

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação da viabilidade do *Lactobacillus paracasei* 431e *Bifidobacterium longum* BB46 em simbiose com resíduos de acerola e *Amidated LM pectin citrus-based* utilizando dois sistemas *in vitro*.

Aluna: Natália Pontin Lopes

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aureluce Demonte

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Katia Sivieri

ARARAQUARA – SP

2016

Trabalho de Conclusão de Curso

“Avaliação da viabilidade do *Lactobacillus paracasei* 431 e *Bifidobacterium longum* BB46 em simbiose com resíduos de acerola e *Amidated LM pectin citrus-based* utilizando dois sistemas *in vitro*”

Natália Pontin Lopes

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aureluce Demonte

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Katia Sivieri

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Araraquara, da Universidade
Estadual Paulista para obtenção do
grau de Farmacêutica-Bioquímica.

ARARAQUARA – SP

2016

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Pedro Lopes e Joice Josefina Pontin, pela dedicação e amor incondicional,

À minha irmã, Ana Carolina e a todos da minha família por todo apoio.

Agradecimentos

Aos meus pais, por todo suporte concedido, por ser meu exemplo e pelo o que sou e conquistei até agora, sem os quais nada seria possível.

À minha irmã, por ser minha confidente e amiga. A toda a minha família, em especial a minha avó, por me apoiarem em cada escolha.

Às Professoras Kátia Sivieri e Aureluce Demonde por me concederem à oportunidade da realização deste projeto de Iniciação Científica, acreditando no meu potencial e pelo seu exemplo de profissionais dedicadas e competentes.

Aos amados Adriana Zavarizi, Fernanda Bianchi, Fernanda Freire, Letícia Sgarbosa e Flávio Picheli por todo ensinamento, amizade, paciência e exemplo como pesquisadores.

Aos meus amigos que foram minha família durante toda a graduação.

À FAPESP, pelo financiamento do Projeto.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL DO PROJETO	8
1. INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVO GERAL	13
2.1 Objetivos específicos	14
3 METODOLOGIA	14
3.1 Preparação das culturas probióticas	15
3.2 Preparação do resíduo de acerola	15
3.3 Avaliação da viabilidade das cepas probióticas nas combinações frente às condições gastrintestinais simuladas in vitro (bancada).	15
3.4 Simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH®)	16
3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	18
3.6 Análise estatística dos dados	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1. Avaliação da viabilidade dos microrganismos probióticos utilizando método in vitro em bancada	18
4.2 Avaliação da viabilidade dos microrganismos probióticos utilizando-o em multiestágio Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH®)	22
4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	26

5	CONCLUSÕES	29
6	REFERÊNCIAS	31

INDICE DE TABELA

Tabela 1. Combinações dos resíduos com as cepas probióticas..... 14

Tabela 2. Composição do meio alimentar basal dissolvido em água destilada..... 17

INDICE DE FIGURA

Figura 1. Viabilidade do <i>Bifidobacterium longum</i> BB46 no teste de bancada.....	19
Figura 2. Viabilidade <i>Lactobacillus paracasei</i> 431 no teste de bancada	20
Figura 3. Comparação da Viabilidade do <i>Lactobacillus paracasei</i> 431 e <i>Bifidobacterium longum</i>	21
Figura 4. Viabilidade do <i>Lactobacillus paracasei</i> 431 e <i>Bifidobacterium longum</i> BB46 em Simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH®).	23
Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura do <i>Bifidobacterium longum</i> BB- 46 sob condições gastrointestinais utilizando método in vitro de bancada. A: BB-46 sem resíduo, B: BB-46+resíduo de acerola fase gástrica, C: BB-46+ resíduo de acerola fase entérica I, D: BB-46+ resíduo de acerola fase entérica II.	27
Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura do <i>Bifidobacterium longum</i> BB-46 sob condições gastrointestinais utilizando o método de multiestágios- Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH). A:BB-46 sem resíduo, B: BB-46+resíduo de acerola fase gástrica, C: BB-46+ resíduo de acerola fase duodenal.....	28
Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura do <i>Bifidobacterium longum</i> BB- 46 sob condições gastrointestinais utilizando método in vitro de bancada. A: BB-46 sem resíduo, B: BB-46+pectina fase gástrica, C: BB-46+ pectina fase entérica I, D: BB-46+ pectina fase entéricaII.....	28
Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura do <i>Bifidobacterium longum</i> BB- 46 sob condições gastrointestinais utilizando o método de multiestágios- Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH). A: BB-46 sem resíduo, B: BB-46+pectina fase gástrica, C: BB-46+ pectina fase duodenal.....	29

RESUMO GERAL DO PROJETO

Probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Prebióticos são compostos orgânicos que o organismo humano não consegue digerir e que servem de substrato aos probióticos podendo melhorar a resistência do microrganismo às adversas condições do trato gastrointestinal, permitindo ao probiótico chegar viável até a região do cólon. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de duas cepas probióticas, de forma isolada e em simbiose com resíduo de acerola e pectina, após a passagem pelo estômago e duodeno. Foram realizados seis experimentos em duplicata para cada método *in vitro*: Experimento 1- *Lactobacillus paracasei* 431, 2- *Lactobacillus paracasei* 431+ 1% acerola, 3- *Lactobacillus paracasei* 431 + 1% *Amidated LM pectin citrus-based* , 4- *Bifidobacterium longum* BB46, 5- *Bifidobacterium longum* BB46 + 1% acerola, 6- *Bifidobacterium longum* BB46 + 1% *Amidated LM pectin citrus-based*. Para avaliar a viabilidade das cepas de forma isolada e nas combinações, foi utilizado dois sistemas *in vitro*, um em bancada e outro em multiestágio (Simulador do Ecosistema Microbiano Humano). Durante a passagem simulada dos microrganismos utilizando os dois métodos *in vitro* foram coletadas amostras de cada fase do teste para realização do plaqueamento em meios de cultura seletivos específicos. As fases gástrica e entérica da combinação com melhor viabilidade, nos dois métodos *in vitro*, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, com o objetivo de observar se houve alteração morfológica do microrganismo. A significância dos resultados foi investigada por meio da análise de variância (ANOVA) e as médias individuais comparadas por meio de teste Tukey ($p < 0,05$). Observou-se uma baixa viabilidade do L- 431, em todas as fases de simulação gastrointestinal do teste de bancada, quando associado à pectina, já quando associado ao resíduo de acerola o probiótico se mostrou resistente a fase gástrica, porém, sensível às fases entéricas I e II quando comparado ao L-431 sem resíduo. Em relação ao

BB-46, observou-se que tanto o resíduo de acerola quanto a pectina auxiliaram na resistência do BB-46 durante a fase gástrica, no entanto, a pectina proporcionou melhor resultado de viabilidade ao BB-46 ao final da fase entérica II quando comparado ao BB sem a pectina ou com a acerola., quando comparado à cepa sem este resíduo, a pectina mostrou melhor resultado de viabilidade no final do teste quando comparado ao BB-46 sem a pectina.. Nos testes utilizando o SEMH[®] não houve queda de ciclo log em nenhuma das fases de simulação para nenhuma das cepas estudadas, em simbiose ou não. Foi selecionado o BB-46 para análise por MEV, pois este microrganismo apresentou uma viabilidade superior ao L-431. Nas amostras analisadas tanto dos experimentos realizados no SEMH[®] como nos de bancada foi possível observar as fibras na fase gástrica indicando uma proteção ao microrganismo, na fase entérica I observou-se uma deformação na morfologia do microrganismo que recupera sua forma original durante a fase entérica II. Analisando os dois métodos *in vitro* utilizados foi possível notar algumas diferenças que podem ser justificadas devido ao dinamismo que o simulador gastrointestinal SEMH[®] apresenta, diferente do teste de bancada, o produto testado (probiótico ou simbiótico) passa pelo trato gastrintestinal simulado com os respectivos tempos de resistência e fluxo similares ao encontrado no ser humano. Neste estudo foi observada a sobrevivência dos probióticos com e sem associação com prebióticos, porém, novos estudos complementares são necessários a fim de compreender melhor o papel da ação simbiótica sobre a microbiota intestinal.

1. INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal humano contém mais de 1000 diferentes espécies de bactérias, com maior diversidade e concentração localizada na região do cólon (RAJILIC-STOJANOVIC et al., 2007), no entanto, o balanço de microrganismos nas diferentes regiões do organismo pode ser modificado de um indivíduo para a outro, de acordo com seu estilo de vida (REUTER, 2001). Os principais filos encontrados na microbiota são: Firmicutes, Bacteroides, Actinobacteria e Proteobacteria (DETHLEFSEN *et al.*, 2007). As bactérias mais comumente encontradas no organismo humano, são as bifidobactérias e os lactobacilos, considerados microrganismos não patogênicos ou benéficos (CUMMINGS; MACFARLANE, 2002).

Além de possuir um papel essencial para o bom funcionamento do intestino, a microbiota intestinal, por meio da fermentação, fornece energia para o epitélio do cólon, participa da digestão dos alimentos, síntese de vitaminas, como a K e a B12, modula o sistema imune, previne contra alergias, câncer de cólon, doença intestinal inflamatória, além de atuar contra bactérias patogênicas intestinais exógenas (CONLY; STEIN, 1992; GIBSON; ROBERFROID, 1995; ANG; DING, 2016).

Apesar da microbiota do cólon ser relativamente estável ao longo dos diferentes estágios de vida, existem alguns fatores, tais como o tipo de dieta, exercício físico e idade que podem afetar a composição da população do trato gastrointestinal (WOODMANSEY, 2007). O consumo de produtos probióticos, prebióticos e/ou ricos em compostos bioativos tem sido uma opção para se obter o equilíbrio da microbiota intestinal e consequentemente garantir uma melhor qualidade de vida.

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, administrados diariamente e em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (WHO/FAO, 2001). Os gêneros bacterianos mais comumente utilizados como

probióticos são os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, além da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, algumas espécies de *Bacillus*. Vários são os benefícios proporcionados pelos probióticos: inibição do crescimento de bactérias patogênicas e estimulação das comensais, diminuição do risco de alguns tipos de câncer, infecção vaginal e cirrose hepática, redução de infecções em geral e manifestações alérgicas, estimulação do sistema imune e redução de doenças associadas ao trato gastrointestinal (WOLVERS *et al.*, 2010; LARSEN *et al.*, 2013).

Para que o probiótico consiga exercer sua ação no cólon, ele deve apresentar capacidade de sobreviver ao ambiente ácido do estômago, aos sais biliares e aos substratos do intestino delgado e obter sucesso na competição por nichos com os outros microrganismos do meio (WIELE *et al.*, 2004).

Diversos estudos demonstraram a ação positiva dos prebióticos, tais como o frutooligossacarídeos (FOS) e a inulina, na sobrevivência do probiótico durante a passagem pelo estômago e duodeno (BIANCHI *et al.*, 2014; ARYANA; MCGREW, 2007; HAULY *et al.*, 2005). A ação sinérgica dos probióticos auxiliados pelas substâncias prebióticas dão origem aos simbióticos, ou seja, a interação entre o probiótico e o prebiótico (DENIPOTE *et al.*, 2010).

Os mecanismos pelos quais os probióticos agem estão geralmente associados a interação entre o hospedeiro-probiótico ou probióticos e outros organismos (como bactérias). Essas interações dependem da viabilidade dos microrganismos probióticos, os quais enfrentam competição por sítio de ação e /ou inibição direta por certos microrganismos produtores de fatores antimicrobianos. Quando a interação é com o hospedeiro, sua atividade se baseia na capacidade das células da mucosa humana em reconhecer componentes microbianos, ativando o sistema imune (GÓRSKA, S. *et al.* 2016).

Prebióticos são compostos orgânicos que o organismo humano não consegue digerir, como por exemplo, oligossacarídeos e fibras que servem como substrato para a microbiota do cólon (ROBERFROID, 2007). Além dos prebióticos existem outras substâncias que podem modular a microbiota tais como polifenóis. Podem-se encontrar diversas quantidades de polifenóis em frutas tropicais e o Brasil é considerado o país que mais cultiva frutas tropicais no mundo (IBRAF, 2009). Além de polifenóis, fibras são encontradas em quantidade elevada principalmente nas sementes e casca das frutas (GORINSTEIN *et al.*, 2011; NEVES, TOSIN, BENEDETT, & CISNEROS-ZEVALLOS, 2015).

Uma destas frutas tropicais é a acerola (*Malpighia emarginata* D.C), fruta rica em fitoquímicos com atividade antioxidante, além de rica fonte de vitamina C (MEZADRI, VILLANO, FERNANDEZ-PACHON, GARCIA-PARRILLA, & TRONCOSO, 2008). Seu resíduo foi caracterizado por Realini, Guàrdia, Díaz, García-Regueiro, & Arnau (2015) e foi concluído que o mesmo poderia ser utilizado para diversos propósitos dando uma nova alternativa àquilo que seria descartado.

Os resíduos de frutas tropicais além de serem ricos em diversos nutrientes e apresentarem grandes quantidades de compostos bioativos, possuem ainda fibras dietéticas compostas por oligossacarídeos (frutooligossacarídeos, galactooligossacarídeos e amido resistente) e polissacarídeos (inulina) que apresentam capacidade de alterar tanto a composição quanto a atividade da microbiota intestinal, conferindo benefícios e bem-estar à saúde do hospedeiro, além disso, estas fibras podem ajudar na sobrevivência dos probióticos durante a passagem gastrointestinal. Desta forma, a combinação de certos probióticos com determinados resíduos de frutas tropicais poderia ser uma opção para se melhorar a resistência do microrganismo às condições adversas do estômago e duodeno.

No Brasil são gerados em torno de 30 a 40% de resíduos agroindustriais durante a produção de sucos e polpas, o que pode contribuir com o aumento da produção do lixo orgânico que pode causar graves problemas ambientais, além de perdas econômicas para a indústria (MARTINS; FARIA, 2002; SOUSA et al., 2011).

O aproveitamento destes resíduos e a associação com determinadas cepas probióticas, é uma forma de agregar valor a estes produtos, os quais normalmente são descartados. Esta associação simbiótica pode trazer benefícios à saúde do consumidor, visto que estes resíduos podem ter a capacidade de melhorar a capacidade de sobrevivência do microrganismo probiótico, fazendo com que o mesmo consiga chegar viável até o intestino.

A avaliação da resistência da combinação simbiótica durante a passagem ao trato gastrointestinal foi realizada por meio de um Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH[®]), que se encontra disponível apenas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP, sendo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa com suporte financeiro da FAPESP (Implantação de sistema de três estágios de cultura contínuo e estudo da ação de probióticos, prebióticos e simbióticos sobre o câncer de cólon- 2009/53878-8). Frente ao exposto, o presente projeto tem caráter inovador, possibilitando a seleção de combinações simbióticas que podem futuramente serem utilizadas como ingrediente no desenvolvimento de formulações alimentícias.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade de duas cepas probióticas (*Lactobacillus paracasei* 431e *Bifidobacterium longum* BB-46) de forma isolada e em simbiose com resíduos de acerola e pectina comercial (*Amidated LM pectin citrus-based*) após passagem pelo estômago e duodeno, utilizando dois sistemas *in vitro*: em bancada e em multiestágio (SEMH[®]).

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade de cada cepa de forma isolada e em conjunto com o resíduo de acerola e com a pectina comercial sob as condições adversas do estômago e duodeno;
- Avaliar qual microrganismo apresenta melhor viabilidade;
- Avaliar qual resíduo proporciona melhor viabilidade ao microrganismo
- Avaliar, utilizando microscopia eletrônica de varredura, as alterações estruturais provocadas durante a passagem simulada da combinação com melhor viabilidade pelo estômago e duodeno.

3 METODOLOGIA

A viabilidade dos microrganismos (*Lactobacillus paracasei* 431 e *Bifidobacterium longum* BB46) de forma isolada e em combinação mutuamente vantajosa (resíduos de acerola e pectina comercial-*Amidated LM pectin citrus-based*) após a passagem pelo estômago e duodeno foi realizada utilizando dois modelos *in vitro*, um em bancada outro em multiestágio (SEMH[®]). A tabela 1 apresenta as quatro combinações testadas. Todas as avaliações foram realizadas em duplicata.

Tabela 1. Combinações dos resíduos com as cepas probióticas.

Combinações	Resíduo de Frutas	Probióticos
1	-	<i>Lactobacillus paracasei</i> 431
2	-	<i>Bifidobacterium longum</i> BB46
3	Pectina	<i>Lactobacillus paracasei</i> 431
4	Pectina	<i>Bifidobacterium longum</i> BB46
5	Acerola	<i>Lactobacillus paracasei</i> 431
6	Acerola	<i>Bifidobacterium longum</i> BB46

3.1 Preparação das culturas probióticas

As cepas de *Lactobacillus paracasei* 431 e *Bifidobacterium longum* BB-46 (Chr. Hansen) foram reativadas individualmente em MRS caldo e MRS caldo enriquecido de L-cisteína a 0,05 % respectivamente (Acumedia, Baltimore, USA), ambos em condições anaeróbias (SIVIERI et al., 2013). As células foram centrifugadas (4000 x g, 10 min., 4 °C) e lavadas com salina a 0,85% até o momento de sua utilização (SIVIERI et al., 2013). Para a contagem das colônias de *Lactobacillus paracasei* 431 foi utilizado o meio de cultura MRS ágar acidificado (pH 5,4) (Himedia, Índia) (YOSHIOKA et al., 1983). Para a contagem das colônias *Bifidobacterium longum* BB46, foi utilizado o meio Bifido. Medium BIM-25 (Difco, França) (MUNOA; PARES, 1988).

3.2 Preparação do resíduo de acerola

O resíduo de acerola foi preparado de acordo com metodologia descrita previamente por Bedani *et al.* (2014). Tanto no sistema *in vitro* de bancada quanto no multistágio SEHM foi utilizado 1% do resíduo de acerola e de pectina comercial.

3.3 Avaliação da viabilidade das cepas probióticas nas combinações frente às condições gastrintestinais simuladas *in vitro* (bancada).

A avaliação da viabilidade das cepas probióticas nas combinações frente às condições gastrintestinais simuladas *in vitro* foi realizada de acordo com o modelo descrito por Buriti, Saad e Castro (2010) com algumas modificações.

10 mL de suspensão de cada cepa, juntamente com o resíduo selecionado, foram adicionados a 90 mL de solução salina NaCl 0,85% (m/v) (diluição 10^{-1}) e homogeneizados em Bag Mixer (Interscience, St. Nom, França). Aliquotas de 10 mL foram transferidos para frascos estéreis e o pH das soluções ajustado para 2,07 a 2,72 com solução de HCl 1M (Merc). Soluções de pepsina (Sigma-Aldrich) e lipase (Amano Lipase G, Sigma-Aldrich) foram adicionadas em concentrações suficientes para que as

amostras apresentassem 3 g/ L e 0,9 mg/ L na solução final respectivamente. Em seguida, os frascos foram encubados em banho de água a 37 °C com agitação constante de aproximadamente 150 rpm durante duas horas (fase gástrica). Após 2 horas de encubação, o pH foi ajustado para 4,21-5,03 com adição de solução alcalina estéril (150 mL de NaOH 1N + 11,16 g de PO₄H₂Na/ L). Em seguida, foram adicionadas solução de bile (Bile bovina) e pancreatina (Sigma-Aldrich) em concentrações suficientes para que a solução final tivesse 10 g/L e 1 g/L, destes componentes respectivamente. As amostras foram encubadas novamente a 37 °C por duas horas (fase entérica I). Ao final da fase entérica I, o pH foi ajustado entre 6,12-6,97 com solução alcalina e adicionado de bile e pancreatina (mantendo-se as concentrações de 10 g/L e 1 g/L na solução final, respectivamente), e novamente encubadas a 37 °C por duas horas sob agitação constante (fase entérica II), totalizando 6 horas de ensaio. A cada fase do teste (0, 2, 4 e 6 horas) foram coletadas amostras para realização da contagem das cepas estudadas.

Para a contagem das colônias de *Lactobacillus paracasei* 431 foi utilizado o meio de cultura MRS ágar (Himedia, Índia) (YOSHIOKA et al.,1983). Para a contagem das colônias *Bifidobacterium longum* BB46, foi utilizado o meio Bifido. Medium BIM-25 (Difco, França) (MUNOA; PARES, 1988).

3.4 Simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH®)

O simulador do ecossistema microbiano humano consiste em uma sucessão de cinco reatores conectados que representam as diferentes partes do trato gastrointestinal humano com seus respectivos valores de pH, tempo de residência e capacidade volumétrica (MOLLY et al., 1993). Trata-se de um sistema fechado e controlado automaticamente por um de software. Para este estudo, foram utilizados apenas os reatores que simulam o estômago e o duodeno. A passagem da combinação pelo estômago foi simulada no Reator 1, com a entrada de HCl 1molar para a

regulação do pH, juntamente com as combinações ou os microrganismos isolados e o meio alimentar basal (meio constituído por substâncias capazes de estabilizar a microbiota do cólon e que simula os líquidos gastrintestinais (Tabela 2) (BIANCHI *et al.*, 2014). A passagem da combinação pelo intestino delgado foi simulada no Reator 2, através da entrada no sistema de 60 mL de suco pancreático artificial (por litro: 12,5 g de NaHCO_3 , 6 g de Oxgall e 0,9 g de pancreatina) a uma taxa de 4 mL/ min. por 15 min., uma hora após a adição das combinações (MOLLY *et al.*, 1993; POSSEMIERS *et al.*, 2004).

Foram coletados 5 mL de amostra do estômago e do duodeno, após 2h e 4h da entrada da combinação nestes compartimentos respectivamente. Diluições seriadas foram preparadas e a inoculação realizada nos meios de cultura apropriados para cada microrganismo testado (item em 3.3).

Tabela 2. Composição do meio alimentar basal dissolvido em água destilada.

Constituintes	Quantidades (g/L)
Amido (Maizena, Brasil)	3,0
Pectina (Vetec, Brasil)	2,0
Mucina (Suínos gástrica tipo III) (Sigma, EUA)	4,0
Xilana (Sigma, EUA)	1,0
Peptona (Acumedia, EUA)	1,0
Arabinogalactano (Sigma, EUA)	1,0
Glicose (Synth, Brasil)	0,4
Extrato de levedura (Acumedia, EUA)	3,0
L-cisteína (Sigma, EUA)	0,5

Fonte: PAYNE *et al.* (2003)

3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para verificar alterações morfológicas das cepas frente às condições adversas do estômago e duodeno foi realizada a microscopia eletrônica de varredura da melhor combinação durante as fases gástrica, entérica I e entérica II do sistema *in vitro* em batelada e gástrica e entérica do sistema multiestágio (SEMH[®]). Esta parte do estudo foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Costa (2014). As amostras, de cada fase do teste (gástrica e entéricas I e II) foram centrifugados (5000 g/ 10 min.) e os sobrenadantes, descartados. O *pellet* foi suspenso em uma solução de NaCl (0,9 % v/v) em concentração final de 5 log UFC/mL. Alíquotas de 1 mL da suspensão de células foram fixadas por 2 horas em solução de glutaraldeído 2% (v/v) seguida por fixação em tetróxido de ósmio por 2 horas. As membranas foram lavadas com água purificada e desidratadas com solução de etanol de 70% (15 minutos), 95% (15 minutos) duas vezes e por último em etanol 100 % (quatro vezes por 15 minutos). Foi realizada a secagem ao ponto crítico de CO₂. As membranas secas foram transferidas para base de alumínio por pulverização catódica revestida com ouro e analisadas utilizando microscopia de varredura eletrônica a 2,5 Kv (JEOL JSM-7401F; JEOL, Tokyo, Japão) (COSTA, 2014).

3.6 Análise estatística dos dados

Os resultados foram avaliados utilizando análise de variância (ANOVA) e as médias individuais comparadas por meio de teste Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software estatístico IBM SPSS v.20 (IBM, Brasil).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da viabilidade dos microrganismos probióticos utilizando método *in vitro* em bancada

Os resultados apresentados na Figura 1 mostram que o resíduo de acerola a pectina comercial proporcionaram proteção ao BB-46 durante a fase gástrica nos testes *in vitro* de bancada. Observa-se, no entanto, ao final das fases entéricas I e II, redução ($p < 0.05$) na viabilidade do BB-46 com ou sem os resíduos.

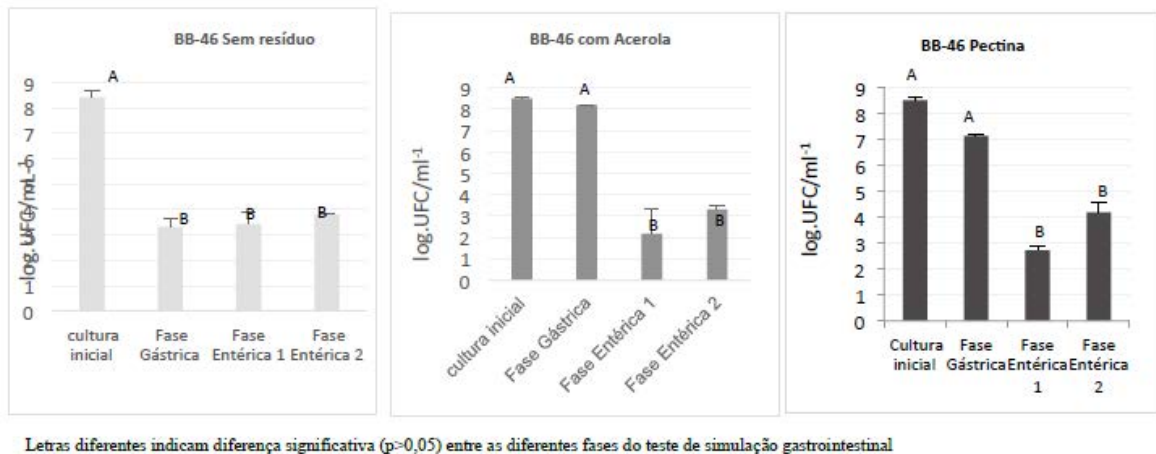


Figura 1. Viabilidade do *Bifidobacterium longum* BB46 no teste de bancada

A Figura 2 mostra resultados semelhantes para o microrganismo L-431 durante o teste de viabilidade frente às condições gastrointestinais, no entanto, para esta cepa, apenas o resíduo de acerola proporcionou resultados positivos de viabilidade durante a fase gástrica. A pectina comercial não exerceu efeito de proteção para esta cepa (Figura 2).

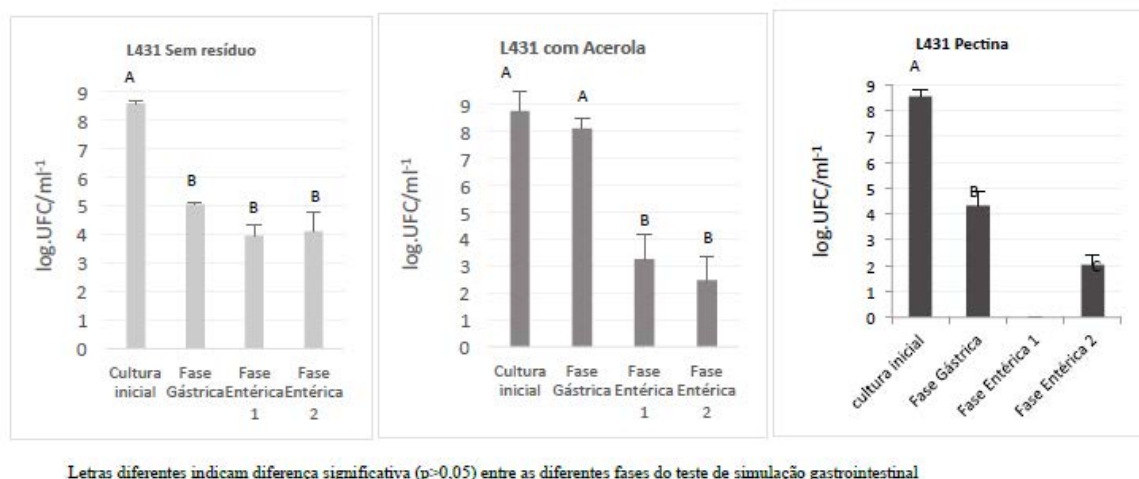


Figura 2. Viabilidade *Lactobacillus paracasei* 431 no teste de bancada

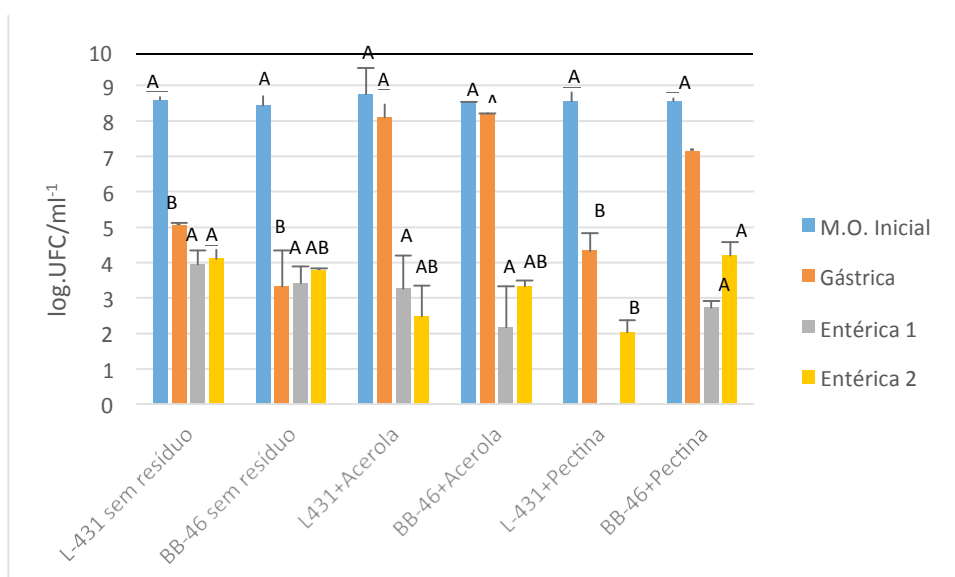
Comparando os diferentes tratamentos (BB-46 sem resíduo, com acerola ou pectina e L-431 sem resíduo, com acerola ou pectina) na mesma fase de experimento (cultura inicial, fase gástrica e entéricas I e II), observa-se que não houve diferença estatística entre as culturas iniciais dos diversos tratamentos, bem como durante a fase entérica I (Figura 3). Durante a fase gástrica, observa-se que não houve diferença estatística entre os microrganismos BB-46 e L-431 sem a pectina ou o resíduo de acerola, no entanto, ambos obtiveram valores de viabilidade estatisticamente maiores quando em contato com a pectina e o resíduo de acerola, com exceção do L-431 + pectina, o qual obteve o pior resultado de viabilidade nesta fase.

Observa-se na fase entérica II, que apenas a combinação L-431+ pectina, por obter o menor valor de viabilidade, diferiu significativamente do BB-46+ pectina e do L-431 sem nenhum dos resíduos. Em termos de ciclo log, as combinações BB-46+pectina e BB-46+acerola obtiveram valores superiores de viabilidade quando comparados aos mesmos microrganismos sem os resíduos (Fig. 3).

Possivelmente, devido à complexidade química da pectina, existem diversos nichos nutricionais os quais explicam o crescimento dos probióticos (CHUNG et al,2016). Aguirre (2014) realizou experimento que demonstrou uma estimulação no crescimento de

Bifidobacterium spp, *Faecalibacterium* spp. e *F. prausnitzii* em meio com a pectina-L.

As cepas probióticas se adaptam progressivamente aos sais biliares, sabe-se também que a pectina em meio ácido forma um gel que garante proteção aos microrganismos frente a ambientes ácidos, mas se desestabiliza em pH básico. Portanto, os microrganismos associados à pectina ficam mais vulneráveis quando passam pelas fases entérica I e II já que o ambiente modifica-se de ácido para básico desestruturando o gel, explicando os resultados encontrados.



Letras diferentes indicam diferença significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes tratamentos para uma mesma fase simulatória

Figura 3. Comparação da Viabilidade do *Lactobacillus paracasei* 431 e *Bifidobacterium longum* BB46 em diferentes fases utilizando teste de bancada.

Embora os resíduos tenham, em geral, proporcionado uma ação protetora ao microrganismo durante a fase gástrica, ao final da fase entérica II, a viabilidade foi baixa, independente da cepa estudada. O resíduo de acerola é rico em compostos fenólicos. Entretanto, os polifenóis podem se ligar a parede bacteriana atrapalhando assim, a função da mesma. As catequinas, por exemplo, geram peróxido de hidrogênio alterando a permeabilidade da membrana celular. Devido a diferenças na

composição da parede celular, espécies Gram negativas são mais resistentes aos polifenóis do que as Gram positivas (CORDONA et al., 2013, DUDA-CHODAK, 2012).

Na acerola (*Malpighia emarginata* DC.), além de vitamina C, carotenoides, encontram-se também os polifenóis, dentre eles, as antocianinas, a quercitina, o hiperosídeo, a proantocianidina e astilbina (HANAMURA et al., 2008). Estudos realizados por Duda-chodak (2012) mostraram que a quercitina pode causar um efeito inibitório em microrganismos, com exceção do *Bifidobacterium* e particularmente acentuado em *Lactobacillus*. O que poderia explicar a baixa viabilidade do *Lactobacillus paracasei* 43 em simbiose com o resíduo de acerola nas fases entéricas (DUDA-CHODAK, 2012). A figura 3 evidencia que o *Bifidobacterium longum* BB46 conseguiu se desenvolver melhor quando em contato com polifenóis presentes no resíduo de acerola do que o *Lactobacillus paracasei* 431, apesar de ambas serem bactérias Gram positivas e se mostrarem menos resistentes aos polifenóis do que quando comparadas às Gram negativas (CORDONA et al., 2013).

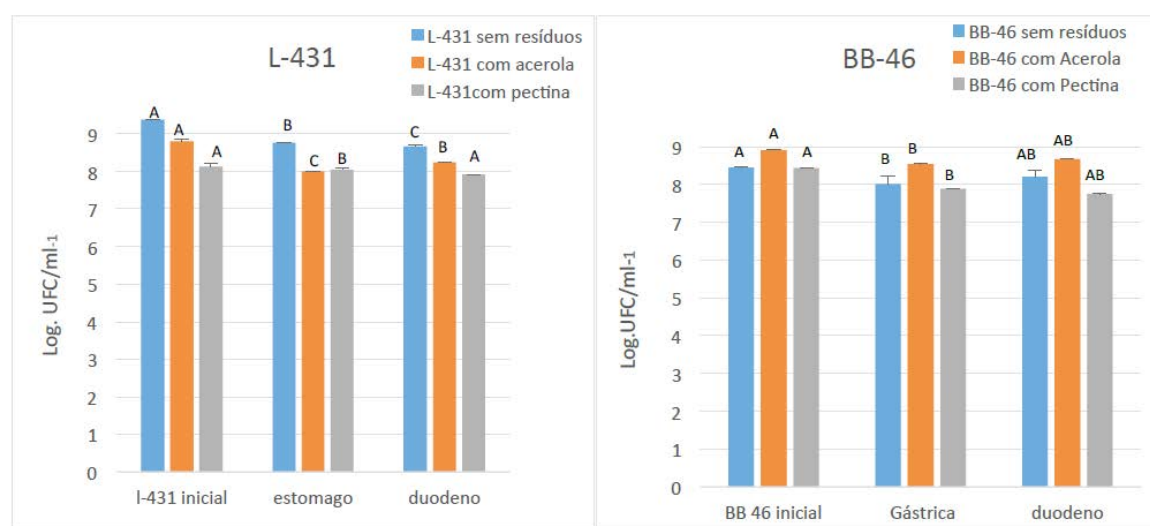
Outro fator que pode ter influenciado os resultados de baixa viabilidade do L-431 + pectina é o fato dos *Lactobacillus* spp poderem produzir altas quantidades de peróxido de hidrogênio, que por ser um fator antibacteriano, aumenta a apoptose e necrose mudando a composição da microbiota e reduzindo o número de probióticos (DUDA-CHODAK, 2012).

Determinados polifenóis possuem a capacidade de alterar a composição da microbiota intestinal em doses adequadas e que, determinados grupos de bactérias podem ser inibidos por esses compostos enquanto outros conseguem se desenvolver melhor (CORDONA et al, 2013; DUDA-CHODAK, 2012).

4.2 Avaliação da viabilidade dos microrganismos probióticos utilizando-o em multiestágio Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH®)

As mesmas combinações foram avaliadas quanto à viabilidade frente às condições

gastrointestinais utilizando o SEMH®. Observou-se que apesar de não ter ocorrido queda de ciclo log em nenhuma das fases que simularam o estômago ou duodeno, demonstrando, de acordo com essa metodologia, elevada viabilidade das cepas estudadas, houve redução ($p<0.05$) de viabilidade na fase gástrica em todos os tratamentos, porém com retorno à condição inicial após passagem pelo duodeno, com exceção do L-431 sem nenhum resíduo e em combinação com a acerola, os quais obtiveram valores menores ($p<0.05$) de viabilidade.



Letras diferentes indicam diferença significativa ($p>0.05$) entre as diferentes fases do teste de viabilidade para um mesmo tratamento

Figura 4. Viabilidade do *Lactobacillus paracasei* 431 e *Bifidobacterium longum* BB46 em Simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH®).

Observando as duas metodologias utilizadas, nota-se diferentes resultados de viabilidade em decorrência da diferença de protocolos de cada método. É importante ressaltar que o Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH) é um sistema dinâmico, onde cada reator que simula o estômago, duodeno, cólon ascendente, transverso ou descendente possui volume e tempo de retenção semelhante ao observado no trato gastrointestinal de humanos (Molly et al., 1993). Por outro lado, o sistema de bancada apenas simula o tempo de contato com os sucos gástricos e intestinais, o que torna os dois sistemas muito diferentes. Portanto, esperava-se que os resultados realmente seriam

diferentes utilizando os dois métodos. Entretanto, independente da viabilidade do microrganismo probiótico após a passagem pelo estômago e duodeno, a preservação da funcionalidade destes microrganismos é um ponto muito importante a ser mais bem explorado.

Klu & Chen (2015) observaram que cepas de *Bifidobacterium* spp geralmente apresentam maiores taxas de sobrevivência quando comparado com cepas de *Lactobacillus* spp.. Evidências mostram que quando cepas de *Bifidobacterium* spp quando são expostas ao suco gástrico (baixo pH e presença de pepsina) mostram uma maior taxa de viabilidade quando comparado à mesma cepa submetida a apenas baixas condições de pH. Portanto acredita-se que a pepsina tenha ação protetora à cepa bacteriana (Matto, Alakomi, Vaari, Virkajarvi, & Saarela, 2006).

De acordo com Vinderola *et al.*, (2011) o efeito *in vivo* de barreiras biológicas, tais como sais biliares , sobre a funcionalidade dos microrganismos probióticos e sobre a sua capacidade de interagir com o intestino devem ser melhor elucidadas. Alguns estudos mostraram que a adaptação do *L. subsp delbrueckii. lactis* para sais biliares permitiu a resistência às concentrações fisiológicas de sais biliares (0,5 % v / v) . No entanto, a adaptação para sais biliares diminuiu a capacidade auto agregação, bem como a sua hidrofobicidade e capacidade de adesão *in vitro* e *in vivo* (Burns *et al*, 2008; 2010). De acordo com a Figura 4, observa-se uma maior queda nos valores de viabilidade do L-431 sem resíduo e L-431 com acerola durante as fases entéricas, isso pode ter ocorrido devido aos sais biliares. De acordo com Saarela, Mogensen, Fondén, Matto e Mattila-Sandholm (2000), sais biliares são tóxicos às células por romperem a membrana celular. As bactérias precisam resistir à ação dos sais biliares a fim de sobreviverem no duodeno.

A tolerância aos sais biliares é cepa dependente, contudo, observa-se que tanto os *Lactobacillus* spp quanto a *Bifidobacterium* spp se adaptaram progressivamente aos sais biliares. Segundo Ruiz, Margikkes e Sánchez (2013) é possível obter cepas resistentes cultivando cepas sensíveis em diferentes concentrações de sais biliares.

A presença de determinados alimentos tem sido associada com a melhora na viabilidade dos microrganismos durante a fase gástrica (Heller, 2001), portanto, diferentes matrizes como açúcares, carboidratos e fibras são utilizadas para obter uma melhora na viabilidade (Guergoletto, Magnani, Martin, Andrade, & Garcia, 2010, Sendra, Sayas-Barberá, Fernández-López & Pérez- Alvarez, 2016,) de determinados probióticos em ambiente com baixo pH como o estômago. O resíduo de acerola possui altas concentrações carboidratos simples e fibras o que poderia contribuir para o aumento da viabilidade dos microrganismos (Marques, 2013). O resíduo de acerola é composto também por altas quantidades de vitamina C, riboflavina, sais minerais, além de pectina (Assis, Lima & Oliveira, 2001).

A pectina tem se mostrado como um importante modulador da microbiota intestinal (Gullón *et al.*, 2013). Quando em contato com sacarose em meio ácido, um gel estável é formado (Albuquerque, 1997), e acredita-se que é este gel que garantiu a proteção dos microrganismos quando em contato com situações adversas durante a fase gástrica. Contudo em pH alcalino o gel é rapidamente dimetoxilado e as ligações β (C4) glicosídicas com o grupo éster carboxílico pelo mecanismo de β -eliminação são rompidas, o que explica a baixa viabilidade durante a fase entérica (Bobbio & Bobbio, 1992).

A escolha da combinação a ser utilizada na microscopia eletrônica baseou-se nos resultados dos testes realizados. A resistência do BB-46+acerola foi superior ao do L-431+acerola nos dois métodos de simulação do trato gastrintestinal, assim optou-se por escolher esta combinação. Também, foi selecionado o BB-46 + pectina para análise de

microscopia eletrônica por esta combinação ter proporcionado bons resultados de viabilidade de acordo com a metodologia de bancada.

4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de MEV foi realizada com o objetivo de observar mudanças morfológicas após a passagem simulada pelo trato gastrointestinal. As amostras BB-46 + resíduo de acerola e BB 46 + pectina que foram submetidas a avaliação da viabilidade utilizando método de bancada e multiestágios (SEMH) foram submetidas a microscopia eletrônica de varredura.

Na Figura 5 estão apresentadas as imagens de MEV das amostras de BB-46 sob condições gastrointestinais (B-46 + resíduo de acerola na fase gástrica, BB-46 + resíduo de acerola fase entérica I e fase entérica II) utilizando método *in vitro* de bancada. Observa-se que durante a fase gástrica (Figura 5-B), as fibras de acerola ao redor dos microrganismos o que pode indicar proteção ao microrganismo preservando assim sua morfologia. A Figura 5-C mostra que houve uma redução do BB-46, assim como mudanças estruturais durante a fase entérica I (4 horas sob condições gastrointestinais). No entanto, após a fase entérica II (6 horas sob condições gastrointestinais Figura 5-D), observou-se completa recuperação do microrganismo a sua estrutura original. Durante a fase entérica I pode-se observar o aparecimento de substâncias, provavelmente provenientes da desintegração do probiótico, que dificultaram a visualização dos microrganismos. Costa (2014) diz que essas substâncias são liberadas pela célula quando a mesma se encontra em condições desfavoráveis. Na Figura 5-C pode-se observar um aglomerado de células com forma alterada.

Na figura 5-D, a célula adquire sua forma original provavelmente devido a mudanças de pH de 4,4 para 6,5 o que proporciona um crescimento do BB-46 De acordo com Shah (2007) este microrganismo tem faixa ótima de pH entre 6 e 7. O

resultado do plaqueamento do BB-46 na fase entérica II foi baixa contudo durante análise microscópica observou-se uma grande população desta bactéria.

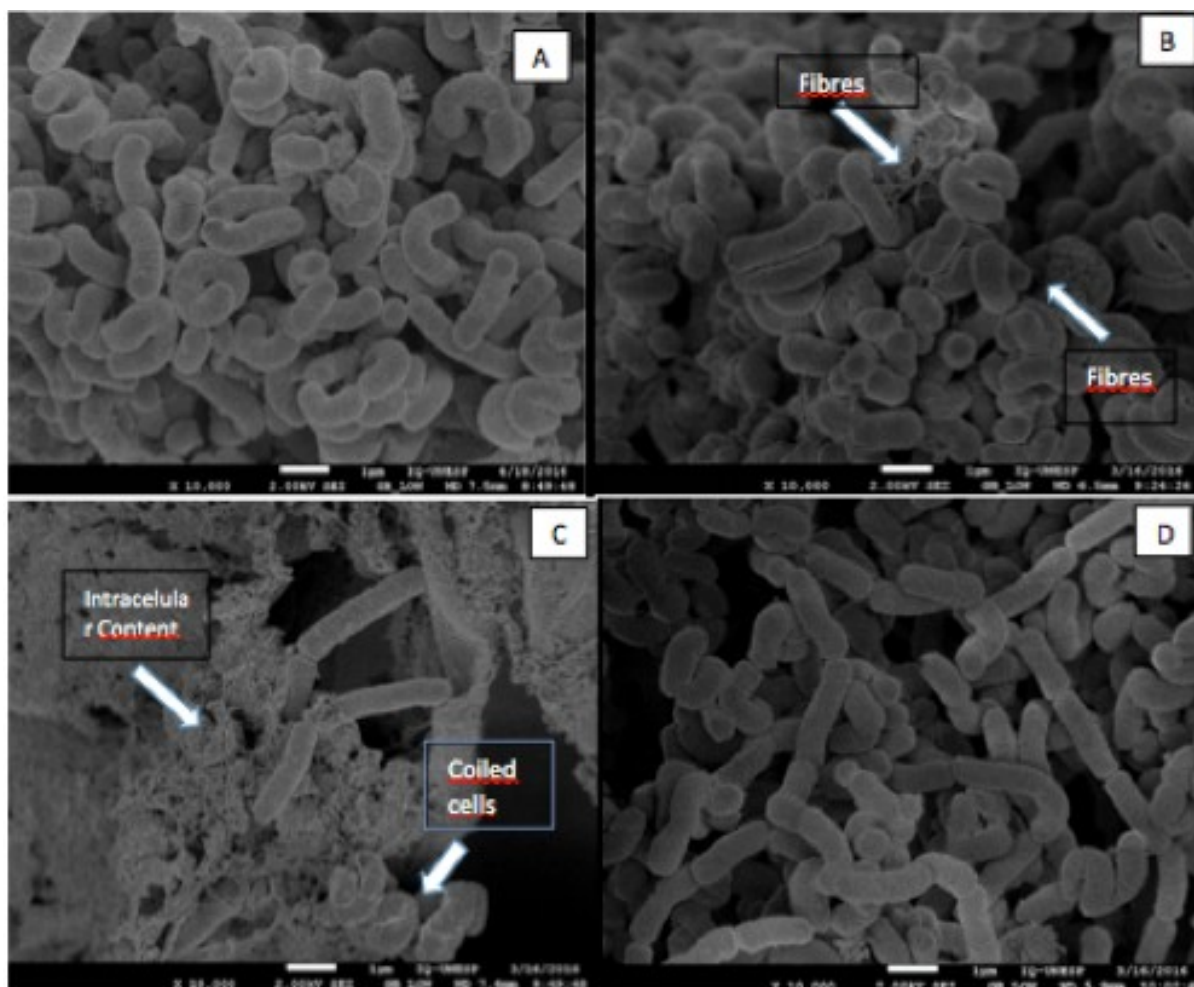


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura do *Bifidobacterium longum* BB- 46 sob condições gastrointestinais utilizando método *in vitro* de bancada. A: BB-46 sem resíduo, B: BB-46+resíduo de acerola fase gástrica, C: BB-46+ resíduo de acerola fase entérica I, D: BB-46+ resíduo de acerola fase entérica II.

Em relação aos resultados das amostras de BB-46 + resíduo de acerola submetidas as condições gastrointestinais utilizando o método de multiestágios (SEMH) observou-se resultados muito semelhantes ao método de bancada. Na figura 6-B as fibras de acerola que estão ao redor dos microrganismos indicam uma proteção o que pode ter preservado sua morfologia. Já na figura 6-C nota-se uma mudança na morfologia original do probiótico assim como observado na figura 5-C, essa mudança

na morfologia pode ter sido ocasionada devido ao pH desfavorável (seu pH ótimo é 6-7) enquanto o pH do ambiente em questão é 4,4. É possível notar também o aparecimento de substâncias de conteúdo intracelular, que geralmente é liberado quando a célula se encontra em situação de estresse.

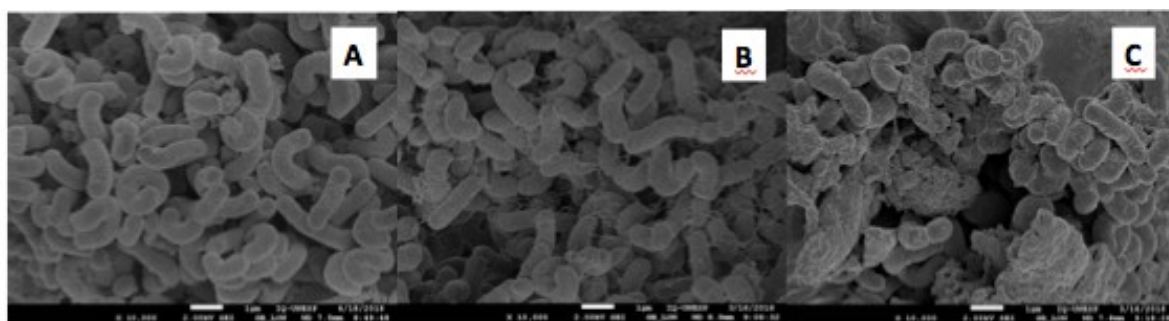


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura do *Bifidobacterium longum* BB-46 sob condições gastrointestinais utilizando o método de multiestágios- Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH). A:BB-46 sem resíduo, B: BB-46+resíduo de acerola fase gástrica, C: BB-46+ resíduo de acerola fase duodenal

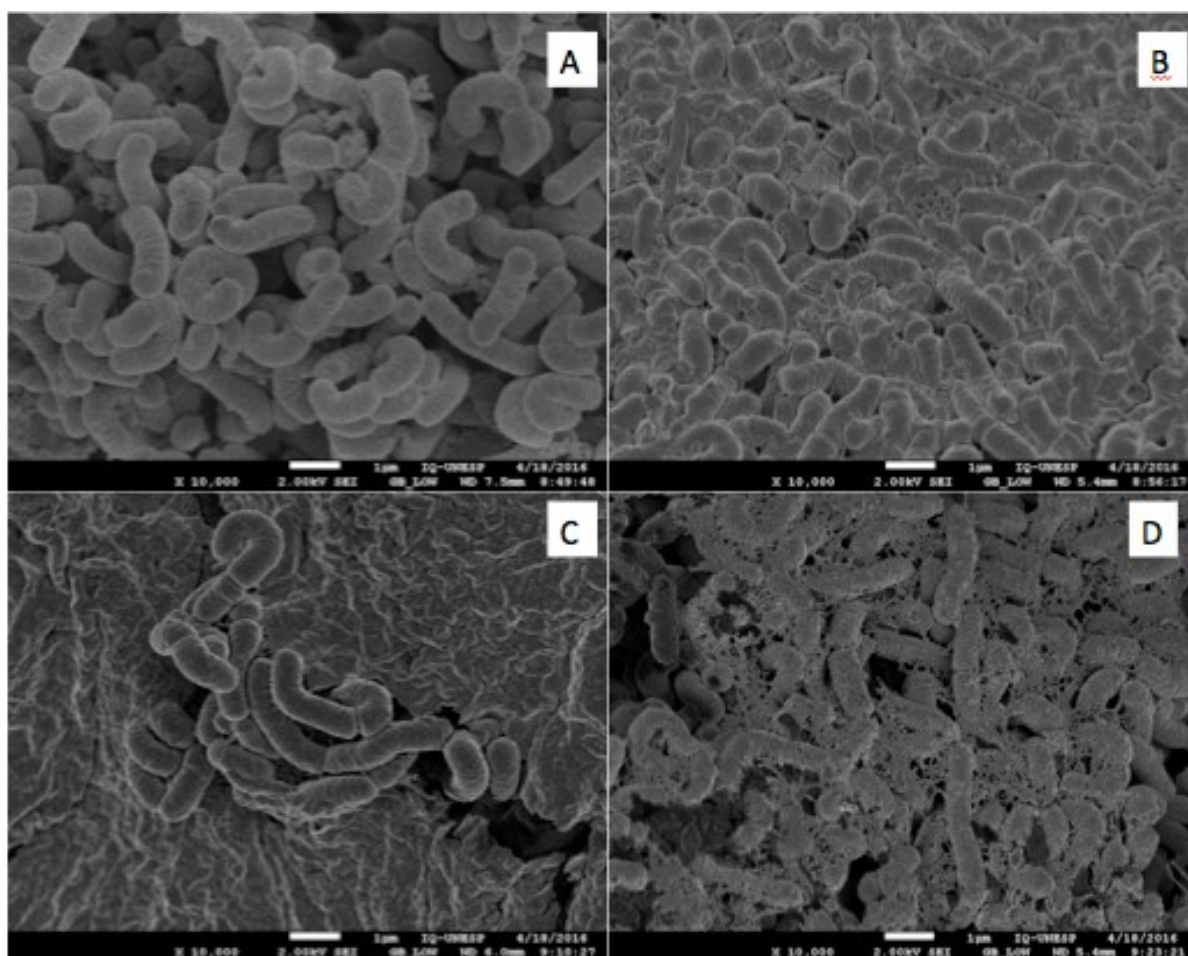


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura do *Bifidobacterium longum* BB- 46 sob condições gastrointestinais utilizando método *in vitro* de bancada. A: BB-46 sem resíduo, B: BB-46+pectina fase gástrica, C: BB-46+ pectina fase entérica I, D: BB-46+ pectina fase entéricaII.

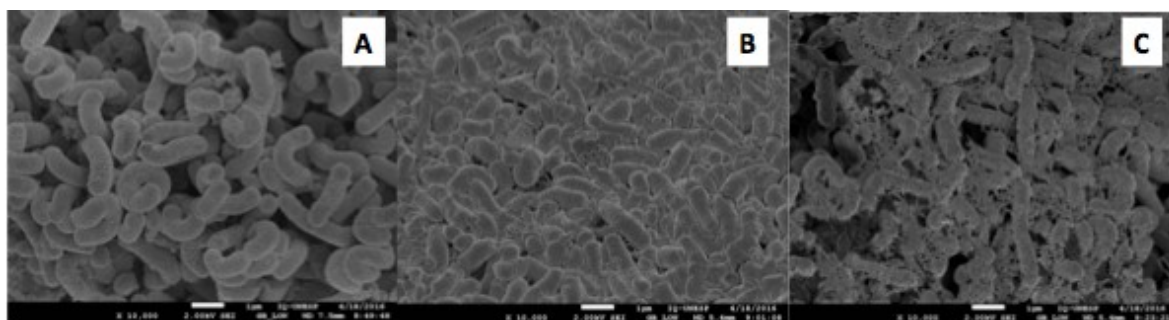


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura do *Bifidobacterium longum* BB- 46 sob condições gastrointestinais utilizando o método de multiestágios- Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH). A: BB-46 sem resíduo, B: BB-46+pectina fase gástrica, C: BB-46+ pectina fase duodenal

O mesmo comportamento pode ser observado durante a análise da microscopia eletrônica do BB-46 em combinação com a pectina, porém, como já mencionado, quando o gel encontra-se em um ambiente com pH alcalino este é rapidamente dimetoxilado e as ligações β (C4) glicosídicas com o grupo éster carboxílico pelo mecanismo de β -eliminação são rompidas, perdendo sua função protetora, como pode ser visualizado nas figuras 4-B e 4-C. O gel formado pela pectina parece ter uma função protetora dos microrganismos fazendo-nos resistir as variações de pH que ocorrem durante a passagem simulada do trato gastrointestinal SEMH (figura 8-B). O mesmo gel pode ser visto recobrindo o microrganismo na figura 7-B durante o teste de bancada. Já na figura 7-C é possível observar a presença de poucos probióticos e estruturalmente alterados, além da ausência do gel recobrindo os probióticos, porém presente na lâmina analisada. Na figura 7-D e 8-C nota-se a presença de fibras envolvendo o microrganismo e sua morfologia restaurada.

5 CONCLUSÕES

É possível concluir que o resíduo de acerola e a pectina melhoraram a viabilidade do BB-46 apenas durante a fase gástrica segundo o teste de bancada. Apesar do L-431, sem nenhum resíduo, apresentar melhor resistência gastrointestinal quando comparado ao BB-46 sem os resíduos, as cepas de BB-46 obtiveram melhores resultados de viabilidade em combinação com o resíduo de acerola e com a pectina comparada ao

L-431, nos ensaios de bancada e no SEMH®.

As amostras analisadas em MEV estavam de acordo com o descrito na literatura. Foi observado o efeito de “proteção” dos resíduos durante a fase gástrica, a deformação dos microrganismos durante a fase entérica I e sua recuperação durante a fase entérica II.

Analisando os dois métodos *in vitro* utilizados é possível notar algumas diferenças que podem ser justificadas devido ao dinamismo que o simulador gastrointestinal SEMH apresenta, diferente do teste de bancada, o produto testado (probiótico ou simbiótico) passa pelo trato gastrointestinal simulado com os respectivos tempos de resistência e fluxo similares ao encontrado no ser humano. Neste estudo foi observada a sobrevivência dos probióticos com e sem associação com prebióticos, porém, novos estudos complementares são necessários a fim de compreender melhor o papel da ação simbiótica sobre a microbiota intestinal.

6 REFERÊNCIAS

AGUIRRE,M. et al. In Vitro Characterization of the Impact of Different Substrates on Metabolite Production, Energy Extraction and Composition of Gut Microbiota from Lean and Obese Subjects. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, , 2014.

ALBUQUERQUE, J. P. (1997). Fatores que Influenciam no Processamento de Geléias e Geleiyadas de Frutas. **Bol. SBCTA**, 31(1), 62-67.

ANG, Z.; DING, J.L. GPR41 and GPR43 in Obesity and Inflammation – Protective or Causative? **Front. Immunol.** v.7, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26870043>. Acesso em: 03 Mar. 2016.

ARYANA, K. J.; MCGREW, P. Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. **International Journal of Food Science and Technology**, v.40, n.10, p.1808–1814,2007.

ASSIS, S. A., LIMA, D. C., OLIVEIRA, & O. M.M.F. (2001). Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. *Food Chemistry*, 74, 133- 137.

BEDANI, R.; storage. **LWT - Food Science and Technology**, v.55, n.2, p. 436–443, 2014.

BIANCHI, F.; ROSSI, E.A.; SAKAMOTO, I.K.; ADORNO, M.A.T.; WIELE, T.V.; SIVIERI, K.Beneficial effects of fermented vegetal beverages on human gastrointestinal microbial ecosystem in a simulator. **Food Research International**, v.64,

p. 43-52, 2014.

BOBBIO, P. A., & BOBBIO F. O. (1992). *Química do Processamento de Alimentos* (2th ed.) São Paulo: Livraria Varela.

BURITI, F.C.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of food microbiology**, v.137, n.(2-3), p.121-129, 2010.

BURNS, P. et al. Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 377-385, 2008.

BURNS, P. et al. Inside the adaptation process of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* to bile. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 132-141, 2010.

CARDONA, F. et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, p. 1415-1422, 2013.

CHUNG, W.S. et al. Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. **BMC Biology**, v. 14, n. 3, 2016.

CONLY, J. M.; STEIN, K. The production of menaquinones (vitamin-K2) by intestinal bacteria and their role in maintaining coagulation homeostasis. **Progress in**

Food and Nutrition Science, v.16, n.4, p.307– 343, 1992.

COSTA, M.G.M. **Desenvolvimento de sorvete simbiótico de açaí com *Lactobacillus rhamnosus* GG e resistncia do probiótico em um modelo de digestão gastrointestinal *in vitro***. Tese de doutorado (Tecnologia de alimentos). 2014. Faculdade de Ciências Farmaceuticas –USP de São Paulo, 183 p.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v.87, n.2, p.145-51, 2002.

DENIPOTE, F. G.; TRINDADE, E. B. S. M; BURINI, R. C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. *Arquivos de Gastroenterologia*, v.47, n.1, p.93-98, 2010.

DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D.A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. **Nature**, v.449, n.1, p. 811–818, 2007.

DUDA-CHODAK, A The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 63, n. 5, p. 497-503, 2012.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of human colonic microbiota: introducing the concept of the prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, n.6, p. 1401-1412, 1995.

GORINSTEIN, S., POOVARODOM, S., LEONTOWICZ, H.,

LEONTOWICZ, M., NAMIESNIK, J., VEARASILP, S., HARUENKITF, R., RUAMSUKEG, P., KATRICHA, E., & TASHMA, Z. (2011). Antioxidant properties and bioactive constituents of some rare exotic Thai fruits and comparison with conventional fruits. In vitro and in vivo studies. *Food Research International*, 44(7), 2222–2232.

GÓRSKA, S. et al. Identification of *Lactobacillus* proteins with different recognition patterns between immune rabbit sera and nonimmune mice or human sera. **BMC Microbiology**, Acesso em: 16 fev. 2016.

GUERGOLETTTO, K. B., MAGNANI, M., MARTIN, J. S., ANDRADE, C. G. T. J., GARCIA, S. (2010). Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 415–421.

GULLÓN, B., GÓMEZ, B., MARTÍNEZ-SABAJANES, M., YÁÑEZ, R., PARAJO, J. C., & ALONSO, J.L. (2013). Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. *Trends of Food Science & Technology*, 30, 153–161.

HANAMURA, T; UCHIDA,E; AOKI,H Skin-Lightening Effect of a Polyphenol Extract from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) Fruit on UV-Induced Pigmentation. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 72, n. 12, p. 3211-3218, 2008.

HAULY, M-C. O.; FUCHS, R. H. B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Soymilk yogurt supplemented with fructooligosaccharides: probiotic properties and acceptance. **Nutrition Review**, v.18, n.5, p.613-622, 2005.

HELLER, K. J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 374-379.

IBRAF. Brazilian Institute of Fruits. Brazilian fruits in demand. (2009). http://www.ibraf.org.br/imprensa/0901_FrutasBrasileirasAscensao.asp.

KAVANAUGH, D. W., O'CALLAGHAN, J., BUTTO, L. F., SLATTERY, H., LANE, J., CLYNE, M. KANE, M., JOSHI, L., & HICKEY, R. M. (2013). Exposure of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* to Milk Oligosaccharides Increases Adhesion to Epithelial Cells and Induces a Substantial Transcriptional Response. *PLoS One*, 8(6).

KLU, Y. A. K., & CHEN, J. (2015). Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. *LWT-Food Science and Technology*, 62(2), 983–988.

LARSEN, N.; VOGENSEN, F.; GOBEL, R.; MOLGARD, C.; JAKOBSEN, M.; MICHAELSEN, K.F.FORSSTEN, S.D.; JAKOBSEN, M.; Effect of *Lactobacillus salivarius* Ls-33 on fecal microbiota in obese adolescents. **Clinical Nutrition**, v.32, n.6, p.935-940, 2013.

MARQUES, T. R. (2013). Aproveitamento tecnológico de resíduos de acerola; farinhas e barras de cereias (Master degree). Lavras, M.G.: Universidade federal de lavras (UFV).

MARTINS, C.R.; FARIAS, R.M. Produção de alimentos x desperdício: tipos, causas e como reduzir perdas na produção agrícola. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.9, n.1, p.83-93, 2002.

MATTO, J., ALAKOMI, H., VAARI, A., VIRKAJARVI, I., & SAARELA, M. (2006). Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *subtilis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *International Dairy Journal*, 16, 1029–1037.

MEZADRI, T., VILLANO, D., FERNANDEZ-PACHON, M. S., GARCIA-PARRILLA, M. C., & TRONCOSO, A.M. (2008). Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(4), 282–290.

MOLLY, K.; WOESTYNE, M.V.; VERSTRAETE, W. Development of a 5-step multichamber reactor as a Simulation of the Human Intestinal Microbial Ecosystem. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n.2, p. 254–258, 1993.

MUNOA, F.J.; PARES, R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n.7, p.1715-1718, 1988.

NEVES, L. C., TOSIN, J. M., BENEDETTE, R. M., & CISNEROS-ZEVALLOS, L. (2015). Post-harvest nutraceutical behaviour during ripening and senescence of 8 highly perishable fruit species from the Northern Brazilian Amazon region. *Food*

Chemistry, 174(1), 188-196.

PAYNE, S.; GIBSON, G.; WYNNE, A.; HUDSPITH, B.; BROSTOFF, J.; TUOHY, K. In vitro studies on colonization resistance of the human gut microbiota to *Candida albicans* and the effects of tetracycline and *Lactobacillus plantarum* LPK. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 4, n.1, p.1-8, 2003.

POSSEMIERS, S.; VERTHÉ, K., UYTENDAELE, S.; VERSTRAETE, W. PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, n.3, p. 495–507, 2004.

RAJILIC-STOJANOVIC, M.; SMIDT, H.; DE VOS, W. M. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. **Environmental Microbiology**, v.9, n.9, p.2125–2136, 2007.

REALINI, C. E., GUÀRDIA, M. D., DÍAZ, I., GARCÍA-REGUEIRO, J. A., & ARNAU, J. (2015). Effects of acerola fruit extract on sensory and shelf-life of salted beef patties from grinds differing in fatty acid composition. *Meat Science*, 99, 18–24.

REUTER, G. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Microflora of the Human Intestine: Composition and Succession. **Curr. Issues Intest. Microbiol.** , p. 43-53, 2001.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The Concept Revisited. **The American Society for Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 830-837, 2007

RUIZ, L., MARGOLLES, A., & SÁNCHEZ, B. (2013). Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in Microbiology*, 4.

SAARELA, M., MOGENSEN, G., FONDÉN, R., MATTO, J., & MATTILA-SANDHOLM, T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 197–215.

SENDRA, E., SAYAS-BARBERÁ, M. E., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., & PÉREZ-ALVARE, J. A. (2016). Effect of Food Composition on Probiotic Bacteria Viability. In Watson, R. R., & Preedy, V. R. (Eds.), *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics Bioactive Foods in Health Promotion* (pp.257–269). Arizona, USA: University of Arizona.

SHAH N.P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International dairy journal*, 17(11), 1262- 1277.

SIVIERI, K.; MORALES, M.L.V.; ADORNO, M.A.T.; SAKAMOTO, I.K.; SAAD, S.M.I.;ROSSI, E.A. *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 improved “gut health” in the SHIME® reactor. **Gastroenterology**, v.13, n.1, 2013.

SOUSA, M.S.B.; VIEIRA, L.M.; SILVA, M.J.M.; LIMA, A. Nutritional characterization and antioxidant compounds in pulp residues of tropical fruits. **Ciência e Agrotecnologia**,v. 35, n. 3, p. 554-559, 2011.

VINDEROLA, G. et al. Cell viability and functionality of probiotic bacteria in

dairy products. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 1-6, 2011.

WHO/FAO -. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**, Córdoba: World health organization/ Food and agriculture organization of the united nations, 2001. 34 p.

WIELE, T.V.; BOON, N.; POSSEMIERS, S.; JACOBS, H.; VERSTRAETE, W. Prebiotic effect of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, v.51, n.1, p.143-153, 2004.

WOLVERS, D.; ANTOINE, J.M.; MYLLYLUOMA, E. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of infections by probiotics. **Journal of Nutrition**, v.140, n.3, p.698-712, 2010.

WOODMANSEY EJ. Intestinal bacteria and ageing. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, n.5, p1178-1186, 2007.

YOSHIOKA, H.; ISEKI, K.; FUJITA, K. Development and difference of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics*, v.72, n.3, p.317-321, 1983.

Araraquara, 27 de dezembro de 2016.

De acordo,

Aluna: Natália Pontin Lopes

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Aureluce Demonte