Anexo 1).

4.2.1 Formulação de dietas

Foram preparadas quatro dietas, como mostrado na tabela 3, utilizando AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993) como padrão, com 12% de proteína (Goena *et al.*, 1989). Todas as dietas foram analisadas quanto ao seu teor de macronutrientes, a fim de oferecer aos animais dietas isocalóricas, isolipídicas e isoprotéicas para que não houvesse interferência no resultado do experimento. Desta forma, extrato etéreo foi analisado pelo método de Bligh e Dyer (1959); nitrogênio orgânico total, proteico e não proteico, pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1975); cinzas e umidade segundo o Instituto Adolfo Lutz (1985); carboidratos foram calculados por diferença.

Tabela 4. Composição da dieta AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993) contendo 12% de proteína (Goena *et al.*, 1989) e modificada de acordo com os tratamentos propostos.

Ingredientes	Controle	FOS	GOS	FOS + GOS
Amido de milho (63,14%)	429,0	429,0	429,0	429,0
Caseína (85% proteína)	150,0	150,0	150,0	150,0
Maltodextrina (20,97%)	142,5	142,5	142,5	142,5
Sacarose	108,0	54,0	54,0	54,0
GOS	-	-	54,0	27,0
FOS	-	54,0	-	27,0
Óleo de soja	70,0	70,0	70,0	70,0
Celulose	50,0	50,0	50,0	50,0
Mix mineral (AIN-93G-MX)	35,0	35,0	35,0	35,0
Mix vitamínico (AIN-93-VX)	10,0	10,0	10,0	10,0
L-Cistina	3,0	3,0	3,0	3,0
Bitartrato colina (41,1% colina)	2,5	2,5	2,5	2,5
Butilhidroquinona	0,014	0,014	0,014	0,014

Os grupos controle e experimentais foram alimentados com as seguintes dietas:

- Grupo Controle: dieta padrão AIN 93G;
- FOS: dieta AIN 93G com substituição de 50% da sacarose por FOS;

- GOS: dieta AIN 93G com substituição de 50% da sacarose por GOS;
- FOS + GOS: dieta AIN 93G com substituição de 50% da sacarose por mistura de FOS e GOS na proporção 3,5: 1.

A proporção de 3,5: 1 FOS/GOS se deve ao fato de o composto GOS conter 28% de galactooligosacarídeo e o FOS conter 95% de oligofrutose. As quantidades não foram equalizadas devido ao alto teor de lactose presente no GOS (descrito na tabela 2 do item 4.1.1), a qual pode provocar diarreia se ingerida em altas quantidades.

O experimento teve duração de 90 dias, quando os animais foram mortos por decapitação, sendo realizada a coleta do conteúdo cecal para as análises propostas.

4.3 Conteúdo cecal

Após a morte dos animais, aproximadamente 2g de amostras do conteúdo cecal foram coletadas com espátula estéril e utilizadas para análises de pH e microbiologia.

4.3.1 Análise de pH cecal

Para análise de pH, 1g de amostras do conteúdo cecal foram diluídas em água deionizada e homogeneizadas. Deste modo, o pH foi obtido por meio de peagômetro digital (TEC 5MP, Tecnal), de acordo com metodologia proposta por Asvarujanon *et al.* (2005).

4.3.2 Análises microbiológicas

Para quantificar as colônias de bactérias, as amostras do conteúdo luminal do ceco foram pesadas, homogeneizadas em vórtex e dispersadas em água de peptona estéril em uma concentração de 50 - 100 mg/ml. Em seguida, foram feitas diluições seriadas 1/10 (de 10^{-1} a 10^{-6}), as quais foram cultivadas em meios específicos (Albuquerque *et al.*, 2010).

Para a cultura de lactobacilos, as amostras foram inoculadas em placa de Petri contendo Agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England).

Para a cultura de bifidobactérias, foi empregado o mesmo meio, porém, suplementado com 0,5 mg/l de dicloxacilina sódica monoidratada (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 1 g/l de LiCl (Synth), e 0,5 g/l de Cloridrato de L-cisteína (Synth).

Foram inoculadas 100 μ l de homogenato do conteúdo cecal nas placas e distribuídas de forma homogênea com o auxílio de uma espátula estéril descartável.

Todas as placas foram incubadas em câmaras de anaerobiose contendo sistema gerador de anaerobiose Anaerogen (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) durante 24 - 48 horas a 37°C. Os resultados foram expressos em logaritmo decimal das unidades formadoras de colônia/g material.

5 Delineamento estatístico

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 5. A análise de variância (ANOVA) foi realizada e os dados paramétricos foram analisados por meio do teste de Tukey, a 5% de significância e os não paramétricos por teste de Dunnett.

6 Resultados e Discussão

6.1 Ensaio biológico

A recomendação para ingestão diária de dieta para ratos durante a fase de crescimento é de 12 a 15 g/dia/animal (De Luca, 1996). No presente estudo a média de consumo variou de 14,57 a 15,94 g/dia/rato, não apresentando diferença estatística entres os grupos (Tabela 5). Desta forma, conclui-se que todos os animais apresentaram ingestão adequada e semelhante de dieta.

O ganho de peso (tabela 5) não revelou diferenças estatísticas entre os grupos, assim como o coeficiente de eficiência alimentar (CEA), o qual variou 0,14 a 0,15. Estudos realizados com animais revelam valores adequados de CEA entre 0,103 a 0,340 (Shibata; Matsuo, 1989; Yuan; Kittis, 1994; Mezei *et al.*, 2003), o que mostra que as dietas suplementadas com os oligossacarídeos do presente estudo encontram-se dentro destes valores e proporcionaram o crescimento adequado dos animais.

Tabela 5. Evolução ponderal dos animais alimentados com dietas contendo FOS, GOS e FOS + GOS.

Ensaio	Controle	FOS	GOS	FOS + GOS
Consumo de dieta/dia (g)	14,57 ± 1,16 ^a	15,41 ± 1,02 ^a	15,16 ± 1,13 ^a	15,94 ± 0,83 ^a
Ganho de peso	185,5 ± 23,67 ^a	202,5 ± 19,7 ^a	194,2 ± 26,3 ^a	215,71 ± 19,25 ^a
CEA ^{A)}	0,14 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,01 ^a

A) CEA – Coeficiente de Eficiência Alimentar (ganho de peso[g]/ ingestão de dieta [g])
Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (p<0,05)

6.2 pH do conteúdo cecal

As médias dos valores de pH do conteúdo cecal dos grupos estão representadas na figura 6. Observou-se uma diminuição significativa do pH do conteúdo cecal nos grupos tratados com FOS e FOS+GOS em relação ao grupo Controle ($p < 0,001$) e em relação ao grupo tratado com GOS ($p < 0,05$).

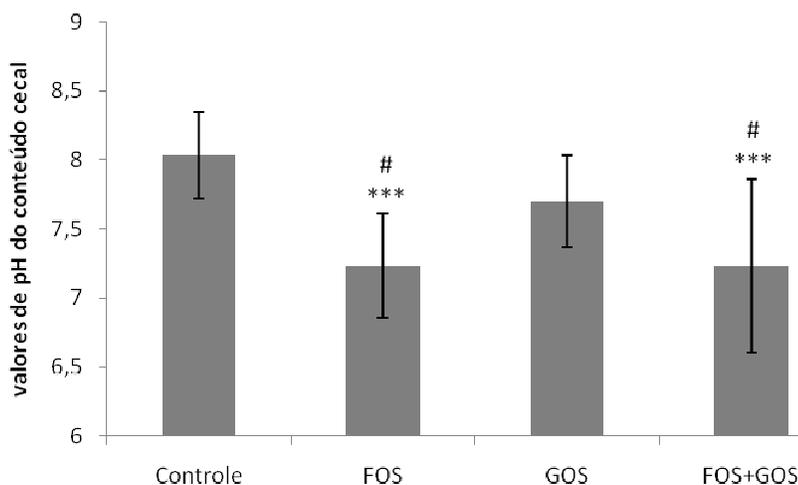


Figura 6- Efeito das dietas nos valores de pH do conteúdo cecal. *** $p < 0,001$ versus grupo controle e # $p < 0,05$ versus grupo GOS.

Alguns autores encontraram uma redução significativa do pH do conteúdo cecal quando utilizaram 5 % de GOS na dieta (Chonan *et al.*, 1993; Chonan *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2009). Entretanto, nos estudos citados, a pureza do GOS era maior (90 a 99%) comparada ao composto utilizado no presente estudo (28%) como apresentado na tabela 3 do item 4.1.1. Possivelmente, a divergência entre os resultados encontrados na literatura e o presente estudo se deve à diferença na composição do composto GOS, o qual apresenta uma quantidade de galactooligossacarídeos aproximadamente quatro vezes menor.

Muitos autores constataram redução significativa do pH do conteúdo cecal, utilizando 5% de FOS na dieta (Campbell *et al.*, 1997; Bruggencate *et al.*, 2004; Lara-Villoslada *et al.*, 2006; Lobo *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2009). O mesmo foi encontrado no presente estudo, nos grupos que se alimentaram das dietas contendo 5% de FOS isolado ou 5 % da mistura de FOS e GOS. Na mistura destes, o FOS corresponde a 2,5 % da dieta. Resultados semelhantes foram descritos por outros autores, os quais utilizaram 3% deste oligossacarídeo na dieta (Bruggencate *et al.*, 2003).

As fibras solúveis, tais como os ONDs com função prebiótica, são fermentadas no intestino grosso, produzindo AGCC - principalmente acetato, propionato e butirato - e gases (CO₂, CH₄ e H₂) (Méier, 2009). O aumento de AGCC resulta no decréscimo do pH, o qual, indiretamente, influencia na composição da microbiota colônica (micro-organismos patogênicos, tais como Clostridium, são reduzidos quando o pH é mais baixo), aumenta absorção de minerais (indiretamente) e reduz a absorção de amônia pela dissociação da mesma e outras aminas (Wong *et al.*, 2006). Além disso, em condições de baixo pH, a formação de ácidos biliares secundários, os quais são citotóxicos, é inibida e sua solubilidade é diminuída (Wijnands *et al.*, 2001).

O aumento no *pool* de AGCC, possivelmente, está relacionado ao efeito desses produtos da fermentação de prebióticos sobre o tecido intestinal propriamente dito. Os AGCC atuam como a principal fonte de acetil-coenzima A (utilizado na lipogênese e síntese de membrana plasmática celular) e de energia para os colonócitos, sendo fundamentais para o crescimento e diferenciação de células normais do epitélio colônico, na produção de muco e no aumento do fluxo sanguíneo na mucosa intestinal (Cummings e Macfarlane, 2002; Chen e Walker, 2005). Os AGCC produzidos pela fermentação dos prebióticos também podem influenciar na absorção intestinal de cálcio, tanto

por transporte passivo como ativo, pois diminuem o pH do meio e assim, provocam a ionização do cálcio, favorecendo o balanço positivo no metabolismo deste mineral (Bruzzese *et al.*, 2006; Netto e Miyasaka, 2006; Netto, 2009).

6.3 Microbiota intestinal

O objetivo principal de suplementar a dieta humana com prebióticos é modular benéficamente a microbiota intestinal. A microbiota do cólon humano compreende, aproximadamente, 95% do total de células do corpo e tem um papel chave na nutrição e saúde do hospedeiro. Mais de 500 espécies pertencentes a cinco gêneros diferentes já foram identificadas em fezes humanas (Tannock, 2002). Destas, há indicações que as *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são os grupos responsáveis por efeitos fisiológicos que melhoram a saúde. Entre estes efeitos benéficos pode-se citar: proteção contra doenças entéricas; diminuição do pH intestinal devido à formação de AGCC após a fermentação dos carboidratos; supressão de micro-organismos patógenos e putrefativos; produção de vitaminas (principalmente do complexo B); estímulo da resposta imune (Kolida *et al.*, 2002).

Devido à sensibilidade de bifidobactérias ao calor e ao oxigênio, sua aplicação em alimentos, como probióticos, tem sido limitada em comparação com os lactobacilos. Portanto, é interessante o uso de ingredientes na indústria de alimentos que produzam um efeito bifidogênico, que resistam aos processamentos normais e demonstrem ter efeito no corpo humano após sua ingestão (Kolida *et al.*, 2002).

Os oligossacarídeos FOS e GOS não são digeridos no trato gastrointestinal superior e chegam, praticamente, intactos ao cólon. Isso faz

com que eles sejam ideais para fermentação no cólon pela microbiota sacarolítica. Os efeitos destes compostos na microbiota intestinal humana tem sido extensivamente estudados *in vivo* e *in vitro* e a maioria dos estudos reportam haver uma fermentação seletiva pela microbiota benéfica, principalmente bifidobactérias e em menor extensão, os lactobacilos (Roberfroid, 2007).

No presente estudo verificou-se um aumento significativo na concentração de *Bifidobacterium* nos grupos tratados com os oligossacarídeos FOS ($P < 0,001$) e GOS ($P < 0,01$) isolados e com a mistura dos dois - FOS+GOS ($P < 0,001$). O aumento nos níveis de *Lactobacillus*, embora tenha ocorrido nos três grupos que receberam os prebióticos, foi estatisticamente maior nos grupos tratados com FOS ($P < 0,05$) e com a mistura FOS+GOS ($P < 0,05$). Os resultados são mostrados na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6- Efeito das dietas nos níveis de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (CFU log 10) do conteúdo cecal

	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>
Controle	7,9 ± (7,7-8,1)	7,8 ± (7,4-8,3)
GOS	8,6 ± (8,0-8,9)	8,7 ± (8,4-9,3)**
FOS	8,5 ± (8,2-9,7)*	9,0 ± (7,9-10,0)***
GOS+FOS	8,5 ± (8,2-9,7)*	9,0 ± (8,8-9,1)***

Dados expressos em mediana ± (min-max). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ versus grupo Controle

Este resultado corrobora com os demais encontrados na literatura, embora estes tenham utilizado os prebióticos em concentrações diferentes do presente estudo. A quantidade de *Bifidobacterium* no conteúdo cecal de ratos

alimentados com FOS e GOS (4% da dieta) foi significativamente maior quando comparados com o grupo controle em estudo feito por Djouzi e Andieueux (1997). Pan *et al.* (2009) também encontraram um aumento na concentração tanto de *Lactobacillus* quanto de *Bifidobacterium* no conteúdo cecal de camundongos quando suplementados com FOS e GOS na concentração de 5% da dieta. Meer *et al.* (2007), ao avaliarem o efeito de uma mistura de oligossacarídeos (85g de GOS/FOS (9:1) + 8,8 g de oligossacarídeos acidificados/ Kg de dieta), encontraram um aumento de 366% e 344% no total de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, respectivamente. Bruggencate *et al.* (2003) não encontraram mudança na quantidade de *Lactobacillus* do conteúdo colônico, mas verificaram aumento significativo quando se tratou da avaliação da quantidade de *Bifidobacterium* em ratos alimentados com 6% de FOS na dieta em comparação com o grupo controle. Em outro estudo, ratos alimentados com uma dieta contendo 5 % de FOS tiveram um crescimento de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* no conteúdo colônico (Bovee-Oudenhoven *et al.*, 2003).

Em estudos com humanos, também já se comprova o efeito destes ONDs na microbiota intestinal. FOS e GOS têm sido utilizados em fórmulas infantis para mimetizar os efeitos dos oligossacarídeos presentes no leite humano, com o intuito de promover o crescimento intestinal, principalmente, de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* em crianças alimentadas com esta fórmula (Boehm *et al.*, 2005).

A prevenção de constipação, a redução do pH das fezes, bem como o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos foram observados em estudos usando uma mistura de GOS e FOS na proporção 9:1 em fórmulas infantis (Moro *et al.*, 2002; Bakker-Zierikzee *et al.*, 2005; Moro *et al.*, 2006). A proporção de 90% de cadeia curta de galactooligosacarídeos e 10% de

frutooligossacarídeos foi usada nestes estudos para simular a distribuição do tamanho molecular de oligossacarídeos do leite humano (Fanaro *et al.*, 2005).

Em estudos em humanos adultos, frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS), quando acrescentados na dieta em doses relativamente pequenas (5-20 g/dia), têm demonstrado, claramente, estimular o crescimento de espécies pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, que normalmente não são os micro-organismos mais numerosos no intestino, exceto no bebê amamentado com leite humano (Gibson *et al.*, 2004).

Gibson *et al.* (1995) encontraram um significativo aumento no número de *Bifidobacterium* em fezes de adultos saudáveis, do sexo masculino, alimentados com 15 g/dia de FOS durante um estudo de 15 dias. No mesmo estudo foi verificado uma diminuição na quantidade de *Bacteroides sp.*, *Clostridium sp.* e fusobacteria. Similarmente, Gibson e Roberfroid (1995) confirmaram o efeito bifidogênico de FOS e também observaram uma redução de *Bacteroides sp.* em adultos saudáveis.

A utilização de GOS por bactérias intestinais e diferentes propriedades fisiológicas dessas moléculas tem sido muito estudada. Uma significativa correlação entre a administração de GOS e o aumento de *Bifidobacterium*, juntamente com a redução de bacteróides e enterobacterias tem sido encontrada nesses estudos (Boehm *et al.*, 2005). Davis *et al.* (2010) observaram que um produto contendo GOS de alta pureza, em doses de 5 g ou mais, causou um efeito bifidogênico em adultos saudáveis, enquanto dose de 2,5 g não mostrou efeito significativo. No entanto, os resultados também mostraram que, mesmo quando GOS foi administrado por várias semanas e em altas doses, algumas pessoas ainda não apresentavam resposta bifidogênica ao tratamento. Embora muitos estudos *in vivo* tenham mostrado o

efeito bifidogênico de GOS (Djouzi e Andieueux, 1997; Holma *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2010), resultados diferentes deste foram encontrados por outros autores (Alles *et al.*, 1999; Malinen *et al.*, 2002).

O fato de a quantidade de *Lactobacillus* não ter sido afetada significativamente no grupo tratado com o prebiótico GOS isolado, contrapondo-se aos resultados encontrados na literatura (Djouzi e Andieueux, 1997; Pan *et al.*, 2009), pode ser explicada pela diferença da pureza dos compostos utilizados nos estudos (99% nos estudos citados contra 28% do presente estudo). O tipo de GOS, a dosagem, a pureza, assim, como o delineamento experimental e métodos de análise diferentes podem contribuir para esta divergência de resultados (Macfarlane *et al.*, 2008). Ainda, Gibson *et al.* (2004) e Roberfroid (2007) relatam haver uma correlação com o número inicial de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* inicialmente presente no cólon e o efeito prebiótico de um produto.

7 Conclusões

- O consumo de dieta e o peso dos animais não foram alterados, significativamente, com os diferentes tratamentos.
- O pH do conteúdo cecal foi diminuído nos grupos tratados com FOS e com FOS+GOS.
- FOS e FOS+GOS (3,5: 1) aumentaram a quantidade de *Lactobacillus* no conteúdo cecal dos animais estudados. A quantidade de GOS isolado presente na dieta não foi suficiente para provocar o mesmo efeito.
- Os oligossacarídeos FOS, GOS ou a mistura dos dois, adicionados às dietas, apresentaram efeito bifidogênico.

8 Referências Bibliográficas

ALLES M. S., HARTEMINK, R., MEYBOOM, S., HARRYMAN, J.L., VAN LAERE, K.M.J., NAGENGAST, F.M., HAUTVAST, J.G.A.J. Effect of transgalactooligosaccharides on the composition of the human intestinal microflora and on the putative risk markers for colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 980-991, 1999.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 12 ed. Washington: AOAC International, v.2, p.15, 1975.

ASVARUJANON, P; ISHIZUKA, S.; HARA, H. Promotive effects of non-digestible disaccharides on rat mineral absorption depend on the type of saccharide. **Nutrition**, Los Angeles, v.21, n.10, p. 1025-1035, 2005.

BAKKER-ZIERIKZEE, A.M.; ALLES, M. S.; KNOL, J.; KOK, F.J.; TOLBOOM, J. J.M.; BINDELS, J.G. Effects of infant formula containing a mixture of galacto- and fructooligosaccharides or viable *Bifidobacterium animalis* on the intestinal microflora during the first 4 months of life. **British Journal of Nutrition**, New York, v.94, n.5, p.783-790, Nov. 2005.

BHATIA A, RANI U. Prebiotics and health: Clinical implications. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 6, p.546-554, Dez. 2007.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, n.8, p.911-917, Aug. 1959.

BOEHM, G.; LIDESTRI, M.; CASETTA, P.; JELINEK, J.; NEGRETTI, F.; STAHL, B.; MARINI, A. Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm. **Archives Disease Child Fetal Neonatal**. v. 86, p.178–181, 2002.

BOEHM, G.; STAHL, B.; JELINEK, J.; KNOL, J.; MINIELLO, V.; MORO, G. E. Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas. **Acta Pædiatrica**, v. 94, p. 18–21, 2005.

BORNET, F.R. J. Undigestible sugars in food products **American Journal of Clinical Nutrition**. v.59, p.763-769, 1994.

BOUHNİK, Y.; VAHEDI, K.; ACHOUR, L.; ATTAR, A.; SALFATI, J.; POCHART, P.; MARTEAU, P.; FLOURIE, B.; BORNET, F.; RAMBAUD J. Short-Chain Fructo-Oligosaccharide Administration Dose-Dependently Increases Fecal Bifidobacteria in Healthy Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 1, p. 113-116, Jan. 1999.

BOVEE-LOUDENHOVEN, I. M. J.; TEN BRUGGENCATE; S J M; LETTINK-WISSINK, M. L. G.; VAN DER MEER, R. Dietary fructo-oligosaccharides and lactulose inhibit intestinal colonisation but stimulate translocation of salmonella in rats.; **Gut**. v. 52, p. 1572-1578, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Brasília, 1999.

BRUGGENCATE, T. S. J.; BOVEE-LOUDENHOVEN, I. M.; LETTINK-WISSINK, M.L.; KATAN, M. B.; VAN DER MEER, R. Dietary fructooligosaccharides and inulin decrease resistance of rats to salmonella: protective role of calcium. **Gut**. v.53, p. 530–535, 2004

BRUGGENCATE, T. S. J.; BOVEE-LOUDENHOVEN, I. M.; LETTINK-WISSINK, M.L.; KATAN, M. B.; VAN DER MEER, R. Dietary fructooligosaccharides dose-dependently increase translocation of salmonella in rats. **Journal of Nutrition**. v. 133, p. 2313–2318, 2003.

BRUZZESE, E.; VOLPICELLI, M.; SQUAGLIA, M.;TARTAGLIONE, A.; GUARINO, A. Impact of prebiotics on human health. **Digestive and Liver Disease**, v. 38 Suppl. 2 ,p. 283–287, 2006.

BRUZZESE, E.; VOLPICELLI, M.; SQUEGLIA, V.; BRUZZESE, D.; SALVINI, F.; BISCEGLIA, M.; LIONETTI, P.; CINQUETTI, M.; IACONO, G.; AMARRI, S., GUARINO, A. A formula containing galacto- and fructo-oligosaccharides prevents intestinal and extra-intestinal infections: An observational study. **Clinical Nutrition**, v. 28, p. 156-161, 2008.

Campbell, J. M.; Fahey, G. C.; Wolf, B. W. Selected Indigestible Oligosaccharides Affect Large Bowel Mass, Cecal and Fecal Short-Chain Fatty Acids, pH and Microflora in Rats. **Journal of Nutrition**. v. 127, p.130–136, 1997.

CASHMAN, K. D. A Prebiotic Substance Persistently Enhances Intestinal Calcium Absorption and Increases Bone Mineralization in Young Adolescents. **Nutrition Reviews**, v. 64, n. 4, 2006.

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

CHERBUT, C.; MICHEL, C.; LECANNU, G. The Prebiotic Characteristics of Fructooligosaccharides Are Necessary for Reduction of TNBS-Induced Colitis in Rats. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 21-27, 2003.

CHONAN, o.; TAKAHASHI, R.; WATANUKI, M. Role of activity of gastrointestinal microflora in absorption of calcium and magnesium in rats fed β 1-4 linked galactooligosaccharides. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 8, p. 1872-1875, 2001.

CHONAN,O.; MATSUMOTO, K.; WATANUKI, M. Effect of galacto oligosaccharides on calcium absorption and preventing bone loss in ovariectomized rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.59, n.2, p.236-239, Feb. 1995.

COOK, S. I.; SELLIN, J. H. Review article: short chain fatty acids in health and disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.12, p. 499-507, 1998.

COUSSEMENT, P. A. Inulin and Oligofructose: Safe Intakes and Legal Status. **Journal of Nutrition**. v.129, p.1412–1417, 1999.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M.J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**. v. 71, p. 353-361, 1996.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. Colonic Microflora: Nutrition and Health. **Nutrition**. v. 13, n.5, p.476-479, 1997.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 87, Suppl. 2, p.145-151, 2002.

DAVIS, L.M.G., MARTÍNEZ, I., WALTER, J., HUTKINS, R., A dose dependent impact of prebiotic galactooligosaccharides on the intestinal microbiota of healthy adults, **International Journal of Food Microbiology** (2010), doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.007

DE LUCA, R.R., ALEXANDRE, S.R., MARQUES, T. **Manual para Técnico em Bioterismo**. São Paulo: Winner Graph, p.259,1996.

DJOUZI, Z.; ANDIUEUX, C. Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with a human faecal flora. **British Journal of Nutrition**. v.78, p. 313-324, 1997.

FANARO, S.; BOEHM, G.; GARSSSEN, J.; KNOL, J.; MOSCA, F.; STAHL, B.; VIGI, V. Galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides as prebiotics in infant formulas: A review. **Acta Pædiatrica**, v. 94, p. 22–26, 2005.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**. v. 9 p. 53-61, 2002

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**. v. 9, p. 53-61,1999.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**. v.87, Suppl. 2, S287–S291, 2002.

GIBSON G. R.; BEATTY, E. R.; WANG X.; CUMMINGS, J. H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**. v. 108, p. 975-82, 1995.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M.B. Dietary of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. **The Journal of Nutrition**. v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G.R.; PROBERT, H.M.; LOO, R.A. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebióticos. **Nutrition Research Reviews**, v.17, p. 259–275, 2004.

GOENA, M.; MARZO, F.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.L.; TOSAR, A.; FRÜHBECK, G.; SANTIDRIÁN, S. 1989. Effect of the raw legume *Vicia ervilia* on muscle and liver protein metabolism in growing rats. **Revista Española de Fisiología**, v.45, p.55-60, 1989.

GOTO, K.; FUKAI, K.; HIDIKA, J., NANJO, F.; HARA, Y. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 59, p. 2346-2347, 1995.

GRÜBER, C.; VAN STUIJVENBERG, M.; MOSCA, F.; MORO, G.; CHIRICO, G.; BRAEGGER C.P. Reduced occurrence of early atopic dermatitis because of immunoactive prebiotics among low-atopy-risk infants. **Journal Allergy Clinical Immunology**. v.126, n.4, p. 791-797, 2010.

Holma, R., Juvonen, P., Asmawi, M. Z., Vapaatalo, H. Korpela, R. Galacto-oligosaccharides Stimulate the Growth of Bifidobacteria but Fail to Attenuate Inflammation in Experimental Colitis in Rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 37, n.9, p. 1042 — 1047, 2002.

HOPKINS, M. J.; SHARP, R.; MACFARLANE, G. T. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. **Gut**, v. 48, p.198–205, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ed. São Paulo. v.1, 1985.

KAPIKI, A.; COSTALOS, C.; OIKONOMIDOU, C.; TRIANTAFYLLIDOU, A.; LOUKATOU, E.; PERTROHILOU, V. The effect of a fructo-oligosaccharide

- supplemented formula on gut flora of preterm infants. **Early Human Development**. v. 83, p. 335-339, 2007.
- KAUR, N.; GUPTA , A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Bioscience**. V. 27, p. 703–714, 2002.
- KOLIDA, S.; TUOHY, K.; GIBSON, G. R. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**. v. 87, Suppl. 2 . p. 193-197, 2002
- LARA-VILLOSLADA, F.; HARO, O.; CAMUESCO, D.; COMALADA, M.; VELASCO, J.; ZARZUELO, A.; XAUS, J.; GALVEZ, J. Short-chain fructooligosaccharides, in spite of being fermented in the upper part of the large intestine, have anti-inflammatory activity in the TNBS model of colitis. **European Journal of Nutrition** . v.45, p.418–425, 2006.
- LIMA DE ALBUQUERQUE, C.; COMALADA, M.; CAMUESCO, D.; RODRÍGUEZ-CABEZAS, M. E.; LUIZ-FERREIRA, A.; NIETO, A.; BRITO, A. R. M. S.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. Effect of kale and papaya supplementation in colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid in the rat. **e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**. p. 1–6, 2010.
- LOBO, A. R.; COLLI, C.; TULLIA, M.; FILISETTI, C.C. Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats. **Nutrition Research**. v. 26, p. 413– 420, 2006.
- MACFARLANE, G.T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 305-344, 2008.
- MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J. H. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.24, p. 701–714, 2006
- MALINEN, E., MÄTTÖ, J., SALMITIE, M., ALANDER, M., SAARELA, M., PALVA, A. PCR-ELISA II: Analysis of Bifidobacterium populations in human faecal samples from a consumption trial with Bifidobacterium lactic Bb-12 and a galactooligosaccharide preparation. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 25, p. 249-258, 2002.
- MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. Prebiotics. Best Practice & Research Clinical **Gastroenterology** . v.18, n.2, p.287–298, 2004.
- MARTEAU,P. Prebiotics and probiotics for gastrointestinal health. **Clinical Nutrition** .v. 20(Suppl.1) p. 41-45, 2001.

MEIER, R. F. Basics in clinical nutrition: Fibre and short chain fatty acids. **e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism**, v. 4 , p.69-71, 2009.

MEZEI, O.; BANZ, W. J.; STEGER, R.W; PELUSO, M. R.; WINTERS, T. A.; SHAY, N. Soy Isoflavones Exert Antidiabetic and Hypolipidemic Effects through the PPAR Pathways in Obese Zucker Rats and Murine RAW 264.7 Cells1. **Journal of Nutrition**, v. 133, n.5, p.1238–1243, 2003.

MOORE, N.; CHAO, C.; YANG, L.; STORM, H.; OLIVA-HEMKER, M.; SAAVEDRA, J. M. Effects of fructo-oligosaccharide-supplemented infant cereal: a double-blind, randomized trial. **British Journal of Nutrition**, v. 90, p. 581–587, 2003.

MORO, G.; ARSLANOGLU, S.; STAHL, B.; JELINEK, J.; WAHN, U.; BOEHM, G. A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. **Archives of Disease in Childhood**, v. 91, p. 814–819, 2006.

MORO, G.; MINOLI, I.; MOSCA, M.; FANARO, S.; JELINEK, J.; STAHL, B.; BOEHM G. Bifidogenic oligosaccharides in a formula for term infants. **J. Pediatric Gastroenterology Nutrition**, v.34, n.3, mar 2002.

MUSSATTO, S.I.; MANCILHA, I.M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**. v. 68, p.587–597, 2007.

NETTO, C. C.; MIYASAKA, C. K. Fructooligosaccharides (FOS) and Hormonal Replacement Therapy (HRT) by estrogen suppressed bone resorption in the ovariectomized rat. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 5, n. 3, p. 231-238, 2006.

NETTO, C.C. **Avaliação das características morfológicas e dos marcadores bioquímicos relacionados à homeostase do tecido ósseo de ratas idosas suplementadas com diferentes tipos de prebióticos**. Tese – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

NIITTYNEN, L.; KAJANDER, K.; KORPELA, R. Galacto-oligosaccharides and bowel function. **Scandinavian Journal of Food and Nutrition**, v. 51, n. 2, p. 62 -66, 2007.

PAN, X.; CHEN, F.; WU, T.; TANG, H.; ZHAO, Z. Prebiotic oligosaccharides change the concentrations of short-chain fatty acids and the microbial population of mouse bowel. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v.10, n.4, p. 258-263, 2009.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.2, p. 385-390, 2003.

PREIDIS, G. A.; VERSALOVIC, J. Targeting the Human Microbiome With Antibiotics, Probiotics, and Prebiotics: Gastroenterology Enters the Metagenomics Era. **Gastroenterology**. v.136, p. 2015–2031, 2009.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A. M.; OKSMAN-CALDENTENTHEY, K. M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Science Technology**. Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C.JR. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **American Institute of Nutrition**, v.123, p.1939–1951, Nov. 1993.

ROBERFROID, M. B. Introducing inulin-type fructans. **British Journal of Nutrition** v. 93, Suppl. 1, S13–S25, 2005.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n. 2, p. 406-409, Feb. 2001.

ROBERFROID, M.B.; GIBSON, G.R.; DELZENNE, N. The Bioquimistry of Oligofructose, a Nondigestible Fiber: An Approach to Calculate its Caloric Value. **Nutrition Reviews**. v.51, n.5, p.137-146, 1993.

ROBERFROID, M.B. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. **Journal of Nutrition**. v.37, 2493S–2502S, 2007.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 1, jan./mar., 2006.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galactooligosaccharides. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 69-80, 1999.

SANTOS, R.; SIMIQUELI, A.P.R.; PASTORE, G.M. Produção de galactooligossacarídeo por *Scopulariopsis* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**., Campinas, v.29, n.3, p. 682-689, jul.-set. 2009.

SAULNIER, D. M. A.; SPINLER, J. K.; GIBSON, G. R.; VERSALOVIC, J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 1-7, 2009.

SHERMAN, P M; CABANA, M; GIBSON, G R; KOLETZKO, B V; NEU, J; VEEREMAN-WAUTERS, G; ZIEGLER, E E; WALKER, W A . Potential Roles and Clinical Utility of Prebiotics in Newborns, Infants, and Children: Proceedings from a Global Prebiotic Summit Meeting. **Journal of Pediatric**, v. 155. p. 61-70, 2009.

SHIBATA, M.; MATSUO, H. Effect of the Addition of Free Tryptophan to a 20% Casein Diet on the Ratio of N1--Methyl-l-pyridone-S-carboxamide plus N1 - Methyl-4-pyridone-3-carboxamide to N1- Methylnicotinamide Excretion. **Agricultural Biology and Chemistry**, v. 53, n.9, p. 2399-2402, 1989.

TESHIMA, E. **Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probióticos, prebióticos e simbióticos**. Universidade Federal de Viçosa, 2001, 113p. (Tese Doutorado).

TEURI, U.; KORPELA, R. Galacto-oligosaccharides relieve constipation in elderly people. **Annals of Nutrition and Metabolism**. v. 42, p. 319-327, 1998.

TUOHY, K.M.; ROUZAUD, G.C.M.; BRÜK. W.M.; GIBSON, G.R. Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics – Assessment of efficacy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 75-90, 2005.

Van HOFFEN, E.; RUITER, B.; FABER, J.; M'RABET, L.; KNOL, E.F.; STAHL, B.; ARSLANOGLU, S.; MORO, G.; BOEHM, G.; GARSSEN, J. A specific mixture of short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides induces a beneficial immunoglobulin profile in infants at high risk for allergy. **Allergy**. v. 64, p. 484-487, 2009.

VAN MEER, H.; BOEHM, G.; STELLAARD, F.; VRIESEMA, A.; KNOL, J.; HAVINGA, R.; SAUER, P.J.; VERKADE, H. J. Prebiotic oligosaccharides and the enterohepatic circulation of bile salts in rats. **American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 294: p.540–547, 2008.

VENTER, S C. Prebiotics: an update. **Journal of Family Ecology and Consumer Sciences**, v. 35, p.17- 25, 2007.

VOS, A. P.; HAARMAN, M.; van GINKEL, J-W. H.; KNOL, J.; GARSSEN, J.; STAHL, B.; BOEHM, G.; M'RABET, L. Dietary supplementation of neutral and acidic oligosaccharides enhances Th1-dependent vaccination responses in mice. **Pediatric Allergy Immunology**, v. 18, p. 304–312, 2007.

WANG, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. **Food Research International**. v.42, p.8–12, 2009.

WIJNANDS, M.V.W.; SCHOTERMAN, H. C.; BRUIJNTJES, J.P.; HOLLANDERS,V.M.H.; WOUTERSEN, R. A. Effect of dietary galacto-oligosaccharides on azoxymethane-induced aberrant crypt foci and colorectal cancer in Fischer 344 rats. **Carcinogenesis**. v.22, n. 1, p. 127-132, 2001.

WONG, J. M. W.; SOUZA, R.; KENDALL, C. W. C.; EMAM, A.; JENKINS, D. J. A. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. **Journal Clinical Gastroenterology**. v. 40. p. 235–243, 2006.

WONG, J.M.W.; JENKINS,D.J.A. Carbohydrate Digestibility and Metabolic Effects. **Journal of Nutrition**. v.137, n. 2, 539S–2546S, 2007.

YUAN, Y. V.; KITTS, D. D. Calcium absorption and bone utilization in spontaneously hypertensive rats fed on native and heat-damaged casein and soya-bean protein. **British Journal of Nutrition**, v. 71, n.4, p. 583-603, 1994.

9 Anexo

Anexo 1



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

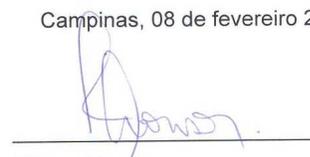
Certificamos que o Protocolo nº 2077-1, sobre "Efeitos dos oligossacarídeos FOS e GOS na produção de ácidos graxos de cadeia curta, microbiota e morfologia intestinal de ratas jovens da linhagem Wistar", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior / Glaucia Carielo Lima, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 08 de fevereiro 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2077-1, entitled "Effect of oligosaccharides FOS and GOS on the intestinal of the young female Wistar rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on February 8, 2010.

Campinas, 08 de fevereiro 2010.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>