

**Efeito de bebidas enriquecidas com frutooligossacarídeos (FOS),
produzidos pela linhagem *Aspergillus japonicus*-119, no trato intestinal de
ratos Wistar.**

VINICIUS D'ARCADIA CRUZ

Orientador: Prof. Dr. HÉRCULES MENEZES

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de
Rio Claro, para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas (Área de
Concentração: Microbiologia Aplicada)

RIO CLARO

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro de 2011

612.3 Cruz, Vinicius D'Arcadia
C957e Efeito de bebidas enriquecidas com frutooligosacarídeos (FOS), produzidos pela linhagem *Aspergillus japonicus*-119, no trato intestinal de ratos Wistar / Vinicius D'Arcadia Cruz. - Rio Claro : [s.n.], 2010
82 f. : il., figs., forms., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Hércules Menezes

1. Nutrição. 2. Alimentos funcionais. 3. Transfrutossilagem. 4. Prebióticos. 5. Probióticos. 6. Efeito bifido. 1. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Efeito de bebidas enriquecidas com frutooligossacarídeos (FOS), produzidos pela linhagem *Aspergillus japonicus*-119, no trato intestinal de ratos Wistar.

AUTOR: VINICIUS D'ARCADIA CRUZ

ORIENTADOR: Prof. Dr. HÉRCULES MENEZES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. HÉRCULES MENEZES

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Campus de Rio Claro - Ib / Instituto de Biociências de Rio Claro

Profa. Dra. WILMA APARECIDA SPINOSA

Faculdades Adamantinaenses Integradas / Curso de Engenharia de Alimentos

Profa. Dra. DERLENE UTTILI DE ANGELIS

Centro de Estudos de Insetos Sociais - Cels / Unesp - Rio Claro

Profa. Dra. PATRICIA DE MIRANDA BRUSANTIN

Universidade de Marília / Faculdade de Engenharia Arquitetura e Tecnologia

Data da realização: 26 de agosto de 2010.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por tudo que me proporcionou.

À Léa, Diana, Fadi, Junior, Aline, Cassandra, Luís Aurélio, Alemão e toda turma do Laboratório de Microbiologia pelo carinho e amizade.

À Dani, Monise, Rafaela e Renata pela preciosa ajuda e amizade.

Aos companheiros de estrada: Henrique, Martins e Cíntia pela amizade (Rio Claro ida e volta).

Aos companheiros de estrada: Vitório, Estevão e Paulo pela amizade (Adamantina ida e volta).

Às coordenadoras: Mara, Silvania, Cassia, Renata, Wilma e Rita pela confiança, compreensão e amizade.

A todos os colegas de trabalho da UNIP. Em especial à Karin, André, Juliana, Carmen, Gi, Leonardo, Emílson, Gláucia e Samir pela amizade.

A todos os colegas de trabalho da FAI. Em especial ao Luís, Giroto, Maria Tereza, Zuleice e Mariana pela amizade

A toda minha família por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Pedro Oliva pelas orientações iniciais e amizade.

Ao Prof. Hércules Menezes pela orientação e amizade. Professor, tenha certeza que me inspirou para toda a vida!

À Prof. Derlene, Prof. Jonas, Profa. Patrícia e Profa. Wilma, membros da banca, meu muito obrigado pelos valorosos ensinamentos!

Aos meu pais

Obrigado por tudo que me proporcionaram!

Esta vitória também é de vocês!

Ao meu filho Pedro e minha esposa Juliana
pelo amor e dedicação incondicional!

A vocês dedico este trabalho.

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Estrutura química dos frutooligossacarídeos, de acordo com Passos & Park (2003).	5
Fluxograma 1: Modelos experimentais - Análises sensoriais de iogurte.....	23
Fluxograma 2: Modelos experimentais - Análises sensoriais de soja	25
Fluxograma 3: Divisão dos grupos de animais quanto às dietas.	27
Figura 2: Cromatograma referente ao FOS II, produzido com quantidade micélio imobilizado (50%) menor que a preconizada na literatura. (Cruz et al., 1998).....	31
Figura 3: Cromatograma referente ao FOS I, produzido com a quantidade de micélio imobilizado preconizada na literatura (Cruz et al., 1998).....	31
Figura 4: Curva de crescimento de <i>Lactobacillus</i> sp. em caldo MRS modificado.....	33
Figura 5: Curva de crescimento de <i>Escherichia coli</i> em caldo EC modificado.....	35
Figura 6: Porcentagem de provadores em relação as diferentes notas da escala hedônica.....	37
Figura 8: Porcentagem de provadores em relação às diferentes amostras de bebidas de soja avaliadas através de escala hedônica.	40
Figura 9: Porcentagem de provadores em relação às amostras S1 e S2 avaliadas através de escala hedônica.	42
Figura 10: Porcentagem de provadores em relação às bebidas de sojas com sacarose e FOS I avaliadas através de escala hedônica.	43
Figura 11: Porcentagem de provadores em relação às amostras sacarose e Ades avaliadas através de escala hedônica.	44
Figura 12: Grupo Controle (GC) - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.....	47
Figura 13: Subgrupo Ga1 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.....	48
Figura 14: Subgrupo Ga2 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.....	49
Figura 15: Subgrupo Ga3 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.....	50
Figura 16: Subgrupo Ga4 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.....	51
Figura 17: Subgrupo Gi1 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.	52

Figura 18: Subgrupo Gi2 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.	54
Figura 19: Subgrupo Gi3 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.	55
Figura 20: Comparação grupo Gi2 x Gi3 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.	56
Figura 21: Subgrupo Gi4 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.	57
Figura 22: Subgrupo Gs1 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.	58
Figura 23: Subgrupo Gs2 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.	59
Figura 24: Subgrupo Gs3 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.	60
Figura 25: Subgrupo Gs4 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.	61
Figura 26: Gráfico comparativo entre os grupos Ga4, Gi4 e Gs4 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.	62
Figura 27: Gráfico comparativo entre os grupos Ga4, Gi4 e Gs4 - UFC/g de fezes nos meios MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.	62
Figura 28: Diferenças das médias de UFC/g de fezes dos animais dos subgrupos água, iogurte e soja entre T0 e TF.	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais	26
Tabela 2: Análise de variância ANOVA para medidas repetidas.....	33
Tabela 3: Teste comparativo de Tukey-Kramer	34
Tabela 4: Análise de variância ANOVA para medidas repetidas.....	35
Tabela 5: Teste comparativo de Tukey-Kramer	36
Tabela 6: Teste de ANOVA (5%) para os diferentes sabores.	37
Tabela 7: Teste de Tukey-Kramer (5%) para as diferentes amostras	38
Tabela 8- Teste T para amostras dependentes. Comparação entre degustação de iogurte convencional e iogurte com FOS. $p < 0.05$	39
Tabela 9: Teste de ANOVA (5%) para os diferentes sabores.	41
Tabela 10: Teste de Tukey-Kramer (5%) para as diferentes amostras	41
Tabela 11: Comparação das amostras S1 e S2	42
Tabela 12: Média da análise sensorial com os diferentes adoçantes	43
Tabela 13: Comparação entre marca comercial Ades e Sacarose.....	44
Tabela 14: UFC/g de fezes dos dois meios testados.....	45

LISTA DE SIGLAS

A1.....Iogurte com 50 mL de FOS I - 80° BRIX.

A2..... Iogurte com 110 mL de FOS I - 80° BRIX.

A3..... Iogurte com 170 mL de FOS I - 80° BRIX.

FOS..... Fructooligossacarídeos.

FOS I..... Mistura de açúcares obtida no presente trabalho contendo 49,7% de fructooligossacarídeos.

FOS II..... Mistura de açúcares obtida no presente trabalho contendo 31,3% de fructooligossacarídeos.

GA..... Grupo experimental com ratos que receberam alimentação convencional e diferentes misturas de açúcares diluídos em água, através de subgrupos experimentais (Ga1, Ga2, Ga3, Ga4).

Ga1..... Subgrupo experimental do grupo Ga, onde os ratos foram suplementados com sacarose diluída em água, além de alimentação convencional.

Ga2..... Subgrupo experimental do grupo Ga, onde os ratos foram suplementados com FOS I diluído em água, além de alimentação convencional.

Ga3..... Subgrupo experimental do grupo Ga, onde os ratos foram suplementados com FOS II diluído em água, além de alimentação convencional.

Ga4..... Subgrupo experimental do grupo Ga, onde os ratos foram suplementados com ORAFI diluído em água, além de alimentação convencional.

GC..... Grupo experimental controle, onde ratos receberam apenas alimentação convencional.

GI..... Grupo experimental com ratos que receberam alimentação convencional e diferentes misturas de açúcares diluídas em iogurte, através de subgrupos experimentais (Gi1, Gi2, Gi3, Gi4).

Gi1..... Subgrupo experimental do grupo GI, onde os ratos foram suplementados com sacarose diluída em iogurte, além de alimentação convencional.

Gi2..... Subgrupo experimental do grupo GI, onde os ratos foram suplementados com FOS I diluído em iogurte, além de alimentação convencional.

Gi3..... Subgrupo experimental do grupo GI, onde os ratos foram suplementados com FOS II diluído em iogurte, além de alimentação convencional.

Gi4..... Subgrupo experimental do grupo GI, onde os ratos foram suplementados com ORAFI diluído em iogurte, além de alimentação convencional.

GOS.....Galactooligossacarídeos.

GS..... Grupo experimental com ratos que receberam alimentação convencional e diferentes misturas de açúcares diluídas em extrato de soja, através de subgrupos experimentais (Gs1, Gs2, Gs3, Gs4).

Gs1..... Subgrupo experimental do grupo GS, onde os ratos foram suplementados com sacarose diluída em extrato de soja, além de alimentação convencional.

Gs2..... Subgrupo experimental do grupo GS, onde os ratos foram suplementados com FOS I diluído em extrato de soja, além de alimentação convencional.

Gs3..... Subgrupo experimental do grupo GS, onde os ratos foram suplementados com FOS II diluído em extrato de soja, além de alimentação convencional.

Gs4..... Subgrupo experimental do grupo GS, onde os ratos foram suplementados com ORAFI diluído em extrato de soja, além de alimentação convencional.

NDOS.....Oligossacarídeos não digeríveis.

S1..... Bebida de soja produzida com 2,5% de extrato de soja com 110 mL de FOS I - 80° BRIX.

S2..... Bebida de soja produzida com 5,0% de extrato de soja com 110 mL de FOS I - 80° BRIX.

S3..... Bebida de soja produzida com 7,5% de extrato de soja com 110 mL de FOS I - 80° BRIX.

S4..... Bebida de soja produzida com 10,0 % de extrato de soja com 110 mL de FOS I - 80° BRIX.

TOS..... Transgalactooligossacarídeos.

UFC..... Unidades Formadoras de Colônias.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3 - OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos	17
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1- Materiais.....	18
4.1.1- Sujeitos experimentais.....	18
4.1.2- Micro-organismos.....	18
4.1.3- Reagentes.....	18
4.1.3.1- Meios de cultura	18
4.1.3.2- Análises	19
4.2- Métodos	19
4.2.1- Imobilização do micélio e produção dos frutooligossacarídeos (FOS) pelo sistema de bateladas.....	19
4.2.2- Caracterização do FOS obtido.....	20
4.2.3 – Determinação do crescimento celular de <i>Lactobacillus</i> sp. e <i>Escherichia coli</i> em diferentes fontes de carbono.	20
4.2.4-Produção de iogurte.....	21
4.2.5- Obtenção do extrato e confecção de bebida à base de soja	21
4.2.6 - Análise sensorial das bebidas produzidas.....	22
4.2.6.1 – Análise sensorial de iogurte.....	22
4.2.6.2 – Análise sensorial de bebida de soja	23
4.2.7- Ratos e dietas.....	25
4.2.8 – Verificação dos efeitos das diferentes suplementações através da contagem de coliformes totais e bactérias lácticas pelo método de plaqueamento <i>pour plate</i> em ÁGAR VRB e ÁGAR MRS.....	28
4.2.9 – Análise estatística	28
5-RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1- Caracterização do FOS Produzido	30
5.2 – Determinação do crescimento celular de <i>Lactobacillus</i> sp. e <i>Escherichia coli</i> em diferentes fontes de carbono.	32
5.3- Análise sensorial	36
5.3.1 – Análise sensorial de iogurte.....	36
5.3.2 – Análise sensorial de bebida de soja	40

5.4 - Contagens de Coliformes totais e Bactérias Lácticas pelo método de plaqueamento pour plate em ÁGAR VRB e ÁGAR MRS, respectivamente.	45
5.4.1 Grupo Controle	46
5.4.2 - Grupo Água	47
5.4.2.1 - Subgrupo Ga1	47
5.4.2.2 - Subgrupo Ga2	48
5.4.2.3 - Subgrupo Ga3	49
5.4.2.4 - Subgrupo Ga4	50
5.4.3 - Grupo Iogurte	51
5.4.3.1 - Subgrupo Gi1	51
5.4.3.2 - Subgrupo Gi2	52
5.4.3.3 - Subgrupo Gi3	54
5.4.3.4 - Subgrupo Gi4	56
5.4.4 - Grupo Soja	57
5.4.4.1 - Subgrupo Gs1	57
5.4.4.2 - Subgrupo Gs2	58
5.4.4.3 - Subgrupo Gs3	59
5.4.4.4 - Subgrupo Gs4	60
6 - CONCLUSÕES.....	65
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8 - ANEXOS	78
ANEXO I	78
ANEXO 2	87

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi o de avaliar uma mistura de frutooligossacarídeos (FOS), sacarose residual, glicose e frutose, produzida por *Aspergillus japonicus* – 119, quanto à capacidade de produzir alterações nas populações de bactérias lácticas e coliformes nos intestinos de ratos machos Wistar. Foram constituídos 13 grupos de animais, sendo um controle e 12 experimentais, cada grupo contendo 7 animais. Durante 3 meses os animais dos grupos experimentais foram suplementados com 350 mL diários de FOS I (49,7% de FOS) ou FOS II (34,3% de FOS), utilizando como excipiente de diluição: água, iogurte convencional e um extrato de soja (2,5% p:v). Estes constituíram os seguintes grupos: Ga; Gi e Gs. As bebidas formuladas com iogurte e extrato de soja foram submetidas a análises sensoriais para verificação de aceitabilidade, visando seu emprego em humanos, no futuro. Para efeito de comparação foram constituídos também 3 grupos de animais que receberam um FOS comercial purificado (ORAFTI) dissolvido nos mesmos excipientes. As médias de UFCs/g de fezes foram submetidas à análise de variância pelos testes de Wilcoxon e/ou Mann-Whitney. Em todos os subgrupos constituídos o FOS I foi mais eficiente que o FOS II para a desejável alteração da microbiota intestinal: aumento das bactérias lácticas e diminuição dos coliformes. Os resultados apontam para a seguinte ordem de eficiência para a diminuição de coliformes: ORAFTI+Iogurte > FOS I+Iogurte > ORAFT+soja = ORAFTI+Água. Para o crescimento de bactérias lácticas, a mistura de FOS I mostrou-se mais eficiente que o ORAFTI em todos os excipientes utilizados. Os resultados sugerem a possibilidade do emprego comercial da FOS I de *Aspergillus japonicus* – 119, independentemente de sua purificação.

Palavras-chave: Frutooligossacarídeos. *Aspergillus japonicus*. Transfrutossilacção. Iogurte. Bebida de soja.

ABSTRACT

The main objective of this work was to evaluate a mixture of fructooligosaccharide (FOS), residual sucrose, glucose and fructose, from *Aspergillus japonicus* - 119, considering their ability to produce changes in populations of lactic acid bacteria and coliform bacteria in the intestines of male Wistar rats. The animals (91 at all) were divided in 13 groups with 7 rat in each group: one control group and 12 experimental groups. During three months the animals of experimental groups were daily supplemented with 350 mL of FOS I (49.7% FOS) or FOS II (31.3% FOS), using as a vehicle for dilution water, conventional yogurt and soybean extract (2.5% w: v). These were designed as Ga, Gi and Gs groups. The drinks made with yogurt and soy extract were subjected to sensory analysis for verification of acceptability, aiming at their employment in humans beings. For comparison were also formed three subgroups of animals that received a purified commercial FOS (Orafti) dissolved in the same dilution vehicle. The averages of CFU/g of feces were submitted to variance analysis by Wilcoxon's test and/or Mann-Whitney test. In all constituted subgroups, the FOS I was more efficient than the FOS II for desirable change in intestinal microbiologic populations: increase of lactic acid bacteria and coliforms decreased. Overall, the results indicate the following order of efficiency for coliforms decreasing: ORAFTI+Yogurt > FOS I+Yogurt > ORAFTI+soybean extract = ORAFTI+Água. For the increasing of lactic bacteria population the mixture of FOS I in all dissolution vehicle showed more efficient then ORAFTI I. The results suggest the possibility of commercial using of FOS I from *Aspergillus japonicus* - 119, even without purification.

Key-words: Fructooligosaccharides. *Aspergillus japonicus*. Transfructosylation. Yogurt. Soy beverage

1- INTRODUÇÃO

Frutooligossacarídeos, mistura de questose (GF2), nistose (GF3) e frutossil-nistose (GF4) ou **FOS**, galactooligossacárides transgalactosilados (**TOS**), não são metabolizados no intestino delgado (*Non digestible oligosaccharides* - **NDOs**) de mamíferos e aves em geral. Passam para o intestino grosso, promovem o crescimento de uma flora constituída, principalmente, por bactérias dos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e alguns *Streptococcus* as quais, por competição, inibem o crescimento de bactérias putrefativas como os *Clostridium* e de outras nocivas ao homem como *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Campilobacter*, etc. Estas propriedades vêm sendo denominadas "efeito prebiótico" dos **NDOs**.

A absorção de FOS também atua estimulando o sistema imunológico através da redução da invasão do tecido extra-intestinal, ainda que indireta, por bactérias patogênicas e suas respectivas endotoxinas, que atravessam a barreira mucosa intestinal através do fenômeno denominado translocação bacteriana, fator este causador de infecções em nódulos linfáticos mesentéricos, fígado, baço, cavidade peritoneal, sangue e circulação linfática.

As características fisiológicas dos **NDOs** permitem que os mesmos sejam amplamente utilizados em formulações infantis como iogurtes e nutrientes enterais que favoreçam o restabelecimento da flora intestinal. Da mesma forma são facilmente utilizados em massas, pães e geleias em virtude de sua elevada estabilidade térmica.

Convencionou-se chamar de probióticos alimentos que já contêm as bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, e *Bifidobacterium*, para desenvolver aqueles importantes papéis na saúde humana. Tipicamente, os probióticos são consumidos em alimentos processados tais como, soro de leite fermentado e iogurte. Diversas linhagens de bactérias intestinais encontradas nestes alimentos, especificamente *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, e *L. thermophilus*, se multiplicam e prosperam no trato digestivo humano alimentando-se, sobretudo de carboidratos e proteínas lá existentes. Os probióticos também produzem muitas vitaminas, contribuindo para uma vida saudável. Pesquisas recentes indicam que o consumo regular de prebióticos e probióticos é a melhor maneira de manter a flora intestinal saudável, uma vez que os lactobacilos não sobrevivem por muito tempo, necessitando serem repostos com frequência.

A utilização de oligossacarídeos não metabolizáveis na dieta de mamíferos e aves vem sendo apontada como importante fator modificador da flora intestinal, aumentando a concentração de bifidobactérias, bactérias probióticas e outras bactérias lácticas. Isto em

detrimento do crescimento de bactérias putrefativas, algumas nocivas aos animais.

Nos últimos tempos bactérias probióticas vêm sendo associadas a produtos com propriedades prebióticas, produzindo alimentos denominados simbióticos. Estes facilitam a colonização dos intestinos de seus consumidores com aquelas bactérias de maneira mais rápida e eficiente.

Alimentos probióticos, prebióticos e simbióticos são considerados alimentos funcionais e vêm aos poucos ganhando espaço devido ao crescente reconhecimento de sua utilidade e importância. Estes produtos tendem a ser um importante segmento das indústrias de alimentos e farmacêutica, privilegiando o bem-estar do consumidor.

Pesquisadores do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica da Unesp de Assis, trabalhando em convênio com empresa privada, desenvolveram em escala de laboratório e, posteriormente em escala piloto, completa tecnologia para a produção de FOS por uma linhagem de *Aspergillus japonicus*. Atualmente estão sendo efetuados testes de viabilidade deste produto, como ingrediente para a possível produção de um iogurte e uma bebida à base de soja com efeito prebiótico.

Alguns destes oligossacarídeos podem ser encontrados em alimentos comuns como frutos e legumes, porém em baixas concentrações. É o caso da banana, repolho, raízes de algumas plantas da família das *Asteraceae*, *Compositae* e sobretudo do yacon (*Smallanthus sonchifolius*), planta de origem andina, mas bem adaptada ao clima e solo do Brasil. Sua purificação, entretanto, tem se revelado bastante cara e comercialmente, pouco viável. Nos últimos tempos tem-se empregado a inulinase para quebrar a cadeia polissacarídica da inulina para a obtenção de frutoligosacarídeos de cadeias mais curtas (três a oito resíduos de frutose), como é o caso do ORAFIT, FOS comercial produzido na Bélgica. Tal técnica, entretanto, também tem mostrado limitações econômicas, tanto pelo cultivo da chicória (*Cichorium intybus*) (baixa produtividade) de onde é extraída comercialmente, como pelo tratamento enzimático empregado.

Como já citado, os FOS e outros produtos prebióticos alteram a flora intestinal, favorecendo o crescimento de bactérias benéficas, como bifidobactérias e lactobacilos comumente referidas com “friendly” bactérias. Entretanto, estes estudos têm utilizado produtos prebióticos isolados ou praticamente puros. A purificação dos FOS ou seu isolamento de outros açúcares remanescentes no substrato (sacarose) e de outros gerados durante o processo (glicose e frutose) encarece, sobremaneira, o produto. Atualmente tal purificação somente é realizada por cromatografia industrial por uma única empresa do

mundo, a NOVASEP, com sede em Miribel na França, detentora da tecnologia APPLEXION[®]. Por outro lado, apesar da disponibilidade no mercado de um produto similar, o ORAFITI, este é proveniente da inulina, produzida comercialmente em pequena escala, quando comparado à obtenção da sacarose da cana de açúcar, substrato para o FOS descrito neste projeto, o que torna este produto nacional muito vantajoso, em relação ao importado. Os fatores preço de purificação e preço de produção tornam, salvo melhor juízo, plenamente justificável o desenvolvimento de estudos dos efeitos dos FOS, mesmo associados a outros açúcares, sobre a flora intestinal de mamíferos e outras classes animais.

A alternativa para a produção de FOS, um dos NDOs, que se apresenta mais viável para as condições brasileiras, devido à abundância de sacarose produzida pela industrialização da cana de açúcar, parece ser o alongamento da molécula da sacarose pela ação da β -frutofuranosidase microbiana. Se neste caso a produção do FOS ocorre a baixo custo, através da tecnologia desenvolvida por um grupo de pesquisadores dos laboratórios de Bioquímica e Microbiologia da Unesp de Assis, a limitação econômica ficaria por conta da purificação do FOS, uma vez que nesta mistura se constata boas concentrações de sacarose residual e de seus monossacarídeos constituintes, glicose e frutose.

Fazia-se, pois, necessário testar o potencial desta mistura, como é produzida, quanto à capacidade de alterar a microbiota, aumentando a concentração das "*friendly*" bactérias e inibindo o crescimento de bactérias potencialmente nocivas. Optou-se, então, para um primeiro trabalho, por bactérias lácticas e coliformes de maneira geral sem escolher um microorganismo específico. Para verificar seu efeito foi adicionado a vários excipientes como a água, simplesmente, a um iogurte tradicional e a uma bebida de soja, leguminosa abundantemente produzida no Brasil. Era possível supor, inicialmente que a adição do FOS a esta bebida teria um efeito sinérgico como produto prebiótico devido à presença natural de outros NDOs no grão da soja, ou seja, a rafinose e a estaquiose.

Não deve ser esquecido, entretanto, que o homem não ingere seus alimentos apenas por sua funcionalidade e pelos benefícios que possam trazer à sua saúde mas, também, pelo prazer sensorial ou, no mínimo, pela aceitação. Por esta razão, era necessário testar a aceitabilidade de todas as formulações testadas, o que justifica todas as análises sensoriais desenvolvidas no desenrolar deste trabalho.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Frutooligossacarídeos

NDOs do tipo FOS diferem em grau de polimerização e massa molar sendo classificados em dois tipos: o grupo inulina e o levan. FOS do tipo inulina são compostos de uma molécula de sacarose (glicose + frutose) associada a uma, duas ou três moléculas de frutose unidas por ligações glicosídicas β -2,1, encontradas no referido polissacarídeo. Desta forma e, como visto na Figura 1, tais FOS se apresentam na forma de tri, tetra ou pentassacarídeo conforme tenham, respectivamente, duas unidades de frutose – **1-questose** (GF2); três unidades de frutose – **nistose** (GF3) e quatro unidades de frutose – **frutosil-nistose** (GF4). Normalmente estes oligossacarídeos podem ser obtidos pela hidrólise química parcial do polímero da inulina ou pela ação de β -frutofuranosiltransferase (E.C. 3.2.1.26), de origem microbiana, ao atuar sobre uma solução altamente concentrada de sacarose.

FOS do tipo levan são aqueles com ligações glicosídicas β -6,2 encontrados tanto em plantas quanto em bactérias. Entretanto, Hidaka et al. (1986) e Hayashi et al. (1992a) estabeleceram o princípio de que o termo "frutooligossacarídeos" deve ser utilizado somente para oligômeros de frutose compostos principalmente por GF₂, GF₃ e GF₄, em que unidades de frutosil (F) são unidas à sacarose (GF) por ligações glicosídicas β -2,1(Figura 1). Contudo, alguns autores têm utilizado o termo "frutooligossacarídeos" para designar "fructans" em geral (BHATIA et al., 1955; DARBYSHIRE & HENRY, 1981; NAGAMATSU et al. 1990) e outros para "oligossacarídeos tipo inulina" (KAUR & GUPTA 2002). Além disso, comercialmente os inulo-oligossacarídeos vem sendo considerados como FOS, mesmo sendo provenientes da ação de endo-inulinases sobre a inulina e que, via de regra, não apresentam unidades de glicose. (YUN et al., 1997).

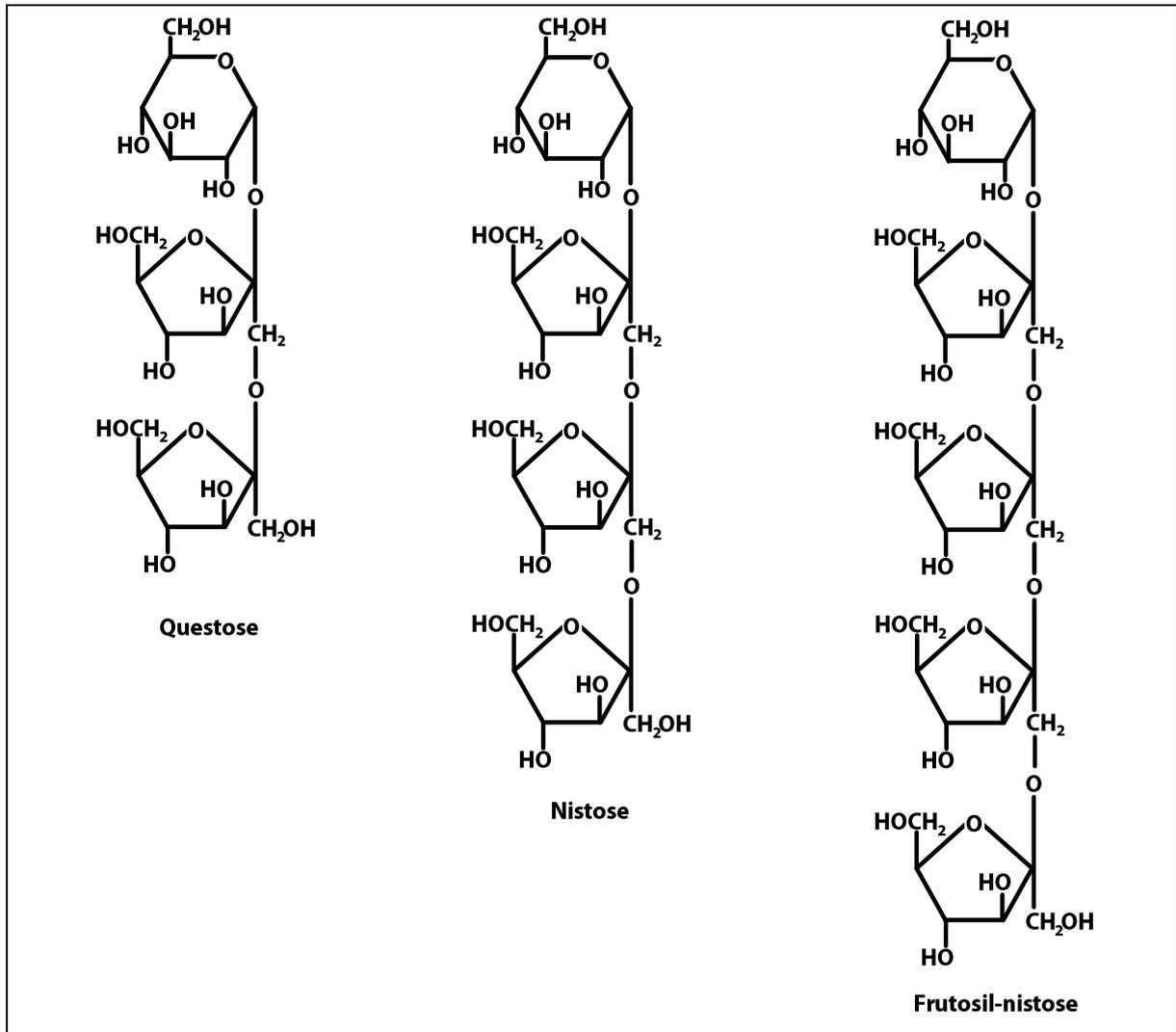


Figura 1: Estrutura química dos frutooligossacarídeos, de acordo com Passos & Park (2003).

Segundo Kono (1993), frutooligossacarídeos são largamente distribuídos em plantas e têm sido ingeridos pelo homem há muitos anos. Estão presentes na constituição de várias plantas como o pinheiro (*Thuja*); nas pertencentes à família *Compositae* como alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) e chicória (*Chicorium intibus*); em várias da família *Gramineae* como trigo (*Triticum*), aveia (*Avena*) e centeio (*Secale*); em plantas como a cebola (*Allium cepa*), aspargo (*Asparagus*), alho (*Allium*), pertencentes a família *Liliaceae* e na banana (*Musa paradisiaca*). FOS também estão presentes em mel, bactérias e leveduras. Campbell et al. (1997) pesquisaram a constituição dos diferentes FOS em diversos vegetais, dividindo estes em três grupos: o das verduras (incluindo os legumes), frutas e grãos. Dentre a categoria das verduras e legumes, a maior concentração de FOS foi encontrada na alcachofra de Jerusalém a qual apresentou 286,2 mg do total de FOS/g de massa seca, sendo seu maior constituinte a frutossil-nistose. Em seguida vem a cebola e raiz de chicória crua sendo,

entretanto, a 1-kestose o maior constituinte. Em relação à frutas, a banana madura foi a que apresentou uma maior quantidade do referido açúcar, com 10,9 mg/ por g de massa seca. Em mais de 50% das frutas testadas foram obtidas alguma concentração de FOS, com a predominância de 1-questose. Ainda segundo Campbell et al. (1997), dentre o grupo dos grãos, no trigo e centeio foram encontradas as maiores concentrações do açúcar, ficando em torno de 4,5 mg/ g de massa seca, com a predominância de 1-questose.

Os FOS podem ser obtidos, biotecnologicamente, através do alongamento da molécula da sacarose com unidades de D-frutose pela ação de β -frutofuranosidase (EC 3.2.1.26) com atividade de frutossiltransferase (HIDAKA et al., 1988; PARK & ALMEIDA, 1991; CRUZ et al., 1998). Entretanto, algumas levansucrases (EC 2.4.1.10) bacterianas também produziram expressivos rendimentos na produção de FOS durante a reação de transfrutossilação. (CRITTENDEN & DOELLE, 1993; HERNANDEZ et al., 1995; TÁMBARA et al., 1999). Tais enzimas, a princípio hidrolisam a sacarose e, em seguida, transportam a frutose livre a outra unidade de sacarose ou FOS funcionando, portanto, inicialmente como hidrolases e depois como transferases (HIDAKA et al., 1988).

A produção de oligossacarídeos a partir da sacarose vem sendo descrita desde a década de 1950. Segundo Pazur (1952), os pesquisadores Bacon & Edelman (1950) e Blanchard & Albon (1950) testaram o processo de transferência de frutose através das enzimas presentes em células de leveduras. Tais autores observaram a formação de tri e tetrassacarídeos durante a ação da enzima das leveduras. Ainda segundo Pazur (1952), Bacon & Edelman (1951) constataram que oligossacarídeos similares foram produzidos através da sacarose e inulina pelo extrato enzimático de alcachofra de Jerusalém. Pazur (1952), também obteve tri e tetrassacarídeos a partir da sacarose por ação da enzima extraída do fungo *Aspergillus oryzae*. Tal autor propôs um modelo em que o trissacarídeo seria composto de uma unidade de sacarose e uma de frutose; já o tetrassacarídeo por uma molécula de sacarose e duas de frutose. Gross et al. (1954) referiram-se ao citado trissacarídeo como Neoquestose. No início da década de 80, o tetrassacarídeo e o pentassacarídeo já foram citados como nistose e frutossil-nistose, respectivamente, pelos pesquisadores Adachi et al. (1982).

O rendimento em frutooligossacarídeos e outras frutanas de maior massa molar produzidos pela ação da atividade de transfrutossilação de enzimas endógenas de plantas é baixo e a produção em maior escala dessas enzimas é limitada por condições sazonais, impedindo o seu emprego para a obtenção industrial de FOS.

Segundo Kono (1993), as primeiras enzimas de origem microbiana, com forte poder de transfrutossilação e, portanto, com alta capacidade para sintetizar FOS foram obtidas por Adachi et al. em 1982, após *screening* com grande quantidade de micro-organismos. Hidaka et al. (1988) investigaram as enzimas dos mesmos micro-organismos detalhadamente e selecionaram *Aspergillus niger* ATCC 20611 como a mais adequada linhagem para a produção de FOS.

Aspergillus

De acordo com a tradição católica romana, aspergillum é um dispositivo litúrgico utilizado pelo clero para aspergir água benta durante uma parte do ritual denominado asperges. De acordo com (BENNETT, 2009), ao observar uma espécie de fungo ao microscópio, Antonio Micheli notou a semelhança deste com o instrumento litúrgico, nomeando-o *Aspergillus* em sua obra intitulada *Nova Plantarum*, em 1727.

Os esporos de *Aspergillus* são componentes comuns de aerossóis, encontrados nas correntes de ar, dispersando-se por diferentes distâncias dependendo das condições ambientais. Quando os esporos entram em contato com uma superfície sólida ou líquida, dependendo das condições de umidade, podem se desenvolver (KANAANI et al., 2008). Segundo Bennett (2009) a maioria dos *Aspergillus*, incluindo a maioria das espécies de importância econômica, é conhecida pela reprodução apenas por esporos assexuais. Uma das características definidoras de todo o reino de fungos é a sua estratégia nutricional diferenciada. Estes organismos secretam ácidos e enzimas para o ambiente externo, transformando alguns de seus componentes de acordo com sua necessidade metabólica, para então absorvê-los.

Fungos do gênero *Aspergillus* são encontrados com frequência em ambientes terrestres e são comumente isolados de solo e serapilheira das plantas associadas. O processo de decomposição realizada por estes fungos é importante para o ciclo natural de elementos químicos, particularmente no ciclo do carbono que contribui para a reposição do fornecimento de dióxido de carbono e outros compostos inorgânicos para os sistemas naturais (MACHIDA & GOMI, 2010).

Segundo Bennett (2009) várias espécies de *Aspergillus* vêm sendo estudadas ao longo da história, algumas por seus metabólitos nocivos e outras por subprodutos úteis ao homem. *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são citados como contaminantes comuns das culturas e produtos agrícolas. Eles produzem uma família de metabólitos altamente

tóxicos e cancerígenos denominados aflatoxinas. De acordo com Samson (2006), apesar de alguns autores relatarem a produção de micotoxinas por algumas linhagens de *Aspergillus ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. tubingensis* e *A. japonicus* estes dados foram contestados e estas cepas não produzem quantidades detectáveis de ocratoxinas. Espécies como *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus sojae* são utilizadas há muitos séculos na Ásia na produção de sakê, misô e shoyo. Vale ressaltar que *A. oryzae* e *A. sojae* tem sido citadas como organismo GRAS (generally regarded as safe" - geralmente considerada segura) de acordo com a FDA (Food and Drug Administration) USA. Outra espécie, notória por sua versatilidade na indústria é a *Aspergillus niger*, pertencente às linhagens classificadas com *Aspergillus* seção *nigri*, que é utilizada na fabricação de ácido cítrico e numerosas enzimas comerciais.

De acordo com Kono (1993) e Támara et al. (1999), a frutotransferase derivada do *Aspergillus niger* ATCC 20611 é a mais apropriada na produção industrial de FOS. Além disso, conforme Spiegel et al. (1994), *A. niger* ocorre comumente na natureza; não é patogênico e tem uma extensa história de uso seguro na indústria de alimentos (PELCZAR et al., 1980).

Segundo Hidaka et al. (1988), a melhor produtividade da β -frutofuranosidase por *A. niger* ATCC 20611 foi obtida em meios contendo 5% ou mais de sacarose, 3,5% de extrato de levedura, 0,5% de carboximetilcelulose (CMC) e pH 6,5. Estes eram inoculados com uma subcultura e incubados a 28°C com aeração durante 48 a 96 h. A enzima acumulada chegava a 250 U/mL ou mais no caldo. A maior parte da enzima permanecia no micélio do micro-organismo e uma pequena quantidade liberada para o meio de cultura. A enzima do micélio era recuperada após ser este seco, triturado, lavado e filtrado. A maior concentração de FOS e menor teor de frutose do meio de reação foram obtidas pela enzima incubada com 50% de sacarose.

Park & Almeida (1991), utilizando amostras de solo cultivado com canaviais isolaram uma cepa de *A. niger* cuja potencialidade para obtenção de FOS foi anunciada por uma indústria açucareira do Estado de São Paulo. A β -fructofuranosidase de outras linhagens de micro-organismos, como o *Aureobasidium* sp e *Aureobasidium pulullans* também foram propostas, aparentemente, com potencial para a produção industrial de FOS (YUN et al., 1990 e LEE et al., 1992). Entretanto, tais micro-organismos apresentam baixo rendimento celular e exigem alto teor de sacarose no meio de cultura, encarecendo o processo.

Hirayama et al. (1989) purificaram β -frutofuranosidase de *A. niger* ATCC 20611 e elucidaram as propriedades da enzima e dos mecanismos de formação dos FOS. Foi

constatado que a enzima era uma glicoproteína (tendo 20% de carboidrato), cujo tamanho molecular era 340.000 Da. O pH ótimo era de 5,0 - 6,0, e a temperatura ótima era de 50-60°C, satisfatoriamente alta para a produção industrial de FOS. Kurakake et al. (1996) descreveram a utilização de uma linhagem de *Aspergillus oryzae* capaz de produzir β-frutofuranosidase com habilidade de transfrusilar a sacarose.

Parenicová et al. (2001) relataram a relevância dos *Aspergillus* seção *nigri* para uso industrial e conseqüentemente a importância do correto conhecimento de seus táxons para proteção jurídica destes organismos. Para tanto, os autores analisaram nove linhagens *Aspergillus japonicus*, dez linhagens de *Aspergillus aculeatus* através de uma combinação de métodos bioquímicos e moleculares com o intuito de fornecer orientações para a identificação de todos os *Aspergillus* seção *nigri*.

Aspergillus japonicus

De acordo com Torralba (2008), os *Aspergillus japonicus*, apresentam esporulação negra e esparsa, micélio amarelado e verso amarelo quando cultivados em meio Ágar Extrato de Malte e Peptona (MEA). Esporulação negra compacta no centro e mais esparsa ao redor com bastante micélio estéril de cor amarelada e verso amarelo, são as características deste micro-organismo, quando cultivado em meio Ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA). Em meio Ágar Czapek Dox (CZ) a colônia apresenta esporulação negra compacta, micélio creme e verso amarelo limão. Além disso, apresentam conídios globosos e espiculados, vesícula com aspecto globoso e ainda apresentam tamanhos característicos do estipe e da fiálide.

Os *Aspergillus japonicus*, são amplamente citados na literatura como importantes produtores de enzimas para emprego em alimentos. Jayaprakash & Ebenezer (2010) notaram excelente atividade lipolítica de enzima produzida por *Aspergillus japonicus*, demonstrando a possibilidade do uso deste em materiais apolares.

No entanto, historicamente, estes micro-organismos vêm sendo citados como excelentes fontes de carboidrases como constatado por Ishii & Yokotsuka (1975) ao relatarem a purificação da enzima pectina liase produzida por *Aspergillus japonicus* demonstrando o potencial deste organismo para produção de carboidrases. Teixeira et al. (2000) ao avaliarem o efeito de diferentes fontes de carbono sobre a atividade de pectinesterease, endo e exopoligalacturonase produzidas por *Aspergillus japonicus* 586 em meio líquido, notaram que pectina, glicose e sacarose, quando adicionados ao meio de cultura em concentrações elevadas, apresentaram um efeito de repressão sobre todas as enzimas analisadas.

Simões & Tauk-Tornisielo (2005) ao utilizarem o *A. japonicus* para produção de xilanase notaram que a máxima atividade desta carboidrase foi obtida quando o fungo foi cultivado em farelo de trigo (sem adição de qualquer outra fonte de carbono), utilizando uma concentração de esporos de 1×10^7 esporos / mL (25 ° C, pH 5,0, 120 h). A atividade de uma xilosidase produzida por outra linhagem de *A. japonicus* foi comparada a uma carboidrase análoga produzida por *Trichoderma reesei*. Neste trabalho, Semenova et al. (2009) notou que a enzima produzida por *A. japonicus* foi mais específica para substratos de menor peso molecular, enquanto que a xilosidase produzida por *Trichoderma reesei* foi mais eficiente naqueles de maior peso molecular.

No ano de 1993 Duan et al. relataram a purificação e caracterização de uma beta-frutofuranosidase produzida pela linhagem de *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1. Chen & Liu (1996) produziram frutooligossacarídeos a partir da sacarose utilizando a linhagem TIT-90076 que foi identificada como *Aspergillus japonicus*. Hayashi et al. (1992b) também purificaram e verificaram as propriedades de uma β -frutofuranosidase produzida por uma cepa de *A. japonicus* MU-2. A massa molar da enzima foi estimada a 304.000 Da, sendo representada por uma glicoproteína, a qual era constituída por 20% de carboidrato. O pH ótimo da reação enzimática foi de 5,5 a 6,0. A estabilidade da enzima era mantida em ampla faixa de pH (4 a 9). A temperatura ótima da reação enzimática foi de 60 a 65°C, porém sua estabilidade térmica somente era mantida abaixo de 60°C.

Portanto, na década de noventa, inúmeros autores (SU et al., 1991; HAYASHI, et al., 1992b; DUAN et al., 1993; CHEN & LIU, 1996; e CRUZ et al., 1998) descreveram linhagens de *Aspergillus japonicus*, como potencialmente mais adequadas para a produção industrial de FOS. Segundo tais autores, esses micro-organismos apresentam crescimento mais rápido que linhagens do grupo de *A. niger* e suas respectivas β -frutofuranosidases possuem maior termoestabilidade, propriedade desejável por diminuir a possibilidade de contaminação dos processos.

Mussato et al. (2009) demonstraram a capacidade do citado organismo para colonizar diferentes materiais sintéticos (espuma de poliuretano, esponja de aço inox, fibra vegetal, pedras-pomes, zeólitos, e espuma de vidro) para produção de frutooligossacarídeos em escala industrial.

Produção Industrial

Em 1984, Meiji Seika Co., no Japão, foi a primeira empresa a obter a produção industrial de FOS (com o nome comercial de Neosugar) pela enzima do *Aspergillus niger* e verificar suas excelentes propriedades funcionais. O desenvolvimento industrial trouxe a possibilidade da produção em larga escala de FOS por diferentes meios enzimáticos. Tal produção pode ser dividida em duas classes: a primeira pelo sistema de batelada usando enzima solúvel e a segunda, através de processo contínuo por meio da imobilização enzimática ou de toda a célula do micro-organismo. (KONO, 1993).

Os FOS vêm sendo comercializados no Japão com nomes de Meioligo e Neosugar e nos EUA de Nutrafora. Segundo Spiegel et al. (1994), FOS como produto comercial, é uma mistura de GF₂, GF₃, GF₄, sacarose, glicose e traços de frutose. De acordo com Kono (1993), Meioligo G é o nome dado a um produto com aproximadamente 57% de FOS, contendo altos teores de glicose, uma vez que não passou pelo processo de separação cromatográfica da glicose e sacarose, mantendo a consistência de xarope devido à presença do monossacarídeo; já o de Meioligo P (purificado nas colunas de cromatografia) pode apresentar-se como xarope ou como um pó branco, sem odor e amorfo contendo 95% de FOS.

Segundo Roberfroid (1993) a inulina é amplamente encontrada em uma grande variedade de plantas. Através da hidrólise enzimática de inulina, que consiste de unidades lineares de frutossil com ou sem uma unidade final de glicose, a empresa Orafiti Ltda, sediada na Bélgica, produz frutooligossacarídeos com o nome comercial Raftilose, com grau de polimerização variando entre 1 e 7 unidades de frutossil. Na Holanda, a empresa Imperial-Suikner Unie também produz e comercializa este mesmo tipo de FOS com o nome comercial “Frutafit” .

Através de uma parceria entre a UNICAMP e a Usina da Barra SA, obteve-se a produção industrial de frutooligossacarídeos, à partir de *Aspergillus niger*, no Brasil. Este produto é comercializado pela Corn Products Brasil com o nome comercial “Bioligo®”.

Ação no metabolismo

Os **NDOs** trazem como principais efeitos fisiológicos desejáveis a diminuição de produtos putrefatos nas fezes, como a amônia, p-cresol e indol (KIKUCHI et al., 1996); regularização do peristaltismo e da função da defecação em indivíduos com história de constipação intestinal crônica (MATSUMOTO, et al., 1993, KORPELA & TEURI, 1997); menor teor de colesterol sanguíneo (CHONAN et al., 1995; KIKUCHI et al., 1996), maior

absorção de cálcio e magnésio, menor perda de tecido ósseo em ratas ovariectomizadas (CHONAN et al., 1995) e menor incidência de câncer de cólon (CHALLA et al., 1996; ROWLAND & TANAKA 1993). Além disso, de maneira geral, **NDOs** são não cariogênicos, não calóricos e apresentam sabor adocicado semelhante ao da sacarose com capacidade edulcorante entre 40 a 60% (FOS) ao daquele açúcar (MATSUMOTO et al., 1993) podendo, estes, serem utilizados como açúcar de mesa alternativo.

Segundo Crittenden & Playne (1997), **NDOs** de cadeias curtas, entre os quais se incluem os **FOS**, podem ser plenamente utilizados em substituição a açúcares no controle do sabor, corpo, viscosidade, teor de umidade, formação de cristais, reações de escurecimento e pontos de congelamento de produtos alimentares.

De acordo com Mul (1997), os **NDOs** já vêm sendo propostos, também, como ingredientes em rações animais, mostrando resultados animadores, principalmente, em rebanhos de gado de corte, onde chegaram a mostrar eficiência alimentar (ganho de peso) de 3 a 14%. Na avicultura têm mostrado excelentes propriedades no controle das salmoneloses. Para estas espécies, a razão custo/benefício têm sido considerada potencialmente positiva, segundo o autor. Segundo Silva & Nornberg (2003), os prebióticos são compostos seguros à saúde humana e animal, fato este, que justificaria seu uso em substituição a certas drogas veterinárias utilizadas na prevenção de alterações do trato gastrointestinal e/ou como promotoras do crescimento. Aumento de peso e melhoria da flora intestinal de leitões foi observada por Jonsson & Conway (1992) após uso de bactérias lácticas, fato este que, somado ao uso de prebiótico, pode ser de grande relevância na indústria de ração.

Experimentos em humanos mostram que os FOS possuem baixa cariogenicidade por não serem metabolizados por bactérias causadoras da cárie, como *Streptococcus mutans* (KONO, 1993; YUN et al., 1993; CHEN et al., 1998 e BURNE et al., 1996). Os FOS possuem baixa caloria por não serem hidrolisados em monossacarídeos. Tais oligossacarídeos ainda apresentam sabor adocicado semelhante ao da sacarose e capacidade edulcorante de 40 a 60% ao daquele açúcar sendo, por isso, utilizados como açúcar de mesa alternativo no Japão e Europa (KONO, 1993; MATSUMOTO et al., 1993). Além disso, como a lactossacarose, galactooligosacarídes, glicosilacarose e outros derivados da xilose, os FOS não são metabolizados no intestino delgado de mamíferos e aves, apresentando o efeito prebiótico (CRITTENDEN & PLAYNE, 1997).

Segundo Gibson & Roberfroid (1995) “prebióticos” são ingredientes alimentícios que afetam benéficamente a saúde do hospedeiro por estimular o crescimento e a atividade de

uma ou um número limitado de bactérias no cólon. Um ingrediente alimentício é considerado como prebiótico ao obedecer aos seguintes requisitos:

- 1) nunca ser hidrolisado nem absorvido em partes superiores do trato intestinal;
- 2) ser um substrato seletivo a uma ou um pequeno número de bactérias benéficas comensais no cólon, promovendo uma melhora na saúde do hospedeiro através do crescimento e ou de suas atividades metabólicas, sendo estas capazes de alterar a composição da flora intestinal.

Os efeitos prebióticos dos FOS proporcionam as seguintes vantagens para seus consumidores:

_ Absorção de Cálcio, Magnésio e Ferro

A produção de ácidos de cadeia curta - como o acético, butírico e propiônico - além de ácido láctico por bactérias predominantemente do gênero *Bifidobacterium*, após a fermentação do FOS, facilitam a absorção de cálcio, magnésio e ferro. (SCHARRER & LUTZ, 1991; SCHARRER et al., 1991; SCHULZ-AHRENS, 2001; GIBSON AND ROBERFROID, 1995; CHONAN et al., 1995). A ingestão de FOS preveniu anemia após a gastrectomia e a osteopenia em ratos (OHTA et al., 1998). Segundo Heuvel et al. (1998), a ingestão de 15 g de oligofrutose por dia aumentou em 10,8% a absorção de Cálcio em homens adolescentes. Vale ressaltar que, de acordo com a resolução RDC nº 19, de 30/04/1999 da ANVISA, "O uso do ingrediente não deve ultrapassar 30g na recomendação diária do produto pronto para o consumo." Além disso, "O consumo deste produto deve ser acompanhado da ingestão de líquidos".

_ Diminuição de amônia no sangue

Um efeito atribuído à produção de ácidos de cadeia curta produzido pela ingestão de FOS é a protonação da amônia potencialmente tóxica em íon amônio, o qual não é absorvido, diminuindo, desta maneira, o nível de amônia no sangue. Tal efeito ácido aumenta a excreção fecal de nitrogênio e diminui a uremia (HANSEN & VILSTRUP, 1985; GIBSON & ROBERFROID, 1995). Segundo Younes et al. (1998), uma mistura de FOS (41,2%) mais algumas fibras estimulou uma rota extra-renal da excreção de nitrogênio em ratos nefrotomizados, ou seja, a excreção passou a ser fecal.

_ Diminuição do teor de colesterol e glicose sangüíneos

Segundo Gibson & Roberfroid (1995), a hipótese de vários autores é que os ácidos de cadeia curta podem também desempenhar um papel regulatório no metabolismo endógeno. Mais especificamente, o acetato e o propionato, possivelmente em combinação com o L-lactato, podem ter efeito na regulação metabólica do lipídio e colesterol. Chonan et al., 1995 e Kikuchi et al., 1996 relataram, também, a diminuição do colesterol sanguíneo em função dos ácidos produzidos por *Bifidobacterium* após a fermentação dos FOS. Muitos estudos ainda estão sendo feitos para um resultado mais apurado sobre tal efeito. Roberfroid (1993) sugeriu que o propionato produzido pela fermentação de fibras solúveis também poderia reduzir a liberação de glicose ao estimular a glicólise. Existe a evidência muito preliminar que FOS mais inulina podem diminuir os níveis de glicose do sangue (ROBERFROID & DELZENNE, 1998). Entretanto, segundo LUO et al. (2000), FOS não afetaram a produção hepática basal de glicose ou a resistência a insulina em indivíduos com Diabets do tipo 2.

_ Inibição do crescimento de bactérias putrefativas

Os FOS passam integralmente para o intestino grosso e no cólon promovem o crescimento de uma flora constituída, principalmente, por bactérias dos gêneros *Bifidobacterium*, além de *Lactobacillus* e alguns *Streptococcus*, as quais, por competição, inibem o crescimento de bactérias putrefativas como as do gênero *Clostridium* e de outros gêneros nocivos ao homem, como *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Campilobacter*, etc.(CRITTENDEN & PLAYNE, 1997; BOSSCHER et al., 2006). Burigo et al. (2007) relataram aumento de bifidobactérias na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica, apos uso de frutooligossacarídeos. Segundo Gibson & Roberfroid (1995), a diminuição do pH pela produção de ácidos por *Bifidobacterium* inibiu o crescimento de bactérias patogênicas no cólon intestinal. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são eliminadas diretamente por produtos antibacterianos excretados por *Bifidobacterium infantis*, mesmo em ambientes com pH mais próximo ao neutro. Após a ingestão de 3 a 5g de FOS ao dia por humanos, durante duas semanas, Gibson & Roberfroid (1995) observaram o aumento significativo da porcentagem de bifidobactérias fecais de 6 para 22%. Entretanto, bacteróides, clostrídeos e fusobactéria tiveram a concentração diminuída de 25 para 4%, 1 para 0,2% e 4 para 0,4%, respectivamente.

_ Restauração da flora intestinal

Após o tratamento com antibióticos a ingestão de FOS permite a restauração da flora intestinal benéfica à saúde do homem ou outros mamíferos. (GIBSON & ROBERFROID, 1995).

_ Ação como imunomoduladores

Certos componentes celulares de bifidobactérias agem como imunomoduladores, isto é, eles promovem o ataque imunológico contra células malignas ou mesmo bactérias putrefativas. (MIZUTANI & MITSUOKA, 1980; SEKINE *et al.* 1985; GIBSON & ROBERFROID, 1995; BENGMARK, 1999). Essa ativação do sistema imune contribui para melhorar a resistência do hospedeiro contra futuros patógenos (GIBSON & ROBERFROID, 1995). Além disso, existe a possibilidade da junção de prebióticos e probióticos, fator este que é interessante, uma vez que Coppola & Turnes (2004) concluíram que vários probióticos têm, além de atividade promotora de crescimento e reguladora da microbiota das mucosas, efeito imunomodulador, porém por mecanismos ainda não elucidados.

_ Redução da incidência do câncer de cólon

O efeito fisiológico mais significativo produzido pela ingestão regular dos FOS e outros NDOs, segundo as conclusões do *International Symposium "Non Digestible Oligosaccharides: Healthy food for the colon"*, realizado de 3 a 5/12/1997 em Wageningen - Holanda, é a sua efetiva ação protetora contra diversos tipos de tumores dos intestinos o que pode ser explicado por, pelo menos três mecanismos (ROWLAND & TANAKA, 1993). Segundo Huis In'T Veld *et al.* (1997), há um acúmulo de evidências de que o desenvolvimento de tumores intestinais está associado à exposição do órgão a certos metabólitos carcinogênicos, produzidos por enzimas como as β -glucuronidases, nitroreduases e ureases. Lactobacilos e bifidobactérias têm demonstrado grande capacidade para diminuir tais metabólitos uma vez que, por competição, reduzem o número de bactérias produtoras de tais enzimas e por aumentar a aderência dos metabólitos carcinogênicos à parede celular do micro-organismo, diminuindo o potencial mutagênico dos mesmos. Challa *et al.* (1996) demonstraram que a administração oral direta de *Bifidobacterium longum* ou de NDOs na dieta de ratos, reduziu a carcinogenicidade do azoximetano, mais precisamente por suprimir os “focos de erupções anormais” (*aberrant crypt foci*) induzidas por aquele metabólito. Finalmente, outro mecanismo gerador de tumores intestinais é a indução de danificação do DNA de células do cólon por N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina e que, segundo Pool-Zobel

et al. (1996), pode ser inibido pelo desenvolvimento de uma flora intestinal em ratos composta por micro-organismos probióticos (bifidobacterias e lactobacilos). Esta mesma flora inibiu também o efeito genotóxico do 1,2-dimetil-hidrazina, de acordo com os mesmos autores.

_ Produção de vitaminas

Segundo Gibson & Roberfroid (1995), *Bifidobacterium* produz vitaminas do complexo B e ácido fólico.

_ Regularização da função de defecação.

Pesquisadores acreditam que o alívio da constipação em indivíduos após a ingestão de FOS se dá através da grande pressão osmótica causada pela ação dos ácidos de cadeia curta, tendo como consequência a aceleração dos movimentos peristálticos, inclusive, em indivíduos com história de constipação intestinal crônica (KONO, 1993; MATSUMOTO et al., 1993, KORPELA & TEURI, 1997).

Segundo Meydani & Ha (2000), o iogurte estimula a imunidade em indivíduos imunodeprimidos, fator este, observado em testes realizados com animais e posteriormente com humanos, sobretudo idosos, que foram acompanhados por testes inclusos de grupo placebo.

3 - OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Testar aspectos funcionais e sensoriais de uma mistura de açúcares contendo frutooligossacarídeos , produzida pela linhagem de *Aspergillus japonicus* - 119.

3.2 Objetivos específicos

1- Comparar curvas de crescimento de *Lactobacillus* sp. e *Escherichia coli* inoculados em sacarose, FOS comercial ORAFTI e mistura de FOS produzida pela linhagem de *Aspergillus japonicus* - 119.

2 - Desenvolver análises sensoriais de extratos de soja suplementados com sacarose (referência) e uma mistura de FOS produzida pela linhagem de *Aspergillus japonicus* - 119.

3 - Verificar o efeito de uma mistura de FOS, sacarose residual, glicose e frutose sobre variação da população de bactérias lácticas e coliformes na microbiota intestinal de animais experimentais (ratos Wistar).

4 - Comparar as variações populacionais de bactérias lácticas e coliformes de ratos suplementados com duas diferentes concentrações de FOS produzidos pela linhagem *Aspergillus japonicus* - 119, com as populações das mesmas bactérias desenvolvidas em ratos suplementados com FOS comercial purificado ORAFTI.

5 - Verificar o efeito sinérgico da mistura de FOS produzida pela linhagem *Aspergillus japonicus* - 119 ao enriquecer extrato de soja com reconhecida presença de galactooligossacárideos.

6 - Verificar o efeito sinérgico da mistura de FOS produzida pela linhagem *Aspergillus japonicus* - 119 com iogurte convencional produzido pela fermentação de leite UHT por inóculo misto comercial (Christian Hansen Ind. e Com. Ltda), constituído de partes iguais de *L.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Materiais

4.1.1- Sujeitos experimentais

•Utilizaram-se ratos machos da linhagem Wistar, SPF (Livres de Patógenos Específicos) como modelos, pesando entre 250 a 300 g, com 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UNESP de Botucatu. Os animais foram mantidos no biotério da FCL/Assis-UNESP em temperatura entre 22° e 23°C, com iluminação ambiente controlada para 12 horas de luz e 12h de plena escuridão.

4.1.2- Micro-organismos

•*Aspergillus japonicus*-119, isolada de amostras de solo obtidas no canal da Usina Nova América - Tarumã - SP, pertencente à coleção do Laboratório de Microbiologia da UNESP- Câmpus de Assis, tipificada pelo Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda em 1995 e mantida em tubo inclinado em meio composto por ágar-batata-dextrose em temperatura de refrigeração. Simultaneamente, amostras de tais linhagens vêm sendo mantidas em tubos com glicerol em freezer especial (Sanyo mod. Ultraflow MDF 492) a 81°C negativos para manutenção dos respectivos genomas.

•Inóculo misto comercial (Christian Hansen Ind. e Com. Ltda), constituído de partes iguais de *L.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*.

4.1.3- Reagentes

4.1.3.1- Meios de cultura

Acetato de sódio (Labsynth), Ágar-batata-dextrose (Acumedia), Citrato de Diamônio (Merck), Cloreto de Potássio (Labsynth), Cloreto de Sódio (Labsynth), Extrato de Carne (Merck), Extrato de Levedura (Labsynth), Farinha de Levedura (Biorigin), Fosfato de Potássio (Labsynth), Fosfato de Potássio Dibásico (Merck), Hidrogenofosfato de Potássio (Sigma), Melaço de Cana (Cosan), MRS-Ágar (Difco), Nitrato de Sódio (Dinâmica), Peptona (Oxoid), Sacarose comercial (Dolce), Sais Biliares (Merck), Sulfato de Magnésio (Labsynth), Sulfato de Manganês (Difco), Triptona (Sigma), Tween 80 (Merck), VRB-Ágar (Sigma), Extrato de Soja comercial e Leite UHT (Líder).

4.1.3.2- Análises

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) - Acetonitrila (Merck), Álcool iso-propílico (Dinâmica), água ultrapurificada e os padrões: Glicose (P.A. Labynt), Sacarose (P.A. Labynt), Frutose (P.A. Labynt), 1-questose, Nistose e Frutosil-nistose (Waco pure chemical Ltda.). Proteína-bruta: Sulfato de Sódio, Cobre, Ácido Sulfúrico, Ácido Bórico, Ácido Clorídrico, Hidróxido de Sódio.

4.2- Métodos

4.2.1- Imobilização do micélio e produção dos frutooligossacarídeos (FOS) pelo sistema de bateladas

As condições de produção e imobilização do micélio foram otimizadas de acordo com as recomendações de CRUZ et al. (1998). Para a obtenção dos frutooligossacarídeos, esporos do fungo *Aspergillus japonicus*-119 foram inoculados, com alça de platina, em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de um meio básico, previamente esterilizado em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão. O meio foi composto por 1,5 % de peptonas (DIFCO), 3% de sacarose comercial e concentrações de 0,05% de KCl e de MgSO₄ 7H₂O, 0,5% de K₂HPO₄, 0,2% de NaNO₃ e pH final 5,0. Após este processo, os frascos foram agitados a 160 rpm, por 60 horas, a 28°C em uma incubadora dotada de controle automático de temperatura para o crescimento do micélio. O micélio produzido foi extensivamente lavado em água destilada, prensado para secagem em sucessivas camadas de papel de filtro até não mais observação visual de umidade no papel. O micélio foi triturado em liquidificador comercial em baixa rotação e adicionado 2,0 % (p.v.) de alginato de sódio e 0,5% de glutaraldeído para formação de gel com 10% de micélio. Esta mistura foi colocada em bandeja perfurada, gotejando sobre uma solução a 2,0% de CaCl₂ e 30% de sacarose em constante, porém fraca agitação. As esferas, assim produzidas, foram mantidas nessa solução por 24 horas em temperatura de refrigeração para adquirir consistência, estando prontas para utilização. Duas relações enzima:substrato (quantidade de micélio imobilizado) foram utilizadas para obtenção de duas concentrações de FOS. Doze e meio litros (12,5) e alternativamente 25 litros de esferas de alginato de cálcio contendo micélio imobilizado foram introduzidos em reator com capacidade para 50 litros, o qual foi completado com uma solução da sacarose a 60%, pH 5,0 e agitado suavemente por 4 horas para ação enzimática. Após as

reações, as soluções foram submetidas a uma filtragem com 0,1% de carvão ativado e 0,9% de celite e, em seguida, concentradas até 80° brix com o uso de evaporador a vácuo em temperatura inferior a 60°C. A análise dos teores de FOS, sacarose residual, glicose e frutose livres geradas no processo, foram quantificadas por HPLC. Para evitar as pequenas diferenças na concentração de FOS entre uma batelada e outra, com a mesma porção de micélio, todas as bateladas foram produzidas previamente e misturadas em recipiente único, sendo submetidas a uma nova dosagem de FOS e açúcares residuais. Desta forma, obtiveram-se vários recipientes com duas diferentes concentrações de FOS. A mistura produzida com maior teor de micélio imobilizado foi denominada FOS I, enquanto que a outra mistura, obtida com menor teor de micélio imobilizado, foi denominada FOS II.

4.2.2- Caracterização do FOS obtido

Amostras das misturas de frutooligossacarídeos obtidos em cada batelada após mistura em recipiente único, foram diluídas a uma concentração, de açúcares totais, de 2000 ppm e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Foi utilizado um cromatógrafo da Agilent Technology modelo 1100 equipado com coluna Zorbax Lc-NH₂. Como fase móvel foi utilizada uma solução de acetonitrila a 75%, fluxo de 2.0 mL por minuto a uma temperatura de 37°C. Utilizou-se um detector de índice de refração Agilent (RID G1362A) e como padrões, sacarose, frutose e glicose da Sigma, além de questose, nistose e frutosil nistose da MEIJI conforme descrito por Cruz et al. (1998).

4.2.3 – Determinação do crescimento celular de Lactobacillus sp. e Escherichia coli em diferentes fontes de carbono.

Nesta etapa, utilizou-se uma linhagem de *E.coli* liofilizada proveniente do Laboratório Cefar e *Lactobacillus* sp. proveniente da coleção do laboratório de microbiologia da UNIP Campus Assis. Os inóculos das culturas foram padronizados e preparados de acordo como descrito por CLSI (2008) e Ludwig et al. (2001) respectivamente.

Para cada linhagem, foi elaborado um meio específico para crescimento. No caso da *E.coli* utilizou-se o caldo EC modificado, com sacarose em substituição à lactose. O meio MRS foi utilizado para crescimento de *Lactobacillus* sp. Outros dois meios com a mesma

composição foram preparados para cada linhagem, substituindo-se apenas a sacarose por FOS I ou ORAFTI, como fontes de carbono.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando-se 1,0 mL de inóculo para cada 50mL de meio de cultura. As amostras foram mantidas em agitador orbital em temperatura de 37°C e agitação de 90 rpm (TARABOULSI et al., 2007) para coliformes e 40 rpm (POPPI & MANCILHA, 2008) para *Lactobacillus* sp., retirando-se alíquotas assepticamente, em intervalos de tempo de uma hora, para leitura em espectrofotômetro.

A determinação do crescimento celular foi realizada através da média aritmética da densidade ótica (D.O) das triplicatas das amostras, em espectrofotômetro (Pharmacia - LKB - Ultrospec III) em 600nm.

4.2.4-Produção de iogurte

Para o preparo dos iogurtes foi utilizado o Fermento Rich[®] constituído de culturas superconcentradas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, em leite integral UHT seguindo orientações da CHR.HANSEN'S. O processo fermentativo foi realizado em banho-maria a uma temperatura de 44°C e considerou-se completo quando o pH do produto atingiu 4,5. Após esta etapa, o produto foi dividido em quatro diferentes porções para adição de: 1) sacarose comercial, 2) mistura contendo maior concentração de FOS (FOS I), 3) mistura contendo menor concentração de FOS (FOS II) e 4) FOS comercial (ORAFTI), todos com iguais concentrações de açúcares totais. Desta forma, foram obtidos quatro tipos de iogurte, prontos para a suplementação dos animais.

4.2.5-Obtenção do extrato e confecção de bebida à base de soja

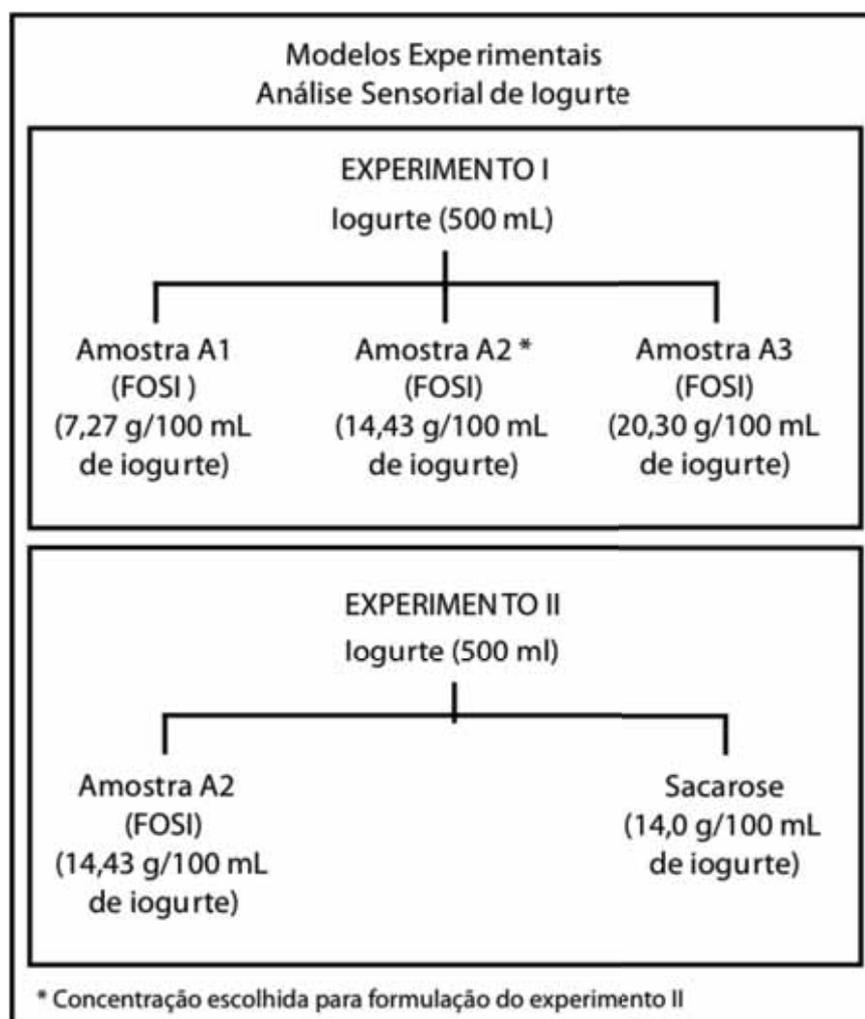
O extrato de soja foi produzido de modo análogo ao descrito por Cruz (1982). Quatro (4) diferentes porções de extrato de soja comercial em pó desengordurado, foram suspensos em água destilada fervente por dez minutos sob fraca agitação, de modo a constituir bebidas com 2,5% , 5,0% , 7,5% e 10% de extrato de soja. Após resfriamento das suspensões até temperatura ambiente, as proteínas foram precipitadas isoeletricamente pela adição de ácido cítrico 1N até ajuste do pH em 4,5. Estas foram retiradas do meio por centrifugação, em centrífuga refrigerada, a 3.600 rpm durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para formulação das bebidas de soja, após ter seu teor de proteínas igualado ao do iogurte, pela adição de porções de caseína bovina, por prévia determinação de proteínas pelo método de

micro-Kjeldahl (SPINOSA et al., 2001). Tais extratos foram utilizados para a produção de 4 diferentes bebidas de soja, enriquecidas de sacarose, FOS I, FOS II e ORAFTI, variando, portanto, apenas o conteúdo de soja. Estas bebidas foram submetidas à análise sensorial para verificação da aceitação.

4.2.6 - Análise sensorial das bebidas produzidas

4.2.6.1 – Análise sensorial de iogurte

A análise sensorial foi realizada através do teste de aceitação de alimentos descrita por Amerine & Roessler, 1983 apud Brusantin (1995) e Queiroz & Garcia (2000), na qual foram avaliados os perfis sensoriais dos produtos. Primeiramente foi feita uma análise sensorial para determinar a dosagem de FOS I, mais adequada para adoçar o iogurte produzido. Para tanto, variou-se o teor de FOS I levando-se em consideração o sabor. A análise sensorial foi conduzida através da participação de 27 provadores não treinados (funcionários, alunos e professores da própria UNESP - Campus Assis) nas quais três amostras (A1 – 50mL , A2 - 110 e A3 - 170 mL de FOS I em 500mL de iogurte) foram disponibilizadas em copos plásticos de café descartáveis e numeradas aleatoriamente com três dígitos. Durante a degustação os voluntários preencheram questionários que continham uma escala hedônica de notas com variação de 1 a 9 (caracterizado desde “desgostei muitíssimo” a “gostei muitíssimo”). As notas atribuídas pelos provadores, foram submetidas a tratamento estatístico, através de análise de variância ANOVA One-way (VIEIRA, 2006). A amostra A2 contendo 110 mL de FOS I foi a melhor avaliada pelos provadores e, por isso, comparada à aceitação de um iogurte convencional acrescido de 70g de sacarose para 500mL de iogurte, concentração esta comum nos iogurtes comerciais adoçados. Para tanto, nova análise sensorial foi realizada nos moldes da anterior e os resultados foram submetidos ao teste T para amostras dependentes. O Fluxograma 1 ilustra os modelos experimentais adotados:

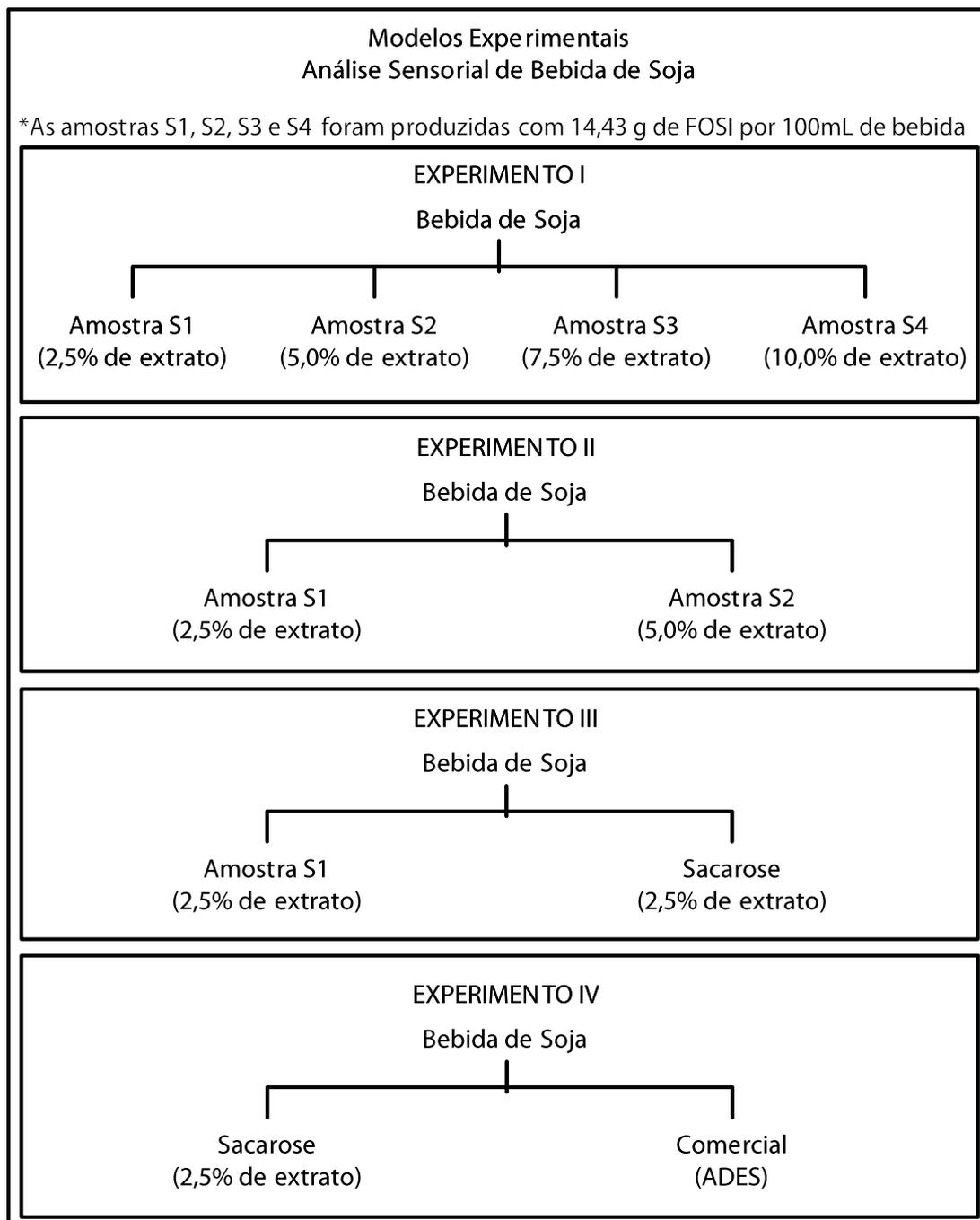


Fluxograma 1: Modelos experimentais - Análises sensoriais de iogurte

4.2.6.2 – Análise sensorial de bebida de soja

Para realização da análise sensorial da bebida de soja, quatro diferentes concentrações de extrato foram testados, uma vez que fixou-se a dosagem de açúcares e proteínas de acordo com o iogurte produzido. Amostras com 2,5% de extrato de soja (S1), 5% (S2), 7,5% (S3) e 10% (S4) foram produzidas com 110 mL de FOS I, a fim de se conhecer a concentração de soja ideal para formulação da bebida. O teste de aceitação foi realizado através da participação de 30 consumidores, não treinados, pertencentes à comunidade UNESP (alunos e funcionários). Os provadores receberam 20mL das amostras em copos plásticos descartáveis (50mL) codificados com números de três dígitos e ficha de avaliação do produto. A aceitabilidade das amostras foi avaliada utilizando-se teste efetivo com escala hedônica estruturada de 9 pontos (9= gostei muitíssimo; 1= desgostei muitíssimo) (AMERINE & ROESSLER, 1983 apud BRUSANTIN, 1995, p. 92). O resultado foi

submetido à análise de variância ANOVA One-way. Como as amostras S1 e S2 foram as mais aceitas pela maioria dos provadores e não apresentaram diferenças significativas entre si, um novo teste de aceitação foi conduzido, aos moldes do anterior, para determinação da melhor concentração de extrato de soja. Através do teste T para amostras dependentes (VIEIRA & HOFFMAN, 1989), os resultados foram analisados estatisticamente, onde a amostra mais aceita (S1) foi comparada a uma amostra com a mesma quantidade de extrato (2,5%), porém adoçada com sacarose em substituição ao FOS, também através do teste de aceitação com 30 provadores, seguida de análise estatística por teste T. Por fim, comparou-se a bebida de soja adoçada com sacarose com o produto comercial ADES, afim de testar sua aceitação frente a um produto comercial. O Fluxograma 2 ilustra os modelos experimentais adotados:



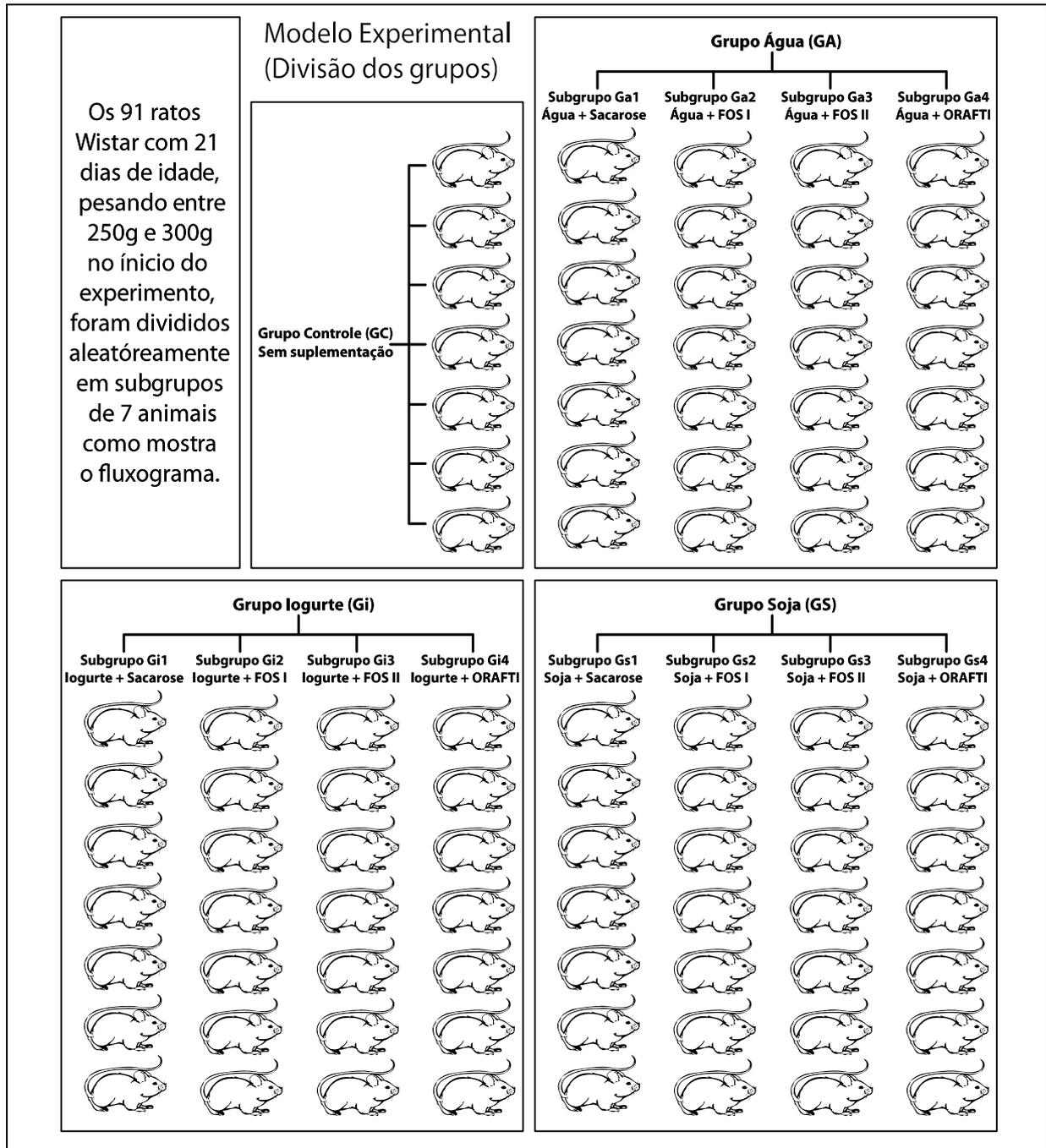
Fluxograma 2: Modelos experimentais - Análises sensoriais de soja

4.2.7- Ratos e dietas

Os ratos utilizados no presente trabalho, foram divididos aleatoriamente em 13 grupos com 7 animais sendo, um grupo controle e doze grupos experimentais recebendo diferentes tipos de suplementação. Os animais foram separados em gaiolas individuais sendo alimentados com ração comercial Purina e água *ad libitum* e a suplementação dos grupos experimentais foi desenvolvida como visto na Tabela 1 e no Fluxograma 3.

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais

Grupo	Sub grupo	Tipo de suplementação
Controle (GC)	-	Sem suplementação
GA*	Ga1	Água + Sacarose
	Ga2	Água + FOS I
	Ga3	Água + FOS II
	Ga4	Água + ORAFTI
GI**	Gi1	Iogurte + Sacarose
	Gi2	Iogurte + FOS I
	Gi3	Iogurte + FOS II
	Gi4	Iogurte + ORAFTI
GS***	Gs1	Soja + Sacarose
	Gs2	Soja + FOS I
	Gs3	Soja + FOS II
	Gs4	Soja + ORAFTI
<p>* Grupo em que se utilizou água como veículo de suplementação;</p> <p>** Grupo em que se utilizou iogurte como veículo de suplementação;</p> <p>*** Grupo em que se utilizou bebida à base de soja como veículo de suplementação;</p>		



Fluxograma 3: Divisão dos grupos de animais quanto às dietas.

Todas as bebidas foram administradas oralmente através do uso de mamadeiras de vidro com capacidade para 500mL de volume. Estes animais foram suplementados com 350 mL da bebida, diariamente, por um período de 3 meses.

4.2.8 – Verificação dos efeitos das diferentes suplementações através da contagem de coliformes totais e bactérias lácticas pelo método de plaqueamento *pour plate* em ÁGAR VRB e ÁGAR MRS.

Inicialmente, foram coletadas amostras de fezes de cada animal dos 13 grupos experimentais e realizados testes para verificar a quantidade de coliformes totais e bactérias lácticas presentes nas fezes destes animais. Para tanto, utilizou-se a técnica de contagem de micro-organismos através de plaqueamento (*pour plate*). Foram utilizados os meios Ágar VRB, para aferição de coliformes totais e Ágar MRS, para contagem de bactérias lácticas. As fezes frescas coletadas tiveram sua parte externa removida e a seguir foram pesadas e diluídas em uma proporção de 1:10 (p:v), em água peptonada a 0,1% constituindo a diluição 10^{-1} . Tais soluções sofreram novas diluições de modo a constituir uma progressão logarítmica inversa. Após este procedimento, foram escolhidas as diluições mais efetivas para contagem de cada um dos grupos. Em seguida foram realizados os plaqueamentos (em profundidade) em triplicata, no qual 1mL das diluições selecionadas foram inoculadas nas placas e estas cobertas com os meios adequados. As placas foram incubadas em posição invertida, em estufa e mantidas a 32°C no caso de bactérias lácticas e 37°C no caso de coliformes, durante um período de 24 a 72 horas. A seguir foram realizadas contagens das colônias típicas para coliformes totais (vermelhas púrpuras rodeadas com halo avermelhado) e para as bactérias lácticas (brancas opacas), selecionando-se as placas com 30 a 300 colônias e determinando o número de **unidades formadoras de colônias por grama** (UFC/g) de fezes multiplicando-se o número de colônias típicas pelo inverso da diluição (VANDERZANT et al., 1992), (SILVA & JUNQUEIRA, 2001). O mesmo procedimento foi realizado após 3 meses de suplementação com o intuito de verificar a eficiência dos produtos testados

Ao final de todo este processo, os animais utilizados foram sacrificados pelo uso de éter etílico. Os procedimentos experimentais obedeceram aos princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

4.2.9 – Análise estatística

Diferentes métodos estatísticos foram utilizados no presente trabalho. Para analisar os resultados obtidos nas curvas de crescimento microbiano, utilizou-se o método de análise de variância ANOVA para medidas repetidas, que pressupõe que os dados são amostrados a partir de populações maiores (ou pelo menos são representativos dessas populações)

(VIEIRA, 2006). Por ele, os dados de cada linha representam medidas repetidas sobre o mesmo assunto, ou são medidas sobre temas correspondentes. Um projeto experimental utilizando esta metodologia apresenta grande credibilidade, pois afere a variabilidade entre indivíduos, por distinguir variabilidade inter-sujeitos (entre linhas) de variabilidade intra-sujeitos (entre colunas). Caso a correspondência seja eficaz, o teste resultará em um valor menor que **P** (GraphPad InStat 3.0 for Mac OSX, 2009).

A análise sensorial mostrou resultados que foram analisados conforme o número de grupos experimentais. Para comparar quatro diferentes extratos de soja, utilizou-se o teste de análise de variância ANOVA One-way que compara as médias de três ou mais grupos (VIEIRA, 2006). O teste apresenta cálculos intermediários que levam ao cálculo do quociente F, a partir do qual é determinado o valor de **P**. (GraphPad InStat 3.0 for Mac OSX, 2009). Quando não se tem certeza se a hipótese é razoável, por distribuição não homogênea de seus valores (colunas), deve-se utilizar o teste de Bartlett que testa a hipótese de que os desvios padrões (DPs) são iguais. A hipótese nula deste teste é quando as populações apresentam o mesmo desvio padrão. Se o valor de P é baixo, pode-se concluir que os dados não se referem a populações com DPs iguais (MENDES & PINTO, 2007). As amostras foram submetidas ao teste T não pareado que compara as médias entre duas colunas. A hipótese é considerada nula quando duas médias populacionais são iguais. (GraphPad InStat 3.0 for Mac OSX, 2009).

Os resultados obtidos nos experimentos com os ratos, foram transformados em Ln de UFC/g e submetidos a tratamento estatístico pela aplicação do teste não paramétrico de Wilcoxon, para verificação de significância, entre os diferentes grupos e subgrupos de animais. O teste de Wilcoxon calcula a diferença entre os valores (entre as duas colunas) para cada sujeito (linha). Os grupos que continham apenas cinco animais (Anexo II), apresentaram um coeficiente de correlação negativa sugerindo um possível emparelhamento não eficaz. Por esta razão, foram também submetidos ao teste não paramétrico de Mann-Whitney para confirmação da significância. Trata-se este de um teste não paramétrico, não pareado, que compara a média de duas colunas ímpares. A utilização concomitante dos dois métodos é recomendada quando há poucas variáveis. (GraphPad InStat 3.0 for Mac OSX, 2009).

5-RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1- Caracterização do FOS Produzido

A análise cromatográfica por HPLC revelou que o experimento denominado FOS II era constituído de uma mistura de açúcares contendo 20,9% de questose; 10,4% de nistose (totalizando 31,3% de frutooligossacarídeos); 35% de sacarose; 24,1% de glicose e 9,5% de frutose (*Figura 2*), menor teor de FOS e maiores concentrações de sacarose residual, glicose e frutose, em comparação ao FOS I, o que era de se esperar, uma vez que se utilizou uma quantidade menor de micélio imobilizado. Em contrapartida, a *Figura 3* ilustra que o experimento denominado FOS I, realizado de acordo com o descrito por Cruz et al. (1998), apresentou uma mistura com 33,2% de questose; 16,5% de nistose (totalizando 49,7% de frutooligossacarídeos); 25,6% de sacarose; 17,9% de glicose; 6,8% de frutose. Desta forma, as amostras de FOS, utilizadas na suplementação dos grupos de animais denominadas FOS I e FOS II, apresentavam composições diferentes, com teores de frutooligossacarídeos muito superior no FOS I que no FOS II. As figuras 2 e 3 mostram também que em ambas as concentrações de micélio, não foi sintetizada a frutosil nistose, um frutooligossacarídeo análogo à nistose, portadora de uma unidade a mais de frutose. Cruz et al. (1998) haviam obtido tal frutooligossacarídeo em seus experimentos, talvez por terem utilizado um tempo menor de fermentação (3 ao invés de 4 horas em cada batelada), ou ainda por terem trabalhado em fermentadores de pequeno porte (2 litros).

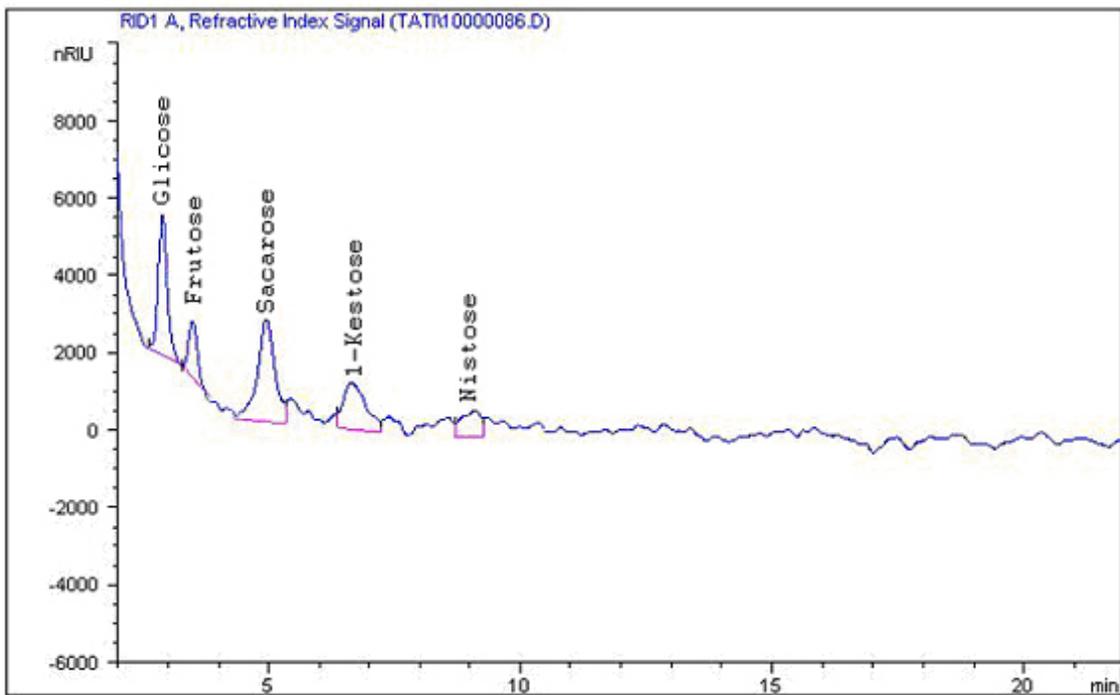


Figura 2: Cromatograma referente ao FOS II, produzido com quantidade micélio imobilizado (50%) menor que a preconizada na literatura. (Cruz et al., 1998).

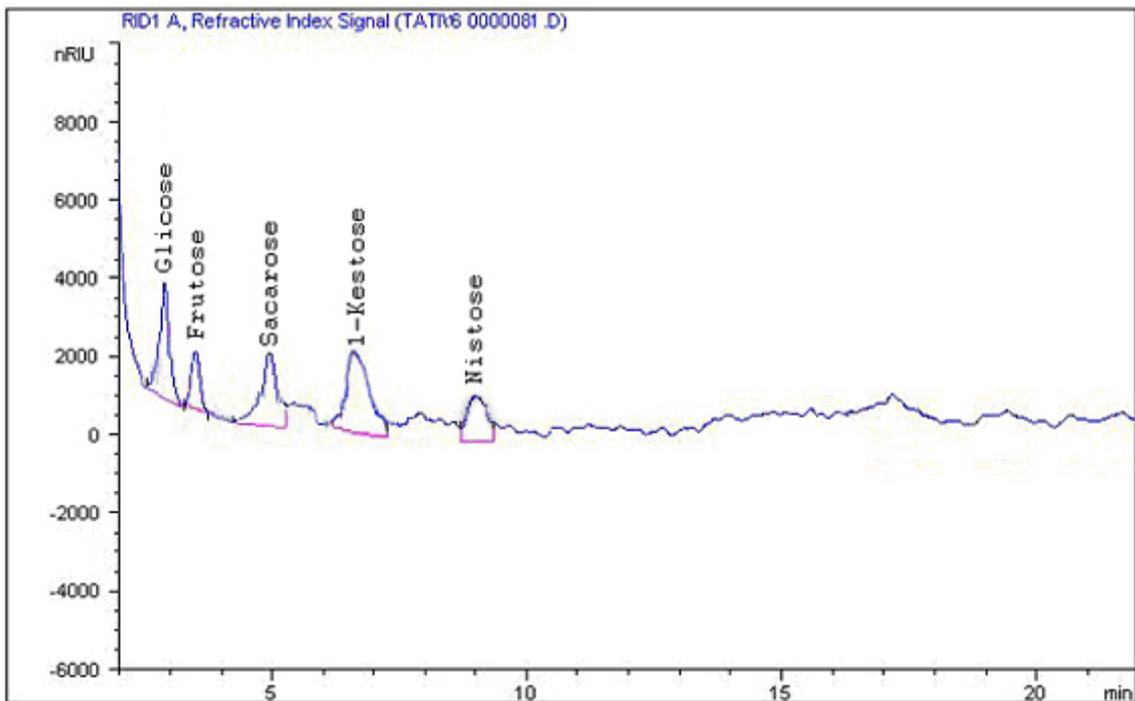


Figura 3: Cromatograma referente ao FOS I, produzido com a quantidade de micélio imobilizado preconizada na literatura (Cruz et al., 1998).

5.2 – Determinação do crescimento celular de *Lactobacillus* sp. e *Escherichia coli* em diferentes fontes de carbono.

A Figura 4 mostra as curvas de crescimento celular de *Lactobacillus* sp. em diferentes fontes de carboidratos. Devido a maior concentração de frutooligossacarídeos no FOS I, este foi selecionado para se realizar a curva de crescimento. É possível notar que houve crescimento em todos os açúcares testados. Porém, o crescimento mais acentuado foi obtido no meio enriquecido com sacarose. Provavelmente, o fato deste açúcar ter uma cadeia mais curta que o FOS, apresentar ligação $\beta(2\rightarrow1)$ pela qual sua β -frutofuranosidase tem afinidade, tenha contribuído para este resultado. Isto explicaria também o crescimento em FOS I uma vez que este é composto de uma mistura que contém 50,3% de mono e dissacarídeos, sendo que 25,6% destes apresentaram picos cromatográficos equivalentes ao da sacarose da curva padrão. Tal fato deve ter influenciado, também, a fase log do crescimento do micro-organismo em FOS I, onde é possível notar, entre duas e quatro horas, uma aceleração do crescimento quando comparado com meio contendo ORAFTI. Este último propiciou o crescimento menos expressivo entre os três açúcares, evidentemente por ser composto por cadeias mais longas que a sacarose. De qualquer forma, a citada figura mostra que os *Lactobacillus* sp. testados utilizaram o produto como fonte de energia para seu crescimento. Ao comparar as curvas obtidas com os meios contendo FOS I e ORAFTI, no período de 6 a 13 horas, observa-se uma curvatura semelhante, provavelmente pelo esgotamento dos mono e dissacarídeos da mistura FOS I supracitados, restando os oligossacarídeos análogos ao ORAFTI. Estes resultados estão de acordo com Buddington et al. (1996) e Gibson et al. (1995) que demonstraram o potencial seletivo dos oligossacarídeos para o crescimento de *Lactobacillus*, uma vez que estes micro-organismos têm potencial para metabolização dos mesmos (MANNING & GIBSON, 2004).

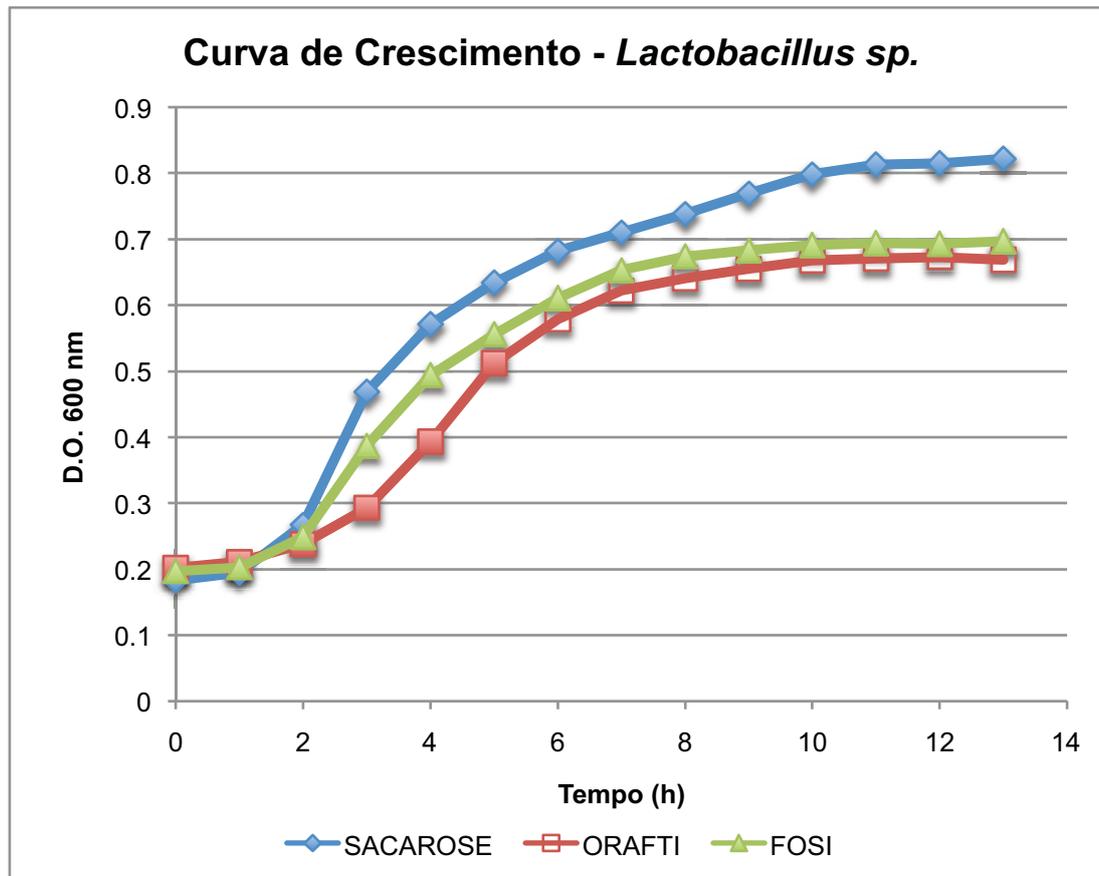


Figura 4: Curva de crescimento de *Lactobacillus sp.* em caldo MRS modificado.

A análise estatística de ANOVA mostrou diferenças extremamente significativas ($p < 0,0001$) no crescimento de *Lactobacillus sp.* nos diferentes açúcares testados (Tabela 2).

Tabela 2: Análise de variância ANOVA para medidas repetidas

Açúcares	Nº de pontos	Média	Desvio Padrão	
Sacarose	14	0.6047	0.2344	
ORAFI	14	0.5019	0.1914	$p < 0,0001$
FOS I	14	0.5344	0.1945	

Ao se utilizar-se o teste de Tukey-Kramer, também, foram encontradas diferenças significativas entre o crescimento nos três meios, porém com significâncias distintas, verificando-se diferença menos expressiva entre o crescimento em ORAFI e FOS I (Tabela 3).

Tabela 3: Teste comparativo de Tukey-Kramer

Comparação	Diferença da média	q	P
Sacarose vs ORAFTI	0.1028	11.257	*** P<0.001
Sacarose vs FOS I	0.07029	7.698	*** P<0.001
ORAFTI vs FOS I	-0.03250	3.559	* P<0.05

É possível notar na Figura 5, que o crescimento de *E. coli* nos três meios, mostrou tendências diferentes das verificadas na curva de crescimento de *Lactobacillus* sp. nos mesmos meios. Na presença de sacarose o micro-organismo obteve grande crescimento, sobretudo entre 2 e 6 horas. Ao utilizar FOS I como fonte carboidrática, foi possível notar crescimento muito menos acentuado, o que pode ser explicado pela presença de frutooligossacarídeos de cadeia mais longa que a sacarose na amostra. É possível supor que o pequeno crescimento da *E. coli* no meio contendo FOS I tenha ocorrido pela presença de 50,3% de açúcares convencionais. Isto parece ficar comprovado pelo praticamente não crescimento de *E. coli* quando utilizou-se ORAFTI, composto apenas por frutooligossacarídeos.

Segundo Passos & Park (2003) os FOS, além de apresentarem efeito antiaderente, inibem o crescimento de *E. coli*. Shoaf et al. (2006) demonstraram que os oligossacarídeos, inibem a aderência desse micro-organismo ao cólon, em 48% quando comparado a um grupo controle. No entanto, Schouleur, et al. (2009), apesar de citarem tal inibição, evidenciaram que algumas linhagens desta bactéria apresentam condições de metabolizar os FOS, resultado este não ocorrido com a linhagem utilizada no presente trabalho.

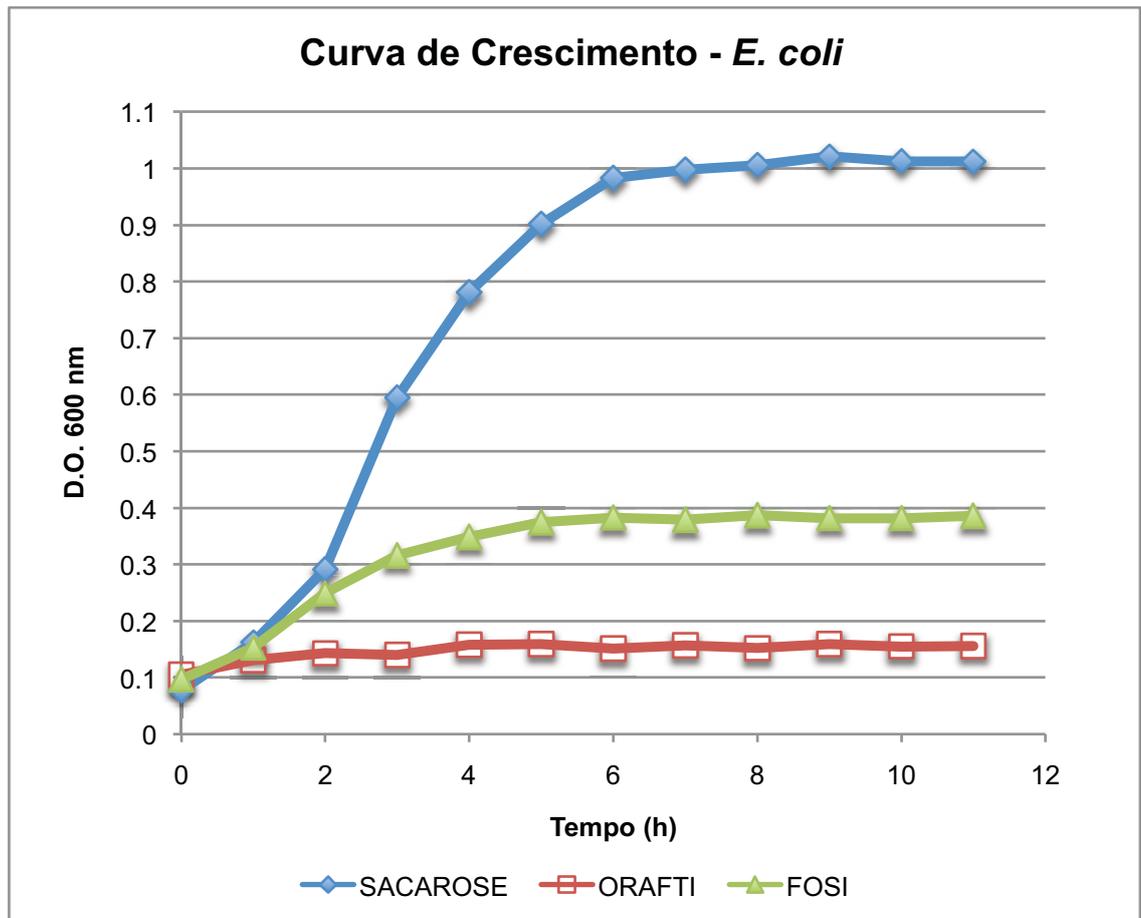


Figura 5: Curva de crescimento de *Escherichia coli* em caldo EC modificado.

A Tabela 4, apresenta os resultados obtidos pela análise estatística de ANOVA, sobre os dados do crescimento de *E. coli*, onde mostraram extremamente significativos ($p < 0,0001$). Nota-se que a maior média obtida foi com o meio contendo sacarose na formulação, seguida pelo meio com FOS I.

Tabela 4: Análise de variância ANOVA para medidas repetidas

Açúcares	Nº de pontos	Média	Desvio Padrão	
Sacarose	12	0.7368	0.3626	
ORAF TI	12	0.1472	0.01590	$p < 0,0001$
FOS I	12	0.3198	0.1002	

No entanto, ao realizar o teste de Tukey-Kramer, os resultados apontaram para uma diferença não significativa entre o meio contendo FOS I e o ORAFTI (Tabela 5). Este resultado é interessante, pois demonstra que o produto FOS I produzido teve impacto análogo ao ORAFTI, sobre o crescimento de *E. coli* e mesmo apresentando-se significativamente diferente do ORAFTI, no caso do crescimento de *Lactobacillus* sp., foi a comparação que apresentou o maior P (Tabela 3). Vale ressaltar que o FOS I foi produzido a partir de sacarose comercial de cana-de-açúcar, através de reação enzimática por micélio imobilizado, não passando pelo processo de purificação. Este fato, somado aos resultados obtidos nas curvas, demonstra a potencialidade deste açúcar frente ao carboidrato comercial ORAFTI que é produzido a partir da hidrólise enzimática da inulina (PASSOS & PARK, 2003), que o torna mais caro que o produzido a partir da sacarose. Além disso, o FOS I não passou por separação, processo este realizado por cromatografia industrial. Esta é a fase mais onerosa da conversão enzimática industrial da sacarose em FOS e, atualmente, somente é realizada pela Applexion, situada na França.

Tabela 5: Teste comparativo de Tukey-Kramer

Comparação	Diferença da média	q	P
Sacarose vs ORAFTI	0.5897	11.183	*** P<0.001
Sacarose vs FOS I	0.4170	7.908	*** P<0.001
ORAFTI vs FOS I	-0.1727	3.275	ns P>0.05

5.3- Análise sensorial

5.3.1 – Análise sensorial de iogurte

O método de micro-Kjeldahl apontou um teor de 4,2 % de proteínas no iogurte produzido. De acordo com os dados da Figura 6, observa-se que uma maior porcentagem de provadores avaliou a amostra A2 com notas maiores como 7, 8 e 9 (que segundo escala hedônica é designada desde “gostei moderadamente” até “gostei muitíssimo”), diferentemente das amostras A1 e A3 que foram avaliadas com notas inferiores.

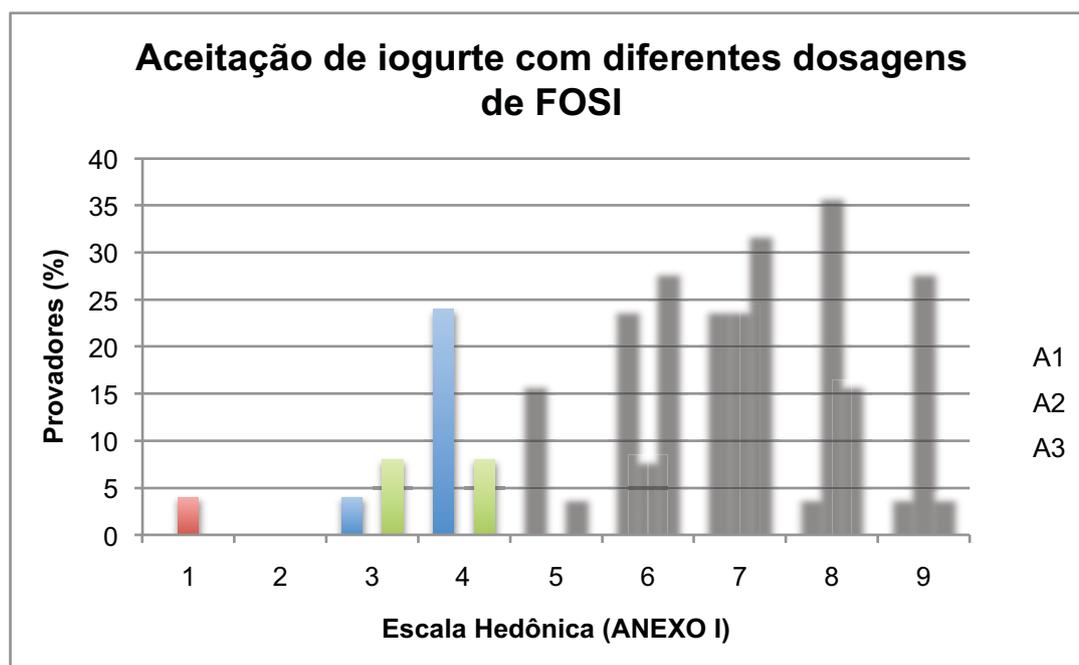


Figura 6: Porcentagem de provadores em relação as diferentes notas da escala hedônica.

A Tabela 6 mostra as médias e respectivos desvios padrões obtidos pelas amostras dos iogurtes formulados. Mostra também que, através do teste estatístico de análise de variância paramétrico (One-way ANOVA) com nível de 5% de significância, foi possível constatar diferenças significativas ($p=0,0002$) entre as formulações testadas.

Tabela 6: Teste de ANOVA (5%) para os diferentes sabores.

<i>Amostras</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	
A1 (50 mL FOS I)	5,680 b*	1,492	
A2 (110 mL FOS I)	7,600 a	1,658	$p= 0,0002$
A3 (170 mL FOS I)	6,320 b	1,547	

* Médias seguidas de mesma letras não diferem entre si ao nível de 5% de significância

Segundo o teste de Tukey-Kramer (Tabela 7) a amostra A2 diferenciou-se das demais onde $p<0,001$ para A1 e $p<0,05$ para A3. A maior pontuação obtida foi para a amostra (A2) que continha 110 mL de FOS I em 500mL de leite UHT, apresentando a melhor aceitabilidade, diferenciando-se de maneira significativa das demais amostras. De acordo com a escala utilizada (ANEXO 2) o valor médio de 7,6 indicou uma aceitabilidade entre "gostei

moderadamente" a "gostei muito".

Outro fator importante observado foi que dos 27 provadores, 96% (24) aceitaram a amostra A2; 28% (7 provadores) rejeitaram a amostra A1 e 16% (4 provadores) mostraram-se indiferentes à mesma. As amostras com 50 mL (A1) e com 170 mL (A3) de **FOS I** não diferiram significativamente ($p>0,05$), obtendo a mesma pontuação em relação a escala hedônica, ambas caracterizadas por “gostei ligeiramente”.

Tabela 7: Teste de Tukey-Kramer (5%) para as diferentes amostras

<i>Comparação</i>	<i>Diferença média</i>	<i>q</i>	<i>P</i>
A1 vs A2	-1,920	6,125	*** $p<0,001$
A1 vs A3	-0,6400	2,042	ns. $p>0,05$
A2 vs A3	1,280	4,083	* $p<0,05$

Por ter apresentado maior aceitabilidade que as amostras A1 e A3, a amostra A2 foi escolhida para ser comparada com a bebida adoçada com sacarose. De acordo com a Figura 7, observa-se que uma maior porcentagem de provadores avaliaram o iogurte adoçado com sacarose com notas maiores como 7, 8 e 9 (notas caracterizadas desde “gostei moderadamente” até “gostei muitíssimo”) e uma porcentagem menor de provadores avaliaram o iogurte adoçado com uma mistura contendo **FOS** com notas como 6, 7 e 8 (caracterizadas desde “gostei ligeiramente” até “gostei muito”) não diferindo muito das notas do iogurte adoçado com sacarose.

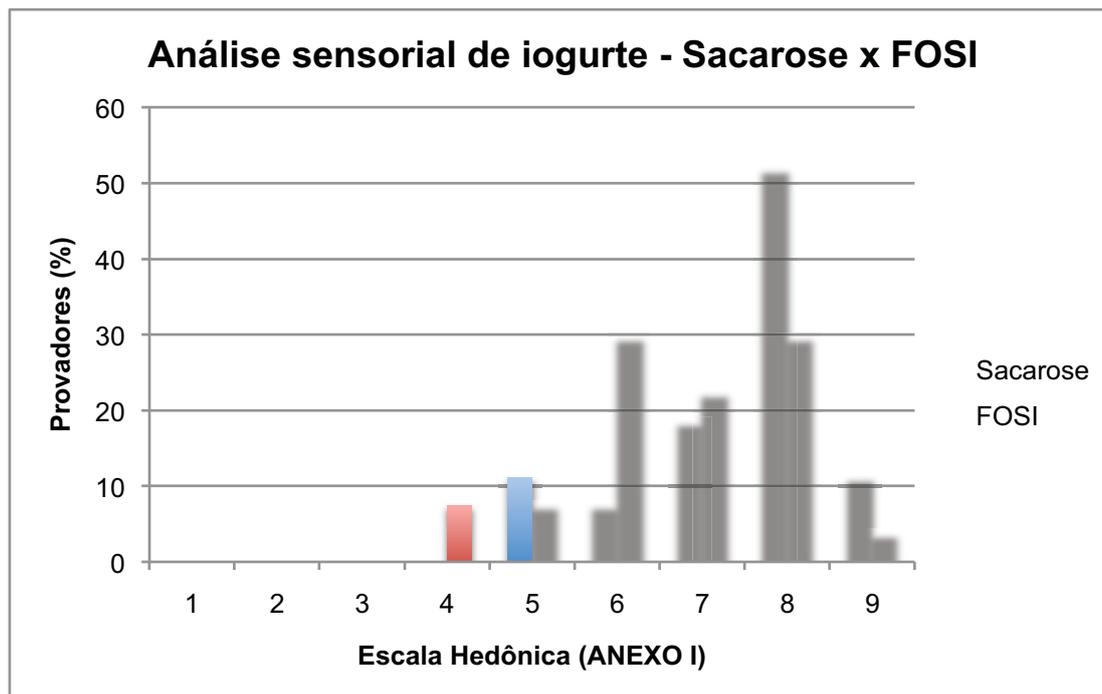


Figura 7: Porcentagem de provadores em relação as diferentes amostras de iogurtes avaliadas através de escala hedônica.

No estudo sensorial comparativo entre as duas amostras foi verificado, através do teste T, que a média de pontuação da amostra de iogurte convencional (adoçado com 70 g de sacarose em 500mL de leite UHT) foi de 7,44 (caracterizada entre “gostei muito” e “gostei muitíssimo”) sendo maior que a média da pontuação para o iogurte adoçado com **FOS I** (110 mL de **FOS I** em 500mL de leite UHT). A média obtida pela formulação com FOS I atingiu 6,70 que se caracteriza como “gostei ligeiramente”. Apesar da significância estatística ($p=0,0309$) entre estes valores e à maior pontuação alcançada pelo iogurte adoçado com sacarose, a aceitabilidade obtida pelo novo produto pode ser considerada bastante satisfatória, uma vez que fora comparado a um produto adoçado com um açúcar que vem agradando o paladar do homem ao longo do tempo.

Tabela 8- Teste T para amostras dependentes. Comparação entre degustação de iogurte convencional e iogurte com FOS. $p<0.05$

	MÉDIA	Desvio Padrão
Iogurte com açúcar	7,44	1,15
Iogurte com FOS I	6,70	1,29

$p=0,043123$

5.3.2 – Análise sensorial de bebida de soja

A Figura 8 mostra que os provadores aceitaram a amostra S1 (2,5% de extrato de soja), sendo que “Gostei Muito” foi a opção de 37% das pessoas com relação a essa amostra. A mesma porcentagem foi repetida na amostra S2 (5% de extrato), porém na opção “Gostei Moderadamente” enquanto que 40% dos provadores rejeitaram a amostra S4 (10% de extrato). É possível notar que 33% dos provadores também optaram por “Gostei Moderadamente” em relação à amostra S3 (7,5% de extrato) contra 20% da amostra S4. As amostras S2 e S3 foram as que obtiveram o maior número de pessoas indiferentes ao produto com 17% e 13% respectivamente. Vale ressaltar que todas as amostras foram elaboradas com a mesma concentração de proteínas (4,2%) encontrada no iogurte produzido.

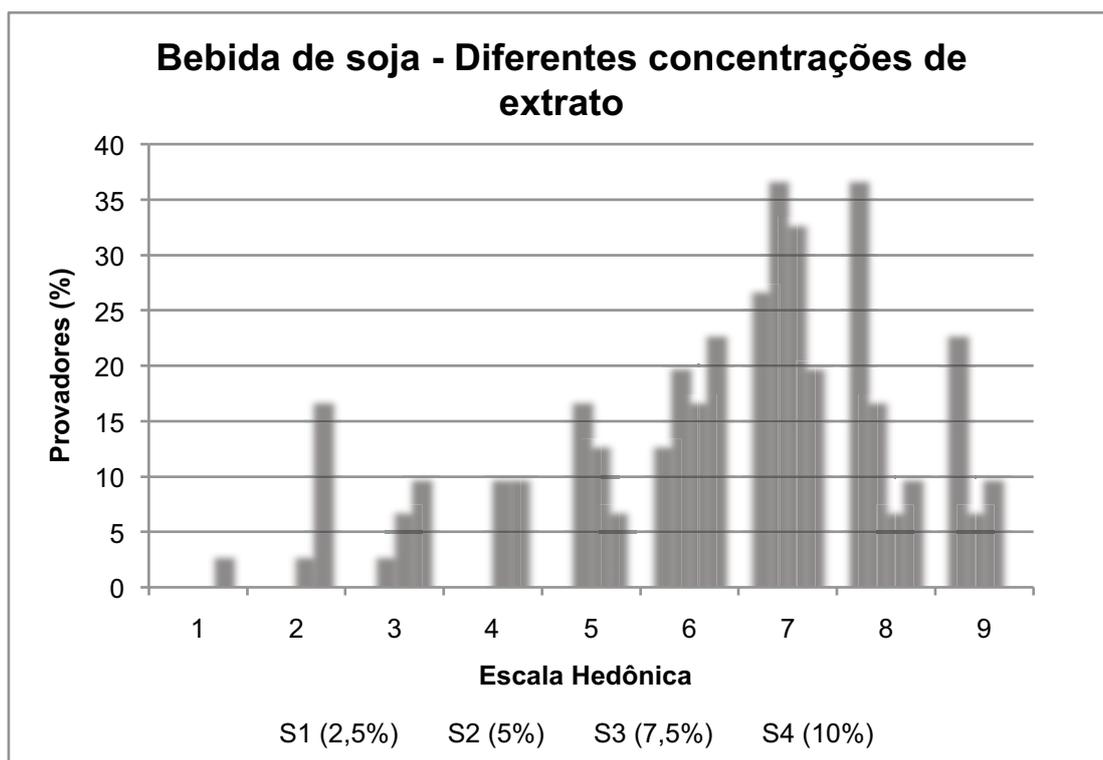


Figura 8: Porcentagem de provadores em relação às diferentes amostras de bebidas de soja avaliadas através de escala hedônica.

De acordo com a análise de variância de ANOVA as amostras apresentaram diferenças extremamente significativas ($p=0,0001$). Tal resultado reflete a pouca homogeneidade de dados entre as amostras, fato este que pode ser avaliado através do teste de

Bartlett indicado para tal situação (MENDES & PINTO, 2007). O resultado deste último teste confirmou os obtidos por ANOVA, porém com $p=0,0003$. Segundo a Tabela 9, a amostra S1, contendo 2,5% de extrato, obteve uma média 7,7 pontos, seguida pela amostra S2 (5% extrato) cuja média foi 6,3.

Tabela 9: Teste de ANOVA (5%) para os diferentes sabores.

<i>Amostras</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>
S1	7.7000	0.987857
S2	6.6333	1.325697
S3	6.1000	1.807074
S4	5.0000	2.149579

Através do teste de Tukey-Kramer (Tabela 10), que confronta diferentes amostras, é possível observar que as diferenças mais significativas foram entre S1 e S4 ($p<0,001$) e S2 e S4 ($p<0,001$). Também houve diferença significativa entre S1 e S3 porém com valor de $p<0,01$. Menos significativa foi a diferença entre as amostras S3 e S4 obtendo $p<0,05$. As amostras S2 e S3 não se diferenciaram significativamente, assim como as amostras S1 e S2.

Tabela 10: Teste de Tukey-Kramer (5%) para as diferentes amostras

<i>Comparação</i>	<i>Diferença média</i>	<i>q</i>	<i>P</i>
S1 vs S2	1,067	3,586	ns. $p>0,05$
S1 vs S3	1,600	5,378	** $p<0.01$
S1 vs S4	2,700	9,076	*** $p<0.001$
S2 vs S3	-0,5333	1,793	ns. $p>0,05$
S2 vs S4	1,633	5,491	*** $p<0.001$
S3 vs S4	1,100	3,698	* $p<0,05$

Com base nos resultados obtidos na análise estatística, onde as amostras S1 e S2 obtiveram a maior média e não se distinguiram significativamente, foi realizada uma nova análise sensorial com provadores diferentes, porém utilizando apenas as duas amostras mais bem avaliadas. Os resultados desta segunda análise foram submetidos ao teste T, onde verificou-se diferença significativa ($p=0,0025$) entre os sabores. Pode-se notar que 84% dos provadores aceitaram a amostra S1 em comparação à amostra S2 que obteve apenas 53%. Desta forma pode-se dizer que existe uma tendência significativa a uma maior aceitação pela amostra S1, com média 6,9 (Tabela 11), com a distribuição das notas principalmente entre os valores “gostei moderadamente” e “gostei muito”(Figura 9).

Tabela 11: Comparação das amostras S1 e S2

<i>Amostras</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>n</i>
S1	6,93	1,38	30
S2	5,80	1,39	30

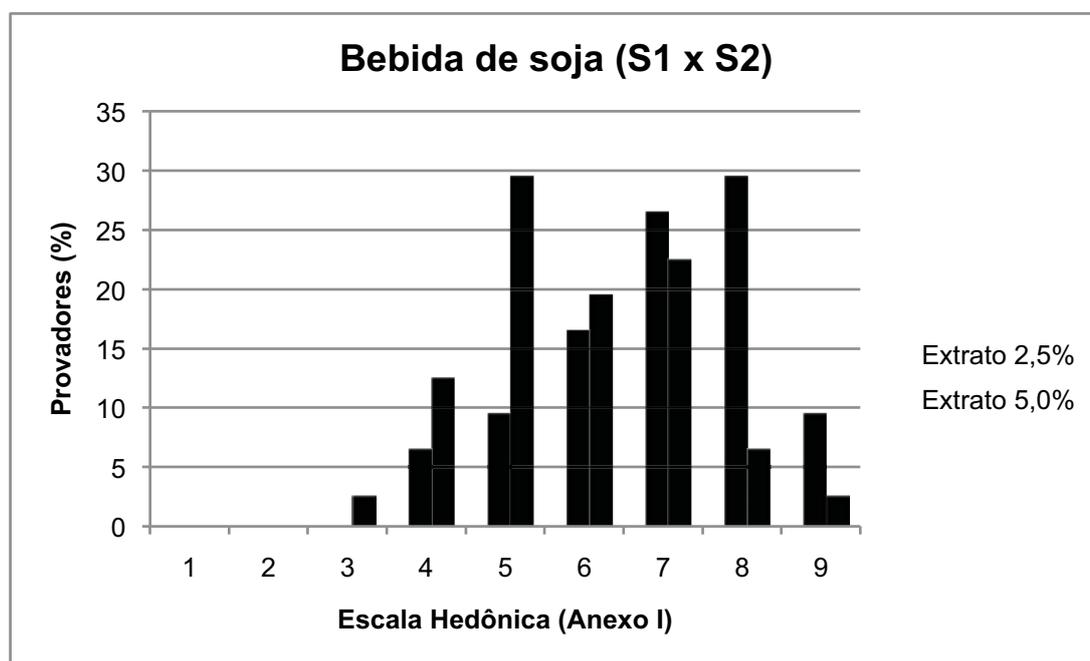


Figura 9: Porcentagem de provadores em relação às amostras S1 e S2 avaliadas através de escala hedônica.

Monteiro et al. (2004) relatam que a aceitação da soja e seus produtos sofrem restrições devido, principalmente, ao seu sabor considerado desagradável, resultado da

associação de compostos carbonílicos de cadeia curta com a fração proteica, catalisados pelas enzimas lipogênases. Sendo assim, a bebida com sabor suave de soja (S1) se destacou por apresentar um sabor leve que agradou a grande maioria, porém com nota abaixo de 7 pontos.

Segundo Yun (1996) os frutooligossacarídeos podem ser usados na formulação de vários alimentos substituindo os açúcares convencionais, pois seu sabor é similar ao da sacarose. Desta forma, outra análise sensorial foi realizada, com 15 provadores, com o intuito de confrontar a amostra S1 com uma bebida de soja adoçada com sacarose. Os resultados obtidos indicaram a tendência de uma boa aceitabilidade para os produtos adicionados de FOS I quando comparados com a bebida adicionada de sacarose. De acordo com Figura 10 e a Tabela 12, a distribuição das notas foi semelhante, sendo que as notas dadas obtiveram média de 6,77 para a bebida adoçada com sacarose e 6,33 para a adoçado com FOS I, não havendo assim diferença significativa ($p=0,94$) quanto às notas dadas pelos provadores, mostrando, assim, que a mistura FOS I pode ser adicionada em substituição ao açúcar convencional em bebida de soja, sem alteração na percepção do sabor doce.

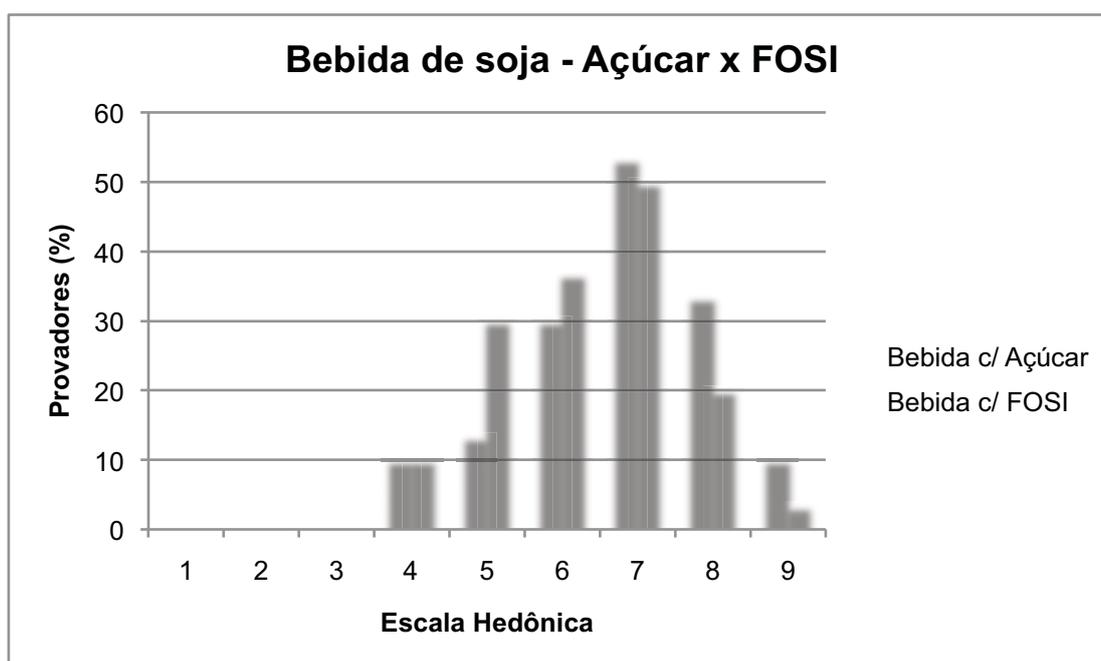


Figura 10: Porcentagem de provadores em relação às bebidas de sojas com sacarose e FOS I avaliadas através de escala hedônica.

Tabela 12: Média da análise sensorial com os diferentes adoçantes

Sucos	Média	Desvio padrão
Bebida c/ Açúcar	6,77	1,27
Bebida c/ FOS	6,33	1,20

Em decorrência da nota obtida na análise acima, fez-se necessária uma comparação com a bebida comercial “Ades” com o objetivo de avaliar seu potencial frente a um produto comercial. De acordo com a Figura 11, os resultados obtidos sugerem que as amostras diferem significativamente, uma vez que o Teste t apresentou $p = 0,004673$, sendo que a bebida comercial “Ades” obteve uma porcentagem de notas mais altas, atingindo uma média de 7,26 , enquanto que a bebida desenvolvida no trabalho apresentou uma média de 6,03 (Tabela 13).

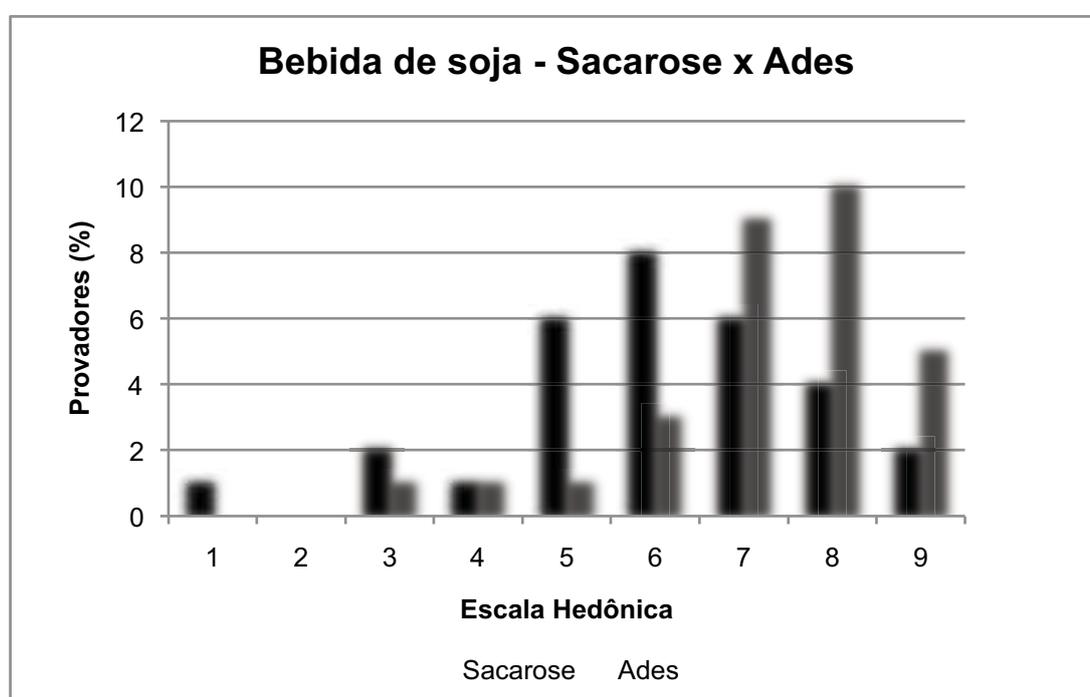


Figura 11: Porcentagem de provadores em relação às amostras sacarose e Ades avaliadas através de escala hedônica.

Tabela 13: Comparação entre marca comercial Ades e Sacarose

Sucos	Média	Desvio padrão	n
Sacarose	6,03	1.79	30
Ades	7,26	1.43	30

Apesar da amostra com sacarose ter tido menor pontuação em relação ao produto comercial Ades, este último obteve nota menor que 7,5 , o que demonstra que as bebidas formuladas com soja, de um modo geral, não agradaram ao paladar da maioria dos provadores, principalmente quando comparadas com notas obtidas pelas amostras formuladas

com iogurte. É importante ressaltar ainda, que a diferença entre as amostras avaliadas pode ser em decorrência do produto comercial Ades, provavelmente conter supressor de aroma que atenua o gosto forte da soja.

5.4 - Contagens de Coliformes totais e Bactérias Láticas pelo método de plaqueamento *pour plate* em ÁGAR VRB e ÁGAR MRS, respectivamente.

A Tabela 14 apresenta a média dos resultados de todos os grupos, obtidos na contagem de colônias pelo método de plaqueamento *pour plate*, além do Ln das mesmas, nos dois meios testados.

Tabela 14: UFC/g de fezes dos dois meios testados

Grupos				
	Média T0 - VRB		Média Tf - VRB	
	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
GC	$4,70 \times 10^5 \pm 0,76 \times 10^5$	13,01	$5,09 \times 10^5 \pm 0,83 \times 10^5$	13,12
Ga1	$4,74 \times 10^5 \pm 0,77 \times 10^5$	13,03	$5,54 \times 10^5 \pm 0,90 \times 10^5$	13,21
Ga2	$4,60 \times 10^5 \pm 0,75 \times 10^5$	12,89	$4,28 \times 10^5 \pm 0,70 \times 10^5$	12,90
Ga3	$3,77 \times 10^5 \pm 0,61 \times 10^5$	12,83	$4,35 \times 10^5 \pm 0,71 \times 10^5$	12,96
Ga4	$8,37 \times 10^5 \pm 1,36 \times 10^5$	13,63	$5,00 \times 10^5 \pm 0,81 \times 10^5$	13,08
Gi1	$7,27 \times 10^5 \pm 1,18 \times 10^5$	13,49	$5,50 \times 10^5 \pm 0,89 \times 10^5$	13,09
Gi2	$7,00 \times 10^5 \pm 1,14 \times 10^5$	13,39	$2,84 \times 10^5 \pm 0,46 \times 10^5$	12,53
Gi3	$7,37 \times 10^5 \pm 1,20 \times 10^5$	13,50	$5,49 \times 10^5 \pm 0,89 \times 10^5$	13,21
Gi4	$8,44 \times 10^5 \pm 1,37 \times 10^5$	13,64	$2,70 \times 10^5 \pm 0,44 \times 10^5$	12,49
Gs1	$5,86 \times 10^5 \pm 0,95 \times 10^5$	13,21	$5,58 \times 10^5 \pm 0,91 \times 10^5$	13,21
Gs2	$5,90 \times 10^5 \pm 0,96 \times 10^5$	13,27	$4,88 \times 10^5 \pm 0,79 \times 10^5$	12,98
Gs3	$6,56 \times 10^5 \pm 1,07 \times 10^5$	13,39	$5,75 \times 10^5 \pm 0,93 \times 10^5$	13,26
Gs4	$7,53 \times 10^5 \pm 1,22 \times 10^5$	13,52	$4,27 \times 10^5 \pm 0,69 \times 10^5$	12,65

Grupos	Média T0 - MRS		Média Tf - MRS	
	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
GC	$1,09 \times 10^7 \pm 0,23 \times 10^7$	16,06	$1,81 \times 10^7 \pm 0,38 \times 10^7$	16,26
Ga1	$1,66 \times 10^7 \pm 0,35 \times 10^7$	16,55	$2,30 \times 10^7 \pm 0,48 \times 10^7$	16,12
Ga2	$2,90 \times 10^7 \pm 0,61 \times 10^7$	17,03	$5,37 \times 10^7 \pm 1,12 \times 10^7$	17,76
Ga3	$3,04 \times 10^7 \pm 0,64 \times 10^7$	16,99	$2,09 \times 10^7 \pm 0,44 \times 10^7$	16,83
Ga4	$2,62 \times 10^7 \pm 0,55 \times 10^7$	17,04	$4,23 \times 10^7 \pm 0,89 \times 10^7$	17,49
Gi1	$2,05 \times 10^7 \pm 0,43 \times 10^7$	16,80	$4,27 \times 10^7 \pm 0,89 \times 10^7$	17,36
Gi2	$2,14 \times 10^7 \pm 0,45 \times 10^7$	16,69	$3,40 \times 10^7 \pm 0,71 \times 10^7$	16,92
Gi3	$2,36 \times 10^7 \pm 0,49 \times 10^7$	16,96	$3,04 \times 10^7 \pm 0,64 \times 10^7$	16,96
Gi4	$1,65 \times 10^7 \pm 0,35 \times 10^7$	16,60	$3,53 \times 10^7 \pm 0,74 \times 10^7$	17,37
Gs1	$2,61 \times 10^7 \pm 0,55 \times 10^7$	17,04	$2,59 \times 10^7 \pm 0,54 \times 10^7$	17,03
Gs2	$1,82 \times 10^7 \pm 0,38 \times 10^7$	16,69	$3,89 \times 10^7 \pm 0,81 \times 10^7$	17,47
Gs3	$2,15 \times 10^7 \pm 0,45 \times 10^7$	16,87	$2,82 \times 10^7 \pm 0,59 \times 10^7$	17,15
Gs4	$1,72 \times 10^7 \pm 0,36 \times 10^7$	16,63	$2,99 \times 10^7 \pm 0,63 \times 10^7$	17,21

5.4.1 Grupo Controle

É possível notar na Figura 12 que o grupo controle (GC) obteve pequeno aumento na contagem de coliformes após três meses de experimentação. Porém, este aumento foi considerado não significativo para $p < 0,05$ ao aplicar o teste estatístico não paramétrico de Wilcoxon ($p = 0,067$). Dos sete ratos deste grupo, dois apresentaram problemas em relação à contagem das placas durante a experimentação (ANEXO I). Em decorrência do menor número de sujeitos, este grupo foi também avaliado pelo método estatístico não pareado de Mann-Whitney. O resultado confirmou a estatística de Wilcoxon concluindo, portanto, que não houve diferença significativa para $p < 0,05$ em decorrência do alto valor de P ($p = 1,0$) obtido. Em relação aos lactobacilos, é possível notar que também houve um aumento no número de UFC/g porém este aumento também não foi considerado significativo de acordo com o teste Wilcoxon ($p = 0,375$). Estes resultados eram esperados, uma vez que os ratos do grupo controle não receberam nenhuma suplementação.

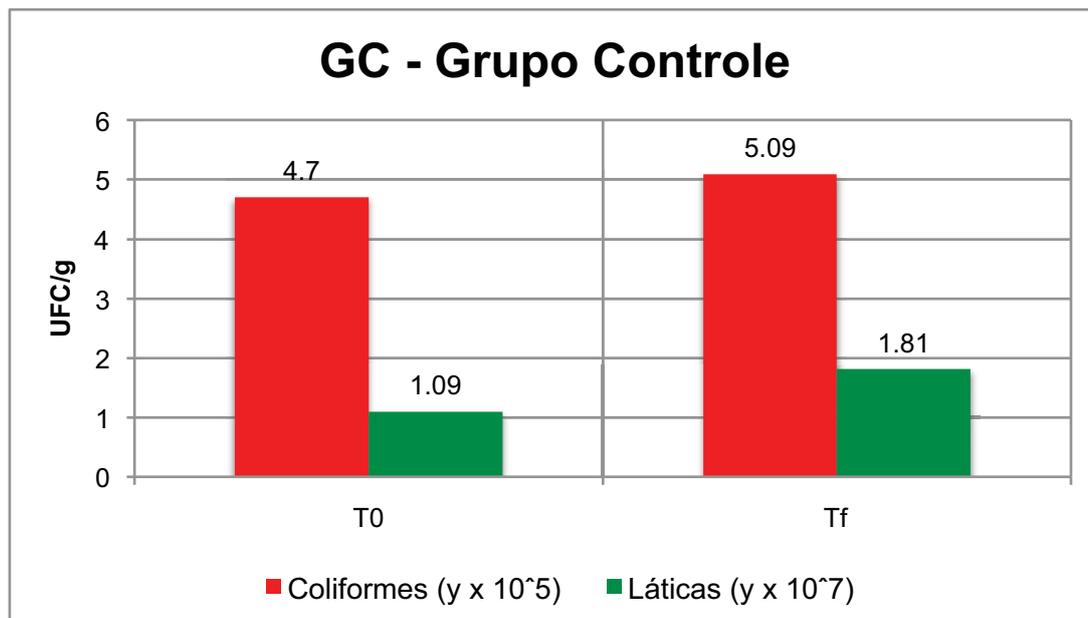


Figura 12: Grupo Controle (GC) - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

5.4.2 - Grupo Água

5.4.2.1 - Subgrupo Ga1

Em relação ao subgrupo Ga1 (suplementado com água e sacarose) foram verificadas diferenças significativas, quanto ao número de UFC/g nos dois meios testados. De acordo com a Figura 13, pode-se observar um aumento na concentração das bactérias cultivadas em meio VRB e das bactérias láticas, cultivadas em meio MRS. A análise estatística por Wilcoxon sugere que há diferença significativa ($p=0,0313$) em relação às quantidades de coliformes antes e depois de três meses de suplementação. A concentração de lactobacilos também aumentou de forma significativa ($p=0,0320$). Estes dados são interessantes, pois revelam uma tendência de aumento de bactérias na presença de sacarose. Segundo Falcão (1976) grande parte dos coliformes fermentam a sacarose por serem dotados de sistema enzimático necessário para metabolizar este carboidrato. Por esta razão acabam por competir com as bactérias láticas que, apesar de também possuírem tal capacidade, perdem rendimento na competição pelo referido carboidrato.

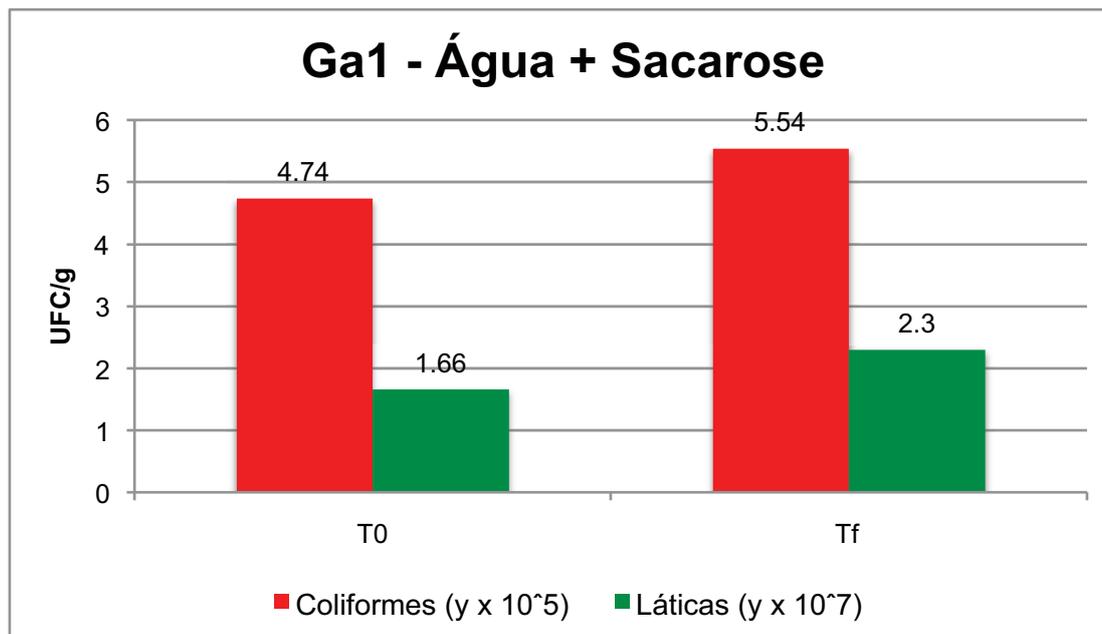


Figura 13: Subgrupo Ga1 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

5.4.2.2 - Subgrupo Ga2

O teste pareado não paramétrico de Wilcoxon, considerou não significativa ($p > 0,999$) a diferença obtida na concentração de coliformes no grupo Ga2 (água + FOS I - 49,7%). Por outro lado a mesma metodologia classificou como significativo ($p = 0,0298$) o aumento de bactérias do grupo dos lactobacilos. Estes resultados demonstram que, na presença de frutooligossacarídeos, os lactobacilos apresentam vantagem competitiva em relação às bactérias do grupo dos coliformes, que diminuiu, porém não significativamente (Figura 14). Isto provavelmente se explica pela presença de mono e dissacarídeos residuais no produto. Este resultado mostra-se importante, pois mesmo a presença de açúcares metabolizáveis, não promoveu aumento de coliformes, como ocorreu no subgrupo Ga1 supracitado. Estes dados confirmam os resultados obtidos nas curvas de crescimento do presente trabalho (Figuras 4 e 5). Mostram-se, também, de acordo com Gibson & Roberfroid (1995) que descreveram a diminuição dos níveis de Bacterioides, Clostridia e coliformes, após uso contínuo de FOS em seu cultivo.

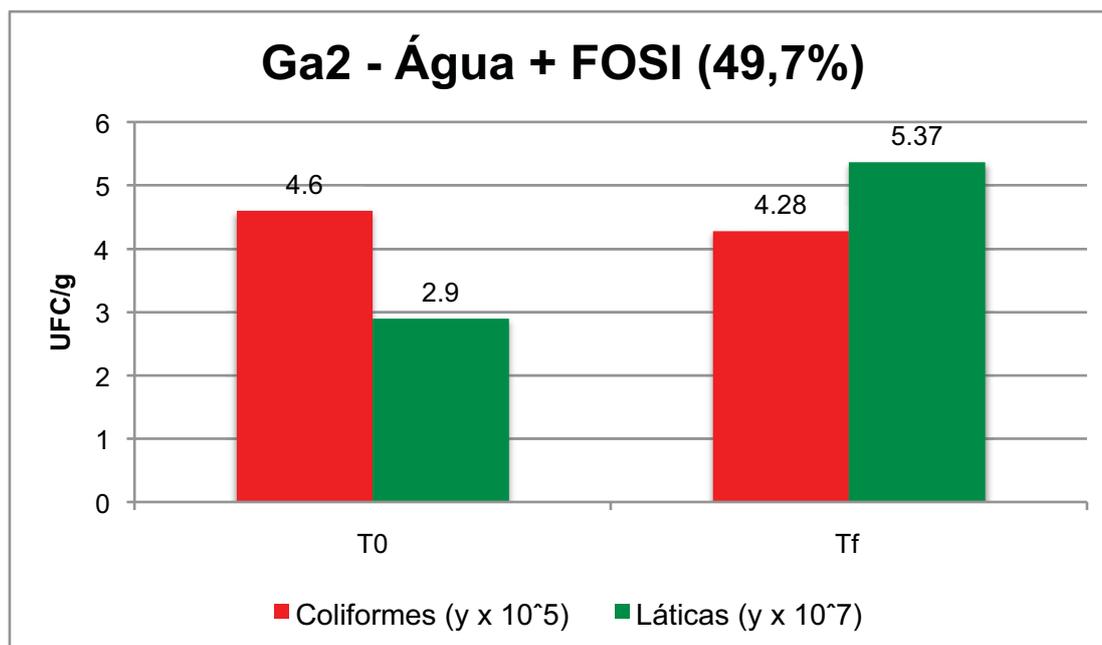


Figura 14: Subgrupo Ga2 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

5.4.2.3 - Subgrupo Ga3

A Figura 15 demonstra que, apesar de apresentar diferenças pós suplementação no grupo Ga3 (água +FOS II – 31,3%), estas não foram consideradas significativas: nem para coliformes ($p=0,4375$) e nem para lactobacilos ($p=0,6875$) segundo o método não paramétrico pareado. Como no experimento do grupo controle, houve problema com a contagem das placas de meio VRB, onde dois ratos foram excluídos. Por esta razão, efetuou-se o teste não pareado de Mann-Whitney, onde foi possível confirmar o dado obtido pelo método de Wilcoxon, porém com $p=0,1508$. Estes resultados estão de acordo com Van Loo et al. (1999) ao relatarem que subdoses de prebióticos podem causar efeito limitado ou nulo sobre a microbiota intestinal. Em estudos realizados por Kullen et al. (1998), em que foram verificados os efeitos de três **NDOs** sobre a população cecal de bifidobactérias e *Clostridium perfringens* em ratos, verificou-se que dois deles (oligossacarídeo de farelo de trigo - WBOS e oligossacarídeo de soja - SBOS) provocaram aumento em ambas as populações microbianas. Verificaram, também, que o tratamento com frutooligossacarídeos (FOS) não provocou diferenças significativas entre o grupo controle e o experimental, o que foi confirmado pelos dados obtidos no presente trabalho. Tal fato é curioso, pois apesar de não serem encontradas diferenças significativas antes e após a suplementação, como ocorreu no grupo controle, os sujeitos deste subgrupo receberam uma bebida contendo 68,7% de açúcares convencionais. Era de se esperar que tais açúcares contribuíssem para o aumento de coliformes e

lactobacilos, assim como ocorreu no grupo Ga1 que continha açúcar convencional. Desta forma é possível supor que a pequena quantidade de frutooligossacarídeos presentes no produto contribuiu para manutenção da flora intestinal dos animais, mesmo na presença de maior concentração de açúcares convencionais.

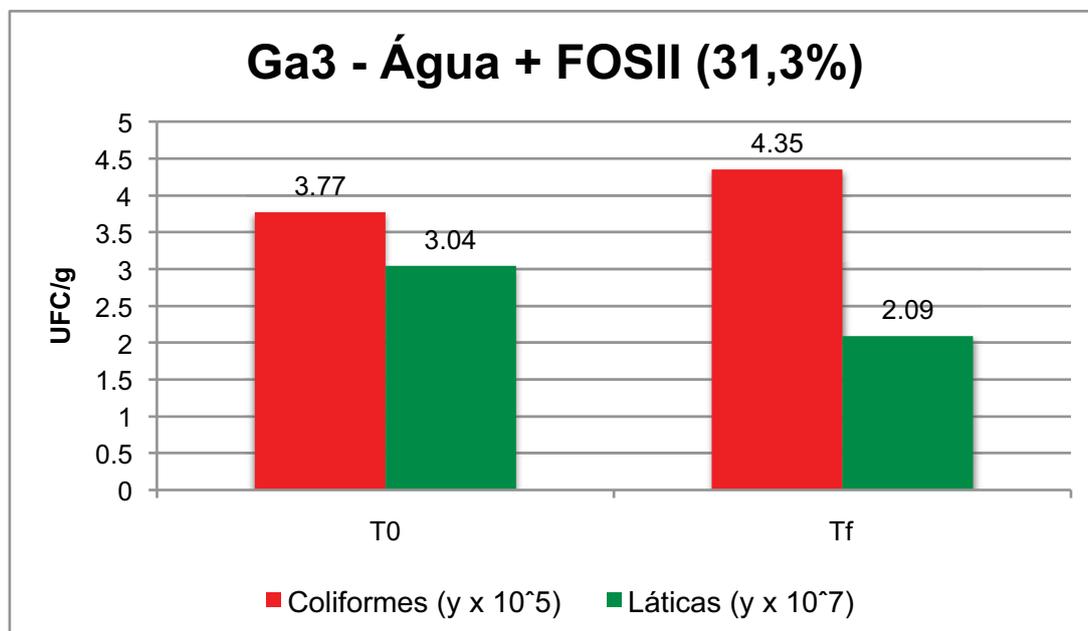


Figura 15: Subgrupo Ga3 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

5.4.2.4 - Subgrupo Ga4

A Figura 16 ilustra os dados obtidos pelo subgrupo Ga4, que mostram o melhor resultado quanto à diminuição de bactérias e aumento de lactobacilos, entre todos os subgrupos do grupo **Ga**. Ao utilizar como suplementação o ORAFIT, que se trata de uma mistura composta apenas por frutooligossacarídeos, obteve-se ganho significativo ($p=0,0145$) na concentração de lactobacilos e diminuição no número de coliformes ($p=0,0239$). Estes dados são análogos aos obtidos por Rao (2001), que ao estudar o efeito da ingestão de oligofrutose em humanos, por três semanas, concluiu que este carboidrato estimula seletivamente o crescimento de bifidobactérias. Estes dados foram confirmados por Freitas & Jackix (2005), que observaram um aumento na contagem de bifidobactérias, ao estudar o efeito prebiótico de frutooligossacarídeos em suco misto. As curvas de crescimento (Figuras 4 e 5) realizadas no presente trabalho confirmaram a seletividade deste carboidrato para efeito de crescimento de lactobacilos. Segundo Gebbink et al. (1999) a adição de 5% de frutooligossacarídeo (**FOS**), em dietas para leitões recém desmamados, demonstrou a ação efetiva destes compostos no aumento na população de bactérias láticas, redução do pH e

diminuição na contagem de *Escherichia coli*. Da mesma forma, Stanley et al. (1996) já haviam observado significativa redução na contagem de coliformes totais ($2 \log_{10}$) em cecos de frangos de corte que receberam 0,2% de lactulose (O- β -D-galactopiranosil (1-3) β -D-frutofuranosídeo) na dieta. Os prebióticos, quando adicionados à dieta, estimulam o crescimento e a estabilidade das populações microbianas produtoras de ácidos orgânicos, em detrimento às demais, ao reduzirem o pH luminal. Este fator, juntamente com enzimas produzidas por estes micro-organismos, inibem a proliferação da flora intestinal danosa, composta por micro-organismos como *Escherichia coli*, *Clostridium* sp. e *Salmonella*, sensíveis a ambientes ácidos (RADECKI & YOKOYAMA, 1991). Swennen et al. (2006) e Mussatto & Mancilha (2007) relatam a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ácidos acético, propiônico e butírico, a partir da fermentação de oligossacarídeos por bactérias lácticas e sua importância na inibição de bactérias patogênicas.

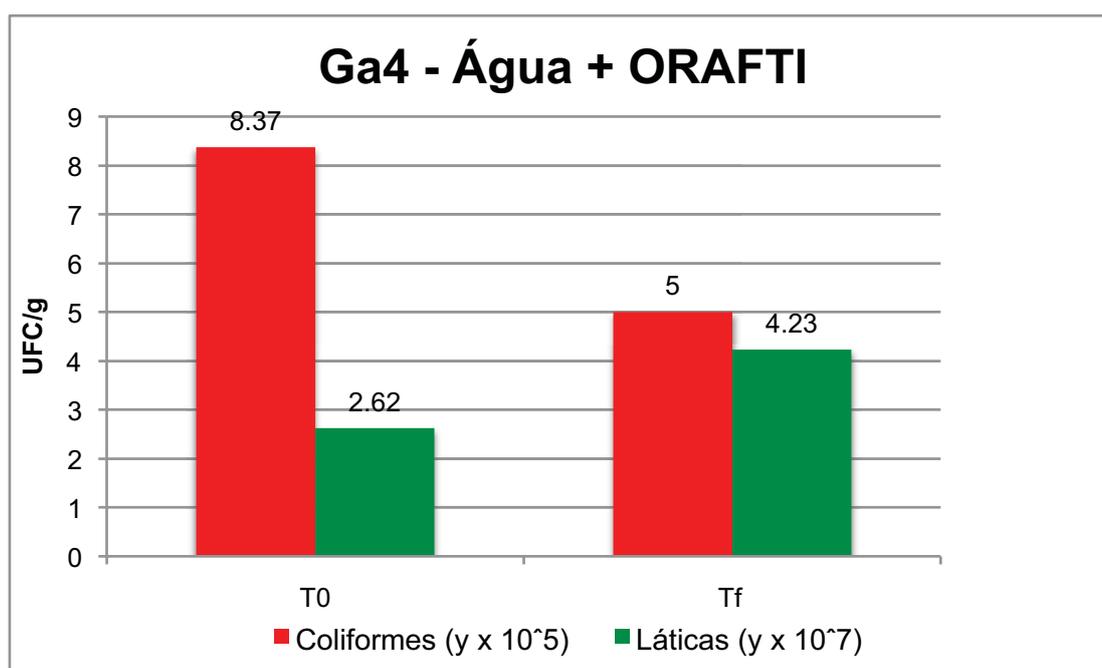


Figura 16: Subgrupo Ga4 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (lácticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

5.4.3 - Grupo Iogurte

5.4.3.1 - Subgrupo Gi1

O grupo **Gi** foi proposto com o intuito de avaliar o efeito dos açúcares acima descritos (sacarose, FOS I, FOS II e ORAFTI), quando combinados com iogurte. O primeiro subgrupo avaliado foi o Gi1 que recebeu um iogurte convencional adoçado com sacarose. De

acordo com o método de Wilcoxon, não houve diferença estatística significativa pós suplementação, nem para o cultivo em meio VRB ($p=0,0625$), nem para o meio MRS ($p=0,0938$). Todavia, a Figura 17 mostra que, mesmo não havendo diferenças significativas, houve tendência à diminuição de coliformes e aumento expressivo de lactobacilos, ao duplicar a sua população. Independente desta observação, o simples fato de não haver alteração significativa pós suplementação, já é um resultado positivo, pois o subgrupo Ga1 do presente trabalho demonstrou que o uso de sacarose e água influenciaram de forma negativa a flora intestinal, promovendo o crescimento de coliformes. Isto mostra que a sacarose, frente ao iogurte, não causa tal impacto, devido à presença de bactérias lácticas e sobretudo ácidos orgânicos presentes na referida bebida.

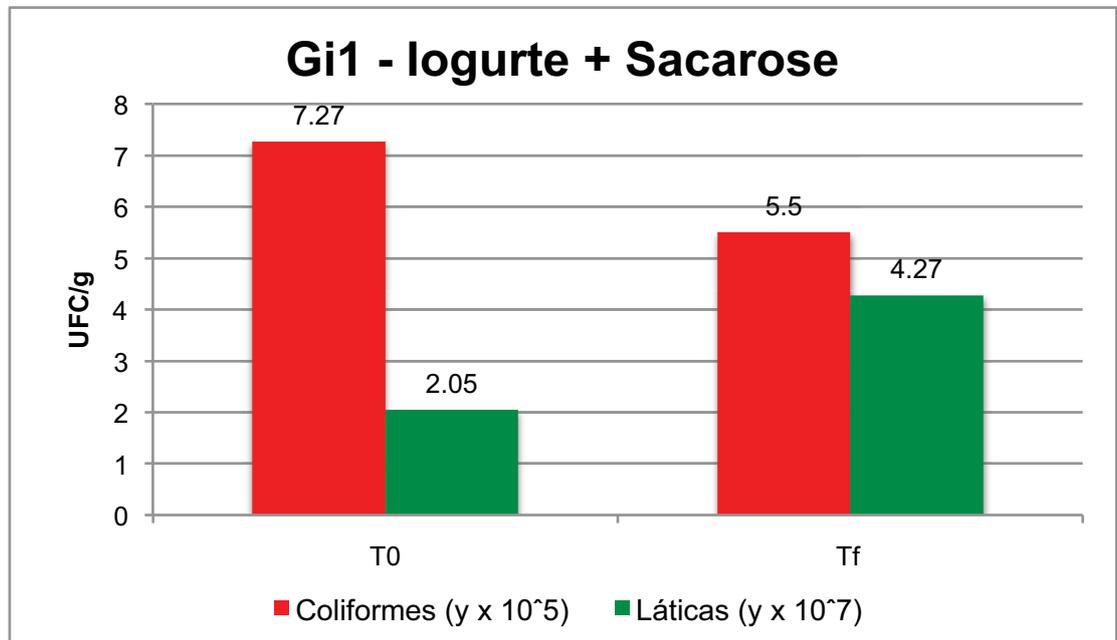


Figura 17: Subgrupo Gi1 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

5.4.3.2 - Subgrupo Gi2

Ao analisar os dados obtidos pela suplementação com o iogurte + FOS I (49,7% de FOS), ou seja o subgrupo Gi2, vistos na Figura 18, observou-se uma significativa ($p=0,0316$) diminuição na concentração celular de coliformes, provavelmente em decorrência da diminuição do pH pela fermentação do produto. Em relação às bactérias lácticas, apesar de um aumento de 59% na concentração destes micro-organismos, a resposta não ocorreu como esperado, uma vez que não foi considerado significativo ($p=0,2785$). Vale ressaltar que o fermento utilizado continha culturas *starter* superconcentradas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, que de acordo com Dave & Shah (1996), possuem efeitos

antagônicos, provocando inibição do crescimento de outras culturas lácticas como bifidobactérias em iogurte, o que pode explicar o fenômeno. Tais autores ressaltaram, também, que os ácidos orgânicos produzidos não têm impacto sobre estas bactérias.

Segundo Gilliland & Speck (1977) citado por Lourens-Hattingh & Viljoen (2001), o peróxido de hidrogênio produzido pelo *L. bulgaricus* causa decréscimo de *L. acidophilus* durante o armazenamento em refrigeração. É importante ressaltar que neste trabalho os iogurtes produzidos foram fornecidos aos animais sem serem submetidos à refrigeração, de modo a descartar esta hipótese como causa do fenômeno. Outro fator a ser considerado, é o relato de Lourens-Hattingh & Viljoen (2001), que afirma existir uma simbiose entre *L. acidophilus* e *B. bifidum*, onde o primeiro exerce efeito promotor do crescimento sobre o segundo. Isto leva a concluir que, ao diminuir a viabilidade de *L. acidophilus*, o *L. bulgaricus* promove também diminuição das colônias de espécies do gênero *Bifidobacterium*. Segundo Brizuela et al. (2001) e Santos et al. (2003) são sete os critérios a serem preenchidos por um micro-organismo para que possa ser empregado como probiótico: i) não apresentar patogenicidade; ii) ser Gram-positivo; iii) ser produtor de ácido e ácido resistente; iv) apresentar especificidade ao hospedeiro; v) apresentar excreção de fator anti-E. coli; vi) ser resistente à bile, e vii) ser viável/estável. Seguindo este critério, Morais & Jacob (2006) sugerem que o *L. bulgaricus* e o *S. thermophilus*, utilizados no presente trabalho não podem ser considerados probióticos. Martinez-Villaluenga et al. (2008), ao avaliarem 14 marcas de iogurtes e fermentados lácteos comercializados no mercado da região de Madri, sugeriram que micro-organismos probióticos possuem capacidade de síntese de GOS (galactooligossacarídeos). Ao quantificarem teores médios destes oligossacarídeos encontraram 0,25% nos iogurtes tradicionais, 0,46% em leites fermentados com *Lactobacillus casei* e 0,54% em leites fermentados por bifidobactérias, sendo, portanto, as duas últimas mais eficientes na produção do GOS.

Em relação às bactérias patogênicas, Chen et al. (1999) relataram diminuição nas contagens de coliformes após uso de iogurte por um período de 8 dias por 34 pessoas e novo aumento destes micro-organismos após 8 dias sem tal suplementação. No entanto, o autor relata aumento de bifidobactérias, fato este não verificado no presente experimento, assim como ocorrido com Fairchild et al. (1999) em experimentos com perus e os obtidos por Farnworth et al. (1992), Gabert et al. (1994) e Orban et al. (1997) em experimento com leitões, ao demonstrarem que a ingestão de alimentos com potencial ação prebiótica nem sempre causa mudanças na microflora intestinal de alguns animais. Estes resultados podem

estar relacionados às diferenças de composição da microbiota entre as espécies animais, às diferenças na estrutura química e propriedades físico-químicas ou à variação na percentagem dos prebióticos presentes ou adicionados à dieta.

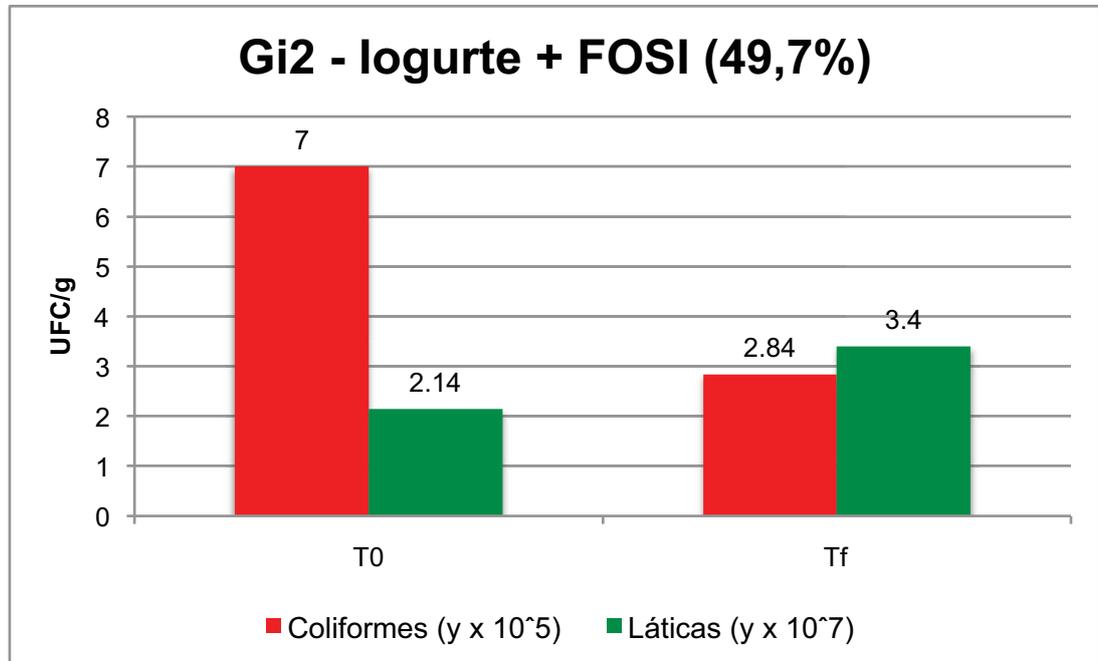


Figura 18: Subgrupo Gi2 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

5.4.3.3 - Subgrupo Gi3

A Figura 19 mostra os dados obtidos no subgrupo Gi3, sendo possível observar diferença significativa ($p=0,0156$) apenas no decréscimo de bactérias crescidas no meio VRB da mesma forma que o ocorrido no subgrupo Gi2. No entanto, é possível notar que houve aumento de 29 % de bactérias láticas, fato este que apesar de não se apresentar como estatisticamente significativo ($p=0,2751$), não pode deixar de ser considerado. Outro fator a ser observado é que esta porcentagem (29%) foi menor que a do subgrupo Gi2 (59%), provavelmente pela suplementação do grupo Gi3 apresentar menos frutooligossacarídeos em sua composição.

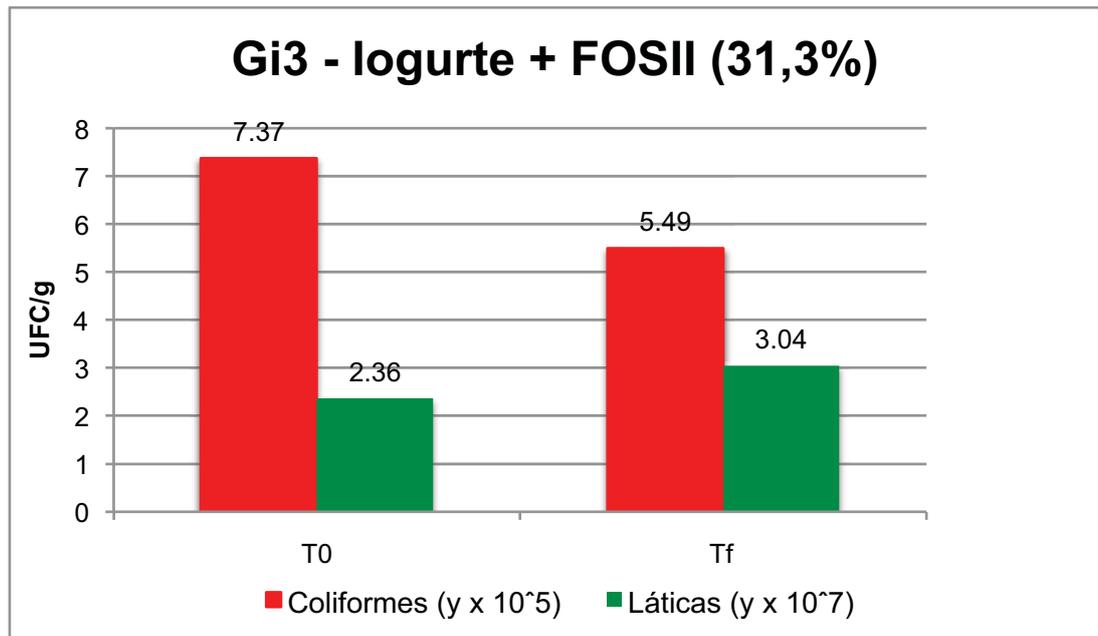


Figura 19: Subgrupo Gi3 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

Para maior facilidade de visualização, os dados obtidos nos grupos Gi2 e Gi3 foram dispostos em gráfico único na Figura 20. Através dela, é possível confrontar crescimentos de colônias em meios formulados com maior e menor concentração de frutooligossacarídeos. O efeito de uma menor concentração de frutooligossacarídeos na formulação do Gi3 produziu menor redução dos coliformes (5,49 para 2,84 UFC/g do Gi2) e moderado menor crescimento de lactobacilos (de 3,04 para 3,4 UFC/g) o que também pode ter sido reforçado pela maior concentração de açúcares convencionais (sacarose, glicose e frutose) no meio. Estes resultados estão de acordo com Macfarlane & Cummings (1999), ao demonstrarem o efeito de diferentes concentrações de frutooligossacarídeos sobre o crescimento de bifidobactérias.

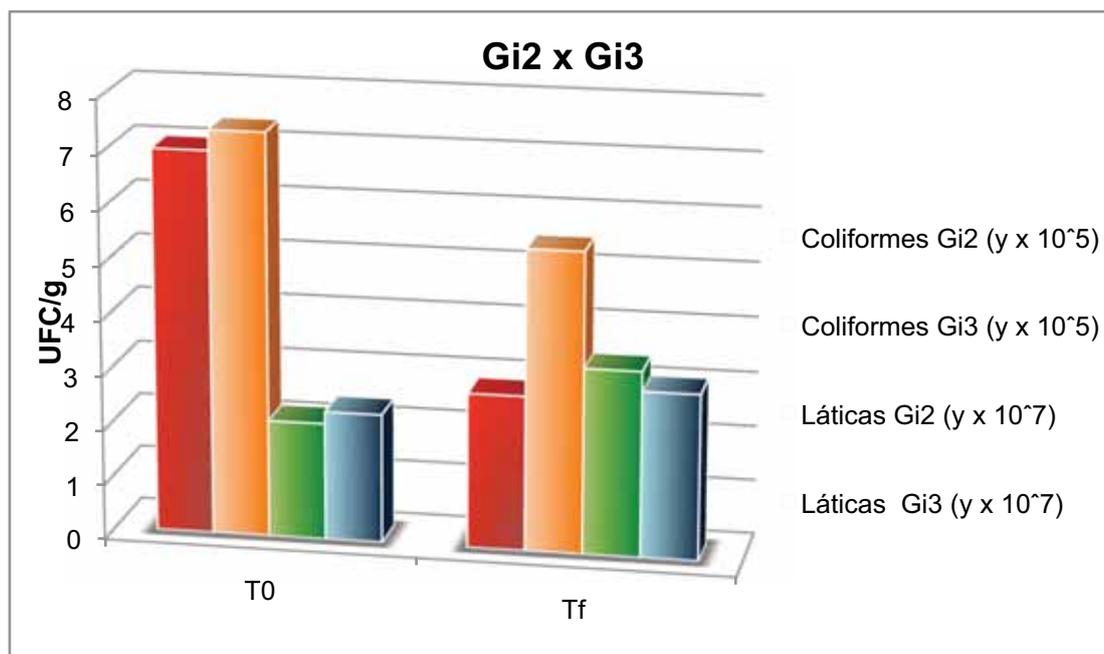


Figura 20: Comparação grupo Gi2 x Gi3 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

5.4.3.4 - Subgrupo Gi4

O teste estatístico para o subgrupo Gi4 (ORAFIT) mostrou diferença significativa para os dois meios testados, onde $p=0,0246$ para bactérias láticas e $p=0,0215$ para coliformes. Este resultado confirma o grande potencial do uso de fructooligossacarídeos puros em um alimento. Ao confrontar este resultado com o grupo Ga4, percebe-se resultado análogo, porém, numericamente, a diferença existente, pré e pós tratamento, foi mais acentuada na amostra Gi4, aparentando maior eficiência na mudança da flora intestinal (Figura 21). Segundo Thamer & Penna (2005), as linhagens utilizadas no presente trabalho, exibem uma relação de protocooperação durante a produção da bebida. A linhagem de *S. thermophilus* cresce rapidamente, utilizando aminoácidos essenciais produzidos por *L. bulgaricus*, enquanto este último beneficia-se dos ácidos láticos e fórmicos, produzidos pelo *S. thermophilus*, que reduzem o pH do meio. Radecki & Yokoyama (1991) supracitados, relatam a inibição de coliformes pela presença de ácidos orgânicos. Desta forma pode-se supor que o iogurte produzido, somado à ação do prébiótico ORAFIT, tenha melhor efeito quando comparado à suplementação realizada no grupo Ga4, onde utilizou-se apenas água e o citado prebiótico. Por esta razão, Pupin (2002), cita o uso de fructooligossacarídeos em uma ampla variedade de alimentos como iogurte, leite, derivados lácteos, extrato de soja, doces, cereais em barra e cereais infantis.

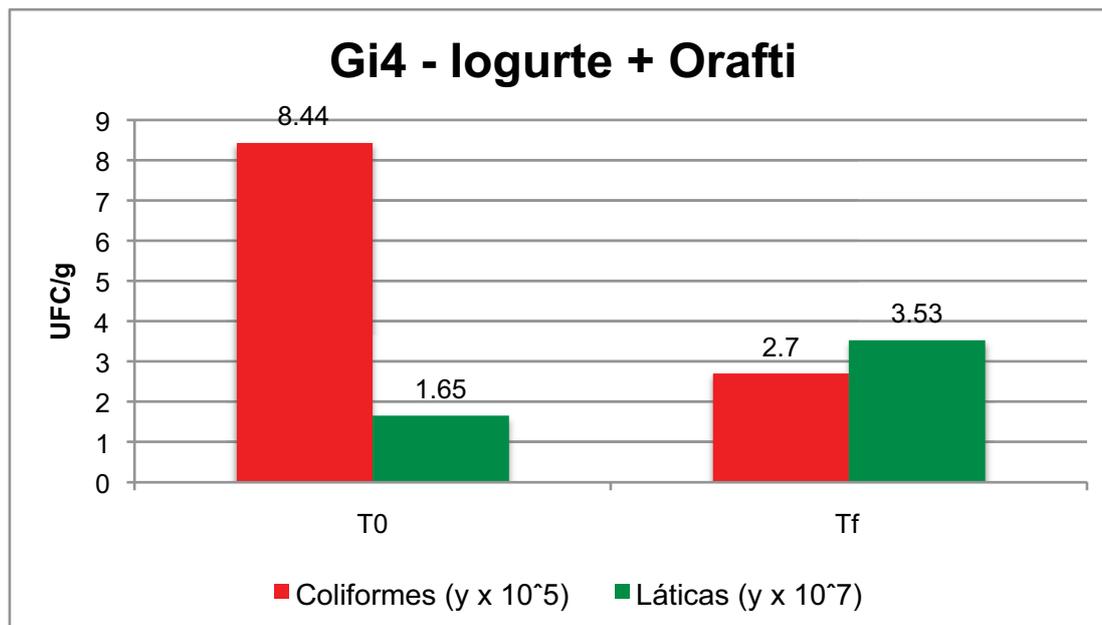


Figura 21: Subgrupo Gi4 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

5.4.4 - Grupo Soja

5.4.4.1 - Subgrupo Gs1

Resultados estatisticamente não significativos ($p=0,4688$ - VRB e $p=1,000$ - MRS) foram obtidos quando ratos foram suplementados com bebida de soja adoçada com sacarose no subgrupo Gs1 (Figura 22). Este fato, apesar de se assemelhar ao ocorrido com subgrupo Gi1, pode ter razões diferentes. Já é de conhecimento científico consagrado (KIM et al., 2003) que os carboidratos representam o segundo maior componente da soja, sendo rica fonte de galactooligosacarídeos (GOS), ou seja, rafinose (aproximadamente 1%) e estaquiase (aproximadamente 4%). Estudando especificamente extratos de soja, Hou et al. (2000) encontraram 1,01 g/L de tais oligossacarídeos em sua composição. A rafinose é um trissacarídeo contendo galactose ligada à unidade de glicose, pertencente à sacarose, por ligação α -(1- \rightarrow 6). A estaquiase é um tetrassacarídeo análogo à rafinose acrescentando-se, apenas, mais uma unidade de galactose (também ligação α -(1- \rightarrow 6)) à unidade de galactose terminal da rafinose (KOGA et al. 2003). Van Loo et al. (1999) relataram a importância dos GOS presentes na soja como potencial ingrediente de alimentos funcionais por apresentar efeito bifidogênico tendo, pois, potencial prebiótico natural. Provavelmente esta foi a razão do não aumento da concentração de coliformes na presença de sacarose adicionada ao extrato de soja, inverso do ocorrido no subgrupo Ga1 (água + sacarose - Figura 13). Quanto às bactérias láticas, os resultados mostram-se interessantes pois, mesmo no meio contendo

galactoligossacarídeos, estas colônias não apresentaram aumento significativo. Vale lembrar entretanto, que como já citado, subdoses de oligossacarídeos, segundo Macfarlane & Cummings (1999), podem não ter total eficiência quanto ao crescimento de culturas láticas. Ainda assim, o uso do extrato de soja foi eficiente ao comparar com o subgrupo Ga1, onde foi verificado aumento significativo das culturas testadas nos dois meios. Outro fato a ser considerado, ao comparar o presente subgrupo com o Gi1, é o pH do produto utilizado na suplementação (4,5 para iogurte e 5,9 para bebida de soja) e a presença de bactérias láticas, mesmo que não probióticas, no iogurte.

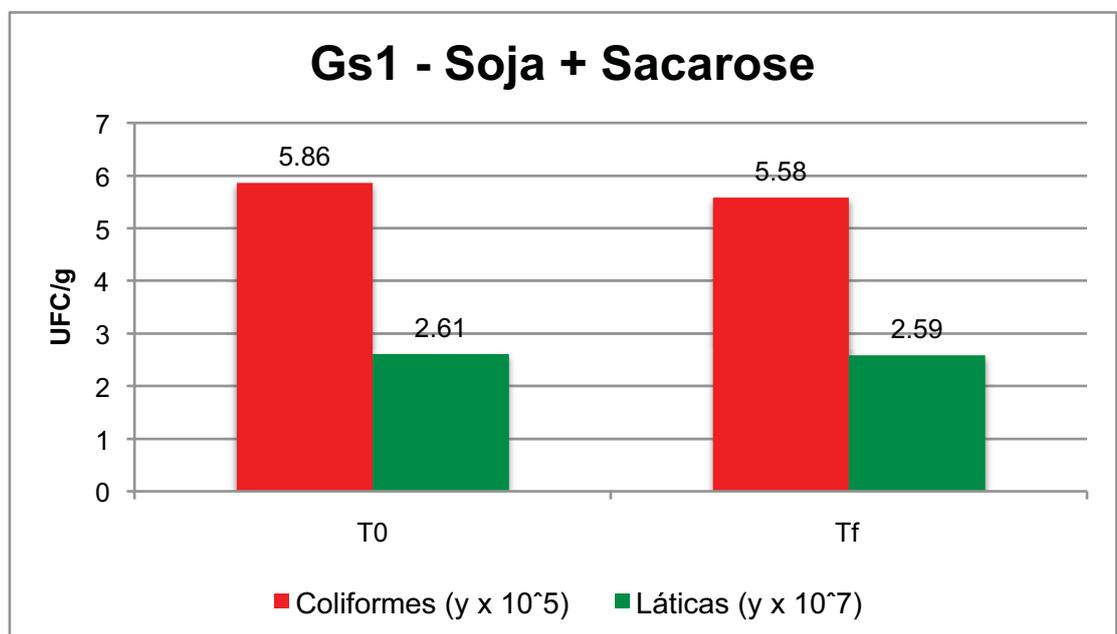


Figura 22: Subgrupo Gs1 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

5.4.4.2 - Subgrupo Gs2

A Figura 23, mostra a presença de coliformes e bactérias láticas nas fezes do subgrupo Gs2, cujos animais receberam extrato de soja suplementado com maior concentração de FOS. E os resultados foram estatisticamente significativos para os dois meios.

Foi verificada diminuição significativa ($p=0,0297$) na contagem de coliformes e aumento de lactobacilos considerado significativo pelo teste de Wilcoxon ($p=0,0524$). Estes resultados demonstram que a presença do extrato de soja somado ao FOS I contribui para a diminuição de bactérias cultivadas em meio VRB, fato este que não ocorreu

significativamente na ausência do extrato de soja no subgrupo Ga2 (água + FOS I - Figura 14). Ao compará-lo com subgrupo Gi2 (iogurte + FOS I - Figura 18), onde houve redução significativa de coliformes e aumento não significativo de culturas lácticas, observou-se vantagem na utilização deste grupo (Gs2). Estes dados estão de acordo com Kullen et al. (1998), que verificaram aumento de bactérias lácticas, quando crescidas em meio contendo oligossacarídeos da soja. Posteriormente, Haully et al. (2005) também mostraram que o extrato de soja é adequado para promover o crescimento de bactérias lácticas, devido à presença de seus galactoligosacarídeos, estaquiose e rafinose.

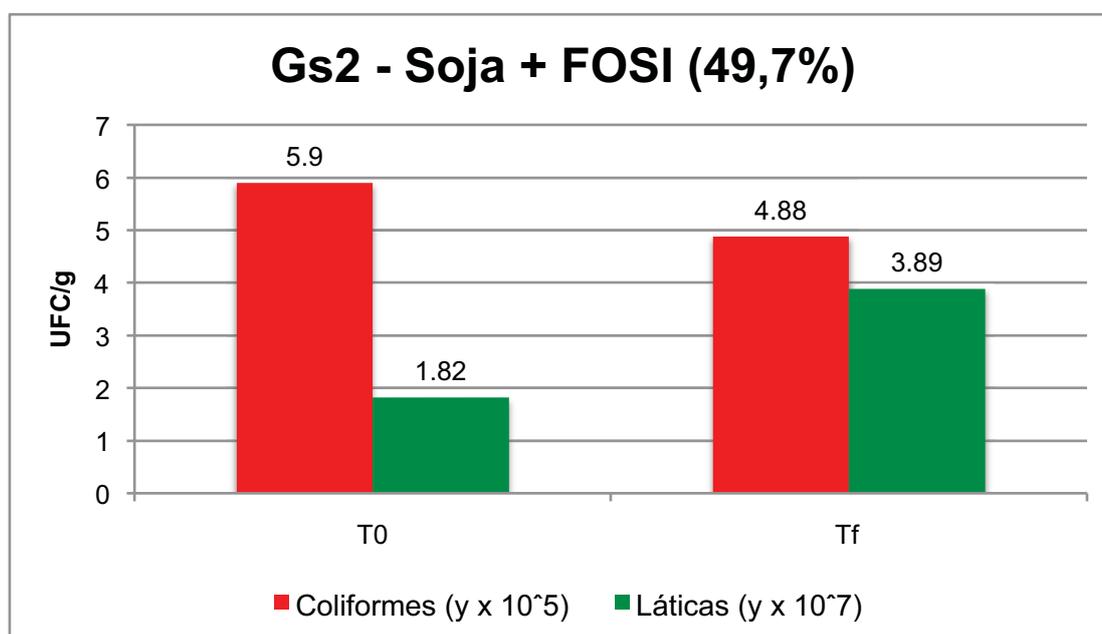


Figura 23: Subgrupo Gs2 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

5.4.4.3 - Subgrupo Gs3

A Figura 24 mostra os dados obtidos com animais que receberam a bebida de soja suplementada com menor teor de FOS (31,3%). Neste grupo obteve-se crescimento significativo ($p=0,0345$ Wilcoxon e $p=0,0436$ Mann-Whitney) na concentração de lactobacilos, apesar de médias de colônias pouco diferenciadas (2,15 no T0 e 2,82 no Tf) quando analisado pelo método. Quanto ao crescimento de coliformes, a diminuição também foi considerada significativa ($p=0,0313$), apesar de médias também pouco diferenciadas, o que evidencia homogeneidade de resultados para todos os animais do grupo.

Assim como no grupo Ga3 e Gi3, a menor quantidade de frutooligosacarídeos acabou por minimizar a ação dos mesmos sobre a microbiota intestinal, fato este que demonstra a importância do produto para o equilíbrio da mesma.

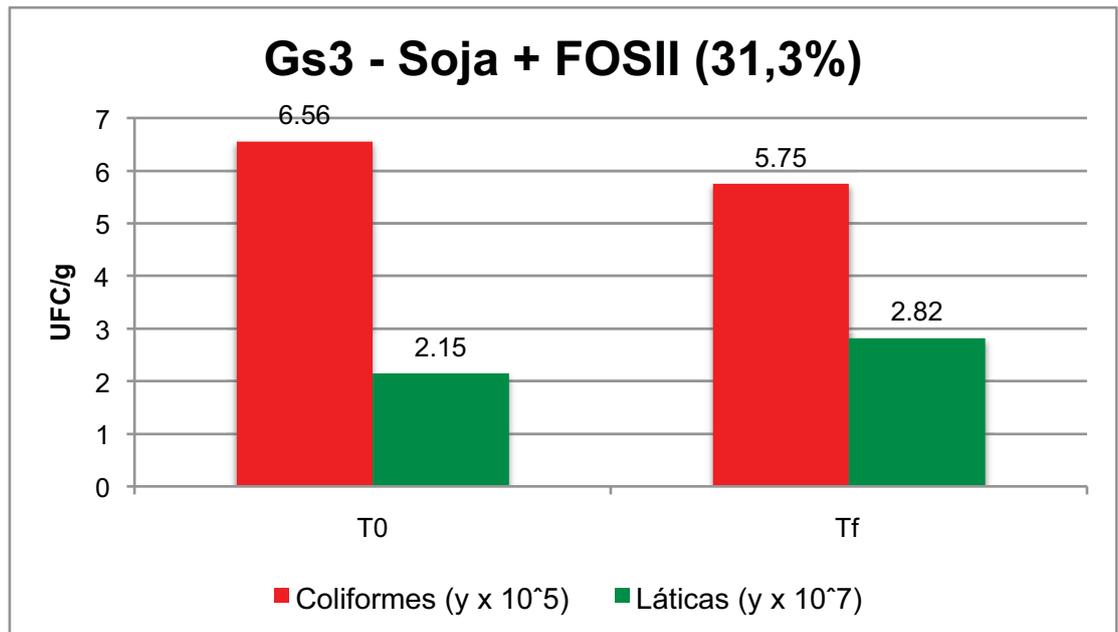


Figura 24: Subgrupo Gs3 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

5.4.4.4 - Subgrupo Gs4

Como mostra a Figura 25, os animais do subgrupo Gs4, como verificado para os dos subgrupos que utilizaram ORAFIT como suplementação (Ga4 e Gi4), obtiveram excelentes resultados no impacto sobre suas populações microbianas. O presente subgrupo, obteve valores significativos tanto para o crescimento de colônias de lactobacilos ($p=0,0302$) como para a diminuição na concentração de coliformes ($p=0,0413$).

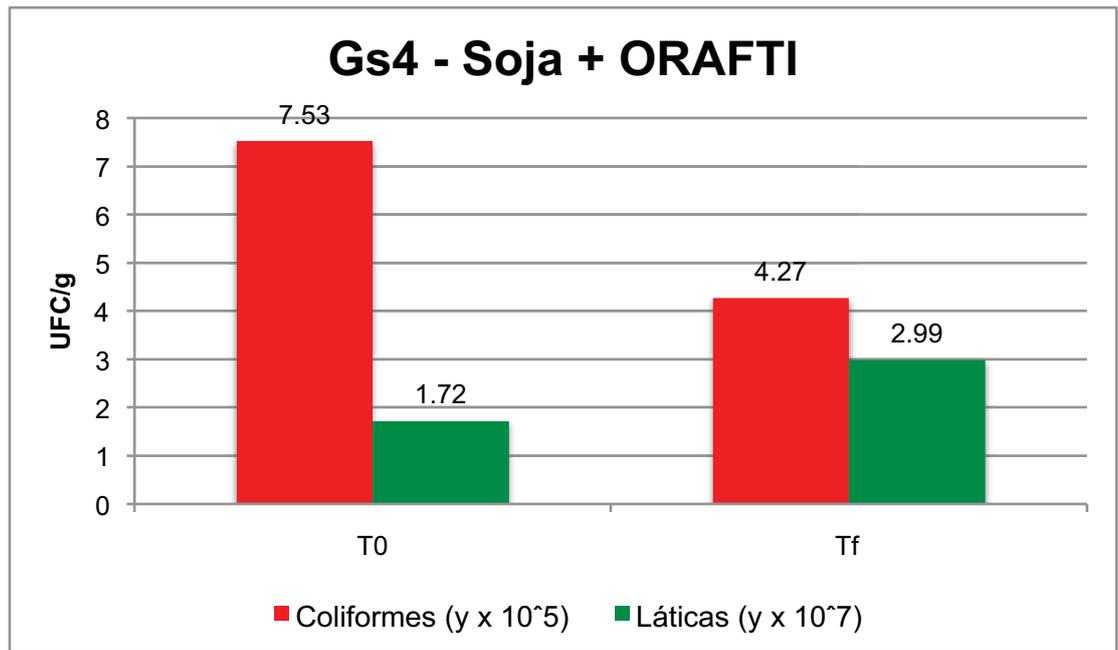


Figura 25: Subgrupo Gs4 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) e MRS (láticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

Nas Figuras 26 e 27 foram dispostos os dados de todos os grupos que receberam ORAFTI como suplementação. Apesar da significância estatística verificada para os dois grupos de bactérias em animais suplementados com soja mais ORAFTI, é possível observar menor impacto sobre as populações, ao comparar o presente subgrupo com o subgrupo e Gi4 que obteve diferenças numéricas maiores com graus de significância também maiores (p menores). No entanto, ao comparar o subgrupo Gs4 com os dados do subgrupo Ga4, mostrou-se superior a este, evidenciando, mais uma vez, o efeito dos galactooligosacarídeos da soja na modificação da microbiota intestinal dos animais testados.

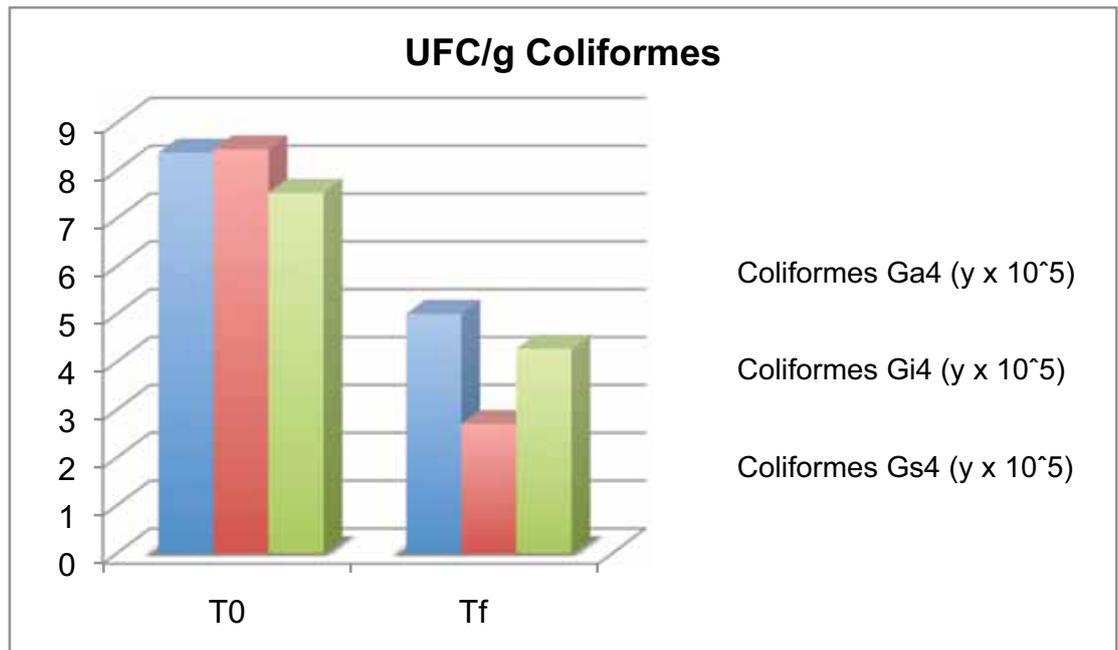


Figura 26: Gráfico comparativo entre os grupos Ga4, Gi4 e Gs4 - UFC/g de fezes nos meios VRB (coliformes) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

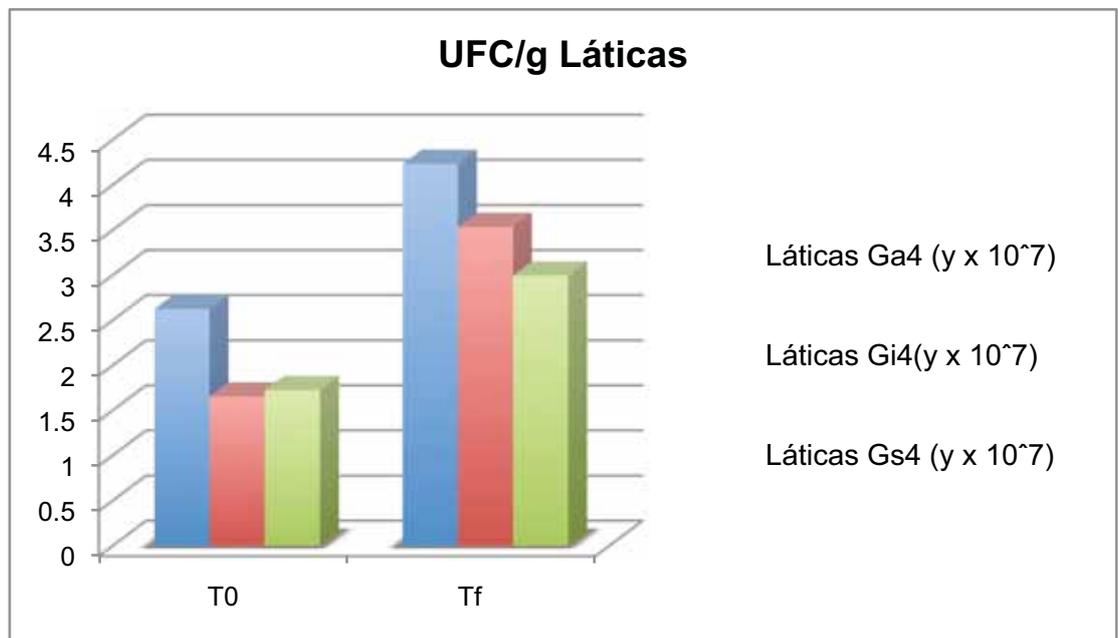


Figura 27: Gráfico comparativo entre os grupos Ga4, Gi4 e Gs4 - UFC/g de fezes nos meios MRS (lácticas) antes (T0) e após (Tf) o período de 3 meses.

Para melhor visualização das alterações da microbiota intestinal dos ratos pertencentes aos subgrupos dos grupos Ga, Gi e Gs, na Figura 28 foram plotadas apenas as diferenças encontradas nas concentrações de coliformes totais e bactérias lácticas entre o T0 e o Tf. Tais dados foram obtidos de T0 - Tf para UFC/g. fezes para coliformes e Tf - T0 para

bactérias lácticas. Foram desprezados os resultados obtidos nos subgrupos suplementados com menor concentração de FOS (Ga3, Gi3 e Gs3) por serem menos expressivos.

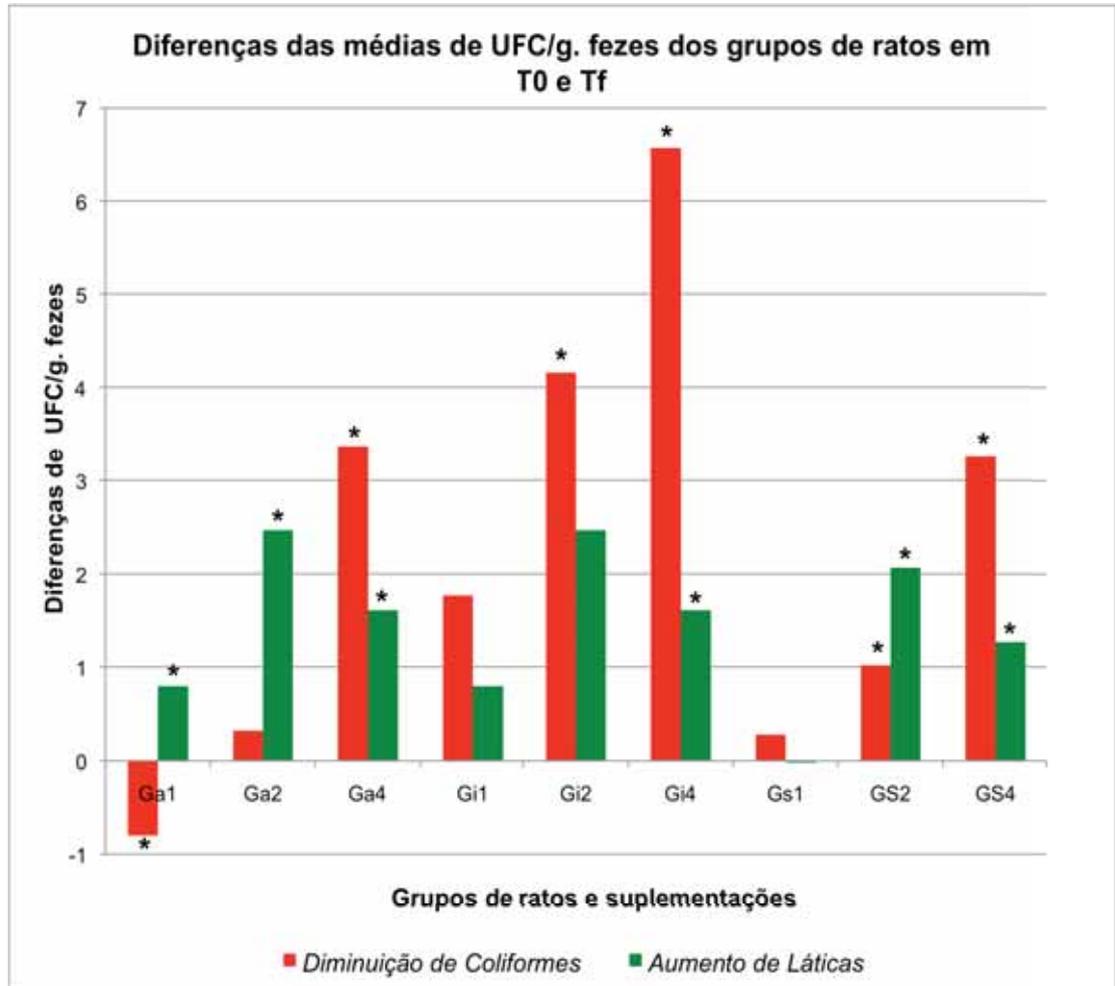


Figura 28: Diferenças das médias de UFC/g de fezes dos animais dos subgrupos água, iogurte e soja entre T0 e Tf.

*** Constatada diferença estatisticamente significativa**

Da citada figura, é possível depreender que o maior impacto no decréscimo de coliformes foi obtido quando o iogurte foi suplementado com o ORAFTI (Gi4) o que talvez seja explicado pelo efeito prebiótico de seus oligossacarídeos com o menor pH do iogurte. Vem a seguir o Gi2, também explicado pela mistura de FOS, (menor concentração que no ORAFTI) e pH, aparecendo em terceiro posto o Ga4 e Gs4, onde se verifica apenas o efeito do ORAFTI. O grupo suplementado com Soja e FOS I (Gs2) também mostrou maior decréscimo de coliformes que o Ga2 devido, provavelmente, à presença de de

galactooligossacarídeos no Gs2. No Ga1 chegou até haver aumento de coliformes no final de três meses de suplementação. Comparando o subgrupo Ga2 com o Gs2, constata-se maior diminuição de coliformes no grupo em que se utilizou o extrato de soja, o que talvez seja explicado pela presença de galactooligossacarídeos naturais da soja neste. Ressalte-se que nas comparações citadas verificou-se significância estatística para todos os dados.

Em relação ao aumento da população de bactérias lácticas nas fezes, o FOS I superou os meios suplementados com ORAFTI, uma vez que os maiores crescimentos de tais bactérias foram encontrados nos subgrupos Ga2, Gs2 e Gi2, apesar de neste último não serem encontradas diferenças estatísticas significativas entre o TF e o T0. Com menor impacto, surgem depois os subgrupos suplementados com ORAFTI, (Ga4, Gs4 e Gs4), portanto independentemente do excipiente utilizado. O maior crescimento de bactérias lácticas no FOS I que nos meios suplementados com ORAFTI está de acordo com a curva de crescimento do *Lactobacillus* sp. (Figura 4). Talvez, o fenômeno seja explicado justamente pela presença de açúcares convencionais sacarose, glicose e frutose naquela mistura que, como visto naquela figura, promoveu maior crescimento do *Lactobacillus* sp entre a segunda e a quarta hora de fermentação. Tal hipótese poderia ser facilmente testada confrontando alterações no crescimento de bactérias lácticas em meio suplementado com ORAFTI purificado e com ORAFTI enriquecido com pequenas porções de açúcares convencionais.

Apesar dos resultados bastante satisfatórios descritos neste trabalho, não se deve descartar o fato de que se trabalhou com ratos e a generalização destes achados para a espécie humana pode ser bastante questionada. Desta forma, para uma próxima etapa, formulações semelhantes devem ser elaboradas e testadas em voluntários humanos.

6 -CONCLUSÕES

1- A cepa de *Aspergillus japonicus* – 119, mantida nos laboratórios da Unesp Assis mostrou-se boa produtora de FOS com, no máximo, três unidades de frutose, deixando de produzir frutossilnístose (4 unidades de frutose), como em pesquisas anteriores.

2- Quando utilizado como fonte única de carbono os FOS I (49,7% de frutoligossacarídeos) mostraram-se eficientes indutores do crescimento de *Lactobacillus* sp e inibidores do crescimento de *E. coli*.

3- As análises sensoriais desenvolvidas neste trabalho mostraram que o FOS I, não purificado, produzido pelo *Aspergillus japonicus* – 119, teve boa aceitação como adoçante e que tal aceitação é melhor quando utilizada numa proporção de 110 mL (80°.Brix) – FOS I para 500 mL de leite UHT.

4- O extrato de soja utilizado teve aceitabilidade inferior à de um iogurte convencional. Entretanto, sua aceitabilidade, adoçado com sacarose ou com o FOS, obteve médias muito semelhantes.

5- A ingestão de FOS produzido pelo *Aspergillus japonicus* -119 por ratos Wistar é capaz de modificar sua flora intestinal, aumentando a concentração de bactérias lácticas, independentemente do excipiente utilizado neste trabalho: água, iogurte e extrato de soja.

6- Os experimentos realizados com FOS I demonstraram que esta mistura de açúcares, promoveu modificação da flora intestinal dos ratos testados. Vale ressaltar porém, que as mais significativas diminuições de coliformes foram encontradas na presença de iogurte ou extrato de soja, demonstrando portanto, efeito sinérgico com estes ingredientes.

7- A diminuição da concentração de coliformes proporcionadas pelo FOS I, se verificou nesta ordem crescente FOS I+água < FOS I+extrato de soja < FOS I+Iogurte.

8- A eficiência de FOS I na alteração positiva da microbiota intestinal mostrou-se superior ao ORAFIT em relação ao crescimento de bactérias lácticas, porém inferior na diminuição de coliformes.

9- Estes resultados sugerem que os FOS produzidos pela linhagem de *Aspergillus japonicus* – 119 têm grande potencialidade como produto prebiótico para emprego industrial, mesmo sem passar por um processo de purificação.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, T.; HIDAHA, H.; TAKEDA, U.; NIIZATO, T. AND NAKAJIMA, Y. Properties of a new sweetener synthesized from sucrose by the action of fructosyltransferase. Abstract of papers, 42nd Annual Institute of Food Technologists (IFT) Meeting, June 22-25, Las Vegas, NV, p. 195, IFT, Chicago, IL, 1982

AMERINE, M. A. & ROESSLER, E. B., 1983 apud BRUSANTIN, P. Estudo do armazenamento da acerola in natura e estabilidade do néctar de acerola. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade de Campinas, Campinas. 123p., 1995, p.80

BACON, J. S.D.; EDELMAN, J. The carbohydrates of the *Jerusalem artichoke* and other Compositae. Biochem J., v. 48, n. 1, p. 114–126, 1951.

BACON, J.S.D.; EDELMAN, J. The action of invertase preparations. Arch. Biochem., v. 28, n. 3, p. 467–468, 1950.

BENGMARK, S. Immunonutrition-Concluding remarks. Nutrition, v.15, p. 57-61, 1999.

BENNETT, J. W. *Aspergillus*: a primer for the novice. Medical Mycology, 47 (Supplement 1), S5 - S12, 2009.

BHATIA, I. S.; SATVANARAVANA, M. N.; SRINIVASAN, M. Transfructosidase from *Agave cera* cruz Mill. Biochem. J.,v. 61, p.171-174, 1955.

BLANCHARD, P.H.; ALBON, N. The inversion of sucrose; a complication. Arch. Biochem., v. 29, n.1, p. 220–222, 1950.

BOSSCHER, J.; VAN LOO.; FRANCK, A. Inulin and oligofructose as prebiotics in the prevention of intestinal infections and diseases. Nutrition Research Reviews, v.19, p. 216–226, 2006.

BRIZUELA, M. A.; SERRANO, P.; PEREZ, Y. Studies on probiotics properties of two *Lactobacillus* strains. Braz. arch. biol. technol., v. 44, n. 1, p. 95-99, 2001.

BRUSANTIN, P. Estudo do armazenamento da acerola in natura e estabilidade do néctar de acerola. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade de Campinas, Campinas. 123p., p.80, 1995.

BUDDINGTON, R. K.; WILLIAMS, C. H.; CHEN, S. C.; WITHERLY, S. A. Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. Am. J. Clin. Nutr., v. 63, p.709–716, 1996.

BURIGO, T. et al., Efeito bifidogênico do frutooligossacarídeo na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica. Rev. Nutr., vol. 20, n. 5, p. 491-497, 2007.

BURNE, R. A.; CHEN, Y. M.; WEXLER, D. L.; KURAMITSU, H.; BOWEN, W. H. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* strains with defects in fructan metabolism assessed in a program-fed specific-pathogen-free rat model. J. Dent. Res., v. 75, p. 1572-1577, 1996.

CAMPBELL, J. M.; FAHEY JR, G. C.; WOLF, B. W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. J. Nutr., v. 127, p. 130–136, 1997.

CHALLA, A.; RAO, D. R.; CHAWAN, A. B.; SHAKELFORD, L. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane colonic aberrant crypt foci in rats. Carcinogenesis, v.18, p. 517-521, 1996.

CHEN W. AND LIU C. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. Enzyme and Microbial Technology, v.18, p.153-160, 1996.

CHEN, R.M.; WU, J.J.; LEE, S.C.; HUANG, A.H.; WU, H.M. Increase of Intestinal *Bifidobacterium* and Suppression of Coliform Bacteria with Short-Term Yogurt Ingestion . Journal of Dairy Science, v. 82, n. 11, p. 2308-2314, 1999.

CHEN, Y. M.; WEAVER, C. A.; MENDELSON, D. R.; BURNE, R. A. Transcriptional regulation of the *Streptococcus salivarius* 57.I urease operon. J Bacteriol., v. 180, p. 5769-5775, 1998.

CHONAN, O; MATSUMOTO, K. & WATANUKI, M. Effect of galacto-oligosaccharides on calcium absorption and preventing bone loss in ovariectomized rats. Biosc. Biotech. Biochem., v. 59, n. 2, p. 236-39, 1995.

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute (2008). Disponível em: <<http://www.clsi.org>>. Acesso em: 15 set. 2008.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C.G. Probióticos e resposta imune. Ciência Rural, Santa Maria, v.34, n.4, p.1297-1303, 2004.

CRITTENDEN, R. G.; DOELLE, H. W. Structural identification of oligosaccharides produced by *Zymomonas mobilis* levansucrase. Biotechnology Letters, v. 15, n.10, p. 1055-1060, 1993.

CRITTENDEN, R.G.; PLAYNE, M.J. Applications of oligosaccharides in food products. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM “NON-DIGESTIBLE OLIGOSACCHARIDES: HEALTHY FOOD FOR THE COLON?”, Wageningen, Institute of Animal Science, p. 139, 1997.

CRUZ, R. Produção, purificação e caracterização de alfa-galactosidase fúngica. Hidrólise de oligossacárides do extrato de soja. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola - Universidade de Campinas, Campinas. 82p., 1982.

CRUZ, R.; CRUZ, V.D., BELINI, M.Z., BELOTE, J.G. & VIEIRA, C. R. Production of fructooligosaccharides by mycelia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate. Biores. Technol., v.65, p.139-143, 1998.

DARBYSHIRE, B.; HENRY, R. J. Differences in fructan content and synthesis in some allium species. New Phytol., v. 87, p. 249-256, 1981.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. International Dairy Journal, v. 7, p. 31-41, 1996.

DUAN, K. J.; SHEU, D. C.; CHEN, J. S. Purification and characterization of β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1. Biosci. Biotech. Biochem., v. 57, p. 1811-1815, 1993.

FAIRCHILD, A.S. et al. Effect of hen age, Bio-Mos and Flavomycin on susceptibility of turkey poult to oral Escherichia coli challenge In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 15., 1999, Nottingham, Alltech, p.185 – 201, 1999.

FALCÃO, D. P. Meio modificado de cultura para caracterização de Salmonella lactose-positiva. Rev. Saúde públ., v.10, p. 65-73, 1976.

FARNWORTH, E. R., MODLER, H. W., JONES, J. D., CAVE, N., YAMAZAKI, H. AND RAO, A. V. Feeding jerusalem artichoke flour rich in fructooligosaccharides to weanling pigs. Can. J. Anim. Sci., v. 72, p. 977-980, 1992.

FREITAS, D.G.C.; JACKIX, M.N.H. Efeito de bebida adicionada de frutoligosacarídeo e pectina no nível de colesterol e estimulação de bifidobactérias em Hamster hipercolesterolêmicos. Braz. J. Food Technol., v. 8, n. 1, p. 81-86, 2005.

GABERT, V.M. et al. The effect of oligosaccharides and lactitol on the ileal digestibilities of amino acids, monosaccharides and bacterial populations and metabolites in the small intestine of weanling pigs. Can. J. Anim. Sci., v.75, n.1, p.99-107, 1994.

GEBBINK, G. A. R. et al. Effects of addition of fructooligosaccharide (FOS) and sugar beet pulp to weanling pig diets on performance, microflora and intestinal health. Swine Day Report, 1999. Disponível em: <<http://www.ansc.purdue.edu/swine/swineday/sday99/psd09-1999.html>>. Acesso em: 18 jul. 2007.

GIBSON, G. R.; BEATTY, E. R.; WANG, X.; CUMMINGS, J. H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. Gastroenterology, v. 108, n. 4, p. 975–982, 1995.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M.B.. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the concept of Prebiotics. Jornal of Nutrition, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G.R.; WILLIAMS, A.; READING, S.; COLLINS, M.D. Fermentation of non-digestible oligosaccharides by human colonic bacteria. Proc. Nutr. Soc., v. 55, p. 899-912, 1996.

GROSS, D.; BLANCHARD, P. H.; BELL, D. J. Neokestose, a trisaccharide formed from sucrose by yeast invertase. Journal Chem. Soc., p. 1727-1730, 1954.

GUILLLILAND, S.E. & SPEAK, M.L. Antagonistic action of *L. acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogens in associative cultures. Journal of food protection, v. 40, n. 11, p. 820-823, 1977.

HANSEN, B. A. and VILSTRUP, H. A method for determination of the capacity of urea synthesis in the rat. Scand. J. Clin. Lab. Invest., v. 45, p. 315–320, 1985.

HAULY, M. C. O.; FUCHS, R. H. B.; FERREIRA, S. H. P. Suplementação de iogurte de soja com frutooligosacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. Rev. Nutr., v. 18, n. 5, p. 613-622, 2005.

HAYASHI, S.; MATSUZAKI, K.; TAKASAKI, Y.; UENO, H.; IMADA, K. Productin of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. World J. of Microbiol. and Biotechnol., v. 8, p. 155-159, 1992a.

HAYASHI, S.; MATSUZAKI, K.; TAKASAKI, Y.; UENO, H.; IMADA, K. Purification and properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus*. World J. of Microbiol. and Biotechnol., v.8, p. 276-279, 1992b.

HERNANDEZ, L. et al. Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. The Biochemical Journal, v. 309, n. 1, p. 113-118, 1995.

HEUVEL E. G. H. M.; SCHAAFSMA, G.; MUIJS, TH.; DOKKUM, W. Non-digestible oligosaccharides do not affect calcium and non-heme iron absorption in young healthy men. Am. J. Clin. Nutr. v. 67, p. 445-452, 1998.

HIDAKA, H. et al. Effect of fructo-oligosaccharides on intestinal flora and human health. Bifidobacteria Microflora, v. 5, p. 37-55, 1986.

HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M.; SUMI, N. A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20.611. Agric. Biol. Chem., v. 52, n. 5, p. 1181-1187, 1988.

HIRAYAMA, M.; SUMI, N.; HIDAKA, H. Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. Agric. Biol. Chem., v. 53, p. 667-673, 1989.

HOU, J. W. ; YU, R. C. ; CHOU, C. C. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. Food Research International. v. 33. p. 393-397. 2000.

HUIS IN 'T VELD, J.; HAVENAAR, R. Selection criteria and application of probiotic microorganisms in man and animal. Microecol Ther. v. 26, p. 43-57, 1997.

IOM/NAS. "Opportunities in the Nutrition and Food Sciences", ed. P.R. Thomas and R. Earl. Institute of Medicine/National Academy of Sciences, National Academy Press, Washington, D.C, p. 109. 1994.

ISHII, S. & YOKOTSUKA, T. Purification and Properties of Pectin Lyase from *Aspergillus japonicus*. Agr. Biol. Chem., v.39, n. 2, p. 313-321, 1975.

JAYAPRAKASH, A. & EBENEZER, P. Investigation on extracellular lipase production by *Aspergillus japonicus* isolated from the paper nest of *Ropalidia marginata*. Indian Journal of Science and Technology, v. 3, p. 113-117, 2010.

JONSSON, E.; CONWAY, P. Probiotics for pigs. In FULLER, R. (Ed.) Probiotics: the scientific basis. London: Chapman e Hall. cap. 11, p. 259-315, 1992.

KANAANI, H.; HARGREAVES, M.; RISTOVSKI, Z. AND MORAWSKA, L. Deposition rates of fungal spores in indoor environments, factors effecting them and comparison with non-biological aerosols. Atmospheric Environment . v. 42, n. 30, p. 7141-7154, 2008.

KAUR, N.; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. J Bioscience, v. 27, p. 703-14, 2002.

KIKUCHI, H. et al. Effect of two levels of transgalactosylated oligosaccharide intake in rats associated with human microflora on bacterial glycolytic activity, end products of fermentation and bacterial steroid transformation. J. Appl. Bacteriol., v. 80, n. 4, p. 439-446, 1996.

KIM, S.; KIM, W.; HWANG, I.K. Optimization of the extraction and purification of oligosaccharides from defatted soybean meal. Int. J. Food Sci. Technol. v. 38, p. 337-342, 2003.

KOGA, Y.; SHIBUTA, T.; O'BRIEN, R. Soybean oligosaccharides. In Oligosaccharides. Production, properties and applications. Japan. Technol. Rev. Section E: Biotechnology vol. 3, No 2. Nakakuki T Ed; Gordon and Breach Science Publishers: Switzerland, pp. 175-203, 2003.

KONO, T. Fructooligosaccharides. in: NAKAKUKI, T. ed. Oligosaccharides: production, properties and applications. Shizuoka, Japan. Gordon and Breach Science Publishers, p. 51 - 78, 1993.

KORPELA, R.; TEURI, T. Effect of a galacto-oligosaccharide-containing yoghurt on constipation in the elderly. INTERNAT. SYMP. "NON-DIGESTIBLE OLIGOSACCHARIDES: HEALTHY FOOD FOR THE COLON?", Wageningen, Netherlands, p. 4-5, 1997.

KULLEN, M.J. et al. Carbohydrate source and bifidobacteria influence the growth of *Clostridium perfringens* in vivo and in vitro. Nutr. Res., v. 18, n. 11, p. 1889-1897, 1998.

KURAKAKE, M.; ONOUE, T.; KOMAKI, T. Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by b- fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae*. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 45, p. 236-239, 1996.

LEE, J. H.; YUN, J. W.; JUNG, K. W.; JEON, Y. J. Continuous production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 2, p. 98 -101, 1992.

LOURENS- HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. International Dairy Journal, v. 11, p. 1-17, 2001.

LUDWIG, K. M.; OLIVA NETO, P.; ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 21, n. 1, p. 63-68, 2001.

LUO, J.; VAN YPERSELLE, M.; RIZKALLA, S. W. Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides does not affect basal hepatic glucose production or insulin resistance in type 2 diabetics. J. Nutr., v. 130, p. 1572-1577, 2000.

MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? Br. Med. J., v. 318, p. 999-1003, 1999.

MACHIDA, M; GOMI, K (editors). Aspergillus: Molecular Biology and Genomics. Caister Academic Press, 2010. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=cDe0afASrnkC&printsec=frontcover&dq=Aspergillus+Molecular+Biologia+and+Genomics&hl=pt-BR&ei=2J6kTLVrwvrvwBse47KIK&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CDMQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 29 abr. 2010.

MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. Probiotics. Best Practice e Research, v. 18, p. 287-278, 2004.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; CARDELLE-COBAS, A.; CORZO, N.; OLANO, A. Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. Journal of Food Composition and Analysis, Oxford, v. 21, n. 7, p. 540-544, 2008.

MATSUMOTO, K.; KOBAYASHI, Y.; UIMA, S.; WATANABE, T.; TANAKA, R.; KAN, T.; AKIO, K.; SUMIHARA, S. et al. Galactooligosaccharides. In: NAKAKUKI, T. ed. Oligosaccharides: production, properties and applications. Shizuoka, Japan. Gordon and Breach Science Publishers, p. 90 - 106, 1993.

MENDES, A. J. D. e PINTO, A. S. Algumas diretrizes estatísticas para a avaliação do erro do método na mensuração de variável quantitativa. R. Dental Press Ortodon. Ortop. Facial, v. 12, n. 1, p. 78-83, 2007.

MEYDANI, S. N.; HA, W. K. Immunologic effects of yogurt. Am. J. Clin. Nutr., v. 71, p. 861-872, 2000.

MIZUTANI, T.; MITSUOKA, T. Inhibitory effect of some intestinal bacteria on liver tumorigenesis in gnotobiotic C3H/He male mice. Cancer Lett., v. 11, n. 2, p. 89-95, 1980.

MONTEIRO, M. R. P. et al. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do Inibidor de Tripsina Kunitz e da isoenzimas Lipoxigenases. Revista de nutrição, v. 17, n. 2, p. 195-205, 2004.

MORAIS M. B.; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. J. Pediatr., v. 82 n.5, 2006.

MUL, A. J.; Application of oligosaccharides in animal feeds. SYMPOSIUM "NON-DIGESTIBLE OLIGOSACCHARIDES: HEALTHY FOOD FOR THE COLON?" Wageningen, Institute of Animal Science, Netherlands, p. 106, 1997.

MUSSATTO S. I.; AGUILAR, C. N.; RODRIGUES L. R.; TEIXEIRA, J. A. Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic materials and application to the production of fructooligosaccharides. Carbohydrate Research, v. 344, p. 795-800, 2009.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review . V. 68, n. 3 , p. 587-597, 2007.

NAGAMATSU, Y.; YAHATA, M.; FUKADA, T.; HATANAKA, C. Identification of 1-kestose- and neokestose-based oligofructans in *Lycoris radiata* herb tissues. Agric. Biol. Chem., v. 54, p. 1291-1292, 1990.

OHTA, A.; OHTSUKI, M.; HOSONO, A.; ADACHI, T.; HARA, H.; SAKATA, T. Dietary Fructooligosaccharides Prevent Osteopenia After Gastrectomy in Rats. The Journal of Nutrition, v. 128, n. 1, p. 106-110, 1998.

ORBAN, J. I. et al. Growth performance and intestinal and intestinal microbial populations of growing pigs fed diets containing thermal oligosaccharide caramel. J. Anim. Sci., v. 75, p. 170-175, 1997.

PARENICOVÁ, L.; SKOUBOE, P.; FRISVAD, J.; SAMSON, R. A.; ROSSEN, L.; HOOR-SUYKERBUYK, M. T.; VISSER, J. Combined Molecular and Biochemical Approach Identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as Two Species. Applied and Environmental Microbiology, v. 67, p. 521-527, 2001.

PARK, Y. K.; ALMEIDA, M. M. Production of fructooligosaccharides from sucrose by a transfructosylase from *Aspergillus niger*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 7, n. 3, p. 331-334, 1991.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Fructooligosaccharídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. Ciencia Rural, v. 33, p. 385-390, 2003.

PAZUR, J.H. Transfructosilation Reactions of an Enzyme of *Aspergillus oryzae*, Journal Biol. Chem., v. 199 p. 217-225, 1952.

PELCZAR J. R. M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. Microbiologia: conceitos e aplicações. V. I e II. Makron Books Ltda, São Paulo, 1980.

POOL-ZOBEL, B. L.; NEUDECKER, C.; DOMIZLAFF, I.; JI, S.; SCHILLINGER, U.; RUMNEY, C.; MORETTI, M.; VILLARINI, I.; SCASSELLATI-SFORZOLINI, R.; ROWLAND, I. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. Nutr. Cancer, v. 26, p. 365-380, 1996.

POPPI, L. B. e MANCILHA, I. M. Nota prévia: Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* in vitro. Braz. J. Food Technol., v. 11, n. 2, p. 113-119, abr./jun. 2008.

PUPIN, A.M. Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais. SEMINÁRIO NOVAS ALTERNATIVAS DE MERCADO, Campinas: ITAL, p. 133-145, 2002.

QUEIROZ, M. B.; GARCIA, N. H. P. Avaliação do perfil sensorial de amêndoas de cupuaçu e cacau torradas utilizando análise descritiva quantitativa. Boletim do CEPPA, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 249-266, 2000.

RADECKI, S. V.; YOKOYAMA, M. T. Intestinal bacteria and their influence on swine nutrition. In: MILLER, E. R.; ULLREY, D. E.; LEWIS, A. (Eds.). Swine nutrition. [S.l.]: Butterworth-Heinemann, cap. 27, p. 439-447, 1991.

RAO, V.A. The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. Nutr. Res. v. 21, n. 6, p. 843-848, 2001.

ROBERFROID M. B. and DELZENNE N. M. Dietary fructans. Annu. Rev. Nutr., v.18, p. 117-143, 1998.

ROBERFROID M. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., v.33, p. 103-108, 1993.

ROWLAND, I. R.; TANAKA, R. The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human faecal microflora. Journal of Applied Bacteriology, v. 74, p. 667-674, 1993.

SAMSON, R. A.; HONG, S. B. & FRISVAD, J. C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. Medical Mycology, v. 44, p. S133-S148, 2006.

SANTOS, M. S; FERREIRA, C. L. L. F; GOMES, P. C.; SANTOS, J. L.; POZZA, P. C.; TESHIMA, E. Influencia do fornecimento de probiótico à base de *Lactobacillus* sp. sobre a microbiota intestinal de leitões. Ciencia. agrotec., v. 27, n. 6, p. 1395-1400, 2003.

SCHARRER, E.; LUTZ, T. Effect of short-chain fatty acids on calcium absorption by the rat colon. Exp. Physiol., v. 76, p. 615-618, 1991.

SCHARRER, E.; LUTZ, T.; WURMLI, R. Short-chain fatty acids stimulate magnesium absorption by the colon. In: Lasserre B, Durlach J, eds. Magnesium - a relevant ion. London: John Libbey, p.131-137, 1991.

SCHOULER, C.; AHMED TAKI, A.; CHOUIKHA, I.; MOULIN-SCHOULEUR, M.; GILOT, P. A Genomic Island of an Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strain Enables the Metabolism of Fructooligosaccharides, Which Improves Intestinal Colonization. Journal of Bacteriology, v. 191, n. 1, p. 388-393, 2009.

SCHULZ-AHRENS, K. Effects of prebiotics on mineral metabolism. Am. J. Clin. Nutr. v. 73, p. 459S-464S, 2001.

SEKINE, K.; TOIDA, T.; SAITO, M.; KUBOYAMA, M.; KAWASHIMA, T.; HASHIMOTO, Y. A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. Cancer Res., v. 45, p. 1300-1307, 1985.

SEMENOVA, M. V.; DRACHEVSKAYA, M. I.; SINITSYNA, O. A.; GUSAKOV, A. V. & SINITSYN, A. P. Isolation and Properties of Extracellular β -Xylosidases from Fungi *Aspergillus japonicus* and *Trichoderma reesei*. Biokhimiya, v. 74, n. 9, p. 1230–1237, 2009.

SHOAF, K.; MULVEY, G. L.; ARMSTRONG, G. D.; HUTKINS, R. W. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. Infection and Immunity, v. 74, n. 12, p. 6920-6928, 2006.

SILVA, L. P.; NORBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. Cienc. Rural., v. 33, n. 5, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2.ed. São Paulo: Livraria Varela, 317p. 2001.

SIMÕES, M. L. G. & TAUK-TORNISIELO, S. M. Optimization of xylanase biosynthesis by *Aspergillus japonicus* isolated from a “Caatinga” area in the Brazilian state of Bahia. African Journal of Biotechnology, v. 5, n.11, p. 1135-1141, 2005.

SPIEGEL, J. E.; ROSE, R.; KARABELL, P.; FRANKOS, V. H.; SCHMITT, D. F. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. Food Technol., v. 48, p. 85-89, 1994.

SPINOSA, W. A. et al. Relationships among oil content, protein content and seed size in soybeans. Arquivos de Biologia e Tecnologia, v. 44, p. 23-32, 2001.

STANLEY, V.G. et al. Effects of lactose and Bio-MOS in dietary application on growth and total coliform bacteria reduction in broiler chicks. Poultry Sci., v.75, supp.1, p.61, 1996.

SU, Y. C.; SHEU, C. S.; CHIEN, Y. Y.; TZAN, T. K. Production of β -fructofuranosidase with transfructosylatin activity for fructooligosaccharides synthesis by *Aspergillus japonicus* NTU-1249. Life Sci., v. 15, p. 131-139, 1991.

SWENNEN, K.; COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A. Non-digestible Oligosaccharides with Prebiotic Properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 46, p. 459–47, 2006.

TAMBARA, Y.; HORMAZA, J. V.; PEREZ, C.; LEON, A.; ARRIETA, J.; HERNANDES, L. Structural analysis and optimised production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. Biotechnol. Lett., v. 21, p. 117-121, 1999.

TARABOULSI JR F. A.; ANDREOTTI, D. Z.; MADEIRA JR., J. V.; SILVA, A. R. E OLIVA, P. Seleção de micro-organismos com atividade antibiótica contra *Escherichia coli*. Revista Analytica., v. 29, p. 60-66, 2007.

TEIXEIRA, M. F. S.; LIMA FILHO, J. L.; DURÁN, N. Carbon Sources Effect On Pectinase Production From *Aspergillus Japonicus* 586. Brazilian Journal of Microbiology, v. 31, p. 286-290, 2000.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligosacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 41, n. 3, 2005.

TORRALBA, L. R. B. Estudo de fungos da coleção de micro-organismos de referência do incqs e de fungos isolados de sedimentos de igarapés em manaus (am) com capacidade de descolorir e detoxificar corantes têxteis. Tese (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 106p., p.41, 2008.

VAN LOO, J. V. et al. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the endo project (DGXII-AIRIICT94-1095). British Journal Nutrition, v.81, p.121-132, 1999.

VANDERZANT, C.; SWANSON, K. M. J.; BUSTA, F. F.; PETERSON, E. H. Colony count methods. In: SPLITTSTROESSER, D. F. (Ed). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3ed. Washigton: American Public Health Association, 1219p. cap. 4, p. 75-95, 1992.

VIEIRA, S. Análise de variância: ANOVA. 1. ed. São Paulo: Editora Atlas, 206 p., 2006.

VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. Estatística experimental. São Paulo: Editora Atlas, 179 p., 1989.

YOUNES, H.; GARLEB, K. A.; BEHR, S. R.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. Dietary fiber stimulates the extra-renal route of nitrogen excretion in partially nephrectomized rats. J. Nutr. Biochem., v. 9, p. 613–620, 1998.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides - occurrence, preparation, and application. Enzyme Microb. Technol., v. 19, p. 107-117, 1996.

YUN, J. W.; JUNG, K. H.; OH, J. W. E LEE, J. H. Semibatch production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized cells of *Aureobasidium pullulans*. Applied Biochemical Biotechnology, v. 24/25, p. 299-308, 1990.

YUN, J. W.; KIM, D. H.; KIM, B. W.; SONG, S. K. Production of Inulo-Oligosaccharides from Inulin by Immobilized Endoinulinase from *Pseudomonas* sp. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 84, n. 4, p. 369-372, 1997.

YUN, J. W.; SONG, S. K.; HAN, J. H.; CHO, Y. C. AND LEE, J. H. Separation and purification of fructo-oligosaccharides by ion-exchange resin column. Korean J. Biotechnol. Bioeng., v. 9, p. 35-39, 1993.

8 - ANEXOS

ANEXO I

GC	Sem suplementação			
	Média T0 - VRB		Média Tf - VRB	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$4,63 \times 10^5$	13,05	$4,60 \times 10^5$	13,04
2	$6,57 \times 10^5$	13,40	$6,85 \times 10^5$	13,44
3	$4,20 \times 10^5$	12,95	$3,87 \times 10^5$	12,87
4	$2,36 \times 10^5$	12,37	$4,60 \times 10^5$	13,04
5	$5,74 \times 10^5$	13,26	$5,54 \times 10^5$	13,22
	Média T0 - MRS		Média Tf - MRS	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$7,3 \times 10^6$	15,81	$9,2 \times 10^6$	16,03
2	$1,10 \times 10^7$	16,22	$6,7 \times 10^6$	15,72
3	$4,8 \times 10^6$	15,39	$7,2 \times 10^6$	15,78
4	$1,38 \times 10^7$	16,44	$1,91 \times 10^7$	16,77
5	$8,3 \times 10^6$	15,94	$9,1 \times 10^6$	16,03
6	$5,9 \times 10^6$	15,58	$5,1 \times 10^6$	15,44
7	$2,55 \times 10^7$	17,06	$7,00 \times 10^7$	18,06

GA	<i>Gal</i> – Água + Sacarose			
	Média T0 - VRB		Média Tf - VRB	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$5,28 \times 10^5$	13,18	$6,42 \times 10^5$	13,37
2	$3,91 \times 10^5$	12,88	$4,03 \times 10^5$	12,91
3	$6,3 \times 10^5$	13,35	$6,97 \times 10^5$	13,45
4	$5,86 \times 10^5$	13,28	$6,34 \times 10^5$	13,36
5	$4,32 \times 10^5$	12,98	$4,92 \times 10^5$	13,11
6	$2,74 \times 10^5$	12,52	$4,55 \times 10^5$	13,03
	Média T0 - MRS		Média Tf - MRS	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$2,34 \times 10^7$	16,97	$9,78 \times 10^6$	16,10
2	$1,59 \times 10^7$	16,58	$8,5 \times 10^6$	15,96
3	$8,72 \times 10^6$	15,98	$7,42 \times 10^6$	15,82
4	$2,56 \times 10^7$	17,06	$1,57 \times 10^7$	16,57
5	$1,70 \times 10^7$	16,65	$1,13 \times 10^7$	16,24
6	$9,21 \times 10^6$	16,04	$8,94 \times 10^6$	16,01

GA	Ga2 – Água + FOSI – 49,7%			
	Média T0 - VRB		Média Tf - VRB	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	4,24 x 10 ⁵	12,96	2,31 x 10 ⁵	12,35
2	3,49 x 10 ⁵	12,76	2,72 x 10 ⁵	12,51
3	1,81 x 10 ⁵	12,11	6,43 x 10 ⁵	13,37
4	2,62 x 10 ⁵	12,47	3,27 x 10 ⁵	12,70
5	3,52 x 10 ⁵	12,77	4,66 x 10 ⁵	13,05
6	6,00 x 10 ⁵	13,30	6,38 x 10 ⁵	13,37
	Média T0 - MRS		Média Tf - MRS	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	2,40 x 10 ⁷	16,99	3,21 x 10 ⁷	17,28
2	2,56 x 10 ⁷	17,06	4,02 x 10 ⁷	17,51
3	2,03 x 10 ⁷	16,83	5,26 x 10 ⁷	17,78
4	2,29 x 10 ⁷	16,95	6,80 x 10 ⁷	18,04
5	1,21 x 10 ⁷	16,31	5,11 x 10 ⁷	17,75
6	6,91 x 10 ⁷	18,05	7,81 x 10 ⁷	18,17

GA	Ga3 – Água + FOSII – 31,3%			
	Média T0 - VRB		Média Tf - VRB	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	4,05 x 10 ⁵	12,91	4,34 x 10 ⁵	12,98
2	4,13 x 10 ⁵	12,93	4,28 x 10 ⁵	12,97
3	1,3 x 10 ⁴	9,47	3,72 x 10 ⁵	12,83
4	2,95 x 10 ⁵	12,60	5,04 x 10 ⁵	13,13
5	3,51 x 10 ⁵	12,77	2,79 x 10 ⁵	12,54
6	4,22 x 10 ⁵	12,95	5,29 x 10 ⁵	13,18
	Média T0 - MRS		Média Tf - MRS	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	2,07 x 10 ⁷	16,85	1,74 x 10 ⁷	16,67
2	1,55 x 10 ⁷	16,56	2,02 x 10 ⁷	16,82
3	2,40 x 10 ⁷	16,99	2,14 x 10 ⁷	16,88
4	1,27 x 10 ⁷	16,35	2,84 x 10 ⁷	17,16
5	2,14 x 10 ⁷	16,88	1,37 x 10 ⁷	16,43

GA	<i>Ga4</i> – Água + ORAFTI			
	Média T0 - VRB		Média Tf - VRB	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$8,39 \times 10^5$	13,64	$5,05 \times 10^5$	13,13
2	$7,54 \times 10^5$	13,53	$6,80 \times 10^5$	13,43
3	$9,08 \times 10^5$	13,72	$2,59 \times 10^5$	12,46
4	$9,53 \times 10^5$	13,77	$5,18 \times 10^5$	13,16
5	$6,6 \times 10^4$	11,09	$1,3 \times 10^4$	9,45
6	$7,46 \times 10^5$	13,52	$5,27 \times 10^5$	13,17
7	$8,21 \times 10^5$	13,62	$5,10 \times 10^5$	13,14
	Média T0 - MRS		Média Tf - MRS	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$1,47 \times 10^7$	16,51	$2,65 \times 10^7$	17,09
2	$1,78 \times 10^7$	16,70	$3,53 \times 10^7$	17,38
3	$3,21 \times 10^7$	17,29	$4,71 \times 10^7$	17,67
4	$3,66 \times 10^7$	17,42	$4,37 \times 10^7$	17,59
5	$2,34 \times 10^7$	16,97	$2,21 \times 10^7$	16,91
6	$3,41 \times 10^7$	17,35	$4,46 \times 10^7$	17,61
7	$2,45 \times 10^7$	17,02	$7,66 \times 10^7$	18,15

GI	<i>Gi1</i> – Iogurte + Sacarose			
	Média T0 - VRB		Média Tf - VRB	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$5,81 \times 10^5$	13,27	$4,92 \times 10^5$	13,11
2	$7,01 \times 10^5$	13,46	$5,15 \times 10^5$	13,15
3	$9,23 \times 10^5$	13,74	$7,48 \times 10^5$	13,53
4	$6,99 \times 10^5$	13,46	$1,67 \times 10^5$	12,02
5	$8,07 \times 10^5$	13,60	$9,40 \times 10^5$	13,75
6	$6,50 \times 10^5$	13,38	$4,37 \times 10^5$	12,99
	Média T0 - MRS		Média Tf - MRS	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$2,96 \times 10^7$	17,20	$9,15 \times 10^7$	18,33
2	$1,41 \times 10^7$	16,46	$3,35 \times 10^7$	17,33
3	$2,17 \times 10^7$	16,89	$1,72 \times 10^7$	16,66
4	$2,27 \times 10^7$	16,94	$7,12 \times 10^7$	18,08
5	$1,34 \times 10^7$	16,41	$2,11 \times 10^7$	16,86
6	$2,14 \times 10^7$	16,88	$2,15 \times 10^7$	16,89

GI	<i>Gi2</i> – Iogurte + FOSI – 49,7%			
	Média T0 - VRB		Média Tf - VRB	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$8,84 \times 10^5$	13,69	$2,98 \times 10^5$	12,60
2	$8,48 \times 10^5$	13,65	$3,21 \times 10^5$	12,68
3	$7,66 \times 10^5$	13,55	$3,02 \times 10^5$	12,62
4	$5,63 \times 10^5$	13,24	$2,15 \times 10^5$	12,28
5	$8,56 \times 10^5$	13,66	$3,90 \times 10^5$	12,87
6	$2,80 \times 10^5$	12,54	$1,79 \times 10^5$	12,10
	Média T0 - MRS		Média Tf - MRS	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$1,89 \times 10^7$	16,75	$2,92 \times 10^7$	17,19
2	$1,90 \times 10^7$	16,76	$4,36 \times 10^7$	17,59
3	$3,94 \times 10^7$	17,49	$5,14 \times 10^7$	17,75
4	$1,62 \times 10^7$	16,60	$3,32 \times 10^7$	17,32
5	$2,95 \times 10^7$	17,20	$3,91 \times 10^7$	17,48

GI	<i>Gi3</i> – Iogurte + FOSII – 31,3%			
	Média T0 - VRB		Média Tf - VRB	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$7,53 \times 10^5$	13,53	$5,39 \times 10^5$	13,20
2	$7,85 \times 10^5$	13,57	$5,78 \times 10^5$	13,27
3	$8,21 \times 10^5$	13,62	$6,04 \times 10^5$	13,31
4	$7,94 \times 10^5$	13,58	$5,63 \times 10^5$	13,24
5	$6,97 \times 10^5$	13,45	$5,29 \times 10^5$	13,18
6	$7,07 \times 10^5$	13,47	$5,52 \times 10^5$	13,22
7	$6,01 \times 10^5$	13,31	$4,78 \times 10^5$	13,08
	Média T0 - MRS		Média Tf - MRS	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$1,84 \times 10^7$	16,73	$2,78 \times 10^7$	17,14
2	$1,97 \times 10^7$	16,79	$3,05 \times 10^7$	17,23
3	$2,92 \times 10^7$	17,19	$3,97 \times 10^7$	17,50
4	$2,40 \times 10^7$	16,99	$3,56 \times 10^7$	17,39
5	$2,76 \times 10^7$	17,13	$4,02 \times 10^7$	17,51
6	$2,56 \times 10^7$	17,06	$3,69 \times 10^7$	17,42

GI	<i>Gi4</i> – Iogurte + ORAFTI			
	Média T0 - VRB		Média Tf - VRB	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$8,51 \times 10^5$	13,65	$2,80 \times 10^5$	12,54
2	$8,25 \times 10^5$	13,62	$2,21 \times 10^5$	12,31
3	$8,20 \times 10^5$	13,62	$2,39 \times 10^5$	12,38
4	$8,44 \times 10^5$	13,65	$3,02 \times 10^5$	12,62
5	$7,80 \times 10^5$	13,57	$2,28 \times 10^5$	12,34
6	$9,41 \times 10^5$	13,75	$3,47 \times 10^5$	12,76
	Média T0 - MRS		Média Tf - MRS	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$1,73 \times 10^7$	16,66	$4,16 \times 10^7$	17,54
2	$1,30 \times 10^7$	16,38	$2,80 \times 10^7$	17,15
3	$1,73 \times 10^7$	16,66	$3,21 \times 10^7$	17,28
4	$1,56 \times 10^7$	16,56	$3,68 \times 10^7$	17,42
5	$2,22 \times 10^7$	16,92	$3,07 \times 10^7$	17,24
6	$1,34 \times 10^7$	16,41	$4,23 \times 10^7$	17,56

GS	<i>Gs1</i> – Soja + Sacarose			
	Média T0 - VRB		Média Tf - VRB	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$6,31 \times 10^5$	13,36	$5,88 \times 10^5$	13,29
2	$3,97 \times 10^5$	12,89	$4,27 \times 10^5$	12,96
3	$7,24 \times 10^5$	13,49	$5,96 \times 10^5$	13,30
4	$5,69 \times 10^5$	13,25	$4,89 \times 10^5$	13,10
5	$2,43 \times 10^5$	12,40	$4,10 \times 10^5$	12,92
6	$7,19 \times 10^5$	13,49	$6,26 \times 10^5$	13,35
7	$8,22 \times 10^5$	13,62	$7,70 \times 10^5$	13,55
	Média T0 - MRS		Média Tf - MRS	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$3,22 \times 10^7$	17,29	$2,01 \times 10^7$	16,81
2	$1,68 \times 10^7$	16,64	$2,28 \times 10^7$	16,94
3	$2,92 \times 10^7$	17,19	$3,30 \times 10^7$	17,31
4	$3,57 \times 10^7$	17,39	$3,71 \times 10^7$	17,43
5	$2,02 \times 10^7$	16,82	$2,35 \times 10^7$	16,97
6	$2,24 \times 10^7$	16,92	$1,86 \times 10^7$	16,74

GS	Gs2 – Soja + FOSI – 49,7%			
	Média T0 - VRB		Média Tf - VRB	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	7,06 x 10 ⁵	13,47	5,22 x 10 ⁵	13,16
2	6,26 x 10 ⁵	13,35	4,26 x 10 ⁵	12,96
3	4,27 x 10 ⁵	12,96	2,65 x 10 ⁵	12,49
4	6,74 x 10 ⁵	13,42	10,22 x 10 ⁵	13,84
5	4,53 x 10 ⁵	13,02	2,40 x 10 ⁵	12,39
6	6,56 x 10 ⁵	13,39	4,51 x 10 ⁵	13,02
	Média T0 - MRS		Média Tf - MRS	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	2,20 x 10 ⁷	16,91	4,15 x 10 ⁷	17,54
2	2,26 x 10 ⁷	16,93	4,90 x 10 ⁷	17,71
3	1,97 x 10 ⁷	16,79	3,85 x 10 ⁷	17,46
4	1,31 x 10 ⁷	16,38	3,69 x 10 ⁷	17,42
5	1,84 x 10 ⁷	16,73	3,28 x 10 ⁷	17,31
6	1,33 x 10 ⁷	16,40	3,44 x 10 ⁷	17,35

GS	Gs3 – Soja + FOSII – 31,3%			
	Média T0 - VRB		Média Tf - VRB	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	7,14 x 10 ⁵	13,48	6,54 x 10 ⁵	13,39
2	6,98 x 10 ⁵	13,46	5,32 x 10 ⁵	13,18
3	5,63 x 10 ⁵	13,24	4,70 x 10 ⁵	13,06
4	6,27 x 10 ⁵	13,35	5,81 x 10 ⁵	13,27
5	7,03 x 10 ⁵	13,46	6,43 x 10 ⁵	13,37
6	6,31 x 10 ⁵	13,36	5,72 x 10 ⁵	13,26
	Média T0 - MRS		Média Tf - MRS	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	2,41 x 10 ⁷	17,00	3,04 x 10 ⁷	17,23
2	1,99 x 10 ⁷	16,81	2,56 x 10 ⁷	17,06
3	1,56 x 10 ⁷	16,56	2,34 x 10 ⁷	16,97
4	2,06 x 10 ⁷	16,84	2,86 x 10 ⁷	17,17
5	2,74 x 10 ⁷	17,13	3,29 x 10 ⁷	17,31

GS	Gs4 – Soja + ORAFTI			
	Média T0 - VRB		Média Tf - VRB	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$8,16 \times 10^5$	13,61	$0,29 \times 10^5$	10,26
2	$8,52 \times 10^5$	13,66	$5,38 \times 10^5$	13,19
3	$7,68 \times 10^5$	13,55	$5,57 \times 10^5$	13,23
4	$8,09 \times 10^5$	13,60	$5,16 \times 10^5$	13,15
5	$6,71 \times 10^5$	13,42	$4,14 \times 10^5$	12,93
6	$5,99 \times 10^5$	13,30	$5,05 \times 10^5$	13,13
	Média T0 - MRS		Média Tf - MRS	
Ratos	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)	UFC/g de fezes (x)	Ln (x+1)
1	$1,96 \times 10^7$	16,79	$3,51 \times 10^7$	17,37
2	$2,30 \times 10^7$	16,95	$2,97 \times 10^7$	17,21
3	$1,58 \times 10^7$	16,57	$2,50 \times 10^7$	17,03
4	$1,94 \times 10^7$	16,78	$3,17 \times 10^7$	17,27
5	$1,36 \times 10^7$	16,43	$2,67 \times 10^7$	17,10
6	$1,18 \times 10^7$	16,28	$3,13 \times 10^7$	17,26

ANEXO 2

Julgador:	Data:
Você está recebendo três amostras codificadas. Avalie globalmente cada uma segundo o grau de gostar ou desgostar, utilizando a escala abaixo.	
Escala:	Número e nota da amostra:
(9) gostei muitíssimo	_____ ()
(8) gostei moderadamente	
(7) gostei regularmente	
(6) gostei ligeiramente	
(5) não gostei, nem desgostei	_____ ()
(4) desgostei ligeiramente	
(3) desgostei regularmente	
(2) desgostei moderadamente	
(1) desgostei muitíssimo	_____ ()

Fonte: ABNT, NBR 14141, 1998