

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM PROBIÓTICOS

**Avaliação da adição da *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 e  
*Enterococcus faecium* CRL 183 sobre a microbiota intestinal  
em Simulador do Ecossistema Microbiano Humano  
(SEMH).**

Daniel Oliveira Martins

**ARARAQUARA**

**2012**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM PROBIÓTICOS

**Avaliação da adição da *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 e  
*Enterococcus faecium* CRL 183 sobre a microbiota intestinal  
em Simulador do Ecossistema Microbiano Humano  
(SEMH).**

Daniel Oliveira Martins

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de  
Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de  
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para a obtenção  
do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Orientador: Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi

Co-Orientador: Dra. Kátia Sivieri

ARARAQUARA

2012

# SUMÁRIO

RESUMO .....	3
LISTA DE FIGURAS .....	4
LISTA DE TABELAS.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	5
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
1.1. MICROBIOTA INTESTINAL.....	6
1.2. PROBIÓTICOS .....	7
1.3. AMÔNIA .....	8
1.4. ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA.....	9
1.5. SIMULADORES INTESTINAIS .....	10
<b>2. OBJETIVOS GERAIS.....</b>	<b>11</b>
<b>3. DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>11</b>
3.1. METODOLOGIA .....	11
3.1.1. <i>Simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH)</i> .....	11
3.1.2. <i>Preparo de células de E. faecium CRL 183 e Lactobacillus acidophilus</i> <i>CRL 1014</i> .....	14
3.1.3. <i>Análises microbiológicas</i> .....	14
3.1.4. <i>Análise de amônia</i> .....	15
3.1.5. <i>Análise de ácidos graxos de cadeia curta</i> .....	16
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
3.2.1. <i>Análises Microbiológicas</i> .....	16
3.2.2. <i>Análise de amônia</i> .....	20
3.2.3. <i>Análise de ácidos graxos</i> .....	21
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>26</b>

## RESUMO

Os micro-organismos probióticos são utilizados em vários produtos alimentícios ou em suplementos alimentares. Simuladores intestinais representam uma opção de realização de estudos com a microbiota intestinal. O simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH) 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. O SEMH foi utilizado para estudar o efeito do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 sobre a microbiota intestinal nativa. Inicialmente, o inóculo preparado com fezes humanas foi introduzido nos três reatores, responsáveis por simular o cólon ascendente, transverso e descendente. Após duas semanas de estabilização foi adicionado, diariamente, durante quatro semanas, *E. faecium* CRL 183 e *L. acidophilus* CRL 1014 contendo  $10^8$  UFC/mL nos três compartimentos que simulam o cólon ascendente, transverso e descendente. Após as quatro semanas de tratamento o sistema permaneceu durante duas semanas sem adição de probióticos. Durante todo o experimento, foi realizado semanalmente a composição da microbiota intestinal baseada na enumeração de bactérias aeróbias e anaeróbias totais, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., Enterobactérias e *Clostridium* spp. Semanalmente, também, foram realizadas análises de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, butirato e propionato) e amônia. Através da análise microbiológica observou-se alterações significativas na composição da microbiota do SEMH no decorrer do período do experimento. Alterações significativas também foram observadas na concentração de amônia e de AGCC, podendo assim observar a influência da inoculação de probióticos na microbiota nativa e os metabólitos produzidos por ela.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representação esquemática do Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH).

**Figura 2.** Conteúdo de amônia (ppm) nos frascos do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH), durante o período pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento.

**Figura 3.** Produção de ácido butírico (mg/mL de suspensão) nos frascos do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH), durante o período pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento.

**Figura 4.** Produção de ácido acético (mg/mL de suspensão) nos frascos do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH), durante o período pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento.

**Figura 5.** Produção de ácido propiônico (mg/mL de suspensão) nos frascos do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH), durante o período pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Valores de volume, tempo de residência e pH estabelecidos em cada um dos reatores do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH).

**Tabela 2.** Composição do meio alimentar basal dissolvidos em água destilada.

**Tabela 3.** Contagens microbiológicas dos frascos do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH), durante o período pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**SEMH** – Simulador do Ecossistema Microbiano Humano.

**UFC** – Unidade Formadora de Colônia.

**TGI** – Trato Gastrointestinal.

**GI** – Gastrointestinal.

**BA** – Ácidos Biliares.

**AGCC** – Ácidos Graxos de Cadeia Curta



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Microbiota intestinal

Compreendendo mais de 400m<sup>2</sup>, o trato intestinal é colonizado por aproximadamente 100 trilhões de micro-organismos (MACDONALD & MONTELEONE, 2005). Há um aumento da concentração bacteriana ao longo do trato intestinal com, aproximadamente, 10<sup>4</sup> células/g de conteúdo luminal no estômago e duodeno até uma densidade de 10<sup>11</sup>-10<sup>14</sup> células/g no intestino grosso (WHITMAN et al., 1998). No total, o número de bactérias intestinais é aproximadamente dez vezes o número de células que constituem o corpo humano.

Com base em sequenciamento de rRNA foi possível identificar até 40 mil espécies de bactérias intestinais (FRANK et al., 2008). Observou-se que 99% das bactérias intestinais são constituídas por quatro filos, incluindo Proteobacteria, Actinobactérias e os dois principais filos Bacteroidetes e Firmicutes (MANSON et al. 2008). Enquanto, as espécies Bacteroidetes mostram uma grande variedade entre os indivíduos, um número elevado de espécies Firmicutes pertencem a aglomerados clostridiais produtores de butirato (ECKBURG et al., 2005). Com os avanços das técnicas de biologia molecular e o desenvolvimento das ciências ômicas, sabe-se que microbioma intestinal, contém 100 vezes mais genes do que o todo genoma humano (TSAI & COYLE, 2009).

O intestino humano e sua microbiota apresentam uma estreita relação. Se esta é de ganho para ambos os parceiros é referida como simbiose, enquanto uma relação comensal é caracterizada por um benefício para um e nenhum ganho ou perda para o outro parceiro e uma relação parasitária é benéfico para um, mas prejudicial para o outro parceiro (METGES, 2000).

Microbiota comensal não patogênica têm um impacto sobre a fisiologia normal

do TGI. Elas garantem a eficácia da motilidade intestinal, do crescimento e da imunidade, bem como a digestão de nutrientes, absorção, angiogênese e fortificação da barreira de muco (ROUND & MAZMANIAN, 2009). Outras funções da microbiota GI incluem digestão de nutrientes, modificação de ácidos biliares (BAs), e a suplementação nutricional de compostos auxotróficos adicionais, tais como ácido fólico e biotina (JONES et al., 2008).

A complexa interação entre a dieta e a microbiota intestinal normal, tem promovido o desenvolvimento de estratégias que permitam o crescimento seletivo de micro-organismos benéficos ou probióticos (LIONG, 2007).

## **1.2. Probióticos**

Probióticos são “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO, 2001). O papel potencial de probióticos tem sido extensivamente analisado, e seus efeitos benéficos incluem a estimulação do sistema imune, alívio na constipação intestinal, produção de vitaminas, aumento da absorção de minerais e redução do risco de desenvolvimento de câncer de cólon (GILL et al., 2004)

A ingestão de bactérias probióticas tem se mostrado como preventiva no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e tumores em animais induzidos química e biologicamente (GOLDIN et al., 1984; ROWLAND et al., 1998). Os mecanismos pelos quais as bactérias probióticas exercem a atividade antitumoral não estão claramente elucidados. Mercenier et al., (2003) resumiram várias suposições destas atividades, dentre elas estão: modulação do sistema imune; ligação e/ou degradação dos potenciais carcinogênicos (melhorando a atividade metabólica intestinal); alteração da atividade metabólica da microbiota intestinal;

alterações das condições físico-químicas do cólon; melhoramento quali e quantitativo da microbiota intestinal e redução de promotores carcinogênicos.

As bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais frequentemente empregadas como probióticos em alimentos, uma vez que elas têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável. O intestino delgado e o cólon são os locais preferenciais para a colonização intestinal dos lactobacilos e bifidobactérias (CHARTERIES et al., 1998; BIELECKA et al., 2002).

*Lactobacillus acidophilus* é uma bactéria gram-positiva, produtora de ácido láctico que possui a capacidade de sobreviver no trato gastrointestinal (TGI), modifica a flora fecal (SUI et al., 2002), adere às células epiteliais humanas *in vitro* (SANDERS & KLAENNHAMMER, 2001), modula a resposta imune do hospedeiro e previne gastroenterites microbianas (VARCOE et al., 2003). Além disso, *L. acidophilus* tem a capacidade de usar oligossacarídeos não digeríveis, que podem também contribuir para a capacidade do organismo para competir no TGI humano (BARRANGOU et al., 2003).

Nosso grupo de pesquisa vem se dedicando ao estudo das propriedades probióticas do *Enterococcus faecium* CRL 183. Vários efeitos benéficos foram observados, tais como; modulador do perfil lipídico, estimulação do sistema imune, atividade anti-carcinogênica e inibição de osteoporose pós-menopausa (ROSSI et al., 2000; 2001; CARLOS et al., 2005; VENDRAMINI et al., 2006; SHIGUEMOTO et al., 2008; SILVA et al., 2009)

### **1.3. Amônia**

Entre os produtos de degradação de proteínas encontram-se ácidos graxos de cadeia curta, ácidos graxos ramificados, derivados fenólicos, indólicos,

poliaminas, aminas e amônia. As aminas e amônia são metabólitos deletérios que podem ser absorvidos ou excretados na urina (Coudeyras e Forestier, 2010). Estudos têm demonstrado que altas concentrações de amônia agem como promotores de tumor no cólon, pois são tóxicas para as células epiteliais do intestino (Montalto et al, 2009). A urease é expressada por muitas bactérias e mediada pela hidrólise da uréia em amônia, a qual é fonte de nitrogênio bacteriano (Højberg et al., 2004).

#### **1.4. Ácidos Graxos de Cadeia Curta**

Uma das características mais comuns da microbiota intestinal é a fermentação. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e lactato são metabólitos microbianos benéficos. AGCC e lactato acidificam o lúmen intestinal, causando a inibição do crescimento ou mesmo a morte de micro-organismos causadores de infecções oportunistas. Além disso, os AGCC são uma fonte de energia para o hospedeiro: butirato nas células epiteliais do cólon, acetato e propionato, no fígado e células musculares (Underwood et al., 2009; Vitali et al., 2010; Vinolo et al., 2011; Rehman et al., 2012). Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são ácidos graxos orgânicos com 1-6 átomos de carbono. Estes surgem a partir da fermentação bacteriana dos polissacarídeos, oligossacarídeos, proteína, peptídeo, e glicoproteína precursores no cólon. A fermentação envolve uma variedade de reações e processos metabólicos da flora microbiana anaeróbia com a finalidade de decomposição de matéria orgânica metabolizável, produzindo energia para o crescimento microbiano e sua manutenção e outros produtos metabólicos para o uso do hospedeiro. O aumento da concentração AGCC está associado à diminuição do pH das fezes, sendo que vários estudos mostram que as fezes com pH baixo estão associadas com a diminuição do

câncer de cólon (CUMMINGS et al., 2001; WOLLOWSKI et al., 2001).

### 1.5. Simuladores intestinais

A microbiota intestinal pode ser estudada “*in vivo*” utilizando voluntários humanos saudáveis, pacientes hospitalizados ou modelo animal. Existem várias limitações nas investigações com voluntários saudáveis e pacientes hospitalizados, tais como, o elevado custo destes experimentos e o tipo de alimentos ou drogas que são administradas aos pacientes. Os modelos animais são excelentes na avaliação da microbiota intestinal, pois possibilitam o controle da dieta e o acesso direto ao conteúdo intestinal, bem como aos tecidos e órgãos. Entretanto, os modelos animais são relativamente caros e demorados quando comparados com os modelos “*in vitro*” (MACFARLANE et al., 2007).

Uma alternativa de investigação é o uso de modelos de cultivo contínuo ou semi-contínuo para simular o intestino grosso. O sistema de cultivo contínuo foi validado usando medidas do conteúdo intestinal de vítimas de morte repentina (MACFARLANE et al., 2007). Entre as vantagens deste modelo estão a facilidade de utilização, a possibilidade de uso de substâncias radioativas e o baixo custo (GIBSON & FULLER, 2000).

Os modelos “*in vitro*” permitem simplificar a realidade, podendo-se estudar separadamente o metabolismo da microbiota nativa e adicionada, na presença de substratos específicos (MACFARLANE et al., 2004).

Vários modelos “*in vitro*” vêm sendo propostos para o trato digestivo (SALMINEN et al., 1998). Os modelos mais utilizados são os de sistema de batelada, semi-contínuo ou contínuo, os quais são considerados os mais adequados para estudos das diferentes funções intestinais. Cada um destes modelos apresenta

características peculiares e a escolha do tipo de cultivo depende do objetivo do estudo em questão (RUMNEY & ROWLAND, 1992., GIBSON & FULLER, 2000).

O modelo de cultivo contínuo vêm sendo utilizado na investigação do metabolismo e ecologia da microbiota intestinal, com ênfase na utilização de probióticos (PAYNE et al., 2003 ; PEREIRA et al., 2003 ), prebióticos (RYCROFT et al., 2001 ; TZORTZIS et al., 2005) e a formação de produtos de fermentação (MACFARLANE et al., 2007). Mäkeläinen et al., (2009) avaliaram em modelo de cultivo contínuo, a eficácia de queijo de massa semi-cozida como veículo de inclusão de probióticos. Os resultados mostraram que os probióticos sobreviveram ao trato gastrointestinal e que a matriz alimentícia não influenciou na sobrevivência dos micro-organismos probióticos.

## **2. OBJETIVOS GERAIS**

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da adição de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 e *Enterococcus faecium* CRL 183 sobre a microbiota intestinal nativa utilizando o Simulador do Ecosistema Microbiano Humano (SEMH).

## **3. DESENVOLVIMENTO**

### **3.1. Metodologia**

#### **3.1.1. Simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH)**

O simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH) 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 (Tabela 1), com um tempo de retenção de 76 h nos três últimos compartimentos. Os cinco reatores foram continuamente agitados por um agitador magnético e mantidos a temperatura de 37°C por meio de um termostato. O meio foi mantido em anaerobiose, pela injeção diária de N<sub>2</sub> durante 30 minutos. O pH adequado de cada porção do trato foi automaticamente controlado pela adição de NaOH 1N ou HCl 1N (POSSEMIERS et al., 2004; MOLLY et al., 1994).

Cada reator apresenta oito aberturas: para entrada e saída do meio, amostragem da fase líquida e do espaço ocupado pelos gases, pH-eletrodo, pH-controle (ácido e base) e para injeção de gases. Bombas peristálticas foram utilizadas para transferir sucessivamente os conteúdos entre os recipientes (Figura 1), de forma contínua (MOLLY et al., 1994), simulando o trato gastrointestinal.

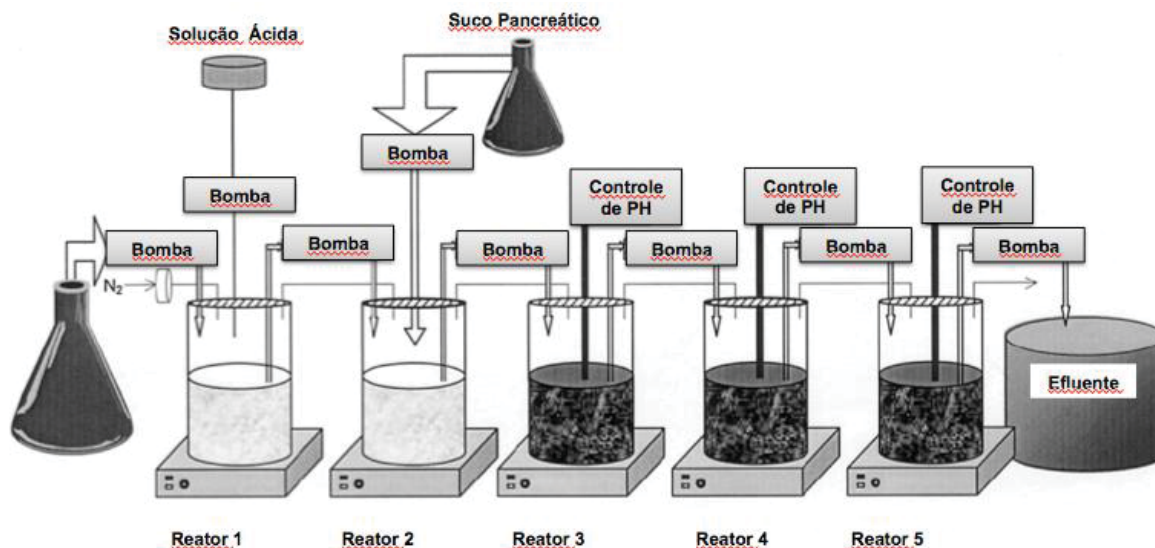
**Tabela 1.** Valores de volume, tempo de residência e pH estabelecidos em cada um dos reatores do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH)

Reator	Volume (ml)	Tempo de residência (h)	pH
R3:Cólon ascendente	500	20	5,6-5,9
R4:Cólon transverso	800	32	6,1-6,9
R5:Cólon descendente	600	24	6,6-6,9

*Fonte:* POSSEMIERS et al. (2004)

No início do experimento, os últimos 3 reatores foram inoculados com amostra de fezes de doador adulto voluntário que não tenha utilizado antibiótico por um período de 2 anos antes do início do experimento. Foram coletadas 20 g de fezes e diluídas dez vezes com tampão fosfato contendo 0,05 mol/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 mol/L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,1% de Na-tioglicolato (pH 6,5). Posteriormente, agitada no

homogeneizador de amostras tipo Stomacher® por 10 min, a amostra diluída foi centrifugada por cinco minutos a 3000 rpm. Do sobrenadante, 40 mL foram adicionados aos reatores 3, 4 e 5.



**Figura 1.** Representação esquemática do Simulador do Ecosistema Microbiano Humano (SEMH).

O período experimental utilizando este tipo de reator, como descrito por Van de Wiele et al., (2007), incluiu um período de estabilização (Período controle) de duas semanas, após a inoculação da amostra de fezes, para permitir a adaptação das bactérias intestinais às condições ambientais presentes nos diferentes compartimentos do cólon e permitir, também, a formação de uma comunidade microbiana estável. Durante este período o meio alimentar basal (Tabela 2) passou pelo sistema, três vezes ao dia, possibilitando a adaptação da comunidade microbiana às condições físico-químicas e nutricionais que predominam nas diferentes partes do cólon (MOLLY et al., 1993). Após as duas semanas de adaptação, o período de tratamento se iniciou. Durante esse período, 109 UFC/mL

de *L. acidophilus* CRL 1014 e *E. faecium* CRL 183 foram inoculadas diariamente, mantendo-se a passagem do alimento basal três vezes ao dia, durante quatro semanas. Após o período de tratamento, iniciou o período de pós-tratamento. Durante duas semanas somente o meio basal entrou no sistema.

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

Constituintes	Quantidades (g/L)
Amido	3,0
Pectina	2,0
Mucina (Suínos gástrica tipo III)	4,0
Xilana	1,0
Peptona	1,0
Triptona	1,0
Glicose	0,4
Extrato de levedura	3,0
L-cisteína	0,5

Fonte: PAYNE et al.(2003)

### 3.1.2. Preparo de células de *E. faecium* CRL 183 e *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014

Semanalmente, cultura pura de *E. faecium* CRL 183 e *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 foram inoculadas em meio Caldo MRS (Acumedia, Baltimore). As bactérias na fase log foram centrifugadas (4000 x g, 10 min., 4°C) e lavadas com água peptonada estéril, as quais foram mantidos em água peptonada estéril na concentração de  $10^8$  UFC/mL até o momento da utilização (Sivieri et al., 2007).

### 3.1.3. Análises microbiológicas

Semanalmente, durante todo o período experimental (controle, tratamento e pós tratamento), 5 mL de amostras foram coletadas dos reatores para as análises microbiológicas. A análise da composição da microbiota intestinal foi baseada na contagem de bactérias aeróbias e anaeróbias totais, *Enterococcus spp.*,

*Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, Enterobactérias, *Clostridium spp.* e Bacteroides. Um mililitro de amostra de cada reator foi suspenso em nove mililitros de água peptonada. Diluições seriadas foram preparadas e inoculadas em meios de cultura seletivos: aeróbios totais e anaeróbios facultativos em meio “Plate Count Agar” (PCA) (Acumedia, EUA; 37°C/48h); *Enterococcus spp.* em meio KF Streptococcus Ágar (Acumedia, EUA; 37°C/48h) (EDLUND *et al.*, 2000); *Lactobacillus spp.* em meio MRS Ágar (Merck, Alemanha; 37°C/48h, anaerobiose) (Yoshioka *et al.*, 1983); *Bifidobacterium spp.* em meio Reinforced Clostridial Agar (RCA) com suplementação de NPKIT (Difco, 37°C/72h, anaerobiose) (MUNOA & PARES, 1988), Enterobactérias em meio MacConkey ágar (Acumedia, EUA; 37°C/48h) (BRIGIDI *et al.*, 2001) e *Clostridium spp.* em meio RCA (Difco, França; 37°C/48h, anaerobiose) (MARZOTTO *et al.*, 2006). Após o período de incubação foi realizada a contagem das colônias em placa. Os resultados das contagens de UFC/mL foram expressos em logaritmo na base 10.

#### **3.1.4. Análise de amônia**

Durante todo o período experimental (pré-tratamento, tratamento e pós - tratamento) foram coletadas 25 mL, uma vez por semana, amostras dos reatores para análise de amônia.

O conteúdo de amônia foi determinado utilizando-se um medidor de íon seletivo (modelo 710A, marca Orion) acoplado a um eletrodo de íon seletivo para amônia (modelo 95-12, Orion). O aparelho foi calibrado utilizando soluções padrão de cloreto de amônio 0,1M, nas concentrações de 10, 100 e 1000 mg/L de amônia. Em 25 mL de amostra foi adicionado 0,5 mL de solução ISA (ammonia pH adjusting Ionic Strength Adjuster (Orion) – solução ajustadora de pH e força iônica). Todas as medidas foram realizadas a 25°C (Bedani, 2008).

### **3.1.5. Análise de ácidos graxos de cadeia curta**

Durante todo o período experimental (pré-tratamento, tratamento e pós - tratamento) foram coletadas, uma vez por semana, amostras dos reatores para análise de ácidos graxos de cadeia curta.

Utilizou-se para determinar os AGCC a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Sistema SHIMADZU®, equipado com bomba LC-10ADVP, amostrador automático SIL-20A HT, forno CT-20A, dois detectores ligados em série: detector de ultravioleta (UV) com arranjo de diodos SPD-M10 AVP e detector por índice de refração RID-10A; controlador SCL-10AVP. Coluna AMINEX® HPX-87H (300 mm x 7.8 mm, BioRad) e software Class-VP (SHIMADZU®). O eluente utilizado foi solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005M, com fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno da coluna de 43 °C. O volume injetado foi de 100 µL. E para o preparo das amostras utilizou-se 1 mL de amostra filtrada em membrana de 0,2 µm e adicionou 80 µL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M.

## **3.2. Resultados e Discussão**

### **3.2.1. Análises Microbiológicas**

O intestino humano é o habitat natural de um grande número de micro-organismos, principalmente bactérias, que se adaptaram à vida na superfície das mucosas ou na luz intestinal. O termo microbiota refere-se aos micro-organismos vivos reunidos em um determinado nicho ecológico. O ecossistema microbiano intestinal inclui espécies nativas permanentemente que colonizam o trato gastrointestinal e uma série de micro-organismos vivos que passam através do tubo digestivo temporariamente. As bactérias nativas são adquiridas no nascimento e durante o primeiro ano de vida, enquanto que as bactérias transitórias são ingeridas continuamente através da comida, bebida, etc. (GUARNER, 2007).

A população microbiana do intestino humano inclui cerca de 100 bilhões de bactérias de cerca de 500 à 1.000 espécies distintas. O tempo de trânsito do cólon é lento o que dá a oportunidade para a proliferação dos micro-organismos fermentadores dos substratos disponíveis oriundos da dieta ou de secreções endógenas(GUARNER, 2007).

Na Tabela 3 são observados os valores das contagens microbiológicas dos frascos que simularam os cólons ascendente, transverso e descendente do reator SEMH.

**Tabela 3.** Médias das populações microbianas ( $\pm$ desvio padrão), expressas em log UFC/mL, para diferentes grupos e gêneros, em diferentes seguimentos do cólon e em diferentes períodos experimentais, em decorrência da inserção no *E.faecium* CRL 183 e do *L. acidophilus* CRL 1014 no sistema.

<b>Grupos Microbianos</b>	<b>Cólon Ascendente</b>	<b>Cólon Transverso</b>	<b>Cólon Descendente</b>
<b>Período pré-tratamento</b>			
<i>Lactobacillus spp.</i>	7,00 $\pm$ 1,09 <sup>B</sup>	7,16 $\pm$ 1,28 <sup>B</sup>	6,91 $\pm$ 1,01 <sup>B</sup>
<i>Enterococcus spp.</i>	5,96 $\pm$ 1,05 <sup>B</sup>	5,96 $\pm$ 1,05 <sup>B</sup>	6,53 $\pm$ 0,58 <sup>B</sup>
<i>Clostridium spp.</i>	8,12 $\pm$ 0,12 <sup>B</sup>	7,51 $\pm$ 0,56 <sup>B</sup>	8,00 $\pm$ 1,09 <sup>B</sup>
<i>Bifidobacterium spp.</i>	6,34 $\pm$ 0,63 <sup>B</sup>	6,80 $\pm$ 0,87 <sup>B</sup>	6,99 $\pm$ 1,08 <sup>B</sup>
Enterobactérias	6,36 $\pm$ 0,40 <sup>B</sup>	7,07 $\pm$ 1,18 <sup>A</sup>	7,04 $\pm$ 1,15 <sup>A</sup>
Aeróbios Totais	8,16 $\pm$ 0,51 <sup>B</sup>	8,69 $\pm$ 0,91 <sup>A</sup>	8,80 $\pm$ 0,57 <sup>A</sup>
Aeróbios Facultativos	8,26 $\pm$ 0,28 <sup>B</sup>	7,92 $\pm$ 1,06 <sup>B</sup>	8,71 $\pm$ 0,41 <sup>B</sup>
<b>Período tratamento</b>			
<i>Lactobacillus spp.</i>	9,72 $\pm$ 1,30 <sup>A</sup>	9,70 $\pm$ 1,20 <sup>A</sup>	9,62 $\pm$ 1,56 <sup>A</sup>
<i>Enterococcus spp.</i>	8,75 $\pm$ 1,07 <sup>A</sup>	8,73 $\pm$ 1,19 <sup>A</sup>	8,73 $\pm$ 0,63 <sup>A</sup>
<i>Clostridium spp.</i>	9,93 $\pm$ 0,69 <sup>A</sup>	9,77 $\pm$ 0,59 <sup>A</sup>	9,83 $\pm$ 0,44 <sup>A</sup>
<i>Bifidobacterium spp.</i>	9,12 $\pm$ 0,90 <sup>A</sup>	9,15 $\pm$ 0,99 <sup>A</sup>	9,14 $\pm$ 0,73 <sup>A</sup>
Enterobactérias	8,11 $\pm$ 0,70 <sup>A</sup>	7,93 $\pm$ 0,66 <sup>A</sup>	8,03 $\pm$ 0,76 <sup>A</sup>
Aeróbios Totais	9,44 $\pm$ 0,32 <sup>A</sup>	9,41 $\pm$ 1,37 <sup>A</sup>	9,35 $\pm$ 1,04 <sup>A</sup>
Aeróbios Facultativos	9,94 $\pm$ 1,01 <sup>A</sup>	9,52 $\pm$ 0,91 <sup>A</sup>	9,84 $\pm$ 0,82 <sup>A</sup>
<b>Período pós-tratamento</b>			
<i>Lactobacillus spp.</i>	9,56 $\pm$ 0,64 <sup>A</sup>	9,74 $\pm$ 0,59 <sup>A</sup>	9,68 $\pm$ 0,67 <sup>A</sup>
<i>Enterococcus spp.</i>	5,50 $\pm$ 0,57 <sup>B</sup>	5,74 $\pm$ 0,47 <sup>B</sup>	5,44 $\pm$ 0,55 <sup>C</sup>

<i>Clostridium spp.</i>	9,78 ±0,06 <sup>B</sup>	9,81 ±0,13 <sup>A</sup>	9,80 ±0,16 <sup>A</sup>
<i>Bifidobacterium spp.</i>	8,52 ±0,27 <sup>A</sup>	8,45 ±0,26 <sup>A</sup>	8,49 ±0,74 <sup>A</sup>
Enterobactérias	6,48 ±0,41 <sup>B</sup>	6,67 ±0,47 <sup>B</sup>	6,59 ±0,13 <sup>B</sup>
Aeróbios Totais	9,59 ±0,23 <sup>A</sup>	9,55 ±0,09 <sup>A</sup>	9,57 ±0,11 <sup>A</sup>
Aeróbios Facultativos	9,31 ±0,22 <sup>A</sup>	9,40 ±0,13 <sup>A</sup>	9,37 ±0,06 <sup>B</sup>

\*Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre o mesmo grupo microbiano, nos períodos de pré-tratamento, tratamento e pós- tratamento.

Com relação à população de enterobactérias foi verificada uma mudança quantitativa durante o período de tratamento no reator que representa o cólon ascendente. Em um estudo realizado por Bedani et al., (2010) observou-se um aumento significativo desses micro-organismos nas fezes de ratos após consumirem, durante trinta dias, células puras de *E. faecium* CRL 183.

Em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa (SIVIERI et al., 2007) não observou nenhuma mudança quantitativa na flora de *Enterococcus* spp. nas fezes em ratos que consumiram durante 30 semanas, diariamente, *E. faecium* CRL 183. Porém, no reator SEMH, durante o período de tratamento, ocorreu um aumento estatisticamente significativo nos três reatores (aproximadamente três ciclos log.) na contagem de *Enterococcus* spp.

A concentração da população de *Lactobacillus* spp. aumentou significativamente em aproximadamente três ciclos logarítmicos nos três seguimentos do cólon durante a fase de tratamento. De acordo com Marteau (2010), o cólon é o sitio primário da colonização microbiana.

O pH no cólon ascendente encontra-se em torno de 5,6 a 5,9, o que favorece o crescimento de *Lactobacillus* spp. Segundo Coudeyras e Forestier (2010) a região ascendente e transversa do cólon tem uma flora semelhante ao do estômago, com dominância de aeróbios e anaeróbios facultativos. O gênero dominante desta região

é o *Streptococcus* spp., sendo que encontra-se também, *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp., os quais geralmente estão presentes no conteúdo do lúmen intestinal.

O tratamento estimulou o crescimento da população de bifidobactérias nas três regiões do cólon. Em estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa (SIVIERI et al., 2011) já havia sido relatado comportamento semelhante no crescimento desse gênero. Bedani et al., (2010) também observaram que os animais que receberam a suspensão do cultivo puro de *E. faecium* CRL 183 apresentaram aumento da população fecal de bifidobactérias nas fezes.

Com relação à população de *Clostridium* spp. houve um aumento significativo durante o período de tratamento nas três regiões avaliadas do cólon. Bactérias pertencentes a esse gênero podem ser prejudiciais devido a sua atividade metabólica e caráter patogênico de algumas espécies (MONTESI et al., 2005). As espécies do gênero *Clostridium* podem estar envolvidas em processos inflamatórios de doenças intestinais (GUARNER E MALAGELADA, 2003). Entretanto, Bedani et al., (2010) não observaram alteração na população fecal de *Clostridium* spp. em ratos que consumiram cultivo de *E. faecim* CRL 183.

Com relação à população de aeróbios totais também se observou aumento significativo destes micro-organismos durante o período de tratamento. Para os aeróbios facultativos houve um aumento significativo nas três regiões do cólon. Segundo Coudeyras e Forestier (2010) uma das principais diferenças entre a microbiota encontrada nas fezes e no cólon é em relação aos anaeróbios facultativos, os quais são abundantes no cólon e praticamente ausentes nas fezes.

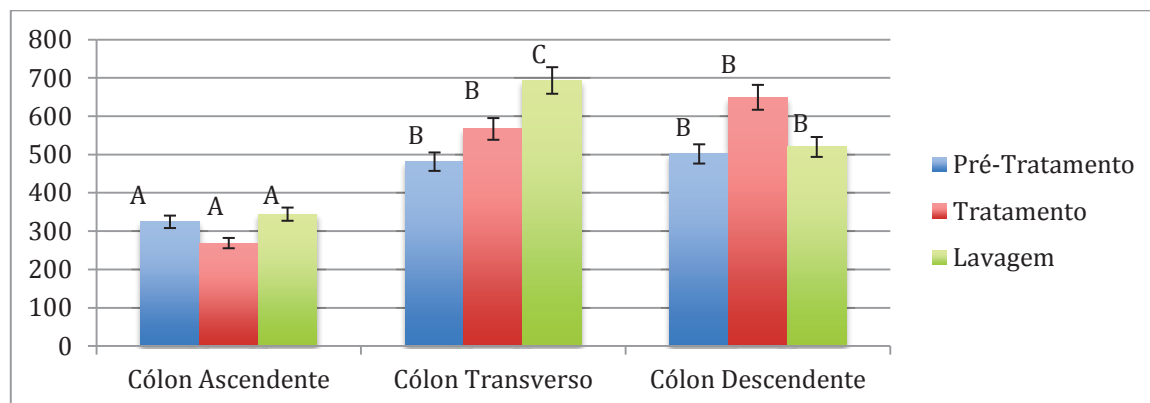
Ao se comparar os períodos de pré-tratamento, tratamento e pós- tratamento

pode-se afirmar que no período de pós-tratamento não há redução significativa na concentração da maioria dos grupos microbianos avaliados. Segundo Doré e Corthier (2010) a microbiota intestinal dominante é resistente a modificações. A administração de probióticos ou prebióticos pode alterar temporariamente a homeostase intestinal. Também, pode-se afirmar que o *E.faecium* CRL 183 e o *L. acidophilus* CRL 1014 estimularam o crescimento de alguns grupos microbianos, tais como; *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.

### **3.2.2. Análise de amônia**

Na Figura 2 observa-se os valores de amônia encontrados nas fases de pré-tratamento, tratamento e pós- tratamento.

Durante o período de tratamento foi observado um aumento significativo dos níveis de amônia, com uma posterior redução, no reator que simula o cólon descendente (Figura 2). Bedani et al (2010), também observaram um aumento significativo da concentração de amônia, em ratos que consumiram diariamente células de *E. faecium* CRL 183. Pomessier et al., (2004) encontraram resultados semelhantes em relação ao conteúdo de amônia em experimento utilizando um simulador dinâmico do ecossistema microbiano humano.

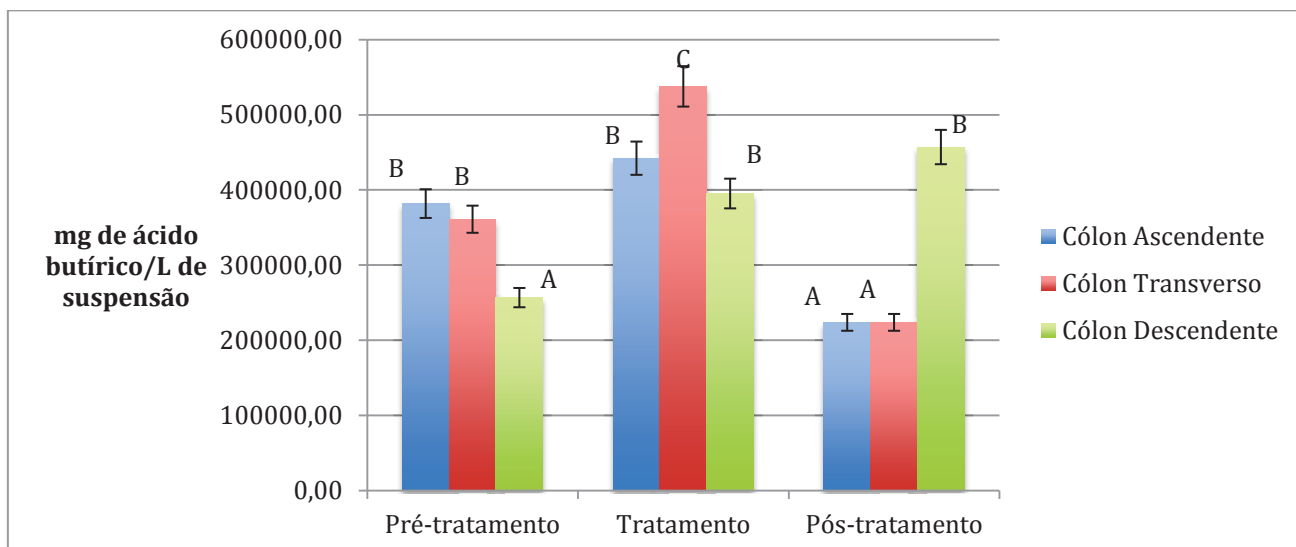


**Figura 2.** Conteúdo de amônia (ppm) nos frascos do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH), durante o período pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento.

\*Letras iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) nos períodos de pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento, referente a suspensão coletada nos reatores 1, 2 ou 3 (cólon ascendente, transversal ou descendente).

### 3.2.3. Análise de ácidos graxos

Um aumento significativo na concentração de ácido butírico foi observado nos reatores que simulam o cólon transversal e o descendente (Figura 3).



**Figura 3.** Produção de ácido butírico (mg/mL de suspensão) nos frascos do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH), durante o período pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento.

\*Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) nos períodos de pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento, referente as amostras coletadas nos reatores 1, 2 e 3 (cólón ascendente, transversal e descendente).

O aumento da concentração AGCC está associado à diminuição do pH das fezes, sendo que vários estudos mostram que as fezes com pH baixo estão associadas com a diminuição do câncer de cólon (CUMMINGS et al., 2001; WOLLOWSKI et al., 2001).

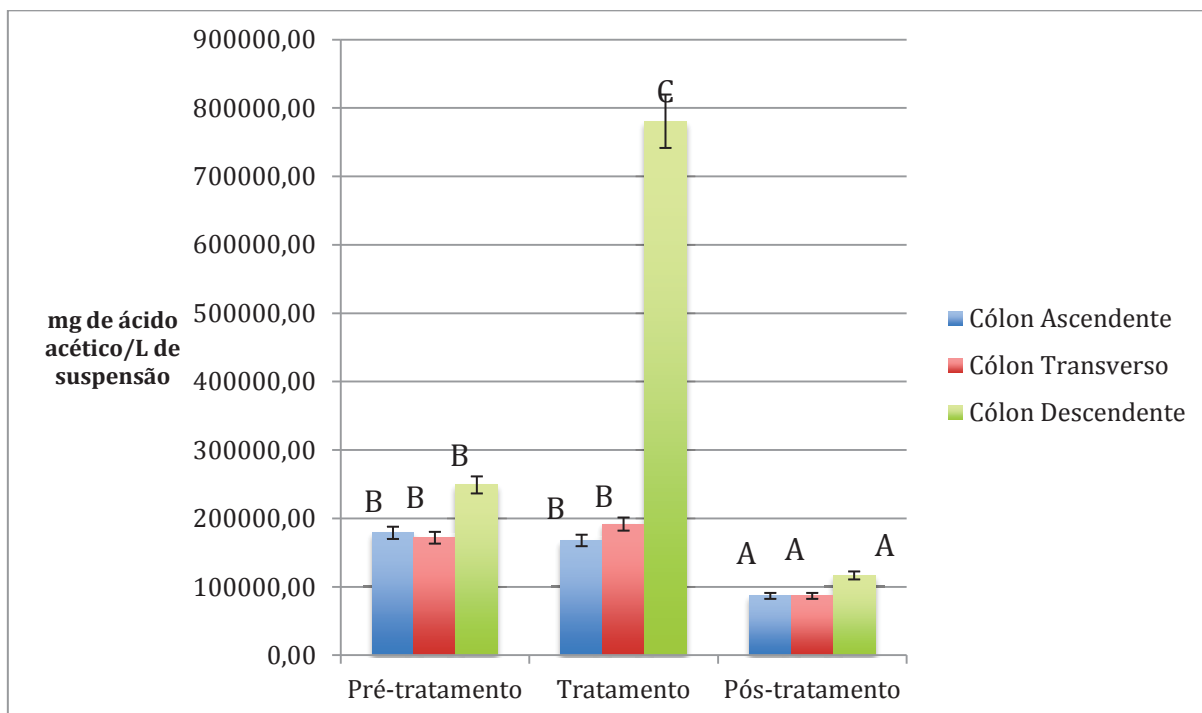
Foi observado em estudos prévios, utilizando modelo animal que o consumo de células puras de *E. faecium* CRL 183 inibiu o desenvolvimento do câncer de cólon (SIVIERI et al., 2008). Nesse sentido, pode-se supor que esta inibição poderia estar relacionada com a produção de ácido butírico observada *in vitro*.

O butirato está associado com muitas propriedades biológicas no cólon. Um dos primeiros efeitos observados do butirato está no grau de metilação do DNA, que provavelmente está associado com a modificação da expressão gênica. O butirato,

também pode melhorar a proliferação celular de células normais e a supressão da proliferação de células transformadas (WOLLOOWSKI et al., 2001) e induzir a expressão de glutathione-S-transferases (GST) e outros genes de resposta ao estresse (SCHARLAU et al., 2009). As GSTs catalisam reações entre compostos glutathione e lipofílico com centros eletrofílicos, que leva à desativação de compostos tóxicos, xenobióticos, e produtos do estresse oxidativo (ECONOMOPOULOS et al., 2010).

O acetato é um dos principais AGCC no cólon, é prontamente absorvido e transportado para o fígado e, portanto, é menos metabolizado no colón (COOK et al., 1998).

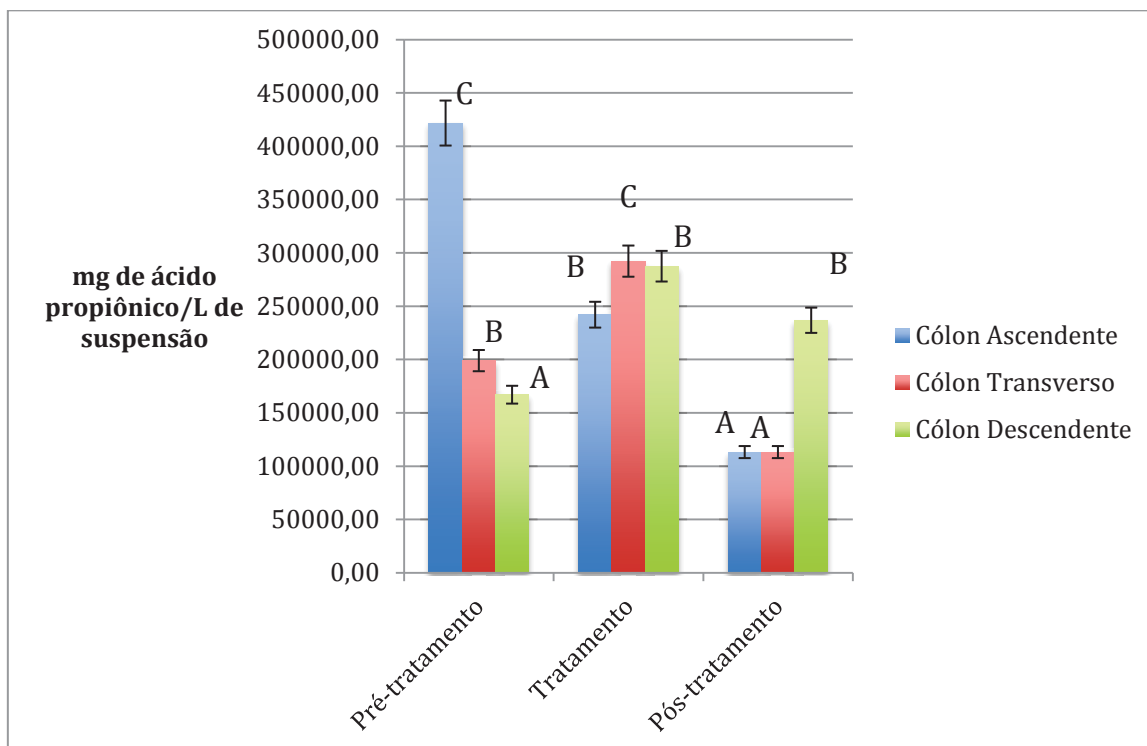
A Figura 4 representa a produção de ácido acético durante os períodos de pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento no SEMH. Durante o tratamento com *Lactobacillus acidophilus* CRL1014 e *Enterococcus faecium* CRL 183 ocorreu um aumento significativo de produção de ácido acético, apenas no frasco correspondente ao cólon descendente. No período de pós-tratamento os níveis deste ácido diminuíram, diferindo estatisticamente do período de pré-tratamento.



**Figura 4.** Produção de ácido acético (mg/mL de suspensão) nos frascos do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH), durante o período pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento.

\*Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) nos períodos de pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento, referente as amostras coletadas nos reatores 1, 2 e 3 (cólón ascendente, transversal e descendente).

Em relação ao ácido propiônico foi observado um aumento significativo da concentração nos reatores que simulam o cólon transversal e descendente, durante o período de tratamento com *Lactobacillus acidophilus* CRL1014 e *Enterococcus faecium* CRL 183. Já no reator que simula o cólon ascendente observa-se uma grande redução ao longo dos períodos. No período de pós-tratamento ocorreu uma diminuição da concentração deste ácido, entretanto somente no cólon descendente esta variação foi estatisticamente significativa (Figura 5).



**Figura 5.** Produção de ácido propiônico (mg/mL de suspensão) nos frascos do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH), durante o período pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento.

\*Letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) nos períodos de pré-tratamento, tratamento e pós- tratamento, referente as amostras coletadas nos reatores 1, 2 e 3 (cólon ascendente, transverso e descendente).

Observações em animais sugerem que o propionato inibe a síntese de colesterol, inibindo tanto a sintase 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA quanto a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (BUSH et al., 1971; RODWELL et al., 1976). O aumento da produção de propionato, por meio de fermentação, pode inibir a síntese de colesterol hepático (CHEN et al., 1984).

#### 4. CONCLUSÃO

A partir deste estudo é possível concluir que no modelo *in vitro* a inoculação

de micro-organismos probióticos influenciou modificando a microbiota intestinal nativa através do aumento na concentração de UFC/mL e conseqüentemente nas concentrações dos metabólitos, como a amônia e os ácidos graxos de cadeia curta. Estes resultados futuramente podem ser utilizados para o desenvolvimentos de metodologias de estudo *in vivo* contribuindo para a elucidação dos fatores que acarretam no desenvolvimentos de tumores intestinais e da influência do consumo de alimentos probióticos no surgimento desta patologia.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azcárate-Peril M.A., Sikes M., Bruno-Bárcena J.M. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301: G401–G424, 2011.
2. Barrangou, R., Altermann, E., Hutkins, R., Cano, R. & Klaenhammer, T. R. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8957–8962.
3. Bedani, R. Influência do consumo de “iogurte” de soja fermentado com *enterococcus faecium* crl 183 na microbiota intestinal de animais e humanos. 2008. 122f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição- Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
4. Bedani, R., Pauly-Silveira, N.D., Roselino, M.N., Valdez, G.F., Rossi, E.A. Effect of fermented soy product on the fecal microbiota of rats fed on a beef-based animal diet. *J Sci Food Agric*, v. 90, p. 233–238, 2010.
5. Bielecka, M., Biedrzycka, E., Majkowska, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. *Food Res. Int.*, v.35,

- n.2/3, p.125-131, 2002.
6. Brady, L.J., Daniel, D.G., Busta, F. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *J.Nutri.*, V.130, p.410-414, 2000.
  7. Brigidi, P.; Vitali, B; Swennen, E; Bazzocchi, G; Matteuzzi, D. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Res. Microbiol.* v. 152, n.8, p. 735-74, 2001.
  8. Bush RS, Milligan LP. Study of the mechanism of inhibition of ketogenesis by propionate in bovine liver. *Can J Anim Sci.* 1971;51: 121–127.
  9. Carlos IZ, Paiva AMR, Vendramini RC, Rossi EA, Damaso AR, Maia DCG, Kinouchi FL: Effects of soy-derivatives ingestion in experimental breast cancer. *ARBS* 2005, 7:1-2.
  10. Charteries, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *Int. J. Dairy Technol.*, v.51, n.4, p.123-136, 1998.
  11. Chen WJ, Anderson JW, Jennings D. Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1984;175:215–218.
  12. Cook SI, Sellin JH. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1998;12:499–507.
  13. Coudeyras, S., Forestier, C. Microbiote et probiotiques: impact en santé humaine. *Canadian Journal of Microbiology*, v.56, p.611-650, 2010.

14. Coura, R.S., Ashton-Prolla, P., Prolla, J.C. Hereditary non-polipomatous colorectal cancer. *Arq. Gastroenterol.*, v. 42, n.2, p.99-106.
15. Cummings, J.H., Macfarlane, G.T., Englyst, H.N. Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr.*, v.73, p. 415S–20S, 2001.
16. Danese S. Inflammatory bowel disease and inflammation-associated colon cancer: partners in crime (Abstract). *Curr Drug Targets* 9: 360, 2008.
17. Doré, J., Corthier, G. The human intestinal microbiota Le microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, v.34, Suppl. 1, S7-S15, 2010.
18. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A.. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308:1635-1638.
19. Eckburg, P.B. et al. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638
20. Economopoulos KP, Sergentanis TN. GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: A comprehensive meta-analysis. *Eur J Cancer* 46: 1617–1631, 2010.
21. Edlund, C.; Beyer, G.; Hiemer-Bau, M.; Ziege, S.; Lode, H.; Nord, C.E. Comparative effects of mixifloxacin and clithromycin on normal intestinal microflora. *Scand. J. Infect. Dis.*, v. 32, p. 81-85, 2000
22. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba,

2001. 34p. Disponível em: <[ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport\\_ en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf)>. Acesso em: 05 jun. 2007. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].
23. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 13780 –13785, 2007.
24. Gibson, G.R., Fuller, R. Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J. Nutr*, v.130, p. S391-S395, 2000.
25. Gill HS, Guarner F. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J* 80: 516 –526, 2004.
26. Goldin, B.R., Gorbach, S.L. The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.39, p.756-761, 1984.
27. Guarner, F., Malagelada, J.R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, v.361, p.512-519, 2003.
28. Guarner, F.. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutr. Hosp.* 2007, vol.22, pp. 14-19 . ISSN 0212-1611.
29. Jones B.V., Begley M, Hill C, Gahan CG, Marchesi JR. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 13580–13585, 2008.
30. Korakli, M. Hinrichs, C. Ehrmann, M. A. Vogel, R. F. Enzymatic determination

- of inulin and fructooligosaccharides in food. *European Food Research and Technology*, v.217, p.530-534, 2003.
31. Ley R.E. , Peterson D.A. , Gordon J.I. . Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124:837-848.
32. Liong MT. Probiotics: a critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesterolemic, and perimenopausal treatments. *Nutr Rev* 65: 316–328, 2007.
33. Macdonald T.T., Monteleone G. (2005) Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307:1920–1925.
34. Macfarlane, G.T.; Macfarlane, S. Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Current Opinion in Biotechnology*, v.18, p.156-162, 2007.
35. Marteau, P. L'importance clinique du microbiote intestinalThe clinical importance of intestinal microbiota. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. v.34,p. 99-103, 2010.
36. Marzotto, M.; Maffei, C.; Paternoster, T.; Ferrario, R; Rizzotti, L.; Pellegrino, M.; Dellaglio, F.; Torriani, S. *Lactobacillus paracasei* A survives gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of healthy infants. *Res. Microbiol.* v. 157, p. 857-866, 2006.
37. Mason KL, Huffnagle GB, Noverr MC, Kao JY. Overview of gut immunology. In: *GI Microbiota and Regulation of the Immune System*, edited by GB Huffnagle and MC Noverr. Austin, TX: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media,

2008, p. 1–14.

38. MCFarlane, G.T., MCFarlane, S. Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand. J. Gastroenterol* , v.222 , S3-S9, 1997.
39. MCFarlane, G.T., MCFarlane, S. Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Current Opinion in Biotechnology*, v.18, p.156-162, 2007.
40. MCFarlane, S., Furrrie, E., Cummings, J.H., MCFarlane, G.T. Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis. *Clin Infect Dis.*, v. 38, p.1690-1699, 2004.
41. Mercenier, A., Pavan, S., Pot, B. Probiotics as biotherapeutic agents: Present Knowledge and future prospects. *Current Pharmaceutical Design*, v.8, p.99-110, 2003.
42. Metges CC (2000) Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *J Nutr* 130:1857S–1864S
43. Molly, K.; Woestyne, M.V.; Verstraete, W. Development of a 5-step multichamber reactor as a Simulation of the Human Intestinal Microbial Ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v. 39, p. 254–258,1993.
44. Molly, K.;Vandewoestyne,M.; Desmet, I.; Verstraete,W. Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganism associated activities. *Microbial Ecology in Health and Disease*, v.7, n. 4, p. 191–200, 1994.

45. Montalto, M., D'Onofrio, F., Gallo, A., Cazzato, A., Gasbarrini, G. Intestinal microbiota and its functions. *Digestive and Liver Disease Supplements*, v. 3, p.30–34, 2009.
46. Montesi, A., Garcia-Albiach, R., Pozuelo, M.J., Pintado, C., Goni, I., Rotger, R. Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, v.98, p.281-289, 2005.
47. Munoa, F.J.; Pares, R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 54, 1988.
48. 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. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, v.4, p.1-8, 2003.
49. Pereira, D.I.A., McCartney, A.L., Gibson, G. An in vitro study of the probiotic potential of a bile salt hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, n.8, p.4743-4752, 2003.
50. Possemiers, S.; Verthé, K.; Uyttendaele, 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*, n. 49, p. 495–507, 2004.
51. Rehman et al.: Effects of probiotics and antibiotics on the intestinal homeostasis in a computer controlled model of the large intestine. *BMC Microbiology* 2012

12:47.

52. Reid G, Sanders ME, Gaskins HR, Gibson GR, Mercenier A, Rastall R, Roberfroid M, Rowland I, Cherbut C, Klaenhammer TR. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 37: 105–118, 2003.
53. Rodwell VW, Nordstrom JL, Mitschelen JJ. Regulation of HMG CoA reductase. *Adv Lipid Res.* 1976;14:1–74.
54. Rossi EA, Vendramini RC, Carlos IZ, Veiji IS, Squinzari MM, Silva SI, Valdez GF: Effects of a novel fermented soy product on the serum lipids of hypercholesterolemic rabbits. *Arq Bras Cardiol* 2000, 7:213-16.
55. Rossi EA: Alimentos funcionais Edited by: Damaso A. Nutrição e exercícios na prevenção de doenças: Medsi; 2001.
56. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 313–323, 2009.
57. Rowland, I., Runney, C.J., Coutts, J.T., Lievens, L.C. Effect of bifidobacterium longum and inulin on gut metabolism and carcinogen- induced aberrant foci crypt in rats. *Carcinogenesis*, v.19, p.281-285, 1998.
58. Royall D, Wolever TM, Jeejeebhoy KN. Clinical significance of colonic fermentation. *Am J Gastroenterol.* 1990;85:1307–1312.
59. Rumney, C.J., Rowland, I.R. *In vivo* and *in vitro* models of the human colonic flora. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, v. 31, p. 299-331, 1992.
60. Rycroft, C.E., Jones, M.R., Gibson, G.R., Rastall, R.A. A comparative “in vitro” evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J. Applied*

- Microbial., v. 91, p. 878-887, 2001.
61. Salminen, S., Bouley, M. C., Boutron-Ruault, M. C., Cumming, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Maoreau, M. C., Roberfroid, M., Rowland, I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, v. 80, suppl. 1, p. S147- S171, 1998.
62. Sanders, M. E. & Klaenhammer, T. R. (2001) *J. Dairy Sci.* 84, 319–331.
63. Sanders, M.E.; Klaenhammer, T.R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.84, p.319-331, 2001.
64. Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Miene C, Munjal U, Stein K, Gleis M. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat Res* 682: 39–53, 2009.
65. Shiguemoto GE, Rossi EA, Baldissera C, Gouveia CH, Valdez GMF, Perez SEA: Isoflavone-supplemented soy product associated with resistive physical exercise increase mineral density of ovariectomized rats. *Maturitas* 2007, 57:261-70.
66. Sivieri, K., Cano, V.S., Valentini, S.R., Rossi, E.A. Demonstration of the cellular viability and safety of *Enterococcus faecium* CRL 183 in long-term experiments. *Le Lait*, v.87, p.59-69, 2007.
67. Sivieri, K.; Spinardi-Barbisan, A.L.T.; Barbisan, L.F.; Bedani, R.; Pauly, N.D.; Carlos, I.Z.; Benzatti, R.C.; Vendramini, R.C.; Rossi, E.A. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. *Eur.*

- Food Res. Technol., v.228, p.331-337, 2008.
68. Sui, J., Leighton, S., Busta, F. & Brady, L. (2002) *J. Appl. Microbiol.* 92, 907-912.
69. Tannock G.W., What immunologists should know about bacterial communities of the human bowel. *Semin Immunol* 2006; doi:10.1016/j.smim.2006.09.001
70. Thacker PA, Salamons MO, Aherne FX, et al. Influence of propionic acid on the cholesterol metabolism of pigs fed hypercholesterolemic diets. *Can J Anim Sci.* 1981;61:969–975.
71. Tsai F., Coyle W.J. (2009) The microbiome and obesity: is obesity linked to our gut flora? *Curr Gastroenterol Rep* 11:307–313
72. Tzortzis, G., Goulas, A.K., Gee, G.M., Gibson, G.R. A Novel Galactooligosaccharide Mixture Increases the Bifidobacterial Population Numbers in a Continuous In Vitro Fermentation System and in the Proximal Colonic Contents of Pigs In Vivo. *J. Nutr.*, v.135, p.1726-1731, 2005.
73. Underwood MA, et al: A randomized placebo-controlled comparison of 2 prebiotic/probiotic combinations in preterm infants: impact on weight gain, intestinal microbiota, and fecal short-chain fatty acids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009, 48(2):216-225.
74. Van De Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, Verstraete W. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *J Appl Microbiol*; v.102, p.452–460, 2007.
75. Varcoe, J. J., Krejcarek, G., Busta, F. & Brady, L. (2003) *J. Food Pro.* 66, 457-456.

76. Vendramini AP, Melo RF, Marcantonio RAC, Carlos IZ: Biocompatibility of acellular dermal matrix graft evaluated in culture of murine macrophages. *Journal of oral science* 2006, 14:67-70.
77. Vinolo M, et al: Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. *Nutrients* 2011, 3(10):858-876.
78. Vitali B, et al: Impact of a synbiotic food on the gut microbial ecology and metabolic profiles. *BMC Microbiol* 2010, 10:4.
79. Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6578–6583
80. Wolever TM, Brighenti F, Royall D, et al. Effect of rectal infusion of short chain fatty acids in human subjects. *Am J Gastroenterol.* 1989;84:1027–1033.
81. Wollowski I., Rechkemmer, G., Pool-Zobel, B.L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *J. Nut.*, Vol. 73, No. 2, 451S-455s, 2001.
82. 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.