



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS –  
CÂMPUS DE ARARAQUARA



---

**Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição**

**(Ciência dos Alimentos)**

---

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO EM SIMULADOR DO  
ECOSSISTEMA MICROBIANO HUMANO DE UMA BEBIDA  
SIMBIÓTICA À BASE DE EXTRATOS AQUOSOS DE QUINOA  
(*Chenopodium quinoa* Willd) E DE SOJA**

**FERNANDA BIANCHI**

ARARAQUARA - SP

Setembro de 2013





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



**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO EM SIMULADOR DO  
ECOSSISTEMA MICROBIANO HUMANO DE UMA BEBIDA  
SIMBIÓTICA À BASE DE EXTRATOS AQUOSOS DE QUINOA  
(*Chenopodium quinoa* Willd) E DE SOJA**

**FERNANDA BIANCHI**

Orientadora: Profa. Dra. KATIA SIVIERI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Área de Ciência dos Alimentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, área de Ciência dos Alimentos.

ARARAQUARA

Setembro de 2013

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

Bianchi, Fernanda

B577d Desenvolvimento e avaliação em simulador do ecossistema microbiano humano de uma bebida simbiótica à base de extratos aquosos de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) e de soja / Fernanda Bianchi. – Araraquara, 2013

122 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Katia Sivieri

1. Bebida fermentada. 2. Soja. 3. Quinoa. 4. SEMH. 5. *Lactobacillus casei*. 6. Análise molecular. I. Sivieri, Katia, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

**Fernanda Bianchi**

**Desenvolvimento e avaliação em simulador do ecossistema microbiano humano de uma bebida simbiótica à base de extratos aquosos de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) e de soja**

Orientador(a):

Prof. Dra. Katia Sivieri

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna

Prof. Dra. Raquel Gutierrez Gomes

*Dedico este trabalho aos meus pais, meus irmãos e meu namorado que são pessoas mais que especiais, presentes em todos os momentos de minha jornada*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço à Deus pela vida, pelas pessoas que nela existem e pela oportunidade de desenvolver este trabalho;*

*Aos meus pais Jorge e Marisa por serem o meu suporte, força e incentivo em todos os momentos de dificuldades e alegrias;*

*À minha irmã, Jaqueline, por todo apoio, ajuda oferecida e conforto durante todo o desenvolvimento deste projeto;*

*Ao meu irmão Alexandre pela força e compreensão sempre;*

*Ao meu namorado Mayron, pelo companheirismo, paciência e apoio em todos os momentos;*

*À Prof<sup>a</sup>. Dra. Katia Sivieri pela orientação, paciência, amizade, disposição, pelo exemplo e incentivo durante todo o trabalho;*

*Aos Professores Dr. Elizeu Antonio Rossi pela co-orientação, amizade, ensinamentos e pela responsabilização do auxílio FAPESP;*

*À prof. Dra. Daniela Cardoso Umbelini Cavalini pelas sugestões ao projeto e pela amizade;*

*À amiga e técnica do laboratório, Roseli Aparecida Pinto, pela ajuda e treinamentos oferecidos ao decorrer das análises, bem como pelos conselhos profissionais e pessoais;*

*À amiga, funcionária da UniverSoja e do laboratório, Joseane Canaã, por estar sempre disposta a ajudar com as análises, sempre me ouvindo e aconselhando em todos os momentos;*

*À prof. Dra. Raquel G. Gomes pela ajuda com as análises reológicas, pelo carinho e apoio;*

*Às professoras Dra. Maria Angela Tallarico Adorno e Dra. Isabel Kimiko Sakamoto da Usp II de São Carlos, pela ajuda na realização das análises de ácidos graxos de cadeia curta e de PCR-DGGE;*

*Às amigas do laboratório Camilla, Erica, Maria Thereza, Ana Paula, Larissa, Mariana e Nadiege pelos momentos de descontração, pela ajuda, troca de conhecimento e apoio nos momentos difíceis e pela amizade que perdurará para sempre;*

*Aos amigos do Laboratório de Biologia molecular, da Unesp, pela ajuda com algumas análises;*

*Aos amigos Wandressa, Francine, José, Carolina, Gabriela e Aline por estarem sempre comigo, me apoiando e me confortando nos momentos de desânimo.*

*A Unesp Campus de Araraquara pelo espaço físico e pelo auxílio Congresso concedido;*

*A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro;*

*A todos os funcionários da biblioteca, da Pós-graduação, da portaria e da limpeza pela atenção e colaboração;*

*Ao longo desses dois anos foram muitas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho. Deixo aqui o meu muito obrigado à cada uma delas.*

*“Quando alguém encontra seu caminho precisa ter coragem suficiente para dar passos errados. As decepções, as derrotas, o desânimo são ferramentas que Deus utiliza para mostrar a estrada.”*

- Paulo Coelho -

## RESUMO

O conhecimento da população, em relação a uma alimentação mais saudável e nutritiva, tem levado o aumento da procura por alimentos funcionais e que proporcionem uma melhor qualidade de vida. Em função deste interesse, pesquisas que comprovem os benefícios do consumo desses novos produtos tornam-se essenciais. O objetivo do trabalho foi desenvolver uma nova bebida fermentada, potencialmente simbiótica, fermentada com *Lactobacillus casei* Lc-01 e adicionado de fruto-oligossacarídeo à base de extratos aquosos de quinoa e de soja e avaliar sua ação sob a microbiota intestinal por meio de sistema *in vitro*. O trabalho foi dividido em duas fases, na Fase I, cinco formulações com diferentes proporções de extrato aquoso de soja e de quinoa foram testadas. A viabilidade do micro-organismo nas bebidas, assim como os valores de pH e de acidez foram monitorados até o 28º dia de estocagem a 5°C. Foram também analisadas a composição química dos extratos e das bebidas elaboradas, bem como as propriedades reológicas e sensoriais dos produtos finais. Embora tenha ocorrido um aumento na acidez e um declínio no pH durante os 28 dias de armazenamento das bebidas, o micro-organismo probiótico manteve uma população de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> para todas as bebidas durante o período experimental. Houve um aumento na viscosidade e na consistência nas bebidas com maior proporção de extrato de quinoa (F1 e F2). A formulação F4 (com 70% extrato de soja- 30% extrato de quinoa) mostrou a menor curva de histerese. As formulações F4 e F5 (com 100% extrato de soja) obtiveram melhor aceitação sensorial e F4 maior intenção de compra. Com relação a composição físico-química, a formulação F3 (com 50% extrato de soja- 50% extrato de quinoa) e F4 mostraram resultados mais próximos aos das bebidas fermentadas à base de soja encontradas na literatura. A bebida F4 foi considerada a melhor bebida desenvolvida e, portanto, teve sua eficácia analisada do Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH), Fase II do trabalho. Foram realizadas semanalmente análises microbiológicas de diversos gêneros microbianos além de análise semanais de íons amônia e de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) das amostras dos reatores que simulam o cólon ascendente, transversal e descendente. Análises moleculares foram realizadas para comprovar a sobrevivência do *L. casei* nas três regiões do cólon, bem como para analisar o comportamento e a diversidade da comunidade de *Lactobacillus* spp durante os tratamentos. Para melhor elucidar os resultados foram também analisadas no SEMH, as bebidas probiótica, prebiótica e placebo. Observou-se que a bebida simbiótica obteve os melhores resultados microbiológicos no Reator R3 (cólon ascendente), estimulando o crescimento de *Lactobacillus* spp, *Bifidobacteria* spp e reduzindo a população de *Clostridium* spp, bacteroides, *Enterococcus* spp e enterobactérias neste compartimento. Não houve diferença estatística entre as bebidas prebiótica, probiótica e placebo em nenhum dos 3 compartimentos com relação aos íons amônia, no entanto todas se diferiram estatisticamente da bebida simbiótica, a qual proporcionou redução significativa destes íons, principalmente no cólon ascendente. Não houve diferença significativa na produção de AGCC entre os diferentes tratamentos com as bebidas e o período basal. A sobrevivência do *L. casei* Lc-01 no reator SEMH foi comprovada por métodos microbiológicos convencionais e moleculares. As análises moleculares mostraram uma maior riqueza e diversidade da comunidade de *Lactobacillus* spp durante o tratamento com a bebida simbiótica, nos 3 compartimentos do reator SEMH que simulam o cólon, com maior acentuação no cólon ascendente. Foi possível desenvolver uma nova bebida simbiótica com características físico-químicas, sensoriais e reológicas adequadas, com ação benéfica sob a microbiota intestinal humana avaliada em Simulador do Ecossistema Microbiano Humano.

**Palavras-chave:** bebida fermentada, soja, quinoa, SEMH, *Lactobacillus casei*, análise molecular

## ABSTRACT

The conscience of the population, regarding to a healthier diet, has led to an increase in the demand for functional foods, providing, this way, a better quality of life. Because of this interest, researches demonstrating the benefic consumption of these new products become essential. The aim of this study was to develop a new potentially synbiotic beverage, fermented with *Lactobacillus casei* Lc-01 and with added fructo-oligosaccharide, based on aqueous extracts of quinoa and soy and to assess its influence on the intestinal microbiota through an in vitro system. The project was divided into two phases, in phase I, five formulations with different proportions of aqueous extract of soy and quinoa were tested. The viability of the microorganism in beverages, as well as the pH and acidity were monitored during 28 days of storage at 5°C. It was also analyzed the chemical composition of the extracts and beverages as well as the rheological and sensorial properties of the final products. Although there was an increase in acidity and a decline in pH during the 28 days of storage, the probiotic microorganism maintained a population of 10<sup>8</sup> UFC/mL for all beverage during the experimental period. There was an increase in viscosity and consistency in beverages with higher proportion of quinoa extract (F1 and F2). The formulation F4 (70% soy extract- 30% quinoa extract) showed the lowest hysteresis curve. The formulations F4 and F5 (100% soy extract) obtained the best sensory acceptance, and F4, the higher intention to purchase. Regarding to physical and chemical composition, formulation F3 (with 50% soy extract-50% quinoa extract) and F4 showed the best results compared to similar fermented beverages. Beverage F4 was considered the best beverage developed and, therefore, had its efficacy analyzed from the Simulator Human Microbial Ecosystem (SHIME), phase II of the project. Plate counts, ammonium concentration analysis, short chain fatty acids (SCFA) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) from the ascending, transverse and descending colon were weekly performed. To further elucidate the results, were also analyzed the probiotic beverage, prebiotic beverage and placebo beverage in reactor SHIME. The synbiotic beverage (TS) showed the best microbiological results in the ascending colon, stimulating the growth of *Lactobacillus* spp and *Bifidobacteria* spp and reducing *Clostridium* spp, *Bacteroides*, *Enterobacteria* and *Enterococcus* spp. There was no statistical difference among the prebiotic, probiotic and placebo beverages in ammonium ion concentration, however all beverages differed from the TS, which provided significant reduction of ammonium concentration in the three regions of the colon, particularly in the ascending colon. There wasn't statistical difference for SCFA production among the treatments and the basal period. Plate count and DGGE showed the survival of *L. casei* in the colon. DGGE analysis showed higher richness and diversity of *Lactobacillus* spp community during the treatment with synbiotic beverage, in three compartments of the reactor SHIME, with higher accentuation in the ascending colon. It was possible to develop a new synbiotic beverage, with appropriated physico-chemical, sensory and rheological properties, with beneficial effects on the human intestinal microbiota proved in Human Microbial Ecosystem Simulator.

**Keywords:** fermented beverage, soy, quinoa, SHIME, *Lactobacillus casei*, PCR-DGGE

## LISTA DE FIGURAS

### *CAPITULO II*

<b>Figura 1</b>	Fluxograma de elaboração dos extratos aquosos de quinoa e de soja.....	48
<b>Figura 2</b>	Etapas do processo de elaboração das bebidas fermentadas.....	50
<b>Figura 3</b>	Avaliação do pH e da acidez durante o período de fermentação.....	56
<b>Figura 4</b>	Reogramas da relação entre taxa de deformação e tensão de cisalhamento das bebidas a 10 e 25°C.....	60
<b>Figura 5</b>	Frequência de resposta para a intenção de compra das formulações.....	67

### *CAPÍTULO III*

<b>Figura 1</b>	Fotografia do Simulador do Ecosistema Microbiano Intestinal Humano.....	80
<b>Figura 2</b>	Protocolo experimental de estudo no SEMH.....	82
<b>Figura 3</b>	Etapas do processo de extração de DNA.....	84
<b>Figura 4</b>	População (log UFC/mL) de <i>L. casei</i> na bebida simbiótica ou probiótica, adicionada ao alimento basal e, após a passagem das bebidas pelo estômago e duodeno .....	89
<b>Figura 5</b>	Análise da sobrevivência do <i>L.casei</i> nos três compartimentos do cólon por Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) durante o tratamento com a bebida simbiótica.....	91
<b>Figura 6</b>	Análise da sobrevivência do <i>L.casei</i> nos três compartimentos do cólon por PCR-DGGE durante o tratamento com as bebidas prebióticas, probióticas e placebo.....	92
<b>Figura 7</b>	Diferença da turvação entre os meios dos reatores R3, R4 e R5 no período inicial (A) e final (B) do tratamento simbiótico.....	96
<b>Figura 8</b>	Dendogramas e percentual de similaridade (%) entre os perfis de bandas de cada tratamento no cólon ascendente (R3), transverso (R4) e descendente (R5).....	99
<b>Figura 9</b>	Nível de riqueza nos reatores R3, R4 e R5, os quais simulam as regiões ascendente, transversa e descendente do cólon, em reator SEMH, durante todo período experimental.....	102
<b>Figura 10</b>	Curvas de Pareto-Lorenz nos reatores R3, R4 e R5, os quais simulam as regiões ascendente, transversa e descendente do cólon, em reator SEMH, durante todo período experimental.....	105
<b>Figura 11</b>	Concentração de AGCC (Mmol) produzido nos reatores R3, R4 e R5, os quais simulam as regiões ascendente, tranversa e descendente do cólon, em reator SEMH, durante todo período experimental .....	110

## LISTA DE TABELAS

### *CAPÍTULO II*

<b>Tabela 1</b>	Concentração dos extratos empregados na formulação das bebidas.....	47
<b>Tabela 2</b>	Composição físico-química dos diferentes extratos e bebidas fermentadas (média ±DP)...	54
<b>Tabela 3</b>	População de <i>Lactobacillus casei</i> (logUFC/mL), pH, acidez e potencial de sobrevivência nas diferentes formulações até o 28º dias de estocagem a 5°C.....	59
<b>Tabela 4</b>	Parâmetros reológicos das bebidas fermentadas conservadas à 10°C e 25°C, obtidas pelo modelo da Lei da Potência ( $\tau = K \gamma^n$ ).....	62
<b>Tabela 5</b>	Valores médios (± DP) dos valores de aceitação de cada atributo avaliado nas diferentes formulações.....	64

### *CAPÍTULO III*

<b>Tabela 1</b>	Diferenças na elaboração das bebidas prebiótica, placebo e probiótica.....	78
<b>Tabela 2</b>	Valores de volume, tempo de residência e pH estabelecidos em cada um dos reatores do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH).....	79
<b>Tabela 3</b>	Composição do meio alimentar basal dissolvidos em água destilada.....	81
<b>Tabela 4</b>	Meios de cultura e condições de cultivo utilizados nas análises microbiológicas.....	83
<b>Tabela 5</b>	Média de população (± DP) expressa em log UFC/mL de diferentes grupos bacterianos, nos diferentes compartimentos do reator SEMH que simulam o cólon ascendente transversal e descendente durante todo período experimental.....	93
<b>Tabela 6</b>	Média e desvio da concentração de íons amônio (ppm) produzidos nos reatores R3, R4 e R5, os quais simulam as regiões ascendente, transversal e descendente do cólon, em SEMH, durante todo período experimental.....	107

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	3
	2.1 Alimentos Funcionais.....	3
	2.2 Probióticos, Prebióticos e Simbióticos.....	5
	2.3 <i>Lactobacillus casei</i> .....	7
	2.4 Utilização de extratos vegetais na obtenção de produtos fermentados.....	10
	2.5 Microbiota intestinal.....	14
	2.6 Estudos do comportamento da microbiota.....	16
3	OBJETIVOS.....	18
	3.1 Objetivo geral.....	18
	3.2 Objetivos específicos.....	18
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

### CAPÍTULO II

	BEBIDA FERMENTADA POTECIALMENTE SIMBIÓTICA À BASE DE EXTRATOS AQUOSOS DE SOJA E DE QUINOA.....	29
	RESUMO.....	29
	INTRODUÇÃO.....	30
	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
	Desenvolvimento das bebidas simbióticas .....	32
	Ingredientes .....	32
	Processo de produção dos extratos de quinoa e de soja.....	33
	Processo de elaboração das bebidas fermentadas.....	34
	Períodos das análises.....	36
	Avaliação físico-química.....	37
	Avaliação da viabilidade do <i>Lactobacillus casei</i> Lc-01 nos produtos.....	37
	Caracterização reológica.....	38
	Avaliação sensorial.....	38
	Análise estatística.....	39

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
Caracterização físico-química.....	40
Evolução do pH e acidez durante a fermentação.....	41
Sobrevivência do <i>Lactobacillus casei</i> (Lc-01) durante o armazenamento refrigerado.....	43
Caracterização reológica.....	46
Avaliação Sensorial.....	50
CONCLUSÕES.....	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

### CAPÍTULO III

IMPACTO DE UMA BEBIDA VEGETAL FERMENTADA SOB A MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA UTILIZANDO MODELO GASTROINTESTINAL DINÂMICO.....	60
RESUMO.....	60
INTRODUÇÃO.....	61
MATERIAL E MÉTODOS.....	63
Elaboração do extrato de quinoa e de soja.....	63
Elaboração das bebidas simbiótica, prebiótica, placebo e probiótica.....	63
Preparo do inóculo.....	64
Simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH).....	65
Protocolo experimental.....	67
Análise de íons amônia.....	68
Análises microbiológicas.....	68
Análise da sobrevivência do <i>L. casei</i> às condições do estômago e duodeno.....	69
Comportamento e diversidade de <i>Lactobacillus</i> no cólon.....	69
Extração de DNA.....	70
PCR-DGGE.....	71
Análise de agrupamentos (Dendogramas).....	71
Análise ecológica da população de <i>Lactobacillus</i> spp.....	72
Análise de ácidos graxos de cadeia curta.....	73
Análise estatística.....	74
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74

Sobrevivência do <i>L. casei</i> às condições do estômago e do duodeno.....	74
Análises Microbiológicas.....	78
Análise da composição e interpretação ecológica (riqueza e funcionalidade) da população de <i>Lactobacillus</i> spp. nos reatores R3, R4 e R5 por PCR-DGGE.....	84
Efeito das bebidas na composição da população de <i>Lactobacillus</i> spp.....	84
Interpretação ecológica (riqueza e funcionalidade) da população de <i>Lactobacillus</i> spp no SEMH..	87
Concentração de íons amônia.....	92
Análise de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC) durante as fases experimentais.....	94
CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
<b>CAPÍTULO IV</b>	
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107

# ***CAPÍTULO I***

## 1 INTRODUÇÃO

A procura crescente por alimentos que possam promover o bem estar, a saúde e, conseqüentemente uma melhor qualidade de vida, tem incentivado uma série de pesquisas em busca de novos componentes naturais (GOLDBERG, 2005), impulsionando assim, o desenvolvimento de uma grande variedade de alimentos funcionais (BLANDON *et al.*, 2007).

Dentre eles destacam-se os que possuem culturas probióticas, ingredientes prebióticos ou a combinação de ambos, denominados de simbióticos (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

De acordo com a WHO/FAO (2001), probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados regularmente e em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro e prebióticos, segundo Roberfrid (2007), como ingredientes seletivamente fermentáveis que permitem mudanças específicas, tanto na composição quanto na atividade da microbiota intestinal, conferindo benefícios e bem-estar à saúde do hospedeiro.

O equilíbrio da microbiota intestinal é considerado um fator essencial à saúde e bem estar do hospedeiro e, por esta razão, existe um considerável interesse em elevar o número e a atividade de micro-organismos benéficos pertencentes a microbiota intestinal, principalmente aquelas que habitam o intestino grosso. Algumas estratégias dietéticas, como o consumo regular de probióticos e prebióticos, que podem ser encontrados em produtos lácteos, fermentados ou não, queijos, sucos, sobremesas e bebidas fermentadas à base de extratos vegetais, tem sido utilizadas com a finalidade de se obter esta melhora, tanto na composição, quanto na atividade microbiana intestinal humana (SCHREZENMEIR; VRESE, 2001).

Os produtos de origem vegetal vem ganhando grande espaço no mercado atual, principalmente quando se fala em alimentos funcionais. Existem alguns vegetais que além de apresentarem alto valor nutritivo, ausência de lactose e colesterol, possuem ainda propriedades

funcionais, como é o caso da quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) e da soja, que podem ser transformados em extrato aquoso, proporcionando assim, novas opções de consumo à população.

A quinoa é um pseudo-cereal, ainda pouco explorado comercialmente, mas que vem apresentando demanda crescente no mundo, principalmente por naturalistas que buscam dietas mais saudáveis (FLEMING; GALWEY, 1995). A composição da quinoa, em aminoácidos essenciais, é bastante próxima à da caseína, fração proteica do leite, possuindo todos os aminoácidos essenciais, além de ácidos graxos de alta qualidade ( $\omega 6$ ,  $\omega 3$  e  $\omega 9$ ) (ANDO *et al.*, 2002). De acordo com Vega-Gálvez *et al.* (2010), a quinoa é um excelente exemplo de alimento funcional, com contribuições positivas à nutrição humana, particularmente para todos os processos celulares que requerem proteção antioxidante de membranas, como a atividade neuronal.

Em razão do vasto e emergente comércio de alimentos funcionais, uma série de pesquisas interessadas em comprovar a eficácia destes produtos no organismo humano, seja através de métodos “in vivo” ou “in vitro”, principalmente envolvendo o comportamento da microbiota intestinal, têm sido incentivadas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma bebida potencialmente simbiótica, fermentada com o probiótico *L. casei* e adicionada do prebiótico fruto-oligossacarídeo (FOS), à base de extratos aquosos de quinoa e de soja e avaliar sua ação sob a microbiota intestinal por meio de Simulador do Ecosistema Microbiano Humano (SEMH).

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Alimentos Funcionais**

De origem Japonesa, a definição de alimentos funcionais surgiu pela primeira vez na década de 80, através de um programa de governo que tinha como objetivo o desenvolvimento de alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava grande expectativa de vida (ANJO, 2004). Nesta década, os alimentos funcionais foram definidos como alimentos e/ou ingredientes alimentares que, além de suas funções nutricionais básicas (fonte de energia e substrato para a formação das células e tecidos), possuem em sua composição, uma ou mais substâncias capazes de atuar como moduladores dos processos metabólicos, melhorando as condições de saúde, promovendo o bem-estar e prevenindo o surgimento precoce de doenças degenerativas (SANDERS, 1998).

De acordo com a portaria 398 de 30 de abril de 1999 (BRASIL, 1999), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais pode, além de suas funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, quando consumidos como parte da dieta usual, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”. Estes efeitos devem ser demonstrados e comprovados em uma ou mais funções no organismo (KWAK; JUNES, 2001). Vale ressaltar ainda que estes efeitos, proporcionados pelos alimentos funcionais, restringem-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (SANDERS, 1998).

A procura por alimentos funcionais, por parte da população, tem aumentado de forma crescente. Entre os fatores que envolvem este aumento estão: a opção dos consumidores por prevenir ao invés de curar doenças; o aumento da consciência dos consumidores que, desejando

melhorar a qualidade de vida, optam por hábitos mais saudáveis; o aumento dos custos médicos; o envelhecimento da população; o desejo de combater os males causados pela poluição, por micro-organismos e por agentes químicos e o aumento das evidências científicas sobre a sua eficácia (CÂNDIDO; CAMPOS, 1995; SANDERS, 1998).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2008), “as alegações de alimentos funcionais aprovadas relacionam a propriedade funcional e ou de saúde a um nutriente ou não nutriente do alimento. No entanto, a eficácia da alegação no alimento deve ser avaliada caso a caso, tendo em vista que podem ocorrer variações na ação do nutriente ou não nutriente em função da matriz ou formulação do produto”. Ômega 3, licopeno, luteína, zeaxantina, fibras alimentares, beta glucana, dextrina resistente, FOS, lactulose, inulina, polidextrose, quitosana, fitoesteróis, polióis, proteína de soja, probióticos, flavonóides, catequinas, antocioninas, isoflavonas e licopenos são alguns exemplos de nutrientes ou não nutrientes do alimento que o caracteriza como funcional. (SALGADO, 2005; BRASIL, 2008).

Uma ampla lista de alimentos foi estabelecida pela Anvisa como alimentos funcionais. Alguns exemplos são: soja, alho, cebola, linhaça, berinjela, diversos tipos de óleos vegetais e de peixe, brócolis, açaí, acerola, lecitina de ovos, quinoa, lecitina de soja, levedura de cerveja, cenoura, beterraba, aveia, uva, tomate, maçã, cevada, leite fermentados e iogurtes (SALGADO, 2005; BRASIL, 2008).

Diversos são os benefícios relacionados com o consumo habitual de alimentos funcionais, entre eles estão o auxílio no funcionamento do intestino, ação antioxidante, manutenção de níveis saudáveis de triacilgliceróis, contribuição para o equilíbrio da flora intestinal, redução da absorção de gordura e colesterol (BRASIL, 2008).

## 2.2 Probióticos, Prebióticos e Simbióticos

Probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, administrados regularmente e em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (WHO/FAO, 2001; SANDERS; KLAENHAMMER, 2001).

Uma série de efeitos benéficos está relacionada com o consumo de probióticos, entretanto, para conferir esses benefícios à saúde do hospedeiro, deve haver um consumo adequado em termos de quantidade e de duração, dependendo de cada cepa utilizada e de acordo com as recomendações do fabricante (WHO; FAO, 2006).

Alguns efeitos benéficos proporcionados pelos probióticos são: fermentação de substratos como os polissacarídeos, amidos resistentes e fibras, resultando na produção de ácidos graxos de cadeia curta e conseqüentemente redução do pH, que exerce ação bactericida; influência na diminuição dos níveis intestinais de amônia; participação na produção de vitaminas do complexo B; redução dos níveis de lipídeos séricos bem como influência na resposta imune (CUMMINGS *et al.*, 2001; BLAUT, 200; MAI, 2013). Alguns receptores do sistema imunológico intestinal, tais como TLRs (receptores *Toll-Like*) reconhecem certos componentes da parede celular ou DNA específico de diferentes bactérias. A ativação das TLRs resulta na indução de complexas cascatas de sinal de transdução intracelular e finalmente na modulação da expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias (CARIO, 2005). As bactérias probióticas podem agir por meio da estimulação de TLRs e certos efeitos, exercidos por algumas cepas probióticas, parecem ser mediados através de interações com distintos TLRs (CARIO, 2005).

No intestino, os probióticos possuem capacidade de ocupar nichos da mucosa, impedindo os patógenos de ocuparem esses sítios. Além disso, as bacteriocinas, consideradas proteínas ou peptídeos metabolicamente ativos e sintetizadas nos ribossomos a partir de aminoácidos presentes na bactéria probiótica, são capazes de exercer ação local contra micro-organismos patogênicos e de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias (DENIPOTE *et al.*, 2010).

Os alimentos probióticos mais disponíveis no mercado incluem sobremesas à base de leite, leite fermentado, leite em pó, sorvete, iogurte e diversos tipos de queijo. Existem também, os probióticos na forma de cápsulas ou produtos em pó para serem dissolvidos em bebidas frias, sucos fortificados, bebidas de origem vegetal e maioneses (SAAD, 2006).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2008) atualizada, os micro-organismos considerados probióticos são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei variedade rhamnosus*, *Lactobacillus casei variedade defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*.

A quantidade mínima de micro-organismos probióticos viáveis necessária para exercer efeitos benéficos ao hospedeiro deve estar situada na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na quantidade de produto recomendada para consumo diário, conforme indicação do fabricante. Por exemplo, se a recomendação diária do produto for de 200mL, deve haver uma contagem de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL. Valores menores podem ser aceitos, porém a empresa deve comprovar sua eficácia (BRASIL, 2008).

Prebióticos são compostos orgânicos não metabolizados pelo trato gastrointestinal superior e que servem como substrato para a microbiota do cólon. Permitem mudanças na composição e na atividade da microbiota intestinal, conferindo benefícios e bem-estar à saúde do hospedeiro (ROBERFROID, 2007; SOUZA *et al.*, 2010). A ação sinérgica dos probióticos auxiliados pelas substâncias prebióticas dão origem aos simbióticos, ou seja, a interação entre o probiótico e o prebiótico (DENIPOTE *et al.*, 2010).

Dentre os prebióticos, têm-se os fruto-oligosacarídeos (FOS) ou oligofrutoses resistentes, ou seja, carboidratos complexos de configuração molecular que os tornam resistentes à ação hidrolítica da enzima salivar e intestinal, permanecendo intacto ao atingir a região do cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

O FOS desempenha diversas funções fisiológicas no organismo, como alteração do trânsito intestinal, promovendo a redução de metabólitos tóxicos; o aumento da frequência de evacuação, prevenindo a constipação e o câncer de cólon; a redução do colesterol plasmático e da hipertrigliceridemia; a absorção de cálcio diminuindo o risco de osteoporose; a melhora da biodisponibilidade de minerais e contribuição para o aumento da concentração das bifidobactérias no cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995; CHERBUT, 2002).

O FOS melhora o metabolismo das bifidobactérias e diminuem o pH do intestino grosso, inibindo a multiplicação de bactérias putrefativas. A acidificação do meio ocorre com a produção dos ácidos graxos de cadeia curta e com o aumento da produção das bactérias produtoras de ácidos orgânicos. Pode-se observar ainda o aumento da digestão e metabolismo da lactose, aumento de reciclagem de compostos como o estrógeno, aumento da produção de compostos imuno-estimulantes, que possuem atividade antitumoral, diminuição do crescimento de bactérias nocivas e diminuição de compostos carcinogênicos (YUN, 1996).

### ***2.3 Lactobacillus casei***

*Lactobacillus casei* são um grupo de bactérias lácticas, Gram-positivas, não esporuladas, catalase-negativas, desprovidas de citocromos, anaeróbias, porém aerotolerantes, ácido-tolerantes e estritamente fermentativas (HOLZAPFEL *et al.*, 2001).

A divisão clássica dos lactobacilos está baseada em suas características fermentativas e inclui os micro-organismos homofermentativos, heterofermentativos e facultativamente heterofermentativo (AXELSSON, 2004). Tradicionalmente, *L. casei* encaixam-se no grupo dos micro-organismos homofermentativos, ou seja, bactérias que fermentam glicose principalmente em ácido láctico e não fermentam pentoses ou gliconato, podendo, entretanto, mudar sua classificação para o padrão heterofermentativo, dependendo da disponibilidade de carboidratos

e/ou presença de condições apropriadas à cultura, permitindo incubação tanto em meios aeróbios quanto anaeróbios (SUTULA *et al.*, 2012).

Para sua sobrevivência, *L. casei* exigem complexos requerimentos nutricionais, tais como, carboidratos, aminoácidos, peptídeos, sais, derivados de ácidos nucléicos, riboflavina, ácido fólico, pantotenato de cálcio e niacina. Tiamina e vitamina B12, entretanto, não são requeridas (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

A vasta aplicação comercial de *L. casei* pode ser consequência de sua notável adaptação ecológica a diversos *habitat* (KANDLER; WEISS, 1986). As espécies pertencentes ao gênero lactobacilos são, no geral, encontradas em locais onde carboidratos estão disponíveis como substrato, tais como membranas de mucosas humanas e animais (cavidade oral, intestino e vagina), plantas ou materiais de origem vegetal e produtos manufaturados como bebidas fermentadas (WOOD; HOLZAPFEL, 1995).

O desenvolvimento de produtos lácteos contendo micro-organismos probióticos é um importante foco para a indústria de alimentos (KOURKOUTAS *et al.*, 2005) e seu sucesso dependerá de alguns requisitos básicos em relação a vida de prateleira, propriedades sensoriais e viabilidade do micro-organismo. De acordo com Brasil (2000), o produto final deve ter vida-de-prateleira média satisfatória (variando de 1 a 30 dias) e propriedades sensoriais agradáveis (cor, aroma, sabor e textura), com os micro-organismos permanecendo viáveis e em número suficientemente elevado ( $> 10^6$  UFC/mL).

Diversos trabalhos, como por exemplo os estudos conduzidos por Phillips *et al.* (2006), Fuchs *et al.* (2006) e Guergoletto *et al.* (2010), têm mostrado que o *L. casei* apresentam uma elevada resistência ao suco gástrico e às secreções biliares, conseguindo, dessa forma, chegar até o trato intestinal e colonizá-lo temporariamente. De acordo com Vinderola *et al.* (2000) e Faria *et al.* (2006), o *L. casei* mostraram resultados satisfatórios com relação à viabilidade celular durante o armazenamento em iogurte e queijo respectivamente. Além disso, o *L. casei* apresentam

atividade antimicrobiana contra micro-organismos patógenos, contaminantes e deteriorantes em alimentos, tornando-os bioconservantes em alimentos (CALDERÓN *et al.*, 2007).

Coelho (2009) também observou manutenção da viabilidade do *L.casei* em suco de laranja armazenado durante 42 dias. A contagem do micro-organismo esteve acima de  $10^9$  UFC/mL até o final do experimento. Fuchs *et al.* (2006), observaram resistência da cepa de *L. casei* frente a um ambiente ácido testado. Segundo este autor, *L. casei* são capazes de manter o número de células viáveis constantes em meio com pH igual a 4 e apesar de ocorrer leve queda na contagem de micro-organismos em pH 2, o número de células continua viável. Desta forma, o micro-organismo é capaz de ultrapassar a primeira barreira fisiológica do organismo que é o baixo valor de pH encontrado no estômago, evidenciando assim uma importante característica probiótica (GIBSON, 2004).

Em relação aos efeitos benéficos à saúde humana, os Lactobacilos em geral, quando consumidos diariamente e em concentrações adequadas nos alimentos, afetam benéficamente o intestino humano por apresentar capacidade de aumentar o número de bactérias intestinais benéficas e de reduzir o de bactérias nocivas além de atenuar diarreias, causadas pela proliferação de bactérias nocivas (KOEBNICK *et al.*, 2003; YUKI *et al.*, 1999). De acordo com alguns estudos, *Lactobacillus casei* apresentam atividade intestinal anti-inflamatória, são capazes de reduzir a incidência de colites e de lesões induzidas por 2,4,6 -ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS), além de reduzirem a translocação de bactérias para a linfa, gânglios, fígado e baço (LLOPIS *et al.*, 2005).

O consumo de *Lactobacillus casei* Lc-01 tem sido associado a efeitos benéficos tais como estimulação do sistema imune e alívio dos sintomas da doença de Chron (ITSARANUWAT *et al.*, 2003). Esta cepa apresenta uma alta taxa de sobrevivência nos produtos, além de resistirem à passagem pelo suco gástrico e entérico, principalmente quando associado à fibras (GUERGOLETTO *et al.*, 2010).

Em vista dessas capacidades e consequentes benefícios à saúde, *L. casei* associado à prebióticos como o FOS, têm sido utilizados numa ampla variedade de alimentos como iogurtes, leites, queijos e extratos vegetais (PUPIN, 2002).

#### **2.4 Utilização de extratos vegetais na obtenção de produtos fermentados**

A utilização de extratos vegetais em substituição ao leite na obtenção de produtos fermentados vem ganhando projeções consideráveis em razão de seus benefícios naturais, tais como ausência de colesterol e presença de compostos bioativos, como flavonoides e antocianinas. Mesmo que a preferência nacional pelo leite ainda seja inquestionável, o consumo de produtos elaborados à base de extratos vegetais vem ganhando espaço, pois, mesmo sabendo que o leite é um alimento rico em proteínas, lipídeos, energia e cálcio, há quem não queira ou não possa depender dele como fonte energética e de nutrientes (FARNWORTH *et al.*, 2007).

A intolerância à lactose é uma inabilidade para digerir completamente a lactose, o açúcar predominante no leite. A lactose é um dissacarídeo e sua absorção requer hidrólise prévia no intestino delgado por meio da enzima lactase. A deficiência desta enzima conduz à má-digestão da lactose e aos consequentes sintomas gastrintestinais típicos da intolerância. Quando não digerida, a lactose passa pelo cólon e é fermentada por bactérias colônicas, havendo produção de ácidos orgânicos de cadeia curta e gases. Isto resulta em cólicas, flatulência, dor e diarreia osmótica (TEVES *et al.*, 2008).

Em decorrência da deficiência da lactase, aproximadamente 37 milhões de brasileiros apresentem intolerância ao leite e, portanto, estão sujeitas a sintomas desagradáveis ao ingerir alimentos contendo lactose (PEREIRA FILHO; FURLAN, 2004). Dessa forma, a crescente procura por extratos vegetais pode ser explicada e compreendida não só em função de seus benefícios nutricionais e funcionais, mas também em razão de sua contribuição nos casos de

intolerâncias e/ou outras questões que impedem o indivíduo de consumir produtos de origem animal, como é o caso do leite.

A soja e seus derivados têm recebido há décadas atenção dos pesquisadores, principalmente devido à quantidade e qualidade de sua proteína, sendo considerada, dentre os vegetais, o melhor substituto de produtos de origem animal. Além disso, a soja é importante fonte de outros compostos, como fibras, oligossacarídeos com potencial prebiótico, como rafinose e estaquiose, vitaminas e minerais (DE ANGELIS, 1999).

A soja contém, em média, 40% de proteínas, 20% de lipídios, 5% de minerais e 34% de carboidratos (glicose, frutose, sacarose, fibras e oligossacarídeos) (EMBRAPA, 2011). Assim como as demais leguminosas, a soja apresenta escassez de aminoácidos sulfurados, tais como metionina e cisteína, e um alto teor do aminoácido lisina (AMARAL, 2006).

Em comparação a outras plantas, a soja contém o maior teor médio de isoflavonas (MANDARINO, 2008), principalmente daidzeína, genisteína e gliciteína, sendo encontradas nas formas não-conjugadas ou agliconas, conjugadas ou glicosiladas (daidzina, genistina e glicitina), acetilglicosiladas e malonilglicosiladas (BEDANI; ROSSI, 2005). Estes são os compostos biologicamente ativos mais estudados dessa leguminosa (XIAO, 2008), e por apresentarem semelhança estrutural e funcional com o hormônio feminino estradiol, possuem ação antioxidante e hipocolesterolemiantes, (ZHANG *et al.* 2003, OMONI; ALUKO, 2005).

O extrato hidrossolúvel de soja (EHS), conhecido popularmente como “leite de soja”, constitui um dos produtos mais difundidos dessa leguminosa. De acordo com a EMBRAPA (2011), em média, cada 100 mL de EHS contém 52 calorias; 2,5% de carboidratos; 3,4% de proteínas; 2,3% de lipídios; 40 mg de cálcio; 105 mg de potássio; 1,2 mg de ferro; 40 mg de vitamina B1 e 120 mg de vitamina B2.

Segundo Casé e Deliza (2005), o extrato aquoso de soja é um produto de elevado valor nutricional, com adequado conteúdo proteico, sendo um excelente produto para os indivíduos

intolerantes à lactose e hiperlipidêmicos por não conter lactose e colesterol. Inicialmente, sua utilização esteve limitada a pessoas com estes tipos de intolerâncias, vegetarianos e indivíduos com restrições alimentares ou de ordem religiosa. Pode-se dizer que os extratos comerciais de soja já alcançaram penetração considerável no mercado como fonte proteica em substituição ao leite (BERK, 1992; LIU, 1999). O consumo vem aumentando, visivelmente, impulsionado pelo novo enfoque da soja relacionado com a redução do risco de algumas doenças.

Estudos epidemiológicos demonstraram que, o câncer de mama, assim como as doenças cardiovasculares, a osteoporose, o câncer de próstata e os sintomas da menopausa são raros nas sociedades onde o consumo da soja é grande, dando indícios do possível papel benéfico dessa leguminosa na saúde do indivíduo (NEVEN, 1998).

Existem ainda, outros alimentos de alto valor nutritivo, com ausência de lactose e colesterol, como por exemplo, a quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), que podem também oferecer o extrato aquoso vegetal, proporcionando alguns benefícios semelhantes aos oferecidos pelo extrato de soja.

A quinoa é um pseudocereal, autóctone da região Andina, que vem apresentando demanda crescente no mundo, principalmente por naturalistas que buscam alternativas de produtos com baixo colesterol e ausência de glúten (FLEMING; GALWEY 1995; SPEHAR; SANTOS, 2002). Há anos vem atraindo a atenção em escala global devido ao seu alto valor nutritivo, principalmente no que diz respeito à qualidade proteica e a grande variedade de vitaminas e minerais, além de ser adequada para pessoas que sofrem de alergias alimentares e/ou querem ter uma alimentação saudável (KOZIOL, 1990; FLEMING; GALWEY 1995; SPEHAR; SANTOS, 2002).

A quinoa tem um alto teor protéico (de 14 a 16 %, dependendo da variedade do grão) em comparação com a maioria dos cereais, mas possui menor teor de proteína do que leguminosas e oleaginosas (MAZZA *et al.*, 1992), porém segundo Theurer-Wood (1985), seu elevado teor em

metionina e cisteína faz da quinoa um bom complemento para leguminosas, que se limitam a esses aminoácidos.

Pelo fato da composição da quinoa, em aminoácidos essenciais, ser bastante aproximada à da caseína, fração proteica do leite, possuindo todos os aminoácidos essenciais, seu consumo na forma de papas ou mingaus no pós desmame, como tradicionalmente são preparados os alimentos infantis entre os habitantes da zona rural brasileira, seria uma opção bastante adequada (ASCHERI *et al.*, 2002). Os adultos podem preparar vários pratos, nos quais a quinoa contribui para aumentar a qualidade alimentar e realçar o sabor típico. É usada também como suplemento na dieta de idosos de convalescentes, além de seu emprego em regimes especiais para pacientes celíacos (ASCHERI *et al.*, 2002; SPEHAR, 2002).

Em relação aos carboidratos, o amido é o maior constituinte da quinoa, representando mais que 58% dos componentes das sementes (RANHOTRA *et al.*, 1993). Os açúcares livres (glicose, frutose e sacarose) chegam a 6,2% e as fibras totais constituem 7,8% do grão (ROMO *et al.*, 2006). A quinoa possui ainda lipídeos de alta qualidade (em torno de 5,6%), com predomínio de ácidos graxos insaturados representados por ácidos oleico ( $\omega$ 9), linolênico ( $\omega$ 3) e linoleico ( $\omega$ 6) (ANDO *et al.*, 2002, ROMO *et al.*, 2006). A quinoa é também uma importante fonte de ferro, com biodisponibilidade maior que a do sulfato ferroso (KOZIOL, 1990). Por essa característica, a quinoa pode ser também considerada como um alimento funcional (SPEHAR, 2006). De acordo com James (2009), o referido pseudogrão é também rico em magnésio além de fornecer fibras, vitamina E, fósforo, cobre, vitaminas do complexo B, potássio, cálcio e zinco.

Vega-Gálvez *et al.* (2010), considera a quinoa um excelente exemplo de alimento funcional, com contribuições positivas à nutrição humana, particularmente para todos os processos celulares que requerem proteção antioxidante de membranas, como a atividade neuronal. A quinoa possui minerais e aminoácidos com implicações potenciais para ajudar a memória e diminuir a ansiedade sob condições estressantes. Estas propriedades funcionais são

proporcionadas por compostos ativos presentes no grão de quinoa, tais como, minerais, vitaminas, ácidos graxos e antioxidantes (VEGA-GALVÉZ *et al.*, 2010).

Levando em conta as características dos produtos citados (probióticos, prebióticos e extratos vegetais), pode-se sugerir que os mesmos podem ser úteis na formulação de novos produtos funcionais, com provável ação positiva na microbiota intestinal.

## **2.5 Microbiota intestinal**

Estima-se que  $10^{14}$  micro-organismos intestinais pertencentes a mais de 1000 diferentes espécies (RAJILIC-STOJANOVIC *et al.*, 2007) estão distribuídos ao longo do trato gastrointestinal humano, alcançando maiores densidade no cólon (PAYNE *et al.*, 2011).

O estômago e o intestino delgado contêm poucas espécies, tanto aderidas ao seu epitélio quanto livres no seu lúmen. O cólon contém um complexo e dinâmico ecossistema microbiano, com grande concentração de bactérias (HART *et al.*, 2002). Dentre elas estão as bifidobactérias e lactobacilos, consideradas bactérias não-patogênicas ou benéficas (CUMMINGS; MACFARLANE, 2002). No estômago são encontradas quantidades abaixo de  $10^3$  UFC/g devido ao pH ácido do meio. Este número aumenta para  $10^4$  a  $10^7$  UFC/g no intestino delgado, onde rápido trânsito e secreção de bile e suco pancreático limitam o crescimento bacteriano. O intestino grosso é a área mais povoada devido às condições favoráveis incluindo os tempos de trânsito intestinal lento, disponibilidade de nutrientes e um pH favorável (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Mais de  $10^{12}$  UFC/g habitam o cólon, totalizando 1-2Kg do nosso peso corporal (PAYNE *et al.*, 2011).

Mais de 50 filos bacterianos foram identificados, porém a microbiota humana é dominada por apenas quatro principais filos: Firmicutes, Bacteroides, Actinobacteria e Proteobacteria (DETHLEFSEN *et al.*, 2007). A inclusão de Clostridia dentro do filo Firmicutes torna-o o mais abundante filo, abrangendo 46-58% das bactérias totais (HARMSSEN *et al.*, 2002; LAY *et al.*,

2005). Outros habitantes importantes incluem os grupos *Bacteroides-Prevotella* (10-30%), *Bifidobacterium* (4,4-4,8%), *Enterobacteriaceae* (0,1-0,2%) e *Lactobacillus* e *Enterococcus* (ambos com 0,1-1,8%) (LAY *et al.*, 2005; ZOETENDAL *et al.*, 2006).

Embora a microbiota do cólon seja relativamente estável ao longo da vida adulta, alterações relacionadas com a idade, dieta e reatividade do sistema imunológico inevitavelmente afetam a composição da população do trato gastrointestinal, gerando uma redução geral na diversidade de grande parte das espécies comensais, podendo resultar no aumento da putrefação no colón e uma maior susceptibilidade à doenças. A estratégia para contornar esta situação é a inclusão de suplementos dietéticos contendo prebióticos, probióticos ou uma combinação de ambos (WOODMANSEY, 2007).

O sucesso da sobrevivência de bactérias probióticas no cólon humano depende de sua capacidade de sobrevivência no ambiente ácido do estômago, sais biliares e substratos do intestino delgado e na capacidade de competição por nichos com os outros micro-organismos do meio (WIELE *et al.*, 2004).

A comunidade microbiana intestinal possui um papel significativo na síntese de produtos da fermentação, que fornecem energia ao epitélio do cólon; no processo de digestão dos alimentos; na bioconversão de compostos endógenos e exógenos; na imunomodulação; síntese de vitaminas K e B12 e resistência contra infecções causadas por patógenos intestinais exógenos (CONLY; STEIN, 1992; GIBSON; ROBERFROID, 1995). Tais micro-organismos fermentam fibras dietéticas não digeríveis (prebióticos), resultando na formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Estes AGCC constituem a principal fonte de energia aos enterócitos e colonócitos, estimulam também a proliferação celular do epitélio, o fluxo sanguíneo visceral e intensificam a absorção de sódio e água (ALMEIDA *et al.*, 2009).

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

Em função destes papéis, entre outros da microbiota intestinal, já citados anteriormente, o trato gastrintestinal tem sido frequentemente estudado e, nas últimas décadas, diversos simuladores intestinais foram desenvolvidos para facilitar este campo de pesquisa (MOLLY *et al.*, 1993).

## **2.6 Estudos do comportamento da microbiota**

O estudo do comportamento da microbiota intestinal na presença de alimentos pró e prébióticos ou de ambos pode ser realizado por meio de modelos *in vivo* ou *in vitro*. Os modelos *in vivo* podem ser estudados utilizando voluntários humanos saudáveis, pacientes hospitalizados ou modelo animal, porém estes modelos apresentam algumas limitações, tais como, elevado custo, demora na obtenção de resultados e tipo de alimento ou drogas administradas (MACFARLANE; MACFARLANE, 2007). Os modelos *in vitro* permitem simplificar a realidade, podendo estudar separadamente o metabolismo da microbiota nativa e adicionada, na presença de substratos específicos (MACFARLANE *et al.*, 2004).

Os modelos *in vitro* mais adequados para estudo das diferentes funções intestinais são os de sistema em batelada, semi-contínuos ou contínuos (SALMINEN *et al.*, 1998). Os modelos de cultivo contínuo ou semi-contínuo são utilizados para simular o intestino grosso, apresentando várias vantagens. Algumas delas referem-se a facilidade de utilização do sistema, a possibilidade de uso de substâncias radioativas e o baixo custo de utilização (GIBSON ; FULLER, 2000).

Os modelos *in vitro* de fermentação intestinal representam um plataforma tecnológica e inovadora que permitem investigações, tanto na existência das espécies microbianas intestinais

quanto de suas respectivas funcionalidades. Em sua essência, os modelos de fermentação *in vitro* são caracterizado pela inoculação de um único ou múltiplos reatores com material fecal e que operam sob tempo de retenção, temperatura e pH semelhantes aos encontrados em humanos e sob condições anaeróbias (MACFARLANE *et al.*, 1998; CINQUIN *et al.*, 2006).

O modelo de cultivo contínuo vêm sendo utilizado na investigação do metabolismo e da ecologia da microbiota intestinal, com ênfase na utilização de probióticos (PAYNE *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2003 ), prebióticos (RYCROFT *et al.*, 2001 ; TZORTZIS *et al.*, 2005) .

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Desenvolver e avaliar uma bebida potencialmente simbiótica, fermentada com *Lactobacillus casei* (Lc-01) e adicionada de fruto-oligofrutose (FOS), à base de extratos aquosos de quinoa e de soja.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Elaborar bebidas fermentadas conforme 5 tratamentos com diferentes concentrações de extrato aquoso de quinoa e de soja
- Avaliar físico-química, sensorial e reologicamente as diferentes formulações de bebidas potencialmente simbióticas;
- Avaliar a viabilidade do *Lactobacillus casei* nas diferentes formulações;
- Definir a melhor formulação desenvolvida de acordo com os resultados físico-químicos, sensoriais e reológicos e de viabilidade do micro-organismo;
- Avaliar a influência do consumo da bebida fermentada potencialmente simbiótica, escolhida como a melhor dentre as 5 formulações elaboradas, em simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH) sob a microbiota intestinal nativa nas diferentes regiões do cólon (ascendente, transversa e descendente);
- Testar no SEMH, além da bebida simbiótica, o produto probiótico (bebida fermentada com o *L.casei* e sem adição de FOS), o produto prebiótico (acidificado artificialmente e com acréscimo de FOS) e a bebida placebo (acidificado artificialmente e sem adição de

FOS), com o intuito de verificar a influencia do probiótico, do prebiótico, da associação de ambos e da bebida placebo sob a microbiota intestinal nativa.

- Avaliar a microbiota das regiões que simulam o cólon ascendente, transverso e descendente, por meio de contagem de micro-organismos específicos, da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e de íons amônia;
- Avaliar a sobrevivência do *Lactobacillus casei* no SEMH por métodos dependentes (microbiologia convencional por placas) e independentes de cultivo (PCR-DGGE);
- Avaliar o comportamento e a diversidade da comunidade de *Lactobacillus* spp nos três compartimentos do cólon simulados no reator SEMH por método de biologia molecular; eletroforese em gel com gradiente de desnaturação ( PCR-DGGE).

#### 4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIB, V. B. P. Disbiose intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.24, n.1 p.58-65, 2009.

AMARAL, V. M. G. **A importância da soja como alimento funcional para a qualidade de vida e saúde**. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Mecânica/ Gestão da Qualidade Total) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

ANDO, H.; CHEN, YI-CHUN; TANG, H.; SHIMIZU, M.; WATANABE, K.; MITSUNAGA, T. Food Components in fractions of quinoa seed. **Food Science Technology Research**, v.8, n.1, p. 80-84, 2002.

ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.3, n.2, p.145-154, 2004.

ASCHERI, J. L.; SPEHAR, C. R.; NASCIMENTO, N. E. Caracterización química comparativa de harinas instantâneas por extrusión de quinua (*Chenopodium quinoa* willd.), mais y arroz. **Alimentaria**, v.39, n.331, p. 82-89, 2002.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. *In*: SALMINEN, S., WRIGHT, A., OUWEHAND, A. (eds). **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 2004. p.1-66.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A. Isoflavonas: bioquímica, fisiologia e implicações para a saúde. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.23, n.2, p.231 – 264, 2005.

BERK, Z. Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome (FAO). **Agricultural Services Bulletin**, n.97, 1992. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e00.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2012.

BLANDON, J.; CRANFIELD, J.; HENSON, S. 2007. International food economy research group: department of food, agricultural and resource economics. Disponível em: <[http://www4.agr.gc.ca/resources/prod/doc/misb/fbba/nutra/pdf/u\\_of\\_guelph\\_functional\\_foods\\_review\\_final\\_25jan2008\\_en.pdf](http://www4.agr.gc.ca/resources/prod/doc/misb/fbba/nutra/pdf/u_of_guelph_functional_foods_review_final_25jan2008_en.pdf)>. Acesso em: 02/02/ 2012.

BLAUT, M. Relationship of probiotics and food to intestinal microflora. **European Journal of Nutrition**, v.41, n.1, p.11-16, 2002.

BRASIL. ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos - IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**, 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 31 jan. 2012.

BRASIL. Portaria 398, de 30 de abril de 1999. **Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos.** Disponível em :<<http://www.ivegetal.com.br/cvegetal/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Correlata%5CPortaria%20n%C2%BA%20398%20de%2030%20de%20abril%20de%201999.pdf>>. Acesso em : 10 jan. 2012.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n.º 36, de 31 de outubro de 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas.** Disponível em:<[http://www.agais.com/normas/leite/leite\\_rtfiq\\_beb\\_lacteas.htm](http://www.agais.com/normas/leite/leite_rtfiq_beb_lacteas.htm)>. Acesso em: 10 jan. 2012

CALDERÓN, O.; PADILLA, C.; CHAVES, C.; VILLALOBOS, L.; ARIAS, M. L. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.57, n.1, p. 51-56, 2007.

CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, M. **Alimentos para fins especiais: Dietéticos.** São Paulo: Varela, 1995. p. 200-243.

CANO, P.G.; PERDIGÓN, G. Probiotics induce resistance to enteropathogens in a re-nourished mouse model. **Journal of Dairy Research**, v.70, n.4, p 433-440, 2003.

CARIO, E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like Receptors and NOD2. **Gut**, v.54, n.8, p.1182-1193, 2005.

CASÉ, F.; DELIZA, R. Produção de ‘leite’ de soja enriquecido com cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, p. 86-91, 2005.

CHERBUT, C. Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. **British Journal of Nutrition**, v.87, n.2, p.159-162, 2002.

CINQUIN, C.; LE BLAY, G.; FLISS, I.; LACROIX, C. New three-stage in vitro model for infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota. **FEMS microbiology ecology**, v. 57, n.2 p. 324–336, 2006.

COELHO, J. C. **Elaboração de bebida probiótica a partir de suco de laranja fermentado com *Lactobacillus casei*.** 2009, 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

CONLY, J. M.; STEIN, K. The production of menaquinones (vitamin-K2) by intestinal bacteria and their role in maintaining coagulation homeostasis. **Progress in Food and Nutrition Science**, v.16, n.4, p.307–343, 1992.

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

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T.; ENGLYST, H. N. Prebiotic digestion and fermentation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p. 415–420, 2001.

DE ANGELIS, R. C. **Fome Oculta**: Bases fisiológicas para reduzir seu risco. São Paulo: Atheneu, 1999. 727 p.

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

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

DJOUZI, Z.; ANDRIEUX, C.; DEGIVRY, M. C.; BOULEY, C.; SZYLIT, O. The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* DN 114.001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal microflora in germ-free rats and in human flora-associated rats. **Journal of Nutrition**, v.127, n.11, p. 2260-2266, 1997.

EMBRAPA . Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja na alimentação**. Disponível em: < [http://www.cnpso.embrapa.br/soja\\_alimentacao/index.php?pagina=23](http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=23)>. Acesso em: 15 jun 2011

FARIA, C. P.; BENEDET, H. D.; GUERROUE, J. L. Análise de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei* e suplementado com *Bifidobacterium longum*. **Ciências agrárias**, v.27, n.3, p.407-414, 2006.

FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I.; DESJARDINS, M. P.; GARDNER, N.; FLISS, I.; CHAMPAGNE, C. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation, **International Journal of Food Microbiology**, v.116, n.1, p. 174–181, 2007.

FLEMING, J. E.; GALWEY, N. W. Quinoa (*Chenopodium quinoa*). In: WILLIAMS, J.T. (Ed.). **Cereals and Pseudocereals**. London: Chapman and Hall, 1995. p. 3-83.

FUCHS, R. H. B.; TANAMATI, A. C.; ANTONIOLI, C. M.; GASPARELLO, E. A.; DONEDA, I. Utilização de *lactobacillus casei* e cultura iniciadora na obtenção de iogurte suplementado com inulina e oligofrutose. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.24, n.1, p. 83-98, 2006.

GIBSON, G. R. Fibre and effects on probiotics (the probiotic concept). **Clinical Nutrition Supplements**, v.1, n.2, p. 25-31, 2004.

GIBSON, G. R. ; FULLER, R. Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **Journal of Nutrition**, v.130, n.2, p. 391-395, 2000.

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

GOLDBERG, R. M. Advances in the treatment of metastatic colorectal cancer. **The Oncologist**, v.10, n.3, p.40-48, 2005.

GUERGOLETTI, K. B.; MAGNANI, M.; JUCA SAN MARTIN, J. S.; ANDRADE, C. G. T.; GARCIA, S. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, n.2, p.415–421, 2010.

- HARMSSEN, H. J. M.; RAANGS, G. C.; HE, T.; DEGENER, J. E.; GJALT W. WELLING, G. W. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.6, p. 2982–2990, 2002.
- HART, A. L.; STAGG, A. J.; FRAME, M.; GRAFFNER, H.; GLISE, H.; FALK, P.; KAMM, M. A. The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.16, n.8, p. 1383-93, 2002.
- HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p. 365-373, 2001.
- HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics, **Food Research International**, v.35, n.2-4, p.109-116, 2002.
- JAMES, L. E. A. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Composition, Chemistry, Nutritional, and Functional Properties. **Advances in food and Nutrition research**, v.58, n.1, p. 1-31, 2009.
- KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus*. In: P. H. A. SNEATH, N. S. MAIR; M. E. SHARPE; J. G. HOLT (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 9. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. p. 1063-1065.
- KOEBNICK, C.; WAGNER, I.; LEITZMANN, P.; STERN, U.; ZUNFT, H. F. Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation, **Canadian Journal of Gastroenterology**, v.17, n.11, p. 655–659, 2003.
- KOURKOUTAS, Y.; XOLIAS, V.; KALLIS, M.; BEZIRTZOGLU, E.; KANELLAKI M. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. **Process Biochemistry**, v.40, n.1, p. 411-416, 2005.
- KOZIOL, M. J. Composición química. In: WAHLI, C. **Quinoa hacia su cultivo comercial**. Ecuador: Latinreco, 1990. p. 137-159.
- KWAK, N. S.; JUKES, D. L. Functional foods: part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**, v.12, n.2, p. 99-107, 2001.
- LAY, C.; RIGOTTIER-GOIS, L.; HOLMSTROM, K.; RAJILIC, M.; VAUGHAN, E.E.; de VOS, W. M.; COLLINS, M. D.; THIEL, R.; NAMSOLLECK, P.; MICHAËL BLAUT, M.; DORÉ, J. Colonic microbiota signatures across five northern European countries. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.7, p. 4153-4155, 2005.
- LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**. New York: Chapman & Hall, 1999. 532 p.
- LLOPIS, M.; ANTOLÍN, M.; GUARNER, F.; SALAS, A.; JMALAGELADA, J-R. Mucosal colonisation with *Lactobacillus casei* mitigates barrier injury induced by exposure to trinitrobenzene sulphonic acid. **Gut**, v.54, n.7, p. 955–959, 2005.

MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. **Current Opinion in Biotechnology**, v.18, n.2, p.156-162, 2007.

MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S.; GIBSON, G. R. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. **The Journal Microbial Ecology**, v.35, n.2, p. 180–187, 1998.

MACFARLANE, S.; FURRIE, E.; CUMMINGS, J. H.; MCFARLANE, G. T. Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, n.12, p.1690-1699, 2004.

MAI, V. Health Benefits Mediated by Probiotics - How Can we Better Establish Them? **Journal of Probiotics & Health**, v.1, n.3, p.1-3, 2013 2013.

MANDARINO, J. M. G. Compostos antinutricionais da soja: caracterização e propriedades funcionais. *In*: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. (Eds.). **Alimentos funcionais: benefícios para a saúde**. Viçosa: UFV, 2008. p.55-80.

MAZZA, G.; BILIADERIS, C. G.; PRZYBYLSKI, R.; OOMAH, B. D. Composition and morphological characteristics of cow cockle (*Saponaria Vaccaria*) seed, a potential alternative crop. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.40, n.9, p.1520-1523, 1992.

MEDICI, M.; VINDEROLA, C. G.; PERDIGÓN, G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. **International Dairy Journal**, v.14, n.7, p.611-618, 2004.

MINELLI, E. B.; BENINI, A.; MARZOTTO, M.; SBARBATI, A.; RUZZENENTE, O.; FERRARIO, R.; HENDRIKS, H.; DELLAGLIO, F. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. **International Dairy Journal**, v.14, n.8, p.723-736, 2004.

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

NEVEN, L. Isoflavones – an overview of benefits for health and market. **Agro-Food Industry Hi- Technology**, v.9, n.1, p.39-41, 1998.

OMONI, A. O.; ALUKO, R. E. Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of actions. **Nutrition Reviews**, v.63, n.8, p.272-283, 2005.

PAYNE, A. N.; ZIHLER, A.; CHASSARD, C.; LACROIX, C. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. **Trends in Biotechnology**, v.30, n.1, p.17-25, 2011.

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

PEREIRA FILHO, D.; FURLAN, S. A., Prevalência de intolerância a lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do laboratório dona Francisca, Joinville (SC). **Revista Saúde e Ambiente**, v.5, n.1, p.24-30, 2004.

PEREIRA, D. I.A.; MCCARTNEY; A. L., GIBSON, G. An in vitro study of the probiotic potential of a bile salt hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.8, p.4743-4752, 2003.

PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K.; TRAN, L. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium sp.*, *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, n.2, p.276–280, 2006.

PUPIN, A. M. Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais. In: Seminário Novas Alternativas de Mercado. 2002, Campinas. **Anais**. Campinas: ITAL, 2002. p. 133-145.

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

RANHOTRA, G. S.; GELROTH, J. A.; GLASER, B. K.; LORENZ, K. H.; JOHNSON, D. L. Composition and protein nutritional quality of quinoa. **Cereal Chemistry**, v.70, n.3, p.303-305, 1993.

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

RYCROFT, C. E.; JONES, M. R.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. A comparative “in vitro” evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, n.5, p.878-887, 2001.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, p.1-16, 2006.

SALGADO, J. M. **Tabela de alimentos funcionais**. Sociedade Brasileira de Alimentos Funcionais - SBAF. 2005. Disponível em: <<http://noticias.universia.com.br/ciencia-tecnologia/noticia/2005/05/24/482047/tabela-alimentos-funcionais.html>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

SALMINEN, S.; BOULEY, M. C.; BOUTRONRUAALT, M. C.; CUMMING, J. H.; FRANCK, A.; GIBSON, G. R.; ISOLAURI, E.; MAOREAU, M. C.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **British Journal of Nutrition**, v.80, n.1, p.147- 171, 1998.

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **Dairy Journal**, v.8, n.5, p.341-347, 1998.

SANDERS, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.2, p.319-331, 2001.

SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.3615-3645, 2001.

SOUZA, F. S.; COCCO, R. R.; SARNI, R. O. S.; MALLOZI, M. C.; SOLÉ, D. Prebióticos, probióticos e simbióticos na prevenção e tratamento das doenças alérgicas. **Revista Paulista de Pediatria**, v.28, n.1, p.86 – 97, 2010.

SPEHAR, C. R. Adaptação da quinoa (*chenopodium quinoa* willd.) para incrementar a diversidade agrícola e alimentar no Brasil. **Cadernos de Ciência e Tecnologia (EMBRAPA)**, v.23, n.1, p.41-62, 2006.

SPEHAR, C. R. Utilização da quinoa como alternativa para diversificar alimentos. *In*: Simpósio sobre ingredientes na alimentação animal, 2002, Uberlândia. **Anais**. Uberlândia: UFU, 2002. p. 49-58.

SPEHAR, C. R.; SANTOS, R. L. de B. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) BRS. Piabiru: alternativa para diversificar os sistemas de produção de grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.6, p.889-893, 2002.

SUTULA, J.; COULTHWAIT, L.; VERRAN, J. Culture media for differential isolation of *Lactobacillus casei* Shirota from oral samples. **Journal of Microbiological Methods**, v.90, n.1 p.65–71, 2012.

TEVES, C.C.; DIWAN, D.; ALMEIDA, J.A. **Leites Modificados**. Trabalho apresentado à Disciplina FBT-0201 Tecnologia de Alimentos do curso de Graduação em Nutrição (6º semestre) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São. São Paulo, 2008. 23 p.  
Disponível em:  
<<http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/eit esmodificados.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2012.

THEURER-WOOD, R. Tale of food survivor: Quinoa. **East West Journal**, p. 63-68, 1985.

TZORTZIS, G.; GOULAS, A. K.; GEE, G. M.; GIBSON, G. R. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. **Journal of Nutrition**, v.135, n.7, p. 1726-1731, 2005.

VEGA-GÁLVEZ, A.; MIRANDA, M.; VERGARA, J.; URIBE, E.; PUENTE, I.; MARTÍNEZ, E.A. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*chenopodium quinoa* willd.), an ancient andean grain: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, n.15, p.2541-2547, 2010.

VINDEROLA, C. G.; PROSELO, W.; GHIRBERTO, D.; REINHEIMER, J. A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. **Journal of Dairy Science**, v.83 , n.9, p.1905-1911, 2000.

WHO/FAO. **Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Rome: Food and agriculture organization of the united nations, food and nutrition paper, 2006. 56 p.

WHO/FAO -. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**, Córdoba: World health organization/ Food and agriculture organization of the united nations, 2001. 34 p. Disponível em: <[ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf)> Acesso em: 03 jan. 2012.

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

WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B. L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **Journal of Nutrition**, v.73, n.2, p.451-455, 2001.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. J. B. **The genera of Lactic Acid Bacteria**. Great Britain: Blackie Academic & Professional, 1995.

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

XIAO, C. W. Health effects of soy protein and isoflavones in humans. **The Journal of Nutrition**, v.138, n.6, p.1244 – 1249, 2008.

YUKI, T.; WATANABE, K.; MIKE, A.; TAGAMI, Y.; TANAKA, R.; OHWAKI, M.; MOROTOMI, M. Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies, **International Journal of Food Microbiology**, v.48, n.1, p.51–55, 1999.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides – Occurrence, preparation and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, n.2, p.107-117, 1996.

ZHANG, X.; SHU, X. O.; GAO, Y. T.; YANG, G.; LI, Q.; LI, H.; JIN, F.; ZHENG, W. Soy food consumption is associated with lower risk of coronary heart disease in Chinese women. **Journal of Nutrition**, v.133, n.9, p.2874-2878, 2003.

ZOETENDAL, E. G.; ELAINE, E.; VAUGHAN, E. E.; de VOS, W. M. A microbial world within us. **Molecular Microbiology**, v.59, n.6, p.1639–1650, 2006.

## ***CAPÍTULO II***

# BEBIDA FERMENTADA POTENCIALMENTE SIMBIÓTICA À BASE DE EXTRATOS AQUOSOS DE SOJA E DE QUINOA

Fernanda Bianchi<sup>1</sup>, Elizeu Antonio Rossi<sup>1</sup>, Raquel Guttierres Gomes<sup>2</sup> e Katia Sivieri<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Alimentos e Nutrição. Laboratório de Pesquisa em Probióticos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) - Araraquara, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Maringá (UEM) - Maringá, Paraná, Brasil

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma bebida potencialmente simbiótica fermentada com *Lactobacillus casei* Lc-01 a base de extrato aquoso de soja e de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) acrescida de fruto-oligossacarídeo (FOS). Cinco formulações com diferentes concentrações de extrato de soja e de quinoa foram testadas. A viabilidade do micro-organismo nas bebidas, assim como os valores de pH e de acidez foram monitorados até o 28º dia de estocagem a 5°C. Foram também analisadas a composição química dos extratos e das bebidas elaboradas, bem como as propriedades reológicas e sensoriais dos produtos fermentados. Embora tenha ocorrido um aumento na acidez e um declínio no pH durante os 28 dias de armazenamento, o micro-organismo probiótico manteve uma população de 10<sup>8</sup> UFC/mL em todas as bebidas durante o período de experimento. Observou-se maior viscosidade e consistência nas bebidas com maior proporção de extrato de quinoa (F1 e F2). A formulação F4 (com 70% extrato de soja- 30% extrato de quinoa) mostrou a menor curva de histerese. As formulações F4 e F5 (com 100% extrato de soja) obtiveram maior aceitação sensorial e F4 maior intenção de compra. Com relação a composição físico-química, a formulação F3 (com 50% extrato de soja- 50% extrato de quinoa) e F4 mostraram resultados mais próximos aos das bebidas fermentadas a base de soja encontradas na literatura. A bebida com 70% extrato de soja- 30% extrato de quinoa (F4) foi considerada a melhor bebida desenvolvida levando em conta os critérios analisados.

**Palavras-chave:** probióticos, prebióticos, bebida fermentada, *Lactobacillus casei*, quinoa, soja.

Autor Correspondente em: Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) - Rodovia Araraquara-Jaú Km 1, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brasil. Tel. 55(16) 33016932 – (16) 997744750.

Endereço de E-mail: febianchi@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

O mercado de alimentos funcionais tem apresentado um elevado crescimento nos últimos anos em função do interesse do consumidor por alimentos que confirmam benefícios a saúde (ANNUNZIATA; VECCHIO, 2011). Dentre os alimentos funcionais destacam-se os que possuem culturas probióticas, ingredientes prebióticos ou ambos. De acordo com a FAO/WHO (2001), os probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, tais como efeitos anti-carcinogênicos, prevenção de diarreia, imunestimulação e proteção contra micro-organismos patógenos.

Um dos gêneros de micro-organismos mais empregados como probióticos são os *Lactobacillus*. Os lactobacilos possuem efeitos benéficos no intestino humano, apresentando capacidade de aumentar o número de bactérias intestinais benéficas e de reduzir o de bactérias nocivas, além de atenuar diarreias causadas pela proliferação de bactérias nocivas (KOEHNICK *et al.*, 2003). Possuem ainda capacidade de melhorar a absorção de minerais, de modular o sistema imune e o metabolismo lipídico e prevenir o processo carcinogênico (VAN LOO *et al.*, 2005). A ingestão de *L. casei* (Lc-01) tem sido associada à estimulação do sistema imune e ao alívio dos sintomas da doença de Crohn (ITSARANUWAT *et al.*, 2003). Esta bactéria tem mostrado também uma alta taxa de sobrevivência nos produtos e habilidade de sobreviver à passagem pelo estômago, resistindo ao suco gástrico, especialmente quando combinado às fibras (GUERGOLETTO *et al.*, 2010).

Prebiótico é um ingrediente seletivamente fermentável que permite mudanças específicas, tanto na composição quanto na atividade da microbiota gastrointestinal, que confere benefícios e bem-estar à saúde do hospedeiro (ROBERFROID, 2007). A ação sinérgica dos probióticos auxiliados pelas substâncias prebióticas dão origem aos simbióticos (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

Dentre os prebióticos, têm-se os fruto-oligosacarídeos (FOS), que desempenham diversas funções fisiológicas no organismo, como alteração do trânsito intestinal; prevenção de câncer de cólon; redução do colesterol plasmático e da hipertrigliceridemia; absorção de cálcio; melhora da biodisponibilidade de minerais e contribuição para o aumento da concentração das bifidobactérias no cólon (GIBSON; ROBERFROID,1995; MANNING; GIBSON 2004). Por esta razão, os prebióticos tem sido utilizados em uma série de alimentos, tais como bebidas fermentadas à base de extratos vegetais.

A utilização de extratos vegetais, em substituição ao leite na obtenção de produtos fermentados, vem ganhando projeções consideráveis em razão de seus benefícios naturais. O extrato de soja é um produto de elevado valor nutricional, com adequado conteúdo proteico, além de ser livre em colesterol, lactose e glúten (CHOU; HOU, 2000; FARNWORTH *et al.*, 2007). Existem ainda, outros vegetais com alto valor nutritivo, com ausência de lactose e colesterol, como por exemplo, a quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), que podem também ser transformados em extrato aquoso, proporcionando novas opções de substituição aos derivados do leite.

A quinoa é um pseudocereal ainda pouco explorado comercialmente, mas que vem apresentando demanda crescente no mundo, principalmente por naturalistas que buscam alternativas de plantas com baixo colesterol e ausência de glúten (FLEMING; GALWEY, 1995). A composição de aminoácidos essenciais da quinoa, é bastante aproximada à da caseína, fração proteica do leite, possuindo todos os aminoácidos essenciais (histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina e lisina), além de ácidos graxos de alta qualidade ( $\omega 6$ ,  $\omega 3$  e  $\omega 9$ ) (ANDO *et al.*, 2002). A quinoa é também uma importante fonte de ferro, com biodisponibilidade maior que a do sulfato ferroso (KOZIOL, 1990). De acordo com Vega-Gálvez *et al.* (2010), a quinoa é um excelente exemplo de alimento funcional, com contribuições positivas à nutrição humana, particularmente para todos os processos celulares que requerem

proteção antioxidante de membranas, como a atividade neuronal. A quinoa possui minerais e aminoácidos com implicações potenciais para ajudar a memória e diminuir a ansiedade sob condições estressantes. Estas propriedades funcionais são proporcionadas por compostos ativos presentes no grão de quinoa, tais como, minerais, vitaminas, ácidos graxos e antioxidantes (VEGA-GALVÉZ *et al.*, 2010).

Desta forma, levando em conta a importância do consumo diário de probióticos e prebióticos e considerando a elevada procura, pela população, por alimentos de origem vegetal de elevado valor nutricional, tais como a soja e a quinoa, o objetivo do trabalho foi desenvolver cinco formulações de bebidas simbióticas, fermentada pelo probiótico *L.casei*, constituída de extrato de quinoa e/ou de soja, acrescida de FOS e definir a melhor formulação de acordo com a composição físico-química, sensorial e a capacidade de sobrevivência do micro-organismo nos produtos durante a estocagem.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Desenvolvimento das bebidas simbióticas**

#### **Ingredientes**

As bebidas foram produzidas com várias proporções de extrato aquoso de quinoa e de soja (Tabela 1), na qual foram adicionadas de 2% de cultura láctica constituída de *Lactobacillus casei* Lc-01 (Chr. Hansen, Brasil), 6% de sacarose (União, Brasil), 0,8% de óleo de soja (Olivebra, Brasil), 1% de lactose (grau alimentício - Purac, Brasil), 0,14% de estabilizante Recodan<sup>TM</sup> RS-B (Danisco, Brasil), 2,5% de leite em pó desnatado (Molico, Brasil), 3% de Fruto-oligossacarídeo – FOS (FOS® - SKL Pharma, Brasil).

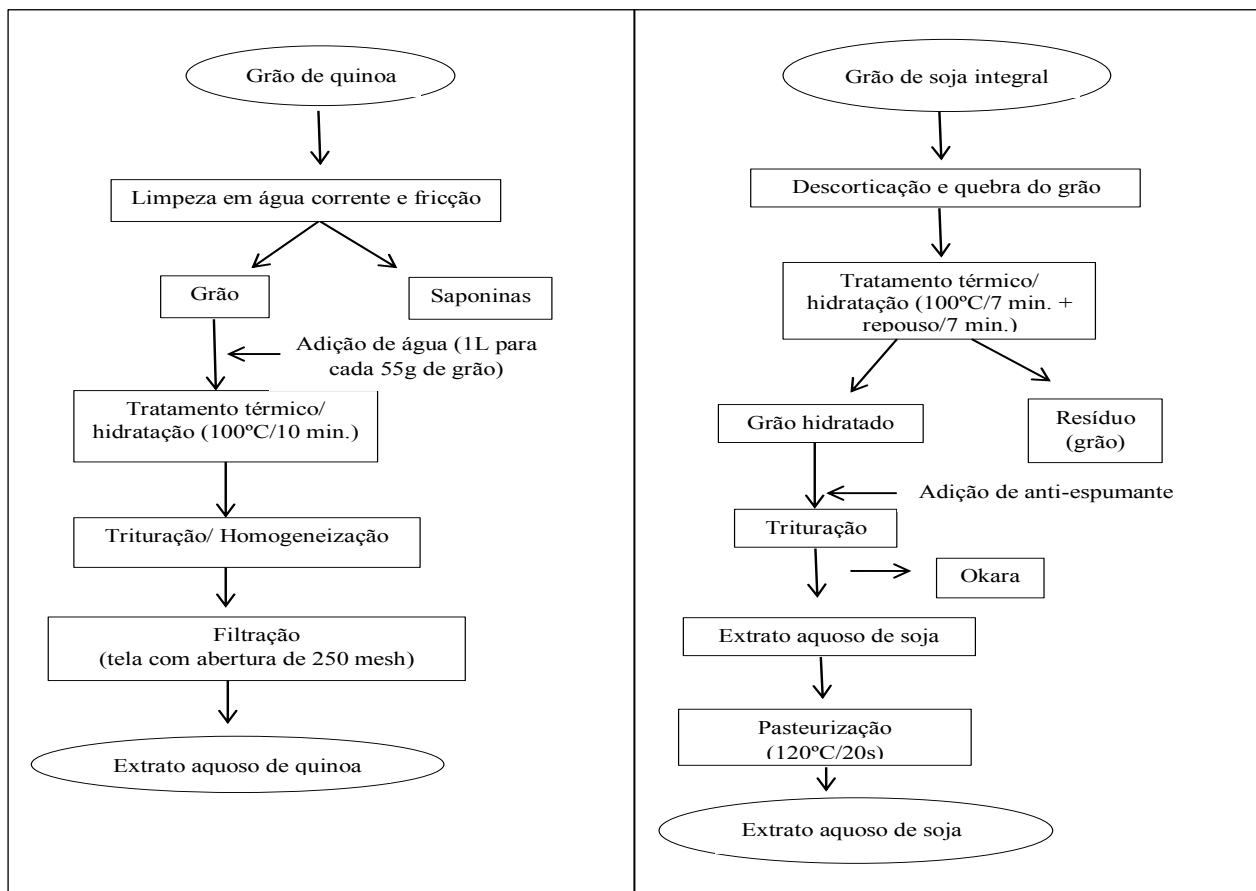
**Tabela 1** Concentração dos extratos empregados na formulação das bebidas

<b>Formulações</b>	<b>Soja (%)</b>	<b>Quinoa (%)</b>
F1	0	100
F2	30	70
F3	50	50
F4	70	30
F5	100	0

### **Processo de produção dos extratos de quinoa e soja**

O extrato hidrossolúvel de soja foi fornecido pela Unidade de Desenvolvimento e Produção de Derivados de Soja, UniverSoja, instalada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/Unesp – Brasil, como descrito por Rossi *et al.* (1999) (Fig. 1) e o extrato aquoso de quinoa, elaborado no Laboratório de Pesquisa em Probióticos, pertencente também, à Unesp de Araraquara. Os grãos de quinoa foram lavados e friccionados em água corrente para a retirada dos componentes antinutricionais (saponinas) e conseqüentemente, redução do gosto residual amargo. Em seguida, foram levados ao fogo (55g/L de água) até atingirem fervura, onde permaneceram por 10 minutos. Posteriormente, os grãos, juntamente com a água, foram triturados até formarem uma mistura homogênea. Filtrou-se então a mistura em tela fina com abertura de 250 Mesh para a obtenção do extrato de quinoa (Fig. 1).

**Figura 1** - Fluxograma de elaboração dos extratos aquosos de quinoa e de soja



### Processo de elaboração das bebidas fermentadas

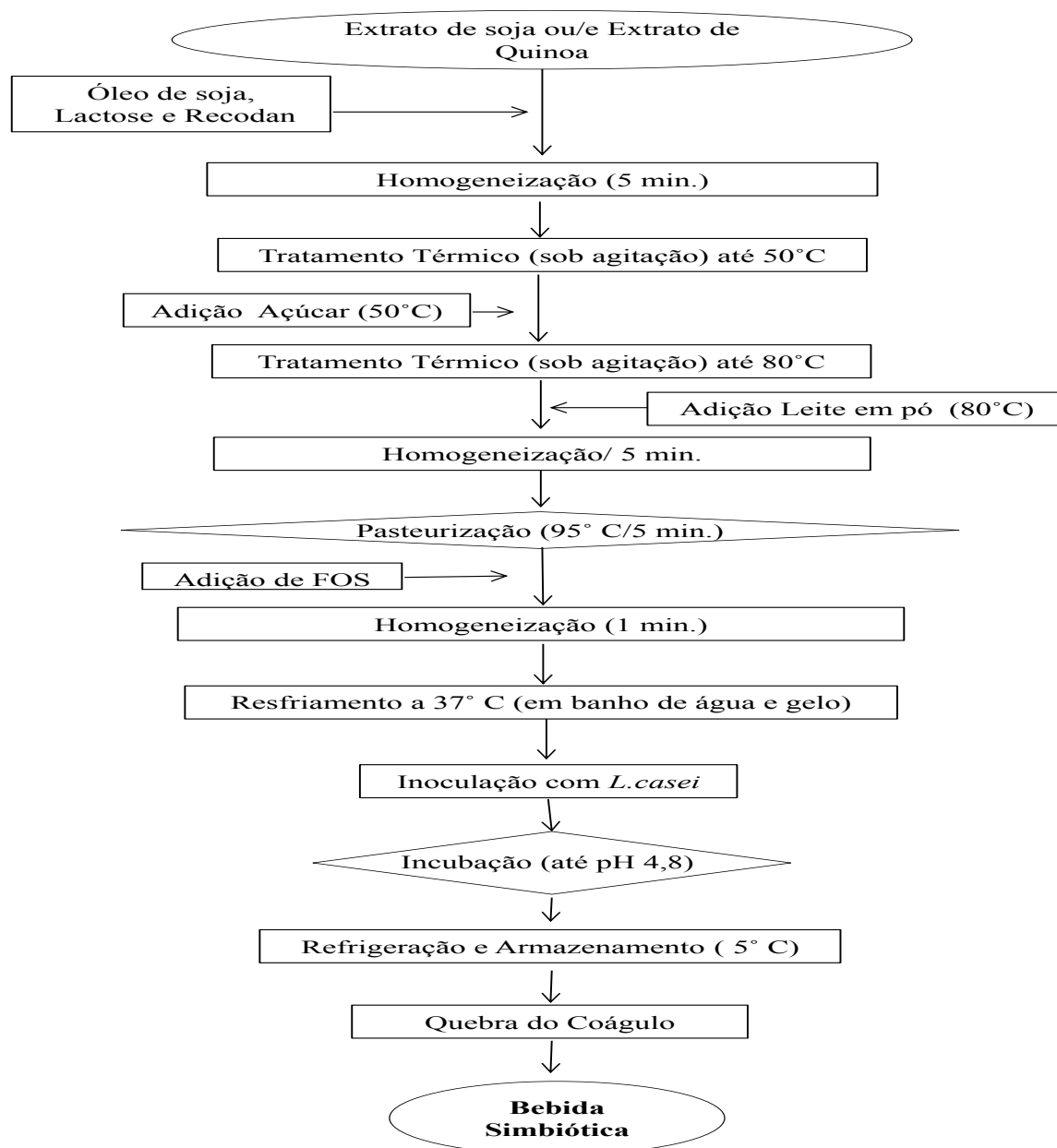
Todas as bebidas foram elaboradas da mesma maneira, como descrito por Rossi *et al.* (1984). Os extratos de quinoa e de soja foram misturados e homogeneizados em liquidificador juntamente com o óleo de soja, a lactose e o estabilizante, por cinco minutos. A mistura foi aquecida até 50°C, para a adição do açúcar, seguindo de aquecimento até 80°C para a incorporação do leite em pó desnatado. Posteriormente, a temperatura foi elevada até 95°C e assim mantida por 5 minutos (pasteurização), sendo em seguida, adicionado o FOS por homogeneização em liquidificador por 1 minuto. Após o resfriamento da mistura a 37°C foi feita a adição do cultivo liofilizado comercial de *Lactobacillus casei*. A mistura foi incubada a 37°C até que se atingisse o pH de 4,8, sendo em seguida resfriada a 12°C e armazenada a 5°C para, no dia posterior, ser batida (quebra do coágulo) (Fig. 2).

A cultura liofilizada de *L. casei* (Lc-01) foi ativada por inoculação em meio de leite (10% de leite em pó desnatado, 1% de glicose, 0,5% de extrato de levedura) (2% v/v) e cultivada em estufa a 37°C por 15 horas, sob condições aeróbias. Em seguida, 2% (v/v) da cultura ativada foi adicionada às bebidas e encubadas (em estufa bacteriológica) a 37°C até atingirem o pH de 4,8.

Durante a incubação, o produto foi submetido a medidas de pH e acidez expressa em ácido láctico, monitorados a cada 60 minutos (triplicata) até o final do processo de fermentação. As bebidas foram armazenadas (em frascos estéreis de tampas rosqueáveis) à temperatura de 5°C durante 28 dias.

Apenas uma fermentação foi apresentada nos resultados para cada formulação, entretanto, testes realizados anteriormente, mostraram que não houve diferença estatística na duração da fermentação das bebidas, nem na composição físico-química das mesmas.

**Figura 2 -** Etapas do processo de elaboração das bebidas fermentadas



### Períodos das análises

As análises reológicas foram realizadas a temperatura de 10 e 25°C após 10 dias de armazenamento a 5°C, como descrito por Basak e Ramaswamy (1994). As bebidas foram submetidas a análise sensorial após 3 dias de estocagem a 5°C, tempo suficiente para a

estabilização dos ingredientes. O pH, a acidez e a viabilidade do *Lactobacillus casei* Lc-01 foram determinados após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 5°C, de acordo com Aragon-Alegro *et al.* (2007). Estes tempos foram utilizados com o intuito de monitorar a viabilidade do micro-organismo durante os 28 dias de estocagem e verificar se mudanças no pH e na acidez poderiam influenciar a sobrevivência no *L. casei* e a qualidade final do produto.

### **Avaliação físico-química**

Foram avaliados o pH (pHmetro digital Corning 320) e a acidez total titulável (por titulação, segundo AOAC, 2010) dos extratos, das bebidas durante os processos de fermentação e dos produtos finais. Nas bebidas, a avaliação do pH e da acidez foi realizada aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 5 °C.

Os extratos e as bebidas prontas foram também avaliados quanto aos teores de gordura (pelo método de Bligh-Dyer segundo IAL, 2008), de proteína (pelo método de Kjeldahl segundo a AOAC, 2010), de sólidos totais, cinzas e carboidratos pelo método de secagem do produto em estufa a 105°C, método de incineração a 550°C e por diferença (fração NIFEXT) segundo AOAC (2010) respectivamente. O valor calórico dos produtos final foi calculado por meio da equação: VCT (valor calórico total) = [proteínas (g x 4)] + [carboidratos (g) x 4] + [lipídeos (g) x 9].

### **Avaliação da viabilidade do *Lactobacillus casei* Lc-01 nos produtos**

A viabilidade do *L. casei* foi avaliada nas cinco formulações propostas, nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 5°C. Para a contagem de células viáveis foi utilizado o meio de cultura MRS Agar (Himedia, Índia) (HARTEMINK *et al.*, 1997). O produto foi mantido sob refrigeração e em recipientes assépticos até o momento de sua utilização. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, sob condições anaeróbias (em jarras de anaerobiose providas de anaerobac) e os resultados expressos em log UFC/mL.

## Caracterização reológica

As análises reológicas das bebidas foram realizadas com 10 dias de armazenamento a 5°C. Os parâmetros reológicos foram obtidos em triplicata a 10°C e 25°C, usando-se um reômetro de cone e placa, modelo MARS III, marca Thermo Scientific. O aumento da tensão de cisalhamento foi obtido pelo aumento da rotação, a partir da variação contínua da velocidade angular do cone. Foram utilizados um gradiente de cisalhamento de 0 até 700 s<sup>-1</sup> em 30 segundos, em curvas ascendentes e descendentes, com cone C 60 e 0,5 mL de amostra. A taxa de deformação foi determinada usando-se um programa computacional (RheoWin Data Manager da Thermo) que emprega as seguintes equações:

$$\gamma = \omega / \sin\theta \quad (\text{Equação 1})$$

$$\tau = \frac{T}{\frac{2}{3} \pi r^3} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:  $\gamma$  = taxa de deformação (1/s);  $\tau$  = tensão de cisalhamento (Pa);  $\omega$  = velocidade angular do cone (rpm);  $\theta$  = ângulo do cone; T = torque (N.m); r = raio do cone (cm).

A descrição do comportamento reológico foi realizada utilizando-se o modelo reológico da Lei da potência ( $\tau = K \gamma^n$ ) com auxílio do programa Origin versão 6.0.

## Avaliação sensorial

Utilizou-se uma equipe não treinada de 80 consumidores voluntários (20 homens e 60 mulheres), dentre alunos, professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, para realizarem o teste de aceitação, que foi aplicado após 3 dias de armazenamento das bebidas. O critério principal de inclusão foi o consumo regular de bebidas fermentadas ou similares. Os atributos analisados foram: cor, aroma, sabor, textura e impressão global.

Para a avaliação das bebidas foi utilizada uma escala hedônica estruturada de 9 pontos variando de “gostei muitíssimo” até “desgostei muitíssimo”. Foi solicitado aos consumidores que indicassem a intenção de compra do produto em análise, caso o encontrassem à venda no mercado, utilizando uma escala descritiva de 5 itens, variando de “certamente compraria o produto” até “certamente não compraria o produto” (MEILGAARD *et al.*, 1999). Os provadores receberam aproximadamente 40 mL da amostra a temperatura entre 4 - 8°C em copos de plástico descartáveis com capacidade para 50 mL. O teste foi realizado em um único dia, de forma monádica, aleatoriamente, em cabines individuais, providas de iluminação natural e servidas de água mineral e bolachas de água e sal para serem consumidas entre as avaliações.

Foram realizadas também análises microbiológicas de coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus* spp. (por placa petrifilm – 3M), bem como *Salmonella* spp. e *Bacillus cereus*, segundo as metodologias recomendadas pela APHA (2001) para garantir a segurança higiênica e microbiológica do produto elaborado antes dos mesmos serem submetidos à análise sensorial.

A análise foi realizada após a aprovação prévia do Comitê local de Ética em Pesquisa (nº 30/2011).

### **Análise estatística**

A significância dos resultados foi investigada por meio da análise de variância (ANOVA) e as médias individuais comparadas por meio de teste Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o software estatístico BioEstat 5.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização físico-química

Os resultados da caracterização físico-química dos extratos e das bebidas podem ser observados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Composição físico-química dos diferentes extratos e bebidas fermentadas (média  $\pm$ DP)

Extratos					
	E1	E2	E3	E4	E5
Sólidos Totais (%)	5,10 $\pm$ 0,11 <sup>E</sup>	5,80 $\pm$ 1,62 <sup>D</sup>	5,90 $\pm$ 0,46 <sup>C</sup>	6,12 $\pm$ 0,25 <sup>B</sup>	6,33 $\pm$ 0,16 <sup>A</sup>
Cinzas (%)	0,13 $\pm$ 0,03 <sup>E</sup>	0,21 $\pm$ 0,00 <sup>D</sup>	0,24 $\pm$ 0,00 <sup>C</sup>	0,27 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	0,33 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>
Carboidratos(%)	4,10 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	3,64 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	3,18 $\pm$ 0,01 <sup>C</sup>	2,23 $\pm$ 0,01 <sup>D</sup>	1,68 $\pm$ 0,01 <sup>E</sup>
Proteínas (%)	0,80 $\pm$ 0,05 <sup>E</sup>	1,47 $\pm$ 0,02 <sup>D</sup>	1,87 $\pm$ 0,16 <sup>C</sup>	2,64 $\pm$ 0,10 <sup>B</sup>	2,92 $\pm$ 0,10 <sup>A</sup>
Lipídeos (%)	0,11 $\pm$ 0,00 <sup>E</sup>	0,47 $\pm$ 0,01 <sup>D</sup>	0,68 $\pm$ 0,02 <sup>C</sup>	0,98 $\pm$ 0,00 <sup>B</sup>	1,43 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>
pH	6,35 $\pm$ 0,04 <sup>E</sup>	6,60 $\pm$ 0,03 <sup>D</sup>	6,70 $\pm$ 0,09 <sup>C</sup>	6,76 $\pm$ 0,05 <sup>B</sup>	6,83 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>
Acidez (%)	0,07 $\pm$ 0,02 <sup>B</sup>	0,07 $\pm$ 0,00 <sup>B</sup>	0,08 $\pm$ 0,00 <sup>AB</sup>	0,08 $\pm$ 0,00 <sup>AB</sup>	0,09 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>
kcal (200mL)	40,83 <sup>E</sup>	49,40 <sup>D</sup>	52,67 <sup>C</sup>	56,59 <sup>B</sup>	62,56 <sup>A</sup>

Bebidas Fermentadas					
	F1	F2	F3	F4	F5
Sólidos Totais (%)	21,20 $\pm$ 0,16 <sup>E</sup>	22,20 $\pm$ 0,30 <sup>D</sup>	23,41 $\pm$ 0,34 <sup>C</sup>	24,45 $\pm$ 0,28 <sup>B</sup>	25,62 $\pm$ 0,56 <sup>A</sup>
Cinzas (%)	0,32 $\pm$ 0,01 <sup>E</sup>	0,41 $\pm$ 0,02 <sup>D</sup>	0,47 $\pm$ 0,03 <sup>C</sup>	0,54 $\pm$ 0,02 <sup>B</sup>	0,63 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>
Carboidratos(%)	18,53 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	18,41 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	18,39 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	17,49 $\pm$ 0,01 <sup>C</sup>	17,32 $\pm$ 0,01 <sup>D</sup>
Proteínas (%)	1,65 $\pm$ 0,03 <sup>E</sup>	2,42 $\pm$ 0,09 <sup>D</sup>	3,10 $\pm$ 0,44 <sup>C</sup>	4,02 $\pm$ 0,08 <sup>B</sup>	4,80 $\pm$ 0,05 <sup>A</sup>
Lipídeos (%)	0,69 $\pm$ 0,02 <sup>E</sup>	0,96 $\pm$ 0,01 <sup>D</sup>	1,44 $\pm$ 0,01 <sup>C</sup>	2,40 $\pm$ 0,06 <sup>B</sup>	2,76 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>
pH	4,40 $\pm$ 0,1 <sup>C</sup>	4,42 $\pm$ 0,1 <sup>BC</sup>	4,47 $\pm$ 0,1 <sup>A</sup>	4,49 $\pm$ 0,1 <sup>A</sup>	4,44 $\pm$ 0,1 <sup>B</sup>
Acidez (%)	0,35 $\pm$ 0,01 <sup>D</sup>	0,43 $\pm$ 0,00 <sup>C</sup>	0,47 $\pm$ 0,00 <sup>B</sup>	0,44 $\pm$ 0,03 <sup>C</sup>	0,60 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>
kcal (200mL)	173,98 <sup>E</sup>	183,92 <sup>D</sup>	197,89 <sup>C</sup>	215,29 <sup>B</sup>	227,49 <sup>A</sup>

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa entre os extratos E1: 100% extrato de quinoa; E2: Extrato 70% quinoa- 30% soja; E3: Extrato 50% quinoa- 50% soja; E4: Extrato 70% soja- 30% quinoa; E5: Extrato 100% soja e entre as formulações F1: Bebida 100% de extrato de quinoa; F2: Bebida 70% de extrato de quinoa- 30% extrato de soja; F3: Bebida 50% extrato de quinoa- 50% extrato de soja; F4: Bebida 70% extrato de soja- 30% extrato de quinoa; F5: Bebida 100% extrato de soja.

Houve diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) na composição centesimal, em todos os parâmetros analisados, para os extratos e bebidas formuladas, exceto para os valores de carboidratos e acidez entre F2 e F3 e entre F2 e F4, respectivamente, e para os valores de pH entre algumas das bebidas e de acidez entre alguns dos extratos. Observa-se que quanto maior a porcentagem de extrato de soja na bebida, maiores são valores de sólidos totais, cinzas, proteínas e gordura.

Comparando a composição centesimal das cinco formulações desenvolvidas com a de outros autores que desenvolveram bebidas fermentadas a base de soja, constata-se que os valores encontrados neste estudo foram próximos ou até superiores, com exceção das formulações F1 (bebida 100% de extrato de quinoa) e F2 (70% de extrato de quinoa -30% de extrato de soja) que obtiveram resultados inferiores aos destes autores. As diferenças encontradas podem estar relacionadas com a elevada diluição na elaboração do extrato de quinoa. O extrato de quinoa foi diluído 18 vezes devido ao sabor forte característico do pseudogrão. Outra explicação para este resultado está nas diferenças de constituição nutricional entre a soja e a quinoa. A quinoa é um pseudogrão rico em vitaminas, minerais e contém todos os aminoácidos essenciais (REPO-CARRASCO, 2003), entretanto, seus teores de proteína e gordura estão abaixo dos encontrados na soja.

Houve um grande aumento de sólidos totais dos extratos em relação às bebidas fermentadas, em todas as formulações desenvolvidas. Este fato pode ser explicado por meio do método de obtenção das bebidas, o qual necessitou de um longo período para a obtenção das temperaturas estabelecidas na elaboração dos produtos fermentados, causando a evaporação de água e desnaturação de proteínas e, conseqüentemente, o aumento de sólidos totais.

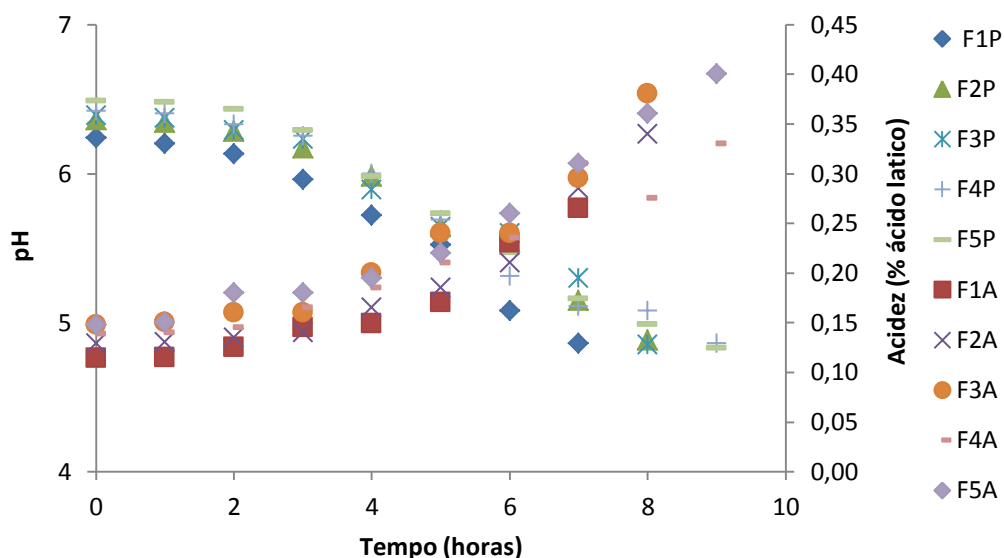
As formulações F3 (Bebida 50% de extrato de quinoa –50% de extrato de soja) e F4 (30% de extrato de quinoa- 70% de extrato de soja) apresentaram quantidades de proteína, gordura, cinzas e sólidos totais compatíveis com os fermentados de soja encontrados na literatura. Estas bebidas apresentaram ainda, menor conteúdo de gordura, menor valor calórico e maior conteúdo de carboidratos do que a formulação 5 (bebida com 100% de extrato de soja).

### **Evolução do pH e acidez durante a fermentação**

Os valores de pH das diferentes formulações podem ser observados na Figura 3. A variação do pH e a acidez das bebidas durante a primeira hora de fermentação foi muito pequena

(queda de  $6,38 \pm 0,09$  para  $6,29 \pm 0,10$  e aumento de  $0,13 \pm 0,01$  para  $0,14 \pm 0,01$  respectivamente), porém, após as três primeiras horas de processo fermentativo, os valores de pH diminuíram e os de acidez aumentaram acentuadamente (de  $5,91 \pm 0,11$  para  $4,85 \pm 0,01$  e de  $0,17 \pm 0,02$  para  $0,34 \pm 0,02$ , respectivamente terminada a fermentação). Resultados semelhantes foram encontrados por Garro *et al.* (1998), que observaram queda mais pronunciada de pH entre 4 e 8 horas de fermentação do extrato de soja com *Lactobacillus casei*.

**Figura 3** - Avaliação do pH e da acidez durante o período de fermentação



F1 = Bebida 100% de extrato de quinoa, F2 = Bebida 70% de extrato de quinoa- 30% de extrato de soja, F3= Bebida 50% de extrato de quinoa- 50% de extrato de soja, F4= Bebida 30% de extrato de quinoa- 70% de extrato de soja e F5 = Bebida 100% de extrato de soja. P (pH): Curva descendente, A (Acidez): Curva ascendente.

O tempo total de fermentação requerido para as formulações atingirem o pH final de 4,8 foi, respectivamente, 7h, 8h, 8h, 9h e 9 horas para as formulações F1, F2, F3, F4 e F5 (Fig. 3). Zhou *et al.* (2009) e Wang *et al.* (2012) obtiveram tempo de 24h e 18h na fermentação de leite de égua e leite, respectivamente, utilizando *L. casei* como micro-organismo *starter*.

Pauly-Silveira *et al.* (2010) e Rossi (1999) utilizaram formulação semelhante à das bebidas em estudo e encontraram valores de aproximadamente 5,5h de fermentação do “iogurte” de soja, porém estes autores utilizaram micro-organismos diferentes e em associação, o que pode

ter colaborado com a redução do tempo do processo. Portanto, a associação do *L. casei* com um ou mais micro-organismos poderia ser uma solução para a redução do tempo de fermentação.

A formulação com maior porcentagem de extrato de quinoa foi a que alcançou o valor de pH esperado em menor tempo do que as demais formulações (Fig.3), indicando que o tempo de fermentação está relacionado com a composição do produto e que a substituição do extrato de soja pelo extrato de quinoa pode ter levado a uma diminuição do tempo de fermentação dos produtos, provavelmente em razão dos elevados teores de carboidratos presentes neste grão.

O *Lactobacillus casei* requer para o crescimento além de carboidrato, aminoácidos, peptídeos, sais, ésteres de ácidos graxos, derivados de ácidos nucléicos, riboflavina (Vit. B2), ácido fólico (Vit. B9), pantotenato de cálcio (Vit. B5) e niacina (Vit. B3). (WOOD; HOLZAPFEL, 1995). Cereais, em geral, são bons meios para fermentação microbiana. Eles são ricos em polissacarídeos, que podem ser usados como fonte de carbono e de energia pelos micro-organismos. Possuem também minerais, vitaminas, esteróis e outros fatores de crescimento que permitem a sobrevivência das bactérias (SALMINEN *et al.*, 2004). De acordo com Dike e Sanni (2010), cereais possuem baixa quantidade de minerais, porém grandes quantidades de vitaminas do complexo B, requeridas para a multiplicação do *L. casei*.

### **Sobrevivência do *Lactobacillus casei* Lc-01 durante o armazenamento refrigerado**

Observa-se na Tabela 3 que a formulação contendo 50% de extrato de quinoa-50% extrato de soja (F3) foi a que obteve o menor potencial de sobrevivência de *L. casei* após 28 dias de armazenamento (91,48%). Entretanto, todas as bebidas testadas obtiveram alto potencial de sobrevivência durante o armazenamento (Tabela 3). De acordo com Shah (2007), estes valores são considerados ótimos para bebidas fermentadas com probiótico.

Segundo os critérios estabelecidos pela FAO/WHO (2001), para ser considerado probiótico, o produto deve conter no mínimo de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL do micro-organismo durante o prazo de validade do produto, entretanto segundo BRASIL (2008), a porção diária do produto deve conter de  $10^8$  a  $10^9$  UFC de micro-organismo probiótico. As cinco bebidas desenvolvidas, apresentaram uma população aproximada de  $10^8$  UFC/mL, do tempo 0 até o 28º dia de armazenamento a 5°C, a qual corresponde a  $10^{10}$  UFC em 200mL de bebida simbiótica (sugestão de porção diária).

Estudando as características probióticas e a aceitabilidade do extrato de soja suplementado com fruto-oligossacarídeos, Haully *et al.* (2005) observaram que até o 28º dia de armazenamento, a população de bactérias ( $9,28 \log$  UFC/mL) foram superiores aos valores mínimos exigidos para caracterizar um alimento como probiótico e que o produto fermentado de soja sem o prebiótico não obteve os mesmos resultados, apresentando a partir do 21º dia de armazenamento, quantidade de bactérias lácticas ( $5,36 \log$  UFC.mL<sup>-1</sup>) insuficiente para caracterizá-lo como probiótico. Aryana e McGrew (2007) também obtiveram uma população significativamente maior do micro-organismo fermentador (*L. casei*) em suas bebidas contendo prebióticos em comparação ao controle não prebiótico.

**Tabela 3** - População de *Lactobacillus casei* (logUFC/mL), pH, acidez e potencial de sobrevivência nas diferentes formulações até o 28º dia de estocagem a 5°C.

Bebidas	Armazenamento (dias)	pH	Acidez (%)	LogUFC/mL
F1	0	4,40±0,01 <sup>aC</sup>	0,35±0,01 <sup>eD</sup>	9,32±0,15 <sup>abB</sup>
	7	3,98±0,10 <sup>bA</sup>	0,56±0,00 <sup>dE</sup>	9,29±0,07 <sup>abC</sup>
	14	3,66±0,08 <sup>eD</sup>	0,68±0,03 <sup>eE</sup>	9,48±0,09 <sup>aAB</sup>
	21	3,58±0,12 <sup>eD</sup>	0,74±0,00 <sup>bD</sup>	9,23±0,15 <sup>abBC</sup>
	28	3,45±0,05 <sup>dC</sup>	0,91±0,01 <sup>aD</sup>	9,03±0,02 <sup>bBC</sup>
<b>Potencial de sobrevivência</b>		96,88%		
F2	0	4,42±0,03 <sup>aC</sup>	0,43±0,05 <sup>eC</sup>	9,33±0,05 <sup>abB</sup>
	7	3,70±0,20 <sup>bE</sup>	0,70±0,03 <sup>dD</sup>	9,4±0,09 <sup>abC</sup>
	14	3,55±0,08 <sup>eE</sup>	0,98±0,01 <sup>eB</sup>	9,45±0,03 <sup>abB</sup>
	21	3,42±0,15 <sup>dC</sup>	1,11±0,01 <sup>bB</sup>	9,6±0,03 <sup>aAB</sup>
	28	3,40±0,01 <sup>dD</sup>	1,18±0,00 <sup>aB</sup>	9,2±0,2 <sup>bABC</sup>
<b>Potencial de sobrevivência</b>		98,60%		
F3	0	4,47±0,05 <sup>aB</sup>	0,40±0,03 <sup>eB</sup>	9,86±0,03 <sup>bA</sup>
	7	3,78±0,01 <sup>bD</sup>	0,74±0,00 <sup>dC</sup>	10,38±0,0 <sup>aA</sup>
	14	3,71±0,03 <sup>cC</sup>	0,83±0,00 <sup>eD</sup>	9,24±0,06 <sup>cC</sup>
	21	3,62±0,09 <sup>dB</sup>	0,96±0,01 <sup>bC</sup>	9,08±0,26 <sup>dcC</sup>
	28	3,58±0,06 <sup>eA</sup>	1,03±0,08 <sup>aC</sup>	9,02±0,12 <sup>ecC</sup>
<b>Potencial de sobrevivência</b>		91,48%		
F4	0	4,49±0,04 <sup>aA</sup>	0,44±0,02 <sup>eC</sup>	9,39±0,09 <sup>bB</sup>
	7	3,83±0,03 <sup>bC</sup>	0,82±0,01 <sup>dB</sup>	9,45±0,00 <sup>bC</sup>
	14	3,78±0,01 <sup>eB</sup>	0,87±0,01 <sup>cC</sup>	9,45±0,07 <sup>bB</sup>
	21	3,75±0,11 <sup>eA</sup>	0,93±0,04 <sup>bC</sup>	9,68±0,08 <sup>aA</sup>
	28	3,59±0,05 <sup>dA</sup>	1,03±0,02 <sup>cC</sup>	9,37±0,07 <sup>bA</sup>
<b>Potencial de sobrevivência</b>		99,78%		
F5	0	4,44±0,01 <sup>aB</sup>	0,60±0,01 <sup>eA</sup>	9,67±0,04 <sup>aA</sup>
	7	3,88±0,02 <sup>bB</sup>	0,92±0,00 <sup>dA</sup>	9,79±0,19 <sup>aB</sup>
	14	3,83±0,02 <sup>eA</sup>	1,16±0,09 <sup>eA</sup>	9,64±0,06 <sup>abA</sup>
	21	3,77±0,01 <sup>dA</sup>	1,27±0,05 <sup>bA</sup>	9,58±0,04 <sup>abAB</sup>
	28	3,51±0,03 <sup>eB</sup>	1,53±0,00 <sup>aA</sup>	9,42±0,00 <sup>bA</sup>
<b>Potencial de sobrevivência</b>		97,41%		

F1 (Bebida 100% de extrato de quinoa), F2 (Bebida 70% de extrato de quinoa- 30% de extrato de soja), F3 (Bebida 50% de extrato de quinoa- 50% de extrato de soja), F4 (Bebida 30% de extrato de quinoa- 70% de extrato de soja) e F5 (Bebida 100% de extrato de soja). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os tempos na mesma formulação e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as formulações no mesmo tempo de estocagem. Potencial de sobrevivência =  $\log \text{UFC/mL no } 28^\circ \text{dia} \times 100 / \log \text{UFC/mL no dia zero (início)}$ .

Apesar de ter ocorrido em média um aumento na acidez de  $0,46 \pm 0,09$  para  $1,14 \pm 0,23$  e uma redução no pH de  $4,43 \pm 0,03$  para  $3,50 \pm 0,08$  durante os 28 dias de armazenamento, não houve alteração na viabilidade do *L. casei* em nenhuma das bebidas desenvolvidas durante todo

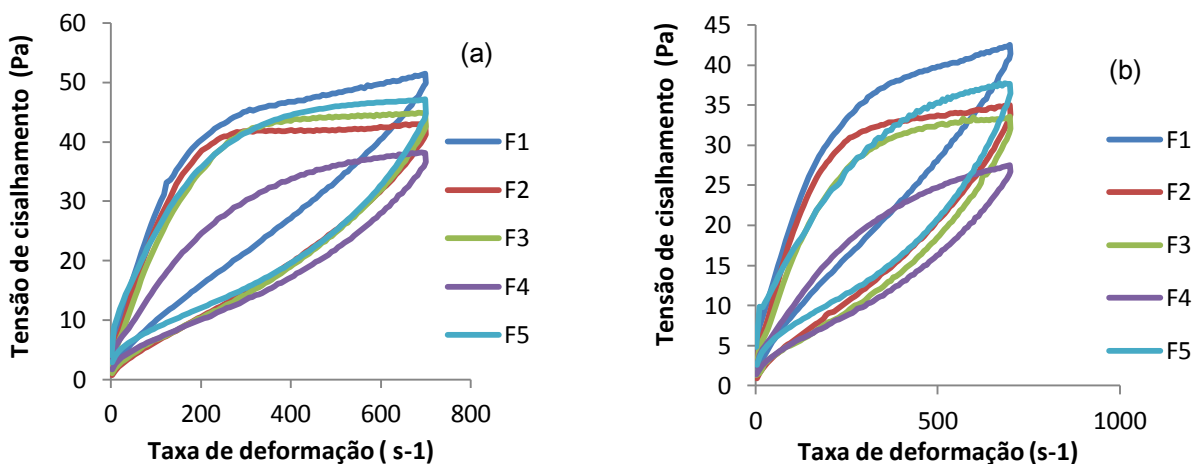
experimento. Vinderola *et al.* (2002) e Pereira *et al.* (2011) também observaram manutenção da viabilidade do *L. casei* com a queda do pH e o aumento da acidez durante 28 dias de armazenamento refrigerado.

De acordo com Mills *et al.* (2011), o acúmulo de histidina é uma importante forma de adaptação do *L. casei*. Oito agrupamentos de genes de *L. casei* estão envolvidos na biossíntese de histidina e, seu acúmulo, de acordo com estes autores, pode aumentar a resistência bacteriana em meios ácidos. Outra importante forma de adaptação do *L. casei* em meios ácidos, é a fermentação malolática. A enzima malolática presente neste micro-organismo realiza a descarboxilação do L-malato em L-lactato e CO<sub>2</sub>, contribuindo assim, com a alcalinização do citoplasma e possibilitando a produção de ATP (MILLS *et al.*, 2011). Estes fatores podem ter contribuído com a alta taxa de sobrevivência do *L. casei* nos produtos durante o armazenamento.

### Caracterização reológica

Os reogramas das bebidas fermentadas armazenadas a 10°C e 25°C estão apresentados na Figura 4 (curvas ascendentes e curvas descendentes).

**Figura 4** - Reogramas da relação entre taxa de deformação e tensão de cisalhamento das bebidas a 10 e 25°C



F1 (Bebida 100% de extrato de quinoa), F2 (Bebida 70% de extrato de quinoa- 30% de extrato de soja), F3 (Bebida 50% de extrato de quinoa- 50% de extrato de soja), F4 (Bebida 30% de extrato de quinoa- 70% de extrato de soja) e F5 (Bebida 100% de extrato de soja) a 10°C (a) e 25°C (b)

Todas as bebidas desenvolvidas apresentaram comportamento de fluido não-Newtoniano com presença de tixotropia, tanto a 10°C quanto a 25°C, sendo que as curvas ascendentes apresentaram comportamento pseudoplástico ( $n < 1$ ), enquanto as curvas descendentes, comportamento dilatante ( $n > 1$ ) ou próximo ao fluido newtoniano ( $n = 1$ ), em quase todas as bebidas formuladas (Tabela 4). Penna *et al.* (2001), Donkor *et al.* (2007) e Rinaldoni *et al.* (2012) obtiveram comportamento semelhantes estudando diversas bebidas fermentadas, indicando que este comportamento parece ser típico de “iogurtes”, produtos muito similares aos desenvolvidos no presente estudo.

As bebidas tiveram comportamentos semelhantes em relação à formação da curva de histerese. Todas apresentaram grande área sob a curva, indicando efeito tixotrópico. Nota-se, entretanto que a curva F4 foi a que apresentou menor histerese. De acordo com Holdsworth (1993), quanto maior a área sob a curva, maior o efeito tixotrópico, o que não é interessante para a indústria de alimentos e nem ao consumir, por indicar perda de estrutura.

Walstra *et al.* (1999) afirmam que é típico de iogurtes apresentarem considerável histerese. Segundo estes autores, após a aplicação de uma alta tensão de cisalhamento, e posterior retorno a tensões mais baixas, a viscosidade aparente torna-se menor e o comportamento de viscosidade se torna próximo ao Newtoniano, o que pressupõe uma quebra da estrutura quase permanente. Essa quebra da estrutura não é completamente permanente já que a viscosidade aumenta ligeiramente quando o iogurte é deixado em repouso por um longo período, por se tratar de um líquido contendo fragmentos de gel. Este mesmo comportamento foi observado nas bebidas fermentadas desenvolvidas neste estudo.

Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos variaram de 0,90 a 0,99, tanto a 10°C quanto a 25°C, explicando aproximadamente 95% dos resultados experimentais, com exceção de F2 (curva ascendente – 10°C) que obteve  $R^2$  de 0,88. Deste modo, o uso deste modelo (Lei da

Potência) para descrever o comportamento reológico das bebidas desenvolvidas pode ser considerado adequado ao estudo.

**Tabela 4** - Parâmetros reológicos das bebidas fermentadas conservadas à 10°C e a 25°C, obtidas pelo modelo da Lei da Potência ( $\tau = K \gamma^n$ ).

Parâmetros reológicos das bebidas fermentadas conservadas à 10° C								
Bebidas	Curvas ascendentes			Curvas descendentes				
	K (Pa.s <sup>n</sup> )	n	R <sup>2</sup>	Visc.( Pa.s)	K (Pa.s <sup>n</sup> )	n	R <sup>2</sup>	Visc.( Pa.s)
F1	6,71±0,01 <sup>a</sup>	0,32 <sup>b</sup>	0,93	500,00 <sup>b</sup>	0,15±0,02 <sup>a</sup>	0,89 <sup>d</sup>	0,99	101,00 <sup>a</sup>
F2	6,25±0,03 <sup>b</sup>	0,34 <sup>a</sup>	0,88	334,00 <sup>c</sup>	0,01±0,04 <sup>c</sup>	1,07 <sup>b</sup>	0,98	54,18 <sup>c</sup>
F3	4,75±0,02 <sup>d</sup>	0,36 <sup>a</sup>	0,90	292,00 <sup>d</sup>	0,02±0,01 <sup>c</sup>	1,12 <sup>s</sup>	0,98	53,51 <sup>d</sup>
F4	2,28±0,01 <sup>e</sup>	0,44 <sup>a</sup>	0,97	191,00 <sup>e</sup>	0,04±0,01 <sup>b</sup>	0,99 <sup>c</sup>	0,99	52,11 <sup>e</sup>
F5	5,71±0,06 <sup>c</sup>	0,33 <sup>b</sup>	0,95	853,00 <sup>a</sup>	0,05±0,03 <sup>b</sup>	1,01 <sup>c</sup>	0,94	75,22 <sup>b</sup>

Parâmetros reológicos das bebidas fermentadas conservadas à 25° C								
Bebidas	Curvas ascendentes			Curvas descendentes				
	K (Pa.s <sup>n</sup> )	n	R <sup>2</sup>	Visc.( Pa.s)	K (Pa.s <sup>n</sup> )	n	R <sup>2</sup>	Visc.( Pa.s)
F1	4,15±0,02 <sup>b</sup>	0,36 <sup>c</sup>	0,96	383,00 <sup>b</sup>	0,15±0,03 <sup>a</sup>	0,84 <sup>d</sup>	0,99	80,76 <sup>a</sup>
F2	4,51±0,02 <sup>a</sup>	0,32 <sup>d</sup>	0,90	243,00 <sup>c</sup>	0,02±0,01 <sup>c</sup>	1,07 <sup>b</sup>	0,98	41,40 <sup>c</sup>
F3	2,95±0,01 <sup>c</sup>	0,38 <sup>bc</sup>	0,94	180,00 <sup>d</sup>	0,02±0,02 <sup>c</sup>	1,13 <sup>a</sup>	0,97	36,70 <sup>d</sup>
F4	1,07±0,04 <sup>e</sup>	0,50 <sup>a</sup>	0,99	96,69 <sup>e</sup>	0,04±0,05 <sup>bc</sup>	0,98 <sup>c</sup>	0,97	33,30 <sup>e</sup>
F5	2,81±0,03 <sup>d</sup>	0,40 <sup>b</sup>	0,98	534,00 <sup>a</sup>	0,05±0,02 <sup>b</sup>	0,99 <sup>c</sup>	0,98	51,37 <sup>b</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as formulações F1 (Bebida 100% de extrato de quinoa), F2 (Bebida 70% de extrato de quinoa- 30% de extrato de soja), F3 (Bebida 50% de extrato de quinoa- 50% de extrato de soja), F4 (Bebida 30% de extrato de quinoa- 70% de extrato de soja) e F5 (Bebida 100% de extrato de soja). \*Valores de viscosidade obtidos a tensão de  $\approx 10$  Pa. K: índice de consistência, n: índice de comportamento de escoamento.

Com base na tabela 4, nota-se diminuição no índice de consistência (K) e na viscosidade para todas as formulações com o aumento da temperatura de 10°C para 25°C. Já o índice de comportamento de escoamento (n) mostrou tendência a aumentar em temperaturas mais elevadas, ou seja, ficou mais líquido, próximo ao comportamento da água. Segundo Karaman e Kayacier (2011) já é bem estabelecido que a temperatura exerça ação significativa sobre as características reológicas dos alimentos e o seu aumento acarreta diminuição da viscosidade. Penna *et al.* (2001) também observaram o mesmo comportamento em bebidas fermentadas,

demonstrando que a temperatura exerce efeito na preservação das características do produto, tornando-o mais ou menos viscoso dependendo da temperatura estabelecida.

O aumento da porcentagem de extrato de quinoa nas bebidas, tanto a 10°C quanto a 25°C causou aumento nos valores de viscosidade e no índice de consistência (K). A formulação 100% de extrato de soja foi uma exceção e apresentou a maior viscosidade nas curvas ascendentes. Nas curvas descendentes, entretanto, nota-se maior viscosidade para a bebida 100% de extrato de quinoa e menor manutenção da viscosidade para bebida 100% de extrato de soja, indicando menor perda de estrutura nas bebidas formuladas com extrato de quinoa (Tabela 4). Nota-se também que, para alcançar uma determinada taxa de deformação é necessária uma maior tensão de cisalhamento nas bebidas que contém maior proporção de extrato de quinoa, demonstrando melhor estabilidade estrutural nessas bebidas em relação às com maior porcentagem de extrato de soja.

De acordo com Amatayakul *et al.* (2006), quanto maior o teor de sólidos totais, maior a firmeza do produto, ou seja, maior o índice de consistência. Dimitreli e Thomareis (2004) concluíram que um produto com alto valor proteico e menor conteúdo de umidade leva a um produto com alto valor de viscosidade. A bebida a base de extrato de soja apresentou maior conteúdo proteico e maiores valores de sólidos totais, explicando assim sua elevada viscosidade. No entanto, Penna *et al.* (2003) observaram maior quebra de estrutura nas bebidas com maior conteúdo de sólidos totais e concluíram que quanto maior o teor de sólidos totais da amostra, maior a degradação causada pelo cisalhamento contínuo.

A quinoa possui elevada quantidade de amido, que pode ter ajudado na formação de um gel viscoelástico, que por sua vez pode ter influenciado na conservação da estrutura e nos valores de viscosidade. O amido quando submetido ao aquecimento a uma determinada faixa de temperatura (geralmente a 90°C ou acima, dependendo do produto em que se encontra), inicia o processo gelatinização. Durante este processo, mudanças irreversíveis como ruptura de ligações

de hidrogênio, captação de água, inchaço, derretimento de cristais ou hélices duplas, perda de birrefringência e solubilização realizam-se, geralmente acompanhadas pelo aumento da viscosidade (ZOBEL; STEPHEN, 2006). De acordo com Kim e Yoo (2009), o aumento na viscosidade aparente em decorrência do aumento da concentração de amido tem sido relatado por vários pesquisadores. Javanmard e Koohikamali (2011) assim como Keogh e O’Kennedy (1998) também observaram maiores índices de consistência e conseqüentemente maiores viscosidades para geleias de manga com maior concentração de amido e em iogurtes elaborados com amido..

### Avaliação Sensorial

Na Tabela 5 está sendo apresentado os valores de aceitação (média ± DP) de cada atributo avaliado nas diferentes formulações. As bebidas F4 e F5 obtiveram as maiores médias, em termos de valor absoluto, para todos os atributos. Em relação ao sabor e ao aroma, as bebidas F1, F2 e F3 foram consideradas rejeitadas, pois apresentaram médias abaixo de 5,0.

**Tabela 5** - Valores médios (± DP) dos valores de aceitação de cada atributo avaliado nas diferentes formulações.

<b>Atributo</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>
<b>Sabor</b>	4,32±2,04 <sup>b</sup>	4,41±2,17 <sup>b</sup>	4,74±2,04 <sup>ab</sup>	5,45±2,06 <sup>a</sup>	5,39±2,17 <sup>a</sup>
<b>Cor</b>	6,44±1,60 <sup>a</sup>	6,57±1,49 <sup>a</sup>	6,81±1,38 <sup>a</sup>	6,84±1,43 <sup>a</sup>	6,87±1,55 <sup>a</sup>
<b>Aroma</b>	4,50±1,76 <sup>ab</sup>	4,45±1,67 <sup>b</sup>	4,92±2,02 <sup>ab</sup>	5,15±1,97 <sup>ab</sup>	5,30±1,88 <sup>a</sup>
<b>Consistência</b>	5,75±1,96 <sup>b</sup>	5,73±1,73 <sup>b</sup>	5,83±2,17 <sup>ba</sup>	6,42±1,92 <sup>a</sup>	6,31±1,96 <sup>ba</sup>
<b>Impressão global</b>	5,00±1,67 <sup>b</sup>	5,16±1,68 <sup>b</sup>	5,41±1,83 <sup>ab</sup>	6,00±1,87 <sup>a</sup>	5,94±1,86 <sup>a</sup>

Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as formulações F1 ( Bebida 100% de extrato de quinoa), F2 (Bebida 70% de extrato de quinoa- 30% de extrato de soja), F3(Bebida 50% de extrato de quinoa- 50% de extrato de soja), F4 (Bebida 30% de extrato de quinoa- 70% de extrato de soja) e F5 (Bebida 100% de extrato de soja).

De acordo com Yang e Li (2010), o sabor característico de feijão cru, proporcionado pela soja, reduz a pontuação em relação ao sabor do produto. Este sabor característico, pouco aceito

pelos ocidentais, geralmente está relacionado à rejeição por parte dos consumidores. Rodrigues *et al.* (2003) relataram que a aceitação de extratos de soja na forma pura ainda é limitada, visto que a maioria dos extratos de soja prontos para o consumo disponíveis no mercado é acrescida de ingredientes que conferem doçura e/ou aromatizantes, com o intuito de mascarar o sabor característico de soja. Entretanto, Osundahunsi *et al.* (2007), obtiveram médias atribuídas ao sabor bastante satisfatórias, que variaram de 6,50 a 7,5 para bebidas fermentadas de soja sabor morango e mamão, respectivamente. Esta melhor aceitação pode estar relacionada à adição das polpas de fruta.

Observou-se que quanto maior a proporção de extrato de quinoa, menor a aceitação por parte dos consumidores em relação ao sabor, entretanto a associação de 70% de extrato de soja com 30% de extrato de quinoa proporcionou, juntamente com a formulação 100% extrato de soja, melhor aceitação.

Em relação ao atributo cor, não houve diferença significativa nos valores de aceitação obtidos entre as formulações, indicando que os consumidores gostaram, de forma semelhante, da coloração das diferentes bebidas. Downham e Collins (1999) acreditam que todos os indivíduos são bastante sensíveis a cor dos alimentos e que o apetite pode ser influenciado e estimulado ou desestimulado pela cor, diminuindo ou aumentando o desejo pelo alimento. A cor é um dos parâmetros utilizados na análise de aceitação de novos produtos, podendo influenciar na rejeição ou aceitação do mesmo, e, conseqüentemente afetar sua compra pelos consumidores (TÁRREGA; COSTELL, 2007). Não foi adicionado nenhum tipo de corante às formulações e todas estavam bem homogêneas. A coloração clara natural das bebidas agradou boa parte dos consumidores que atribuíram nota em média de 6,70, correspondente a “gostei moderadamente” para este atributo.

O aroma não foi um atributo muito apreciado pelos consumidores, provavelmente em razão do odor característico e diferenciado dos extratos vegetais em relação aos “iogurtes”

tradicionais, principalmente daqueles advindos dos grãos de quinoa, que é menos usual do que os de soja. Uma maior porcentagem de consumidores (aprox. 50%) concentrou-se entre o intervalo de 3 a 4 (desgostei moderadamente e desgostei levemente) para as bebidas F1, F2 e F3 (maior porcentagem de extrato de quinoa). As bebidas F4 e F5 tiveram melhor aceitação em relação ao aroma (médias de  $5,15 \pm 1,97$  e  $5,30 \pm 1,88$ ). Houve diferença estatística apenas entre F5 (bebida 100% extrato de soja) e F2 (bebida 70% extrato de quinoa-30% extrato de soja), que obtiveram respectivamente o maior ( $5,30 \pm 1,88$ ) e o menor ( $4,45 \pm 1,67$ ) valor de aceitação para este atributo.

Osundahunsi *et al.* (2007) avaliaram sensorialmente suas bebidas fermentadas de soja com diferentes aromatizantes e encontraram resultados satisfatórios em relação ao atributo aroma (média entre 7,94 e 6,96 para a bebida com aroma de morango e de laranja respectivamente).

Todas as bebidas formuladas no presente estudo foram oferecidas aos consumidores em sua forma natural, ou seja, nenhuma delas foi acrescida de aromatizante. A utilização de algum aromatizante, com a finalidade de mascarar o odor e o sabor característico dos extratos vegetais, não habitual pelos ocidentais, seria, portanto, uma forma de elevar a aceitação com relação ao aroma.

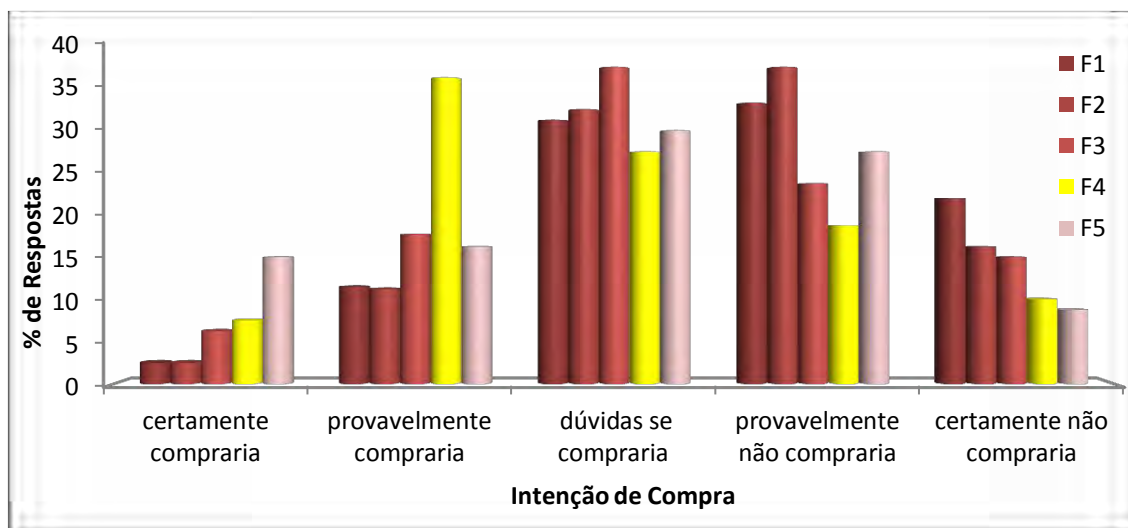
Em relação à consistência, houve preferência pelas formulações F4 e F5, entretanto a única diferença estatística observada ocorreu entre as formulações F1 e F4, que apresentaram respectivamente a menor ( $5,75 \pm 1,96$ ) e a maior média de aceitação ( $6,42 \pm 1,92$ ). Penna *et al.* (2001) observaram que bebidas fermentadas com índice de consistência elevado apresentam maior aceitabilidade. Neste estudo, a bebida com menor índice de consistência (F4), nas curvas ascendentes, apresentou uma das melhores aceitabilidades quanto a consistência.

Os consumidores expressaram melhor aceitação pelas formulações F3, F4 e F5 com relação à impressão global. As bebidas F4 e F5 se diferiram estatisticamente das demais bebidas.

Quanto à intenção de compra, a bebida F4 (30% de extrato de quinoa-70% de extrato de soja) obteve os melhores resultados. De forma geral, 44% dos consumidores respondeu que

provavelmente ou certamente comprariam a bebida F4, enquanto que 14%, 14%, 24% e 31% respondeu que provavelmente ou certamente comprariam as bebidas F1, F2, F3 e F5, respectivamente. Por outro lado, uma menor fração dos consumidores (28%) respondeu que provavelmente ou certamente não comprariam a bebida F4, enquanto 55, 54, 39 e 36% respondeu que provavelmente ou certamente não comprariam as bebidas F1, F2, F3 e F5, respectivamente (Fig. 5).

**Figura 5** – Frequência de resposta para a intenção de compra das formulações



F1 (Bebida 100% de extrato de quinoa), F2 (Bebida 70% de extrato de quinoa- 30% de extrato de soja), F3 (Bebida 50% de extrato de quinoa- 50% de extrato de soja), F4 (Bebida 30% de extrato de quinoa- 70% de extrato de soja) e F5 (Bebida 100% de extrato de soja).

Ressalta-se ainda que, todas as bebidas servidas durante a análise sensorial estavam seguras do ponto de vista microbiológico, uma vez que o número de coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp. e *Bacillus cereus* estavam em conformidade com a Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

## CONCLUSÕES

A bebida com 70% extrato de soja- 30% extrato de quinoa (F4) foi considerada a melhor bebida desenvolvida levando em conta os critérios analisados (caracterização centesimal, potencial de sobrevivência do *L. casei*, caracterização reológica, aceitação sensorial e intenção de compra). A utilização da quinoa como constituinte da bebida mostrou resultados interessantes, uma vez que o pseudogrão contribuiu com a diminuição do tempo de fermentação, causou aumento da viscosidade dos produtos e proporcionou bebidas com conteúdos adequados de proteínas, carboidratos e com teores de lipídeos e valor calórico inferiores ao da bebida formulada apenas com o extrato de soja.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMATAYAKUL, T.; SHERKAT, F.; SHAH, N. P. Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratios and EPS-producing starter cultures at 9 and 14% total solids. **Food hydrocolloid**, v.20, n.2-3, p.314–324, 2006.
- APHA. **Compendium of methods for microbiological examination of foods**. 4. Ed. Washington: American Public Health Association press, 2001. 571p.
- ANDO, H.; CHEN, YI-CHUN; TANG, H.; SHIMIZU, M.; WATANABE, K.; MITSUNAGA, T. Food components in fractions of quinoa seed. **Food Science and Technology Research**, v.8, n.1, p.80-84, 2002.
- ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Factors affecting italian consumer attitudes toward functional foods. **Journal of Agrobiotechnology Management & economics**, v.14, n.1, p. 20-32, 2011.
- ARAGON-ALEGRO, L.; ALEGRO, J. H. A.; CARDARELLI, H.R.; CHIU, M. C.; SAAD, S. M. I. Potentially probiotic and symbiotic chocolate mousse. **LWT-Food Science and Technology**, v.40, n.4, p.669-675, 2007
- ARYANA, K. J.; MCGREW, P. Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. **International Journal of Food Science and Technology**, v.40, n.10, p.1808–1814, 2007.
- AOAC. **Official methods of analysis of the association official analytical chemists**, ed.18, Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 2010.

BASAK, S.; RAMASWAMY, R. S. Simultaneous evaluation of shear rate and time dependency of stirred yogurt rheology as influenced by added pectin and strawberry concentrate. **Journal of Food Engineering**, v.21, n.3, p.385-393, 1994.

BRASIL. 2005. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea**. Resolução nº 16, 23 de Novembro, 2005. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <[www.agais.com/normas/leite/leite\\_fermentado.htm](http://www.agais.com/normas/leite/leite_fermentado.htm)>. Acesso em 01 mar. 2012.

BRASIL. 2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos** - Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001.

BRASIL. 2008. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos** - IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008.

CHOU, C. C.; HOU, J. W. Growth of Bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. **International Journal of Food Microbiology**, v.56, n.2-3, p.113–121, 2000.

DIKE, K. S.; SANNI, A. I. Influence of starter culture of lactic acid bacteria on the shelf life of agidi, an indigenous fermented cereal product. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.46, p. 7922-7927, 2010.

DIMITRELI, G.; THOMAREIS, A. S. Effect of temperature and chemical composition on processed cheese apparent viscosity. **Journal of Food Engineering**, v.64, n.2, p. 265–271, 2004.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Rheological properties and sensory characteristics of set-type soy yogurt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.24, p.9868- 19876, 2007.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, v.35, n.1, p. 5-22, 1999.

FAO/WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Geneva: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2001.

FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I.; DESJARDINS, M. P.; GARDNER, N.; FLISS, I.; CHAMPAGNE, C. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, n.1, p.174–181, 2007.

FLEMING, J. E.; GALWEY, N. W. Quinoa (*Chenopodium quinoa* willd). In: Williams, J.T. (Ed.), **Cereals and pseudocereals**. London: Chapman and hall, 1995. p. 3-83.

GARRO, M. S.; VALDEZ, F. V.; OLIVER, G.; GIORI, G. S. Growth characteristics and fermentation products of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus casei* and *L. fermentum* in soymilk. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A**, v.206, n.1, p.72-75, 1998.

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

GUERGOLETTI, K. B.; MAGNANI, M.; JUCA SAN MARTIN, J. S.; ANDRADE, C. G. T.; GARCIA, S. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, n.2, p.415–421, 2010.

HARTEMINK, R.; VANLAERE, K. M.J.; ROMBOUTS, F. M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v.38, n.3, p.367-374, 1997.

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

HOLDSWORTH, S. D. Rheological models used for the prediction of the flow properties of food products: a literature review. **Transaction of Institute of Chemical Engineering**, v.71, n.1, p.139-179, 1993.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v.35, n.2-3, p.109-116, 2002.

IAL. **Normas analíticas do instituto adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ITSARANUWAT, P.; AL-HADDAD, K.; ROBINSON, R. K. The potential therapeutic benefits of consuming 'health-promoting' fermented dairy products: A brief update. **International Journal of Dairy Technology**, v.56, n.4, p. 203–210, 2003.

JAVANMARD, M.; KOOHIKAMALI, S. A study on the effect of native sago starch on the mechanical properties of modified mango jam. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.5, n.9, p.501-507, 2011.

KARAMAN, S.; KAYACIER, A. Effect of temperature on rheological characteristics of molasses: modeling of apparent viscosity using adaptive Neuro - Fuzzy inference system (ANFIS). **Food Science and Technology**, v.44, n.8, p.1717-1725, 2011.

KEOGH, M. K.; O'KENNEDY, B. T.O. Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids. **Journal of Food Science**, v.63, n.1, p.108-112, 1998.

KIM, W. W.; YOO B. Rheological behaviour of acorn starch dispersions: effects of concentration and temperature. **International Journal of Food Science & Technology**, v.44, n.3, p.503–509, 2009.

KOEBNICK, C.; WAGNER, I.; LEITZMANN, P.; STERN, U.; ZUNFT, H. F. Probiotic beverage containing lactobacillus casei shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v.17, n.11, p.655–659, 2003.

KOZIOL, M. J. Composición química. *In*: WAHLI, C (Ed.). **Quinoa hacia su cultivo comercial**. Ecuador: Latinreco, 1990, p. 137-159.

- MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. Prebiotics. **Best Practice Research Clinical Gastroenterology**, v.18, n.2, p.297-298, 2004.
- MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. Boca Raton: CRC press, 1999, p.387.
- MILLS, S.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. **Microbial Cell Factories**, v.10, n.1, p.1-19, 2011.
- OSUNDAHUNSI, O. F.; AMOSU, D.; IFESAN, B. O. T. Quality evolution and acceptability of soy-yogurt with different colours and fruit flavours. **American Journal of Food Tecnology**, v.2, n.4, p.273-280, 2007.
- PAULY-SILVEIRA, N. D.; BEDANI, R.; CAVALLINI, D. C. U.; MANZONI, M. S. J.; MIGUEL, D. P.; BORSATO, D.; ROSSI, E. A. Optimization of a synbiotic formulation of soy yoghurt containing yacon extract by response surface methodology. **International Journal of Probiotics & Prebiotics**, v.5, n.1, p.211-216, 2010.
- PENNA, A. I. B.; OLIVEIRA, M. N.; TAMIME, A. Y. Influence of carrageenan and total solids content on the rheological properties of lactic beverage made with yogurt and whey. **Journal of Texture Studies**, v.34, n.1, p.95-113, 2003.
- PENNA, A. L. B.; SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. Relation between quality and rheological properties of lactic beverages. **Journal of Food Engineering**, v.49, n.1, p7-13, 2001.
- PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v.44, n.5, p.1276–1283, 2011.
- REPO-CARRASCO, R.; ESPINOZA, C.; JACOBSEN, S. E. Nutritional value and use of the andean crops quinoa (*chenopodium quinoa*) and kañiwa (*chenopodium pallidicaule*). **Food Reviews International**, v.19, n.1-2, p.179–189, 2003.
- RINALDONI, A. N.; CAMPDERRÓS, M. E.; PADILLA, A. P. Physico-chemical and sensory properties of yogurt from ultrafiltered soy milk concentrate added with inulin. **Food Science and Technology**, v.45, n.2, p.142–147, 2012.
- ROBERFROID, M. Prebiotics: The concept revisited. **The American Society for Nutrition**, v.137, n.3, p.830-837, 2007.
- RODRIGUES, R. S.; GOZZO, A. M.; MORETTI, R. H. Comportamento reológico de extratos de grãos, farinha integral e isolado protéico de soja. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.21, n.2, p. 67-378, 2003.
- ROSSI, E. A.; REDDY, K. V.; SILVA, R. S. S. F. Formulation of soy-whey yogurt, using response surface methodology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.27, n.3, p.387-390, 1984.

ROSSI, E. A.; VENDRAMINE, R. C.; CARLOS, I. Z.; PEI, Y. C.; VALDEZ, G. F. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. **European Food Research Technology**, v.209, n.5, p.305-307, 1999.

SALMINEN, S.; WRIGHT, A. V.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria- microbiological and functional aspects**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 2004, 656p.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v.17, n.11, p.1262-1277, 2007.

TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Color and consistency of semi-solid dairy desserts: instrumental and sensory measurements. **Journal of Food Engineering**, v.78, n.2, p.655-661, 2007.

VAN LOO, J.; CLUNE, Y.; BENNETT, M.; COLLINS, J. K. The syncan project: goals, set-up, first results and settings of the human intervention study. **British Journal of Nutrition**, v.93, n.1, p.91-98, 2005.

VEGA-GÁLVEZ, A.; MIRANDA, M.; VERGARA, J.; URIBE, E.; PUENTE, I.; MARTÍNEZ, E. A. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*chenopodium quinoa willd.*), an ancient andean grain: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, n.15, p.2541-2547, 2010.

VINDEROLA, G. C.; MOCCHUITTI, P.; REINHEIMER, A. J. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.4, p.721-729, 2002.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. **Dairy technology: principles of milk properties and processes**. New York: Marcel Dekker, 1999, 752p.

WANG, J.; ZHANG, W.; ZHONG, Z.; WEI, A.; BAO, Q.; ZHANG, Y.; SUN, T.; POSTNIKOFF, A.; MENG, H.; ZHANG, H. Gene expression profile of probiotic *Lactobacillus casei* zhang during the late stage of milk fermentation. **Food Control**, v.25, n.1, p.321-327, 2012.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. J. B. **The genera of lactic acid bacteria**. Great Britain: Chapman and Hall, 1995. 398p.

YANG, M.; LI, L. Physicochemical, textural and sensory characteristics of probiotic soy yogurt prepared from germinated soybean. **Food Technology and Biotechnology**, v.48, n.4, p.490-496, 2010.

ZHOU, Q.; WANG, J. C.; GUO, Z.; YAN, L.; ZHANG, Q.; CHEN, W.; LIU, X-M.; ZHANG, H-P. Fermentation characteristics and transit tolerance of *Lactobacillus casei* zhang in reconstituted mare milk during storage. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, n.2, p.249-254, 2009.

ZOBEL, H. F.; STEPHEN, A. M. Starch: structure, analysis, and application *In*: STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O. **Food polysaccharides and their applications**. New York: CRC press, 2006, p.25-85.

## ***CAPÍTULO III***

# IMPACTO DE UMA BEBIDA VEGETAL FERMENTADA SOB A MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA UTILIZANDO MODELO GASTROINTESTINAL DINÂMICO

Fernanda Bianchi<sup>1</sup>, Elizeu Antonio Rossi<sup>1</sup>, Isabel Kimiko Sakamoto<sup>2</sup>, Maria Angela Tallarico Adorno<sup>2</sup> e Katia Sivieri<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Alimentos e Nutrição. Laboratório de Pesquisa em Probióticos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) - Araraquara, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Engenharia Ambiental - CPDI-EA. Laboratório de Processos Biológicos – LPB. Escola de Engenharia de São Carlos - EESC/USP, São Carlos, São Paulo, Brasil.

## RESUMO

Levando em consideração a suma importância em manter o equilíbrio da microbiota intestinal estável, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação de quatro formulações de bebidas à base de extratos aquosos de soja e quinoa, com diferenças na forma de acidificação (artificialmente ou por *L. casei* Lc-01) e na adição ou não de fruto-oligossacarídeo (FOS), sob a microbiota intestinal humana por meio de um Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH). Foram realizadas semanalmente análises microbiológicas de diversos gêneros microbianos além de análise semanais de íons amônia, de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (PCR-DGGE) das amostras dos reatores que simulam o cólon ascendente, transverso e descendente, durante todas as fases de experimento. Observou-se que a bebida simbiótica obteve os melhores resultados microbiológicos no reator R3 (cólon ascendente), estimulando o crescimento de *Lactobacillus* spp, *Bifidobacteria* spp e reduzindo a população de *Clostridium* spp, bacteroides, *Enterococcus* spp e enterobactérias neste compartimento. Não houve diferença estatística entre as bebidas prebiótica, placebo e probiótica em nenhum dos 3 compartimentos com relação aos íons amônia, no entanto todas diferiram estatisticamente da bebida simbiótica, a qual proporcionou redução significativa destes íons, principalmente no R3. Não houve diferença significativa na produção de AGCC entre os diferentes tratamentos com as bebidas e o período basal. A sobrevivência do *L. casei* Lc-01 foi comprovada tanto por métodos dependentes quanto independentes de cultivo. As análises de PCR-DGGE mostraram uma maior riqueza e diversidade da comunidade de *Lactobacillus* spp durante o tratamento com a bebida simbiótica, principalmente, no cólon ascendente. O SEMH mostrou que apesar das bebidas prebiótica, probiótica e placebo terem apresentado bons resultados em relação à microbiota intestinal e influenciarem na redução de íons amônia (no cólon ascendente), estes resultados não foram tão satisfatórios quanto os proporcionados pela bebida simbiótica.

**Palavras-chave:** SEMH, bebida fermentada, *Lactobacillus casei*, PCR-DGGE, viabilidade, AGCC

Autor Correspondente em: Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) - Rodovia Araraquara-Jaú Km 1, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brasil. Tel. 55(16) 33016932 – (16) 997744750.  
Endereço de E-mail: febianchi@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal é um complexo ecossistema de micro-organismos que colonizam o trato gastrointestinal, composta por aproximadamente  $10^{14}$  de micro-organismos, pertencentes a mais de 1000 diferentes espécies (RAJILIC-STOJANOVIC *et al.*, 2007, FRICK; AUTENRIETH, 2013), alcançando maiores densidade na região do cólon (PAYNE *et al.*, 2011).

Embora a composição da microbiota do cólon seja relativamente estável ao longo da vida adulta, alterações relacionadas à dieta e à reatividade do sistema imunológico podem afetar esta composição, gerando uma redução geral na diversidade de grande parte das espécies bacterianas, podendo resultar no aumento de bactérias putrefativas no colón e uma maior susceptibilidade à doenças. Uma das estratégias utilizadas para se amenizar o desequilíbrio da microbiota intestinal é a inclusão, na alimentação diária, de alimentos contendo prebióticos, probióticos ou uma combinação de ambos (WOODMANSEY, 2007).

Probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, administrados regularmente e em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (WHO/ FAO, 2001; SANDERS; KLAENHAMMER, 2001). Os prebióticos são ingredientes seletivamente fermentáveis que permitem mudanças específicas, tanto na composição quanto na atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios e bem-estar à saúde do hospedeiro (ROBERFROID, 2007).

Para que os probióticos tenham efeito positivo no trato intestinal alguns requisitos específicos devem ser cumpridos, tais como, resistir ao processo de fabricação e armazenamento, apresentando ao final do período de vida útil, um limiar acima de  $10^6$  UFC/mL (KURMANN; RASIC, 1991); bem como, resistir, sem perder a viabilidade, às condições físico-químicas do trato gastrointestinal, tais como o ácido gástrico e as secreções biliares, além de obterem sucesso na competição com a microbiota intestinal residente (FOOKS; GIBSON, 2002).

Um dos gêneros de micro-organismos mais empregados como probióticos é o *Lactobacillus spp.* O consumo de *Lactobacillus casei* Lc-01 tem sido associado a diversos efeitos benéficos, tais como, estimulação do sistema imune e alívio dos sintomas da doença de Chron (ITSARANUWAT *et al.*, 2003). O *L. casei* Lc-01 apresenta alta taxa de sobrevivência nos produtos, além de resistirem à passagem pelo suco gástrico e entérico, principalmente quando associado às fibras (GUERGOLETTTO *et al.*, 2010).

Com o intuito de melhor entender a relação micro-organismo/ hospedeiro, o trato gastrointestinal tem sido frequentemente estudado e nas últimas décadas diversos simuladores intestinais foram desenvolvidos para facilitar este campo de pesquisa (MOLLY *et al.*, 1993).

Os experimentos “in vivo” utilizados para avaliar a administração de prebióticos e probióticos podem gerar respostas mais representativas, uma vez que os parâmetros fisiológicos e as interações com o organismo do hospedeiro são levados em conta. No entanto, nestes modelos, normalmente apenas a microbiota fecal é investigada e não representam a composição da comunidade microbiana das diferentes partes do cólon (MINEKU *et al.*, 1999; MOLLY *et al.*, 1993), enquanto que os sistemas “in vitro” dinâmicos simulam a região proximal e distal do cólon humano (MOLLY *et al.*, 1993). Estes simuladores fornecem resultados reprodutíveis e permitem estudos utilizando vários parâmetros controlados. Os modelos “in vitro” são, portanto, adequados para o estudo da influência de prebióticos, probióticos e outros alimentos sob a microbiota intestinal nativa (VAN DE WIELE *et al.*, 2004).

As bebidas em estudo, preparadas com extratos aquosos de quinoa (30%) e soja (70%), acidificadas por micro-organismo probiótico e/ou adicionadas de FOS ou não, podem contribuir com a alteração benéfica da microbiota intestinal, influenciada pela ação dos probióticos, dos prebióticos e até mesmo em função dos constituintes bioativos da soja e da quinoa. A quinoa, além de possuir todos os aminoácidos essenciais e ácidos graxos de alta qualidade ( $\omega 6$ ,  $\omega 3$  e  $\omega 9$ ) (ANDO *et al.*, 2002), é um excelente exemplo de alimento funcional, com potencialidade de

reduzir o risco de várias doenças (VEGA-GÁLVEZ *et al.*, 2010), além de ser um alimento livre de colesterol, lactose e glúten, da mesma maneira que a soja. A bebida simbiótica à base de extratos aquosos de quinoa e de soja, apresenta adequada composição centesimal, boa aceitação sensorial, além de proporcionar uma alta viabilidade ao micro-organismo probiótico. Entretanto, sua ação sob a microbiota intestinal humana não foi ainda estudada e comprovada. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a influencia das bebidas simbiótica, prebiótica, probiótica e placebo, à base extrato aquoso de soja e de quinoa, sob a microbiota intestinal humana utilizando Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Elaboração do extrato de quinoa e de soja**

Os grãos de quinoa foram lavados e friccionados em água corrente para a retirada dos componentes antinutricionais (saponinas) e conseqüentemente, redução do sabor residual amargo. Em seguida, foram levados ao fogo (55g/L de água) até atingirem fervura, onde permaneceram por 10 minutos. Posteriormente, os grãos, juntamente com a água, foram triturados até formarem uma mistura homogênea. Filtrou-se então a mistura em tela fina com abertura 250 Mesh para a obtenção do extrato de quinoa.

O extrato hidrossolúvel de soja foi produzido pela Unidade de Desenvolvimento e Produção de Derivados de Soja – UniverSoja, instalada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/Unesp - Brasil, segundo metodologia descrita por Rossi *et al.* (1999).

### **Elaboração das bebidas simbiótica, prebiótica, placebo e probiótica**

As quatro bebidas em estudo foram produzidas com 30% de extrato aquoso de quinoa e 70% de extrato aquoso de soja, 6% de sacarose (União, Brasil), 0,8% de óleo de soja (Liza,

Brasil), 1% de lactose grau alimentício (Purac, Brasil), 0,14% de estabilizante Recodan™ RS-B (Danisco, Brasil) e 2,5% de leite em pó desnatado (Molico, Brasil). Todas foram elaboradas de acordo com a metodologia descrita por Rossi *et al.* (1984), diferindo apenas, quanto a maneira de acidificar as bebidas e na adição ou não do fruto-oligossacarídeo (FOS) (Tabela 1).

**Tabela 1-** Diferenças na elaboração das bebidas simbiótica, prebiótica, probiótica e placebo

<b>Bebida</b>	<b>Adição de FOS</b>	<b>Acidificação</b>
<b>Simbiótica (TS)</b>	Adicionada de FOS	Acidificada com <i>L. casei</i> Lc-01
<b>Prebiótica (Tpe)</b>	Adicionada de FOS	Acidificada artificialmente
<b>Probiótica (Tpo)</b>	Sem adição de FOS	Acidificada com <i>L. casei</i> Lc-01
<b>Placebo (Tpa)</b>	Sem adição de FOS	Acidificada artificialmente

Todas as bebidas passaram por processo de pasteurização antes da inoculação do micro-organismo ou da acidificação.

Utilizou-se ácido láctico P.A. (85%) para acidificar as bebidas prebiótica e placebo até o pH final de 4,8. Nas formulações com adição de FOS, foram utilizados 3% de Fruto-oligossacarídeo (FOS -SKL Pharma, Brasil) após o processo de pasteurização.

### **Preparo do inóculo**

A cultura liofilizada de *L. casei* Lc-01 (Chr. Hansen, Brasil), foi ativada por inoculação em meio de leite (10% de leite em pó desnatado, 1% de glicose, 0,5% de extrato de levedura) (2% v/v) e cultivada em estufa a 37°C por 15 horas (até atingir a fase estacionária), sob condições aeróbias. Em seguida, 2% (v/v) da cultura ativada foi adicionado às bebidas simbiótica e probiótica e, encubadas a 37°C até atingirem o pH de 4,8.

## Simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH)

O simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH) consiste em uma sucessão de cinco reatores conectados que representam as diferentes partes do trato gastrointestinal humano com seus respectivos valores de pH, tempo de residência e capacidade volumétrica (Tabela 2).

**Tabela 2** - Valores de volume, tempo de residência e pH estabelecidos em cada um dos reatores do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH)

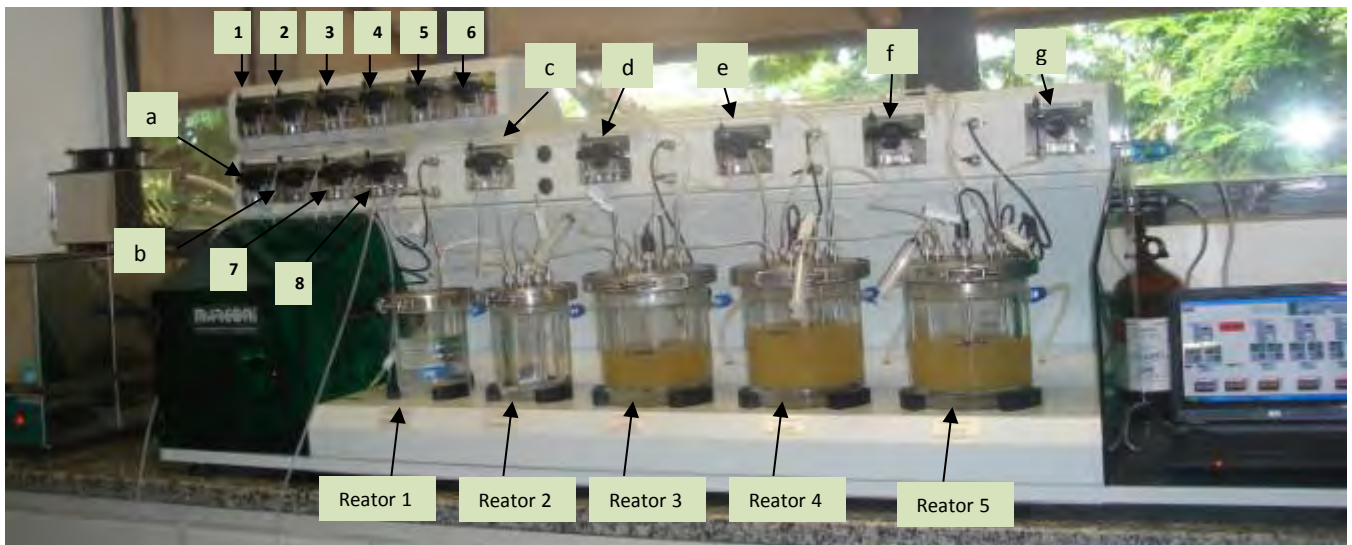
Reator	Volume (mL)	Tempo de residência (h)	pH
R1: Estômago	200	2,5	2,2-2,4
R2: Intestino delgado	200	4	-
R3:Cólon ascendente	500	20	5,6-5,9
R4:Cólon transverso	800	32	6,1-6,9
R5:Cólon descendente	600	24	6,6-6,9

Fonte: POSSEMIERS *et al.* (2004)

Os cinco reatores mantiveram-se continuamente agitados por agitador magnético e mantidos a temperatura de 37°C por meio de um banho maria termostaticado e com sistema de circulação. O interior de cada um dos reatores foi mantido em anaerobiose pela injeção diária de N<sub>2</sub> durante 30 minutos. O pH adequado de cada porção do trato permaneceu ajustado automaticamente, controlado pela adição de NaOH 1N ou HCl 0,1N (POSSEMIERS *et al.*, 2004; MOLLY *et al.*, 1994).

Cada reator esteve provido de oito portas: para entrada e saída do meio em estudo; amostragem da fase líquida e do espaço ocupado pelos gases; pH-eletrodo; pH-controle (entrada de ácido e base) e para entrada e saída de gás N<sub>2</sub>. Bombas peristálticas foram utilizadas para transferir sucessivamente os conteúdos entre os recipientes. As bombas nomeadas de a-d (Fig. 1) trabalharam de forma semi-continua e o restante (e-g) (Fig. 1), de forma continua (MOLLY *et al.*, 1994), simulando o trato gastrointestinal.

**Figura 1** – Fotografia do Simulador do Ecossistema Microbiano Intestinal Humano



Reator 1= Estômago; Reator 2= duodeno; Reator 3= cólon ascendente; Reator 4= cólon transverso; Reator 5= cólon descendente; a= Bomba que leva o alimento basal ou alimento basal mais a bebida até o estômago; b= bomba que leva o suco pancreático até o duodeno; c= bomba de transferência do estômago para o duodeno; d= bomba de transferência do duodeno para o cólon ascendente; e= bomba de transferência do cólon ascendente para o transverso; f= bomba de transferência do cólon transverso para o descendente; g= bomba de transferência do cólon descendente até o descarte final, 1=Bomba controle de pH (ácido) do Reator 3; 2= Bomba controle de pH (base) do Reator 3; 3= Bomba controle de pH ( ácido) do Reator 4; 4= Bomba controle de pH (base) do reator R4; 5= Bomba controle de pH ( ácido) do Reator 5; 6= Bomba controle de pH (base) do Reator 5; 7= bomba controle de pH do estômago (base); 8= bomba controle de pH do estômago (ácido).

A passagem do alimento pelo intestino delgado foi simulada pelo Reator 2 através da entrada no sistema de 60 mL de suco pancreático artificial a uma taxa de 4ml/min. por 15min., uma hora após a adição dos alimentos (MOLLY *et al.*, 1993; POSSEMIERS *et al.*, 2004).

No início do experimento, os últimos 3 reatores foram inoculados com amostra de fezes de doador adulto voluntário que não tinha utilizado antibiótico por um período de 2 anos antes do início do experimento. Foram coletadas e diluídas 20 g de fezes em tampão fosfato contendo 0,05 mol/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,05 mol/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 0,1% de Na-tioglicolato (pH=6,5). Posteriormente, após agitada em agitador do tipo *stomacher* por 10 minutos, a amostra diluída foi centrifugada por 5min a 3000 rpm. Do sobrenadante, 40 mL foram adicionados a cada um dos reatores 3, 4 e 5 (três últimos reatores).

## Protocolo experimental

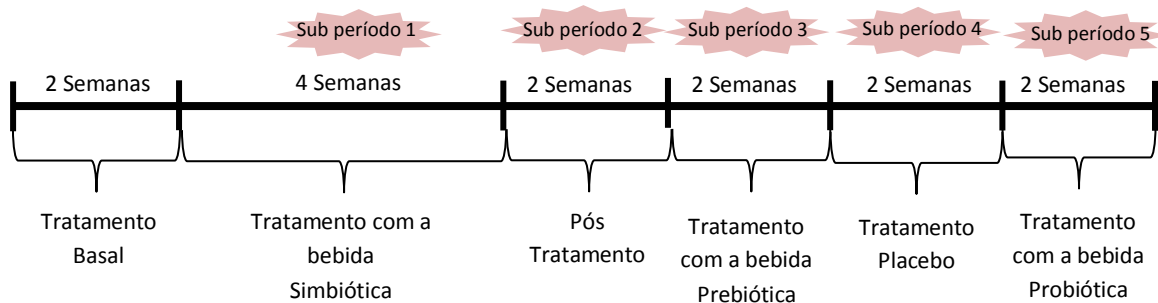
O período experimental utilizando este tipo de reator foi previamente descrito por Van de Wiele *et al.* (2007). Este inclui um período de estabilização (Período basal) de 2 semanas, após a inoculação da amostra de fezes, para permitir a adaptação das bactérias intestinais às condições ambientais presentes nos diferentes compartimentos do cólon e permitir, também, a formação de uma comunidade microbiana estável. Durante este período ocorreu a passagem do meio alimentar basal (Tabela 3) pelo sistema, três vezes ao dia, possibilitando a adaptação da comunidade microbiana às condições físico-químicas e nutricionais que predominam nas diferentes partes do cólon (MOLLY *et al.*, 1993). Após as duas semanas de adaptação, iniciou-se os períodos de tratamentos, com um total de 14 semanas de protocolo experimental (Fig. 2). O período experimental foi dividido em 5 sub períodos, como descrito a seguir: sub período 1: entrada do produto simbiótico pelo sistema, juntamente com o alimento basal, durante 4 semanas; sub período 2: período de pós-tratamento com duração de 2 semanas, entrando somente o meio basal no sistema, sub período 3: 2 semanas de passagem pelo SEMH, da bebida prebiótica (junto ao alimento basal), sub período 4: passagem da bebida placebo (junto ao alimento basal) pelo simulador durante 2 semanas e sub período 5: passagem da bebida probiótica (junto ao alimento basal) no sistema por 2 semanas. Todos os tratamentos tiveram um fluxo de entrada de três vezes ao dia. O protocolo completo, com base no protocolo de Kontula *et al.* (2002), pode ser visualizado na Figura 2.

**Tabela 3** - Composição do meio alimentar basal dissolvidos em água destilada

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

Fonte: PAYNE *et al.*(2003)

**Figura 2-** Protocolo experimental de estudo no SEMH.



### **Análise de íons amônia**

Durante todo o período experimental (basal, tratamento simbiótico, pós tratamento, tratamentos prebiótico, probiótico e placebo) foram coletadas, uma vez por semana, amostras dos reatores 3, 4 e 5 para análise da produção de íons amônia. O conteúdo de amônia foi determinado utilizando-se um medidor de íon seletivo (modelo 710A, marca Orion) com eletrodo próprio para amônia (modelo 95-12, Orion). A calibração do aparelho foi realizada utilizando soluções padrão de cloreto de amônio 0,1M, nas concentrações de 10, 100 e 1000 mg/L de amônia. Em 25 mL de amostra foram adicionados 0,5 mL de solução ISA (ammonia pH adjusting Ionic Strength Adjuster (Orion) – solução ajustadora de pH e força iônica). Todas as medidas realizaram-se a 25°C (BEDANI, 2008).

### **Análises microbiológicas**

Foram coletadas, semanalmente, durante todo o período experimental, 5 mL de amostras dos reatores 3, 4 e 5 para as análises microbiológicas. A análise da composição da microbiota intestinal baseou-se na enumeração de bactérias aeróbias e anaeróbias totais, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., Enterobactérias, *Clostridium* spp. e *Bacteroides* spp. Um mL de amostra de cada reator foi suspenso em 9 mL de água peptonada estéril. Diluições seriadas foram preparadas e a inoculação realizada em meios de cultura seletivos (Tabela 4):

**Tabela 4** – Meios de cultura e condições de cultivo utilizados nas análises microbiológicas

Gênero	Meio de Cultura	Marca	Tempo/ Temperatura	Condição de oxigênio	Referência
<i>Lactobacillus</i>	ágar MRS	Himedia (India)	37°C/48h	anaerobiose	YOSHIOKA <i>et al.</i> (1983)
<i>Bifidobacterium</i>	Bífido. medium BIM-25	Difco (França)	37°C/72h	anaerobiose	MUNOA; PARES (1988)
<i>Clostridium</i>	ágar RCA	Difco (França)	37°C/48h	anaerobiose	MARZOTTO <i>et al.</i> (2006)
Enterobactérias	ágar MacConkey	Acumedia (EUA)	37°C/48h	anaerobiose	BRIGIDI <i>et al.</i> (2001)
<i>Enterococcus</i>	ágar KF Streptococcus	Acumedia (EUA)	37°C/48h	aerobiose	EDLUND <i>et al.</i> (2000)
Bacteróides	ágar BE	Acumedia, (EUA)	37°C/120h	anaerobiose	LIVINGSTON <i>et al.</i> (1978)
Anaeróbios totais	ágar Standard Methods	Acumedia (EUA)	37°C/48h	anaerobiose	YOSHIOKA <i>et al.</i> (1983)
Aeróbios facultativos	ágar Standard Methods	Acumedia (EUA)	37°C/48h	aerobiose	YOSHIOKA <i>et al.</i> (1983)

### **Análise da sobrevivência do *L. casei* às condições do estômago e duodeno**

Para confirmar a sobrevivência do *L. casei* após a passagem simulada do micro-organismo pelo estômago e duodeno, foram realizadas semanalmente análises microbiológicas do meio basal junto à bebida fermentada e dos reatores que simulam o estômago e o duodeno. Foram coletados 5 mL de amostra do estômago e do duodeno, ambos após 1h e 30min da entrada do produto nestes compartimentos. Um mL de cada amostra foi suspenso em 9 mL de água peptonada. Diluições seriadas foram preparadas e a inoculação realizada em meio MRS Agar (Himedia, India) por 37°C/48h sob anaerobiose. A avaliação da sobrevivência do *Lactobacillus casei*, foi realizada, também, utilizando o método molecular independente de cultivo: Reação de Polimerização em Cadeia - Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante PCR-DGGE.

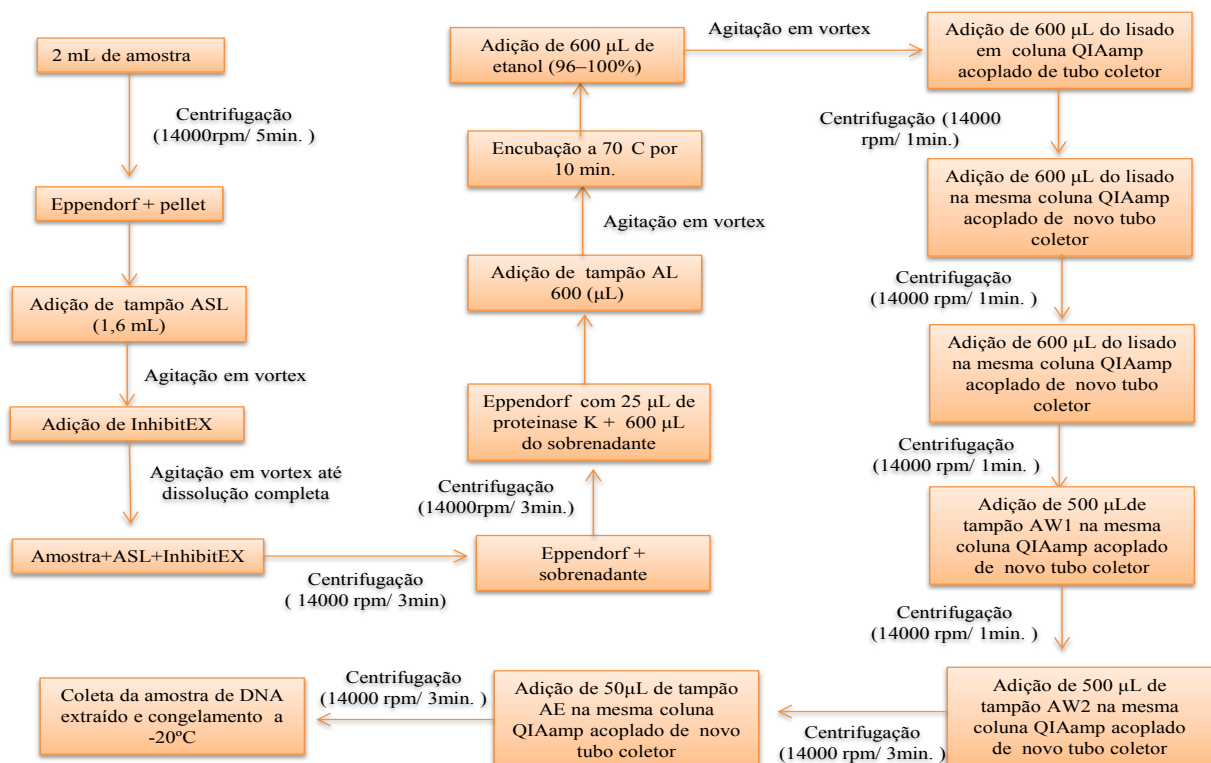
### **Comportamento e diversidade de *Lactobacillus* no cólon**

A análise do comportamento e diversidade da comunidade de *Lactobacillus* spp, durante todo período experimental, nos 3 reatores que simulam o cólon, foi realizada por meio de método molecular (PCR-DGGE).

## Extração de DNA

O DNA das amostras de cada um dos reatores, para cada período de estudo, assim como da amostra da cultura liofilizada, foi extraído utilizando-se o kit de extração QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. Os DNAs foram quantificados utilizando um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Willmington, EUA) (SIVIERI *et al.*, 2013). Neste estudo, o protocolo utilizado para a extração do DNA foi “Isolation of DNA from Stool for Human DNA” (QIAGEN, 2010), com modificações na quantidade inicial da amostra (de 220 mg para 2 mL de cada amostra) e na quantidade de tampão AE (de 200 uL para 50 uL). Após testes preliminares para a obtenção de uma maior quantidade de DNA extraído, não foram realizadas as etapas 3 e 4 do protocolo e acrescentou-se uma etapa de centrifugação (5 min. a 14.000rpm) dos 2 mL iniciais da amostra (descartando o sobrenadante) antes da adição do tampão ASL. A figura 3 mostra as etapas, já com as adaptações, utilizadas para a extração do DNA de cada um dos reatores.

**Figura 3** – Etapas do processo de extração de DNA



## PCR-DGGE

Os *primers* de oligonucleótidos, utilizados como ponto de partida para a replicação do DNA, foram o Lab159f (5'-GGAAACAGATGCTAATACCG-3') e o Lab677GCR (5'-GCCCGGGGCGCCCCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGGCACCGCTACATGGAG- 3') (HEILIG *et al.*, 2002). A polimerização do DNA foi realizada utilizando-se o Taq Polimerase Brasil (Invitrogen, Brasil). As amostras foram amplificadas em termociclador (Applied Biosystems, EUA), utilizando-se o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C durante 2 min.; 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30s, anelamento do primer específico a 56°C por 40s, extensão a 72°C durante 5 min, seguido de um resfriamento a 4°C. A eletroforese previamente descrita por Heilig *et al.* (2002), foi realizada utilizando um gel de poliacrilamida a 8%, com um gradiente desnaturante de 30-50%, durante 16 h, a 85 V em tampão TAE (0,5%), numa temperatura constante de 60°C. Os géis foram corados com brometo de etídio pelo método de Sanguinetti *et al.* (1994), digitalizados em 400 dpi, e analisadas pelo Software BioNumerics 6.0 (Matemática Aplicada).

### **Análise de agrupamentos (Dendogramas)**

O dendograma é um gráfico gerado por uma técnica que separa as amostras em grupos que compartilham características semelhantes (perfis de conjuntos de bandas) a partir de uma matriz de similaridade gerada pela presença e ausência obtida dos dados dos géis de DGGE. Neste gráfico estão dispostas linhas ligadas segundo os níveis de similaridade que agruparam pares de espécies ou de variáveis (ALVES *et al.*, 2007).

A similaridade do padrão de bandas intra-gel foi verificada utilizando-se o coeficiente de similaridade Jaccard. Para a avaliação do perfil da diversidade das amostras e cálculo do coeficiente de Jaccard, utilizou-se o programa BioNumerics (BioNumerics 6.0, Applied Maths, Bélgica).

O índice de Jaccard é um coeficiente de similaridade binário que expressa a proporção de caracteres que dois objetos possuem mutuamente quando comparados e é representado pela seguinte equação (GOMES; FERREIRA, 2004):

$$IJ = a / (a + b + c)$$

onde:

a = as duas espécies ocorrem

b = somente a primeira ocorre

c = somente a segunda ocorre

### **Análise ecológica da população de *Lactobacillus* spp**

Para a análise ecológica da população de *Lactobacillus* spp, foram utilizados dois parâmetros, a riqueza (Rr) e a funcionalidade (Fo) desta população nos três reatores, durante todo o período experimental

O cálculo da riqueza da população estudada foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$Rr = (N^2 \times Dg) \text{ (MARZORATI } et al., 2008)$$

Onde N representa o número total de bandas na linha de DGGE e Dg o gradiente desnaturante compreendido entre a primeira e a última banda.

Esta fórmula, de acordo com Marzorati *et al.* (2008), é baseada no fato de que se um ambiente é muito habitável, ele pode hospedar elevada quantidade de diferentes microorganismos e, portanto, apresentará elevada variabilidade genética e, como consequência, um maior gradiente de desnaturação será necessário para descrever a diversidade microbiana total. Por outro lado, se o ambiente é adverso ou exclusivo, uma menor quantidade de microorganismos irá fazer parte da comunidade microbiana e, portanto, será necessário um gradiente de desnaturação mais estreito para descrever a diversidade total.

Outro parâmetro utilizado para descrever a população de *Lactobacillus* spp foi a organização funcional. A organização funcional (Fo) é um valor numérico utilizado para descrever a uniformidade da comunidade microbiana. Para representar graficamente a uniformidade das comunidades de *Lactobacillus* spp, foram criadas curvas de distribuição de Lorenz (LORENZ, 1905) com base nos perfis de DGGE, como previamente descrito (MERTENS *et al.*, 2005). Resumidamente, para cada linha de DGGE, as respectivas bandas são classificadas com base em suas intensidades. Consecutivamente, a proporção acumulada de espécies é utilizada como o eixo x, e o eixo y é representado pelas proporções acumuladas de intensidades das bandas. Matematicamente, isto gera uma curva convexa. Quanto mais a curva de Lorenz desvia da linha teórica perfeita de equilíbrio (isto é, 45°), uma menor uniformidade pode ser observada na estrutura da comunidade estudada. A baixa uniformidade significa que uma pequena fração das diferentes espécies está presente em quantidades predominantes. Neste estudo, a curva de Lorenz foi também avaliada com base no princípio de Pareto (PARETO, 1897). Segundo este princípio, o valor cumulativo do eixo y (no caso, a proporção de intensidades de bandas) corresponde à 20% da proporção cumulativa da espécie avaliada (eixo X). Na economia, onde se originou a curva de Pareto, observou-se que apenas 20% da população de um país possuem 80% de sua riqueza (PARETO, 1897). Refere-se às curvas de Lorenz, avaliadas no nível de 20% do eixo do x, como "curva de Pareto Lorenz."(WITTEBOLLE *et al.*, 2008).

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

Os níveis de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foram determinados, semanalmente, a partir de amostras coletadas de cada um dos reatores (R3, R4 e R5) e congeladas a -20 ° C. Os AGCC foram extraídos utilizando-se um cromatógrafo gasoso equipado com um detector de ionização de chamas, um injetor capilar (“Split”/“splitless”) e uma coluna HP-INNOWAX com

30 m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ L de entrada (Shimadzu GC2010). Utilizou-se o hidrogênio como gás transportador, a uma vazão de 1,56 mL/min. As temperaturas da coluna, do injetor e do detector utilizadas foram 170, 250 e 280°C, respectivamente (VAN DE WIELE *et al.*, 2004; VAN DE WIELE, *et al.*, 2007).

### **Análise estatística**

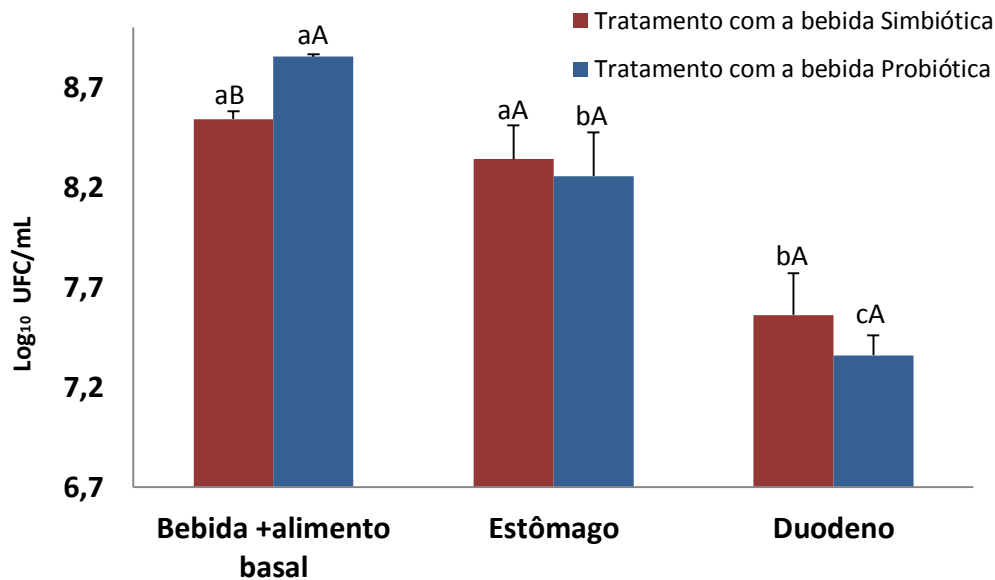
A significância dos resultados foi investigada por meio da análise de variância (ANOVA) e as médias individuais comparadas por meio de teste Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o software estatístico BioEstat 5.0.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Sobrevivência do *L. casei* às condições do estômago e do duodeno**

Durante a fase de tratamento, com as bebidas simbiótica e probiótica, foram realizadas análises microbiológicas para verificar a viabilidade do micro-organismo probiótico após a passagem pelos reatores que simulam o estômago e o duodeno. Ambas as bebidas foram adicionadas ao alimento basal obtendo-se uma concentração final de  $10^8$  UFC/mL. Os resultados da viabilidade de *L. casei* no alimento basal, no estômago e no duodeno podem ser visualizados na Figura 4.

**Figura 4-** População (log UFC/mL) de *L. casei* na bebida simbiótica ou probiótica, adicionada ao alimento basal e, após a passagem das bebidas pelo estômago e duodeno



Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na população de *L. casei* entre os dois compartimentos e a bebida junto ao alimento basal para o mesmo tratamento e letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na população de *L. casei* entre os tratamentos.

Não houve perda de viabilidade do *L. casei* ao passar pelo estômago durante o tratamento com a bebida simbiótica, embora uma redução de um ciclo log tenha sido observada após a passagem pelo duodeno. Entretanto, no tratamento com a bebida probiótica, houve uma redução significativa na população de *L. casei*, tanto ao passar pelo estômago quanto pelo duodeno, indicando que a associação entre o micro-organismo probiótico e o prebiótico FOS proporciona um efeito positivo na sobrevivência do *L. casei* em meios ácidos. Aryana e McGrew (2007), assim como Haully *et al.* (2005), também obtiveram uma população significativamente maior do micro-organismo fermentador (*L. casei*) nas bebidas contendo prebióticos em comparação ao controle sem prebiótico.

Apesar da redução da população de *L. casei*, observada após a passagem do micro-organismo pelo o duodeno, tanto na bebida simbiótica quanto na probiótica, as cepas de *L. casei*

continuaram viáveis ao entrar no primeiro compartimento do cólon, mantendo uma população em média de  $7,45 \pm 0,14$  log UFC/mL.

O acúmulo de histidina é uma importante forma de adaptação do *L. casei* e, seu acúmulo, pode aumentar a resistência bacteriana em meios ácidos. Outra importante forma de adaptação do *L. casei* em meios ácidos é a fermentação malolática. A enzima malolática presente neste micro-organismo realiza a descarboxilização do L-malato em L-lactato e CO<sub>2</sub>, contribuindo assim, com a alcalinização do citoplasma (MILLS *et al.*, 2011).

Vários artigos evidenciam a capacidade do *Lactobacillus spp.* de sobreviver às condições gastrintestinais. Guo *et al.* (2009) afirmam que a espécie *casei* possui boa resistência ao suco gástrico e entérico. De acordo com Mishra e Prasad (2005), a habilidade de tolerar o ácido e o suco pancreático pode variar de uma cepa para outra. Em seus estudos, Mishra e Prasad (2005), evidenciaram resistência gástrica e intestinal em apenas três de sete linhagens de *Lactobacillus casei*. Pozza *et al.* (2011), estudaram diferentes linhagens de *Lactobacillus* isoladas das fezes de crianças e comprovaram a resistência de 8 cepas às condições ácidas e aos sais biliares.

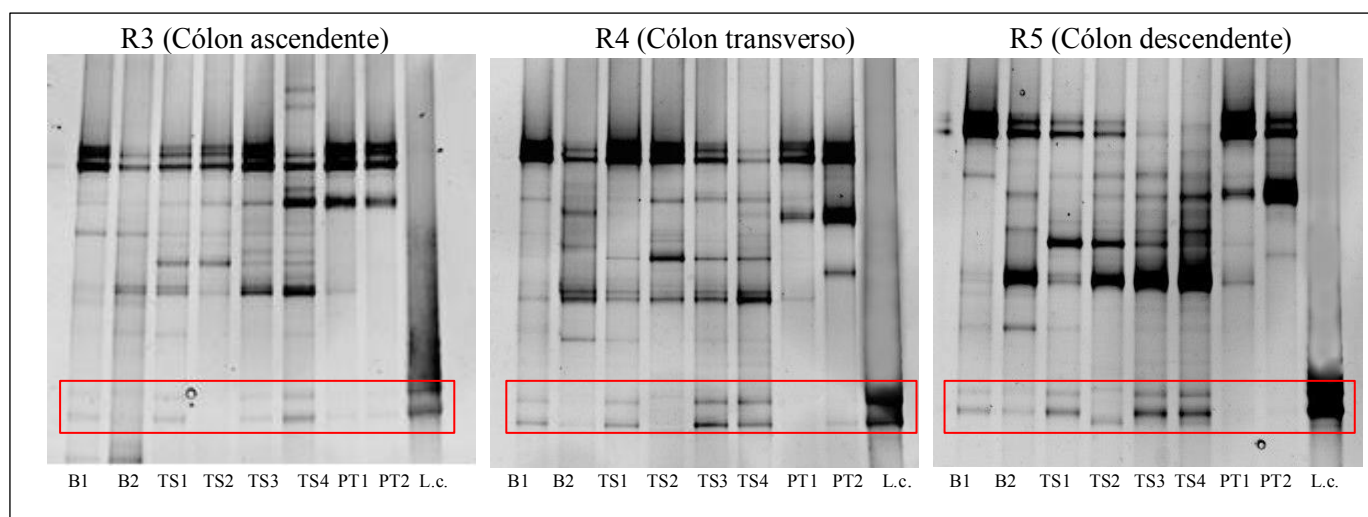
Xanthopoulos *et al.* (2000) afirmam que a taxa de resistência aos sais biliares tende a variar entre as bactérias ácido lácticas e entre as linhagens de uma mesma espécie. De acordo com Gilliland *et al.*, (1987) e Saarela *et al.* (2000), os sais biliares são tóxicos para as células, uma vez que eles desorganizam a estrutura da membrana celular e, por esta razão, a tolerância aos sais biliares é considerada uma das características requeridas para a sobrevivência das bactérias lácticas no intestino delgado, podendo ser esta, uma explicação para a redução da população de *L. casei* no duodeno para ambas as bebidas testadas.

Apesar da microbiologia convencional por placas ter demonstrado a resistência e consequente sobrevivência do *L.casei* Lc-01 às condições adversas proporcionadas pelo estômago e duodeno, foi realizada, também, análise molecular (PCR-DGGE) das amostras, utilizando-se a cultura pura de *L.casei* Lc-01 como controle para comprovar a presença desta

cepa no reator SEHM, nas partes que simularam as regiões do cólon, já que o meio de cultura MRS ágar, utilizado na microbiologia convencional, é um meio seletivo para o gênero *Lactobacillus*, porém não a espécie *casei*.

A Figura 5 apresenta os resultados da análise de DGGE durante os períodos de tratamento com a bebida simbiótica nos reatores R3 (Cólon ascendente), R4 (Cólon transversal) e R5 (Cólon descendente) e a Figura 6, os resultados da DGEE durante os períodos de tratamento com as bebidas probiótica, prebiótica e placebo (sem *L. casei* e FOS) nos mesmos compartimentos.

**Figura 5** - Análise da sobrevivência do *L. casei* nos três compartimentos do cólon por Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) durante o tratamento com a bebida simbiótica.



B1: Período Basal 1, B2: Período Basal 2, TS1: Tratamento simbiótico semana 1, TS2: Tratamento simbiótico semana 2, TS3: Tratamento simbiótico semana 3, TS4: Tratamento simbiótico semana 4, PT1: Pós-tratamento semana 1, PT2: Pós-tratamento semana 2, L.c. : cultura pura de *L. casei* Lc-01

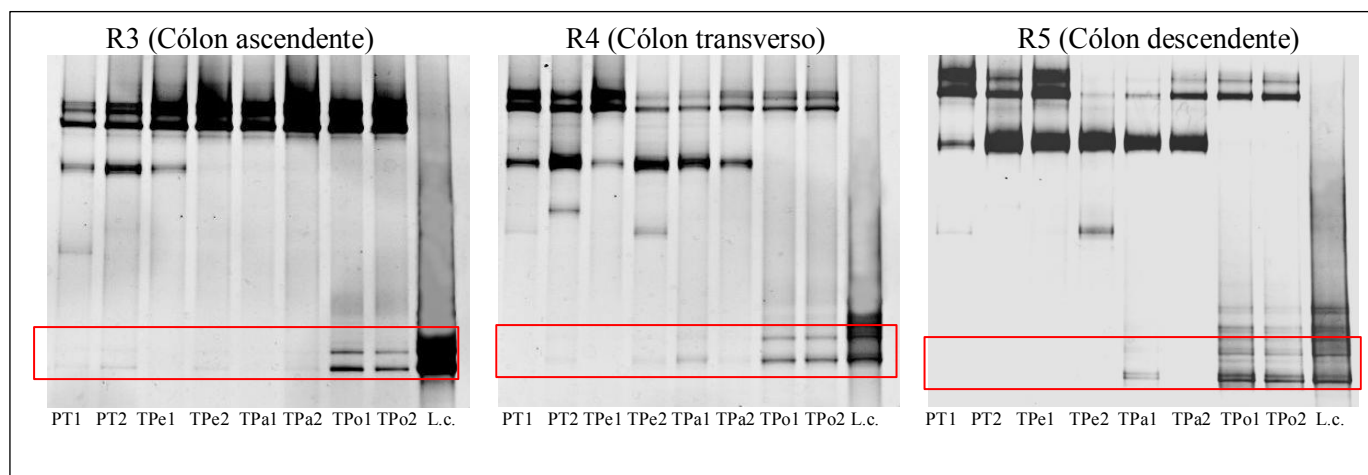
Observa-se, na Figura 5, que nas duas últimas semanas de tratamento com a bebida simbiótica (TS3 e TS4), ocorreu uma intensificação das bandas que correram na mesma posição que a cultura pura de *L. casei*. O inverso ocorreu no pós-tratamento (PT1 e PT2), período no qual foi cessada a passagem da bebida simbiótica.

A sobrevivência do *L. casei* pode ainda ser observada na Figura 6, pelo aparecimento das bandas equivalentes ao *L. casei* (controle) apenas quando o tratamento foi realizado com a bebida

probiótica (TPo). Quando as bebidas prebiótica (Tpe) e placebo (TPa) são analisadas, percebe-se que pouca ou nenhuma banda é visualizada correndo na mesma posição da cultura pura (*L. casei*)

O *L. casei* Lc-01 sobreviveu às condições de estresse proporcionadas pelos compartimentos que simulam o estômago e o duodeno, uma vez que sua presença pôde ser confirmada nos reatores que simulam o cólon ascendente, transverso e descendente por meio de técnicas moleculares (Fig. 6).

**Figura 6** - Análise da sobrevivência do *L.casei* por PCR-DGGE nos três compartimentos do cólon durante o tratamento com as bebidas prebióticas, probióticas e placebo.



PT1: Pós-tratamento semana 1, PT2: Pós-tratamento semana 2, TPe1: Tratamento prebiótico semana 1, TPe2: Tratamento prebiótico semana 2, TPa1: Tratamento placebo semana 1, TPa2: Tratamento placebo semana 2, TPo1: Tratamento probiótico semana 1, TPo2: Tratamento probiótico semana 2, L.c. : cultura pura de *L. casei* Lc-01

### **Análises Microbiológicas**

A Tabela 5 mostra a população microbiana parcial de amostras retiradas dos reatores que simulam o cólon ascendente, transverso e descendente do reator SEMH durante todo período experimental.

**Tabela 5** - Média de população ( $\pm$  DP) expressa em log UFC/mL de diferentes grupos bacterianos, nos diferentes compartimentos do reator SEMH que simulam o cólon ascendente, transversal e descendente durante todo período experimental.

	<b>R3 (Cólon ascendente)</b>					
	B	TS	PT	Tpe	TPa	TPo
<i>Lactobacillus spp</i>	7,88 $\pm$ 0,06 <sup>C</sup>	8,39 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	8,40 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	7,29 $\pm$ 0,08 <sup>D</sup>	8,04 $\pm$ 0,02 <sup>B</sup>	8,11 $\pm$ 0,07 <sup>B</sup>
<i>Bifidobacterium spp</i>	7,75 $\pm$ 0,00 <sup>C</sup>	8,21 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	8,44 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	7,48 $\pm$ 0,01 <sup>D</sup>	7,31 $\pm$ 0,10 <sup>E</sup>	7,82 $\pm$ 0,06 <sup>C</sup>
<i>Clostridium spp</i>	8,44 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	8,02 $\pm$ 0,00 <sup>BC</sup>	8,35 $\pm$ 0,01 <sup>AB</sup>	7,01 $\pm$ 0,01 <sup>D</sup>	8,66 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	7,97 $\pm$ 0,01 <sup>C</sup>
<i>Enterococcus spp</i>	7,45 $\pm$ 0,21 <sup>B</sup>	4,73 $\pm$ 0,07 <sup>D</sup>	8,77 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	6,66 $\pm$ 0,08 <sup>C</sup>	7,86 $\pm$ 0,09 <sup>B</sup>	6,53 $\pm$ 0,28 <sup>C</sup>
<b>Enterobactérias</b>	9,23 $\pm$ 0,07 <sup>A</sup>	7,45 $\pm$ 0,03 <sup>C</sup>	7,61 $\pm$ 0,06 <sup>B</sup>	7,09 $\pm$ 0,00 <sup>D</sup>	7,19 $\pm$ 0,07 <sup>D</sup>	5,79 $\pm$ 0,04 <sup>E</sup>
<b>Anaeróbios totais</b>	8,20 $\pm$ 0,07 <sup>A</sup>	7,74 $\pm$ 0,03 <sup>B</sup>	8,39 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	7,68 $\pm$ 0,05 <sup>B</sup>	7,27 $\pm$ 0,02 <sup>C</sup>	7,80 $\pm$ 0,02 <sup>B</sup>
<b>Aeróbios facultativos</b>	8,13 $\pm$ 0,05 <sup>C</sup>	7,68 $\pm$ 0,05 <sup>D</sup>	8,89 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	7,23 $\pm$ 0,11 <sup>E</sup>	8,59 $\pm$ 0,05 <sup>B</sup>	8,06 $\pm$ 0,02 <sup>C</sup>
<b>Bacteróides</b>	4,94 $\pm$ 0,05 <sup>B</sup>	2,58 $\pm$ 0,11 <sup>D</sup>	4,43 $\pm$ 0,02 <sup>B</sup>	5,46 $\pm$ 0,05 <sup>A</sup>	5,47 $\pm$ 0,12 <sup>A</sup>	4,04 $\pm$ 0,16 <sup>C</sup>
	<b>R4 (Cólon transversal)</b>					
<i>Lactobacillus spp</i>	7,82 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	7,04 $\pm$ 0,03 <sup>BC</sup>	6,91 $\pm$ 0,02 <sup>C</sup>	7,40 $\pm$ 0,33 <sup>B</sup>	6,36 $\pm$ 0,10 <sup>D</sup>	7,01 $\pm$ 0,01 <sup>C</sup>
<i>Bifidobacterium spp</i>	7,56 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>	7,02 $\pm$ 0,02 <sup>B</sup>	7,10 $\pm$ 0,03 <sup>B</sup>	6,82 $\pm$ 0,09 <sup>C</sup>	5,06 $\pm$ 0,11 <sup>E</sup>	6,30 $\pm$ 0,02 <sup>D</sup>
<i>Clostridium spp</i>	8,24 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	7,26 $\pm$ 0,13 <sup>CD</sup>	7,40 $\pm$ 0,06 <sup>C</sup>	7,11 $\pm$ 0,05 <sup>D</sup>	7,93 $\pm$ 0,04 <sup>B</sup>	6,85 $\pm$ 0,04 <sup>E</sup>
<i>Enterococcus spp</i>	7,09 $\pm$ 0,08 <sup>B</sup>	4,61 $\pm$ 0,04 <sup>E</sup>	7,98 $\pm$ 0,07 <sup>A</sup>	6,90 $\pm$ 0,22 <sup>B</sup>	6,16 $\pm$ 0,15 <sup>C</sup>	5,42 $\pm$ 0,12 <sup>D</sup>
<b>Enterobactérias</b>	7,69 $\pm$ 0,13 <sup>A</sup>	6,19 $\pm$ 0,03 <sup>D</sup>	7,09 $\pm$ 0,04 <sup>B</sup>	7,46 $\pm$ 0,10 <sup>A</sup>	6,40 $\pm$ 0,08 <sup>D</sup>	6,62 $\pm$ 0,05 <sup>C</sup>
<b>Anaeróbios totais</b>	7,76 $\pm$ 0,09 <sup>A</sup>	7,77 $\pm$ 0,08 <sup>A</sup>	7,52 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>	7,15 $\pm$ 0,14 <sup>B</sup>	7,44 $\pm$ 0,24 <sup>AB</sup>	6,68 $\pm$ 0,01 <sup>C</sup>
<b>Aeróbios facultativos</b>	7,82 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	6,87 $\pm$ 0,01 <sup>BC</sup>	7,90 $\pm$ 0,09 <sup>A</sup>	6,87 $\pm$ 0,22 <sup>BC</sup>	5,75 $\pm$ 0,02 <sup>D</sup>	6,66 $\pm$ 0,05 <sup>C</sup>
<b>Bacteróides</b>	7,39 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	7,65 $\pm$ 0,07 <sup>B</sup>	7,30 $\pm$ 0,09 <sup>B</sup>	8,68 $\pm$ 0,26 <sup>A</sup>	8,63 $\pm$ 0,27 <sup>A</sup>	7,73 $\pm$ 0,27 <sup>B</sup>
	<b>R5 (Cólon descendente)</b>					
<i>Lactobacillus spp</i>	7,90 $\pm$ 0,06 <sup>A</sup>	6,50 $\pm$ 0,03 <sup>B</sup>	6,40 $\pm$ 0,09 <sup>B</sup>	6,23 $\pm$ 0,15 <sup>B</sup>	5,62 $\pm$ 0,29 <sup>C</sup>	6,29 $\pm$ 0,08 <sup>B</sup>
<i>Bifidobacterium spp</i>	7,44 $\pm$ 0,07 <sup>A</sup>	7,00 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	6,63 $\pm$ 0,00 <sup>C</sup>	6,10 $\pm$ 0,13 <sup>D</sup>	5,22 $\pm$ 0,16 <sup>F</sup>	5,54 $\pm$ 0,27 <sup>E</sup>
<i>Clostridium spp</i>	8,24 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	7,26 $\pm$ 0,13 <sup>C</sup>	7,69 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	6,73 $\pm$ 0,13 <sup>D</sup>	8,14 $\pm$ 0,24 <sup>A</sup>	6,47 $\pm$ 0,08 <sup>D</sup>
<i>Enterococcus spp</i>	7,21 $\pm$ 0,28 <sup>A</sup>	4,94 $\pm$ 0,16 <sup>EC</sup>	6,50 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	5,59 $\pm$ 0,38 <sup>CD</sup>	5,48 $\pm$ 0,20 <sup>DC</sup>	5,02 $\pm$ 0,21 <sup>DE</sup>
<b>Enterobactérias</b>	7,73 $\pm$ 0,11 <sup>A</sup>	6,77 $\pm$ 0,06 <sup>B</sup>	6,50 $\pm$ 0,22 <sup>BD</sup>	5,40 $\pm$ 0,41 <sup>C</sup>	6,14 $\pm$ 0,09 <sup>D</sup>	6,49 $\pm$ 0,09 <sup>BD</sup>
<b>Anaeróbios totais</b>	7,65 $\pm$ 0,13 <sup>A</sup>	7,27 $\pm$ 0,64 <sup>B</sup>	7,47 $\pm$ 1,03 <sup>A</sup>	6,97 $\pm$ 0,29 <sup>C</sup>	6,23 $\pm$ 0,97 <sup>E</sup>	6,60 $\pm$ 0,11 <sup>D</sup>
<b>Aeróbios facultativos</b>	6,79 $\pm$ 0,08 <sup>A</sup>	6,79 $\pm$ 0,05 <sup>A</sup>	6,88 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>	6,97 $\pm$ 0,10 <sup>A</sup>	6,85 $\pm$ 0,02 <sup>B</sup>	6,99 $\pm$ 0,07 <sup>A</sup>
<b>Bacteróides</b>	7,78 $\pm$ 0,05 <sup>BC</sup>	8,00 $\pm$ 0,11 <sup>B</sup>	7,35 $\pm$ 0,02 <sup>C</sup>	8,14 $\pm$ 0,06 <sup>B</sup>	8,45 $\pm$ 0,28 <sup>A</sup>	8,14 $\pm$ 0,34 <sup>B</sup>

Letras maiúsculas na mesma linha representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes fases de tratamento para um mesmo reator. B: período basal, TS: Tratamento com a bebida simbiótica, PT: Pós-tratamento, Tpe: Tratamento com a bebida prebiótica, Tpo: Tratamento com a bebida probiótica e TPa: tratamento com a bebida placebo.

A população de *Lactobacillus spp* aumentou significativamente, em um ciclo log, no cólon ascendente (R3), durante a fase de tratamento com a bebida simbiótica. No cólon transversal e descendente, houve redução significativa em R4 e R5. Nos tratamentos com as demais bebidas (prebiótica, probiótica e placebo) observa-se resultados semelhantes. Não houve aumento de ciclo log desta população no cólon transversal (R4) e descendente (R5) quando comparadas ao tratamento basal e simbiótico. Entretanto, no cólon ascendente (R3), observou-se, em relação ao período basal, um aumento de 1 ciclo log, quando o tratamento é realizado com as

bebidas probiótica e placebo. De acordo com Marteau (2010), o cólon é o principal sítio de colonização microbiana, uma região constituída de diferentes nichos e ecossistemas. O pH no cólon ascendente encontra-se entre 5,6 e 5,9, o que segundo Sivieri *et al.* (2011), favorece o crescimento de *Lactobacillus* spp, explicando assim estes resultados.

Resultados semelhantes ocorreram com a população de *Bifidobacteria* spp. O tratamento com a bebida simbiótica estimulou o crescimento (em 1 ciclo log) desta população apenas no reator 3, não alterando, entretanto, a população (em termos de ciclos log) de bifidobactérias nos demais reatores que simulam o cólon transversal e descendente. No tratamento com as bebidas prebiótica, probiótica e placebo houve uma leve redução desta população, inclusive no cólon ascendente (R3). Sivieri *et al.* (2011) observaram aumento significativo de *Bifidobacteria* spp durante o período de tratamento com *E. Faecium* CRL 183 no SEMH, porém não somente no reator 3, mas também nos dois últimos. Estes resultados mostram que o efeito probiótico de estimulação da microbiota nativa é dependente da cepa probiótica utilizada. Segundo Mitre (2009), as bifidobactérias possuem diversos efeitos benéficos no organismo, tais como, contribuição na redução no tempo de transito intestinal, ação contra *Helicobacter pylori*, eficácia no alívio dos sintomas de intolerância à lactose, prevenção de câncer do cólon retal, ação contra diarreias, hipercolesterolemia, alergias e doenças do trato respiratório, além de estimularem a produção de IgA e exercerem influência na produção e liberação de citocinas (SILVA *et al.*, 2004; SENOK *et al.*, 2005), sendo portanto, interessante o seu aumento na microbiota intestinal.

Houve diferença estatística na população de *Clostridium* spp durante o período de tratamento simbiótico nas três regiões analisadas do cólon, diminuindo, de forma significativa, a contagem desta população. Com exceção do tratamento placebo, que não foi eficaz em reduzir a população de *Clostridium*, as demais bebidas (prebiótica e probiótica) reduziram de forma significativa esta população, tanto no cólon ascendente quanto no transversal e no descendente, obtendo, inclusive, resultados mais eficientes do que o tratamento com a bebida simbiótica.

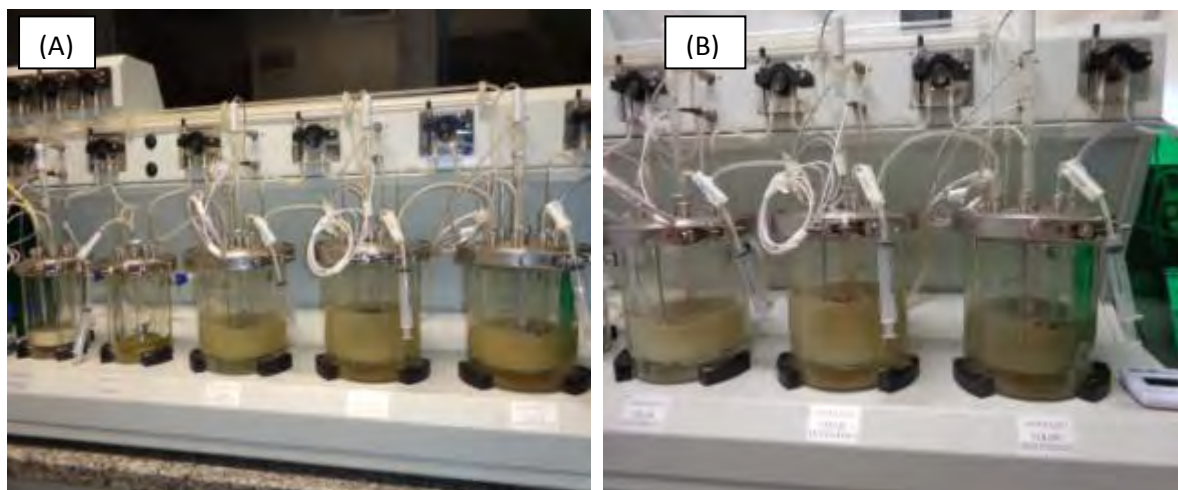
Diferentes resultados foram encontrados por Sivieri *et al.* (2011) e Bedani *et al.* (2010), que observaram nenhuma alteração na população de *Clostridium* spp nos três últimos reatores durante o período de tratamento com micro-organismo probiótico e nas fases de rato que consumiram probiótico, respectivamente. Algumas espécies pertencentes a este gênero podem ser prejudiciais em função de sua atividade metabólica e caráter patogênico (MONTESI *et al.*, 2005). Pode-se observar que durante o período de pós tratamento e tratamento placebo, houve aumento significativo da população de *Clostridium* spp nos 3 reatores (R3, R4 e R5) e que a utilização do prebiótico e/ou do probiótico na elaboração das bebidas, reduziu esta população de forma significativa, demonstrando, assim, contribuição positiva do prebiótico e do probiótico nas bebidas, tanto de forma separada quanto associada. Provavelmente, tanto o prebiótico quanto o probiótico, estimularam as bactérias intestinais a produzirem metabólitos ou bacteriocinas, o que pode ter contribuído para a redução da população de *Clostridium* spp, tanto no cólon ascendente, quanto no transversal e no descendente.

Quanto a população de *Enterococcus* spp, observou-se redução significativa de 3 ciclos log para R3, R4 e R5 utilizando-se a bebida simbiótica. Nos tratamentos com as demais bebidas (prebiótica, probiótica e placebo), houve, também, redução bastante significativa de *Enterococcus* nos 3 compartimentos estudados (R3, R4 e R5), porém tal redução foi mais significativa no tratamento com a bebida simbiótica. No reator R3, por exemplo, tanto a bebida prebiótica quanto a probiótica obtiveram uma redução de 1 ciclo log em relação ao período de pós tratamento e de 2 ciclos log em relação ao período basal. No reator R4, as bebidas prebiótica e placebo tiveram redução de 1 ciclo log quando comparadas ao período de pós tratamento e tratamento basal, e a bebida probiótica uma redução de 2 ciclos log em relação aos mesmos períodos. No reator R5, tanto a bebida prebiótica quanto a probiótica e a placebo, tiveram uma redução de 2 ciclos log em relação ao período basal e de um ciclo log em relação ao período de pós-tratamento. Embora nem todas as espécies de *Enterococcus* sejam patogênicas, como é o

caso do *Enterococcus faecium* CRL 183, que é considerado como um probiótico, os *Enterococcus* são conhecidos pelo seu potencial crescente como agente de sérias infecções. Entre os fatores de virulência mais conhecidos de algumas espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* está a resistência intrínseca a antibióticos comumente usados no tratamento de doenças e a habilidade em adquirir genes que conferem alta resistência à vancomicina e à eicoplanina pela transferência de plasmídeos contendo elementos VanA (HANDWERGER; SKOBLE, 1995).

Observa-se na Figura 7, uma diferença na turvação entre os meios dos reatores ao final do período de tratamento simbiótico, que pode estar relacionada com as diferenças microbiológicas encontradas durante este período, gerando a produção de metabólitos específicos e consequentemente, mudanças na coloração.

**Figura 7-** Diferença da turvação entre os meios dos reatores R3, R4 e R5 no período inicial (A) e final (B) do tratamento simbiótico.



Com relação à população de enterobactérias, nota-se, em relação ao período basal, uma redução de 2 ciclos log no cólon ascendente quando o tratamento foi realizado com as bebidas simbiótica, prebiótica e placebo e, de 4 ciclos log, quando o tratamento foi realizado com a

bebida probiótica. No cólon transverso houve redução de 1 ciclo log, em todos os tratamentos, com exceção do tratamento com a bebida prebiótica que não afetou esta população. No cólon descendente, houve redução de 1 ciclo log desta população quando o tratamento foi realizado com as bebidas simbióticas, placebo e probiótica, já no tratamento com a bebida prebiótica houve redução de 2 ciclos log, neste compartimento, em relação ao período basal.

As enterobactérias são grupos de bactérias Gram-negativas, oxidase negativas e fermentadoras da glicose, que incluem espécies como *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* e *Enterobacter sp*. Seu hábitat natural é o trato intestinal de animais e humanos, entretanto, podem causar infecções intestinais e extra-intestinais, sendo os principais fatores de virulência: toxinas, adesinas, invasinas, presença de cápsula e capacidade de resistência à bactericidas (SANTOS, 2006).

Houve uma redução, na população de bacteroides, de 3 ciclos log no cólon ascendente durante a fase de tratamento com a bebida simbiótica, não havendo, entretanto, alteração no ciclo log nos reatores R4 (cólon transverso) e R5 (cólon descendente) neste período. Também não houve redução na população de bacteróides em nenhum dos compartimentos quando o tratamento foi realizado com as bebidas probiótica, prebiótica e placebo, com exceção do tratamento probiótico no cólon ascendente (R3). Entretanto, esta redução não foi tão significativa quanto a proporcionada pela bebida simbiótica. Carnicer *et al.* (2006) também encontraram redução na população de bacteroides nas fezes de crianças alimentadas com leite fermentado por *L. casei* durante 6 semanas. Este efeito, segundo estes autores, pode ser devido ao bloqueio dos locais de adesão dos bacteróides à mucosa intestinal pelo *L. casei*. Os bacteróides desempenham um papel importante no ecossistema do cólon, porém algumas de suas espécies são patógenos oportunistas como é o caso do *B. fragilis* e, em menor escala, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron* e *B. ovatus*, que podem causar uma variedade de infecções, incluindo infecções da corrente sanguínea, bem como abscessos no cérebro, no pulmão ou na cavidade abdominal. O tratamento

destas infecções é complicado pelo fato dos bacteróides do cólon serem resistentes a vários antibióticos (WOLTMANN *et al.*, 1999).

Pode-se afirmar, observando as diferentes populações de bactérias intestinais (comensais e patogênicas), que todas as bebidas (probiótica, prebiótica, placebo e simbiótica), tiveram melhores efeitos no Reator R3 (cólon ascendente), estimulando o crescimento de diversos gêneros comensais e reduzindo a população de vários gêneros patogênicos neste compartimento. Comparando os diferentes tratamentos, nota-se, no geral, que a bebida simbiótica foi a que mais estimulou o desenvolvimento de forma equilibrada da microbiota nativa quando comparada aos outros tratamentos avaliados.

### **Análise da composição e interpretação ecológica (riqueza e funcionalidade) da população de *Lactobacillus* spp. nos reatores R3, R4 e R5 por PCR-DGGE**

#### **Efeito das bebidas na composição da população de *Lactobacillus* spp**

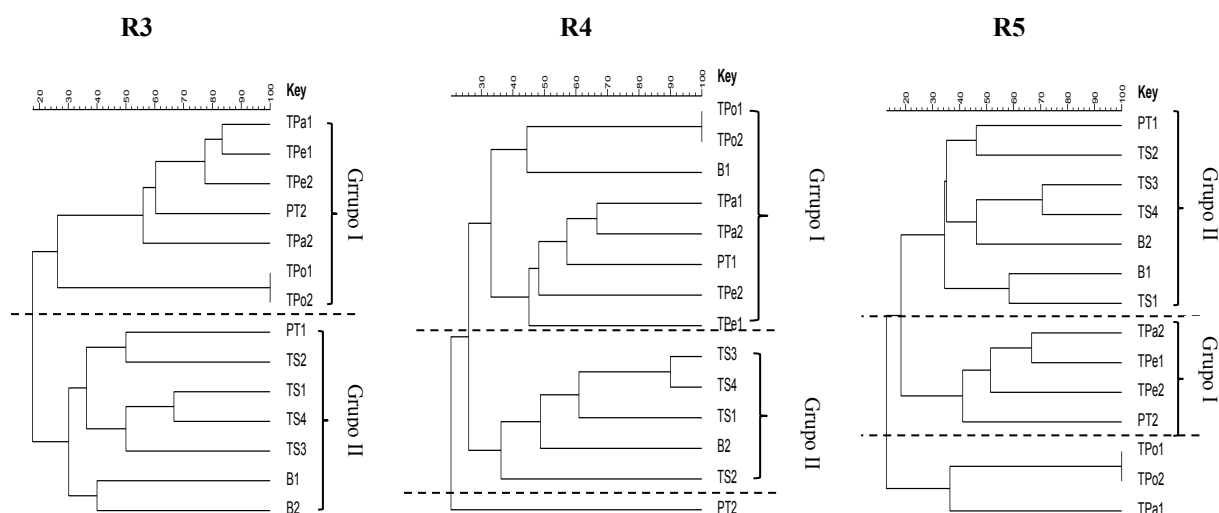
Aproximadamente 70-80% da microbiota intestinal é incultivável em meios de cultura tradicionais, portanto, para se analisar mais precisamente o comportamento do ecossistema de lactobacilos, foi realizada à análise molecular independente de cultivo (PCR-DGGE). (POSSEMIERS *et al.*, 2004).

Com o intuito de comparar o efeito das diferentes bebidas em relação à composição da população de *Lactobacillus* spp, nas diferentes porções que simulam o cólon intestinal humano, foi gerado um dendograma para cada um dos reatores (R3, R4 e R5) incluindo todo período experimental (Fig. 8). A análise de similaridade foi realizada utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard.

Os dendogramas gerados, tanto do cólon ascendente (R3) quanto do transversal (R4) e do descendente (R5), mostraram a formação de dois principais agrupamentos, separando os

períodos de tratamento com a bebida simbiótica (TS), dos períodos de tratamento com a bebida prebiótica (TPe), probiótica (TPo) e placebo (TPa), que no geral, agruparam-se formado o grupo I.

**Figura 8** – Dendogramas e percentual de similaridade (%) entre os perfis de bandas de cada tratamento no cólon ascendente (R3), transverso (R4) e descendente (R5)



B1: Período Basal 1, B2: Período Basal 2, TS: Tratamento simbiótico realizado em 4 semanas (TS1, TS2, TS3 e TS4), PT1: Pós-tratamento semana 1, PT2: Pós-tratamento semana 2, TPe1: Tratamento prebiótico semana 1, TPe2: Tratamento prebiótico semana 2, TPa1: Tratamento placebo semana 1, TPa2: Tratamento placebo semana 2, TPo1: Tratamento probiótico semana 1, TPo2: Tratamento probiótico semana 2.

Esta divisão em dois grandes grupos, com reduzida similaridade entre si (~ 20%), indica diferentes espécies de *Lactobacillus* spp no SEMH (MARZORATI *et al.*, 2010) durante os diferentes tratamentos e, portanto, alterações na comunidade de *Lactobacillus* spp, principalmente no tratamento com a bebida simbiótica em relação às demais bebidas (TPe, TPa e PTo).

Nota-se, no cólon ascendente (R3), uma similaridade de apenas 42% entre os períodos B1 e B2, indicando a real necessidade de mais de uma semana de período de estabilização da microbiota intestinal antes do início do tratamento. Estes resultados estão de acordo com os observados por Possemiers *et al.* (2004). Esta similaridade torna-se ainda menor (30%) quando o

período basal é comparado ao período de tratamento com a bebida simbiótica e o período de pós-tratamento 1, demonstrando grandes alterações na comunidade microbiana com a utilização da bebida simbiótica. Este resultado confirma os resultados encontrados na microbiologia convencional por placas, onde foi observado aumento da população de *Lactobacillus* spp no R3 durante o tratamento com a bebida simbiótica.

No cólon transversal (R4), nota-se também uma baixa similaridade entre B1 e B2, estando o período basal 2 agrupado no grupo II (grupamento no qual se encontram os tratamentos simbióticos). Entretanto, evidencia-se uma redução da similaridade do período B2, em relação aos períodos de tratamento simbiótico, com o aumento das semanas de tratamento utilizando a bebida simbiótica, uma vez que a similaridade entre o período basal 2 (mais estável que B1) e o TS1, TS3 e TS4 foi de apenas 48% em contrapartida com a similaridade de TS1 com relação a TS3 e TS4 (~60%) e a similaridade entre a penúltima (TS3) e a última semana (TS4) de tratamento com a bebida simbiótica (~90%), indicando, novamente, mudanças na composição da população de *Lactobacillus* spp. Resultados semelhantes foram observados no R5 (cólon descendente), ou seja, uma baixa similaridade entre B1 e B2. Nota-se entretanto, que o período B1 apresentou maior similaridade em relação ao TS1 (~60%) e, o período B2, uma maior similaridade com o TS3 e o TS4 (~46%), que correspondem as últimas semanas de tratamento simbiótico. Cabe ressaltar, no entanto, que esta similaridade é baixa e que, portanto, a alteração da composição de lactobacilos é alta, comparando o período basal com o de tratamento simbiótico.

A baixa similaridade (~ 20%) entre a bebida simbiótica e as demais bebidas (prebiótica, probiótica e placebo), em todos os reatores, indica que esta bebida (simbiótica) causou uma maior influência na população de *Lactobacillus*, estimulando o crescimento de diversas espécies, o que não ocorreu com as demais bebidas. Este evento pode ser verificado na figura 5, onde se observa, nos 3 reatores, o aumento do número de bandas com o aumento das semanas de

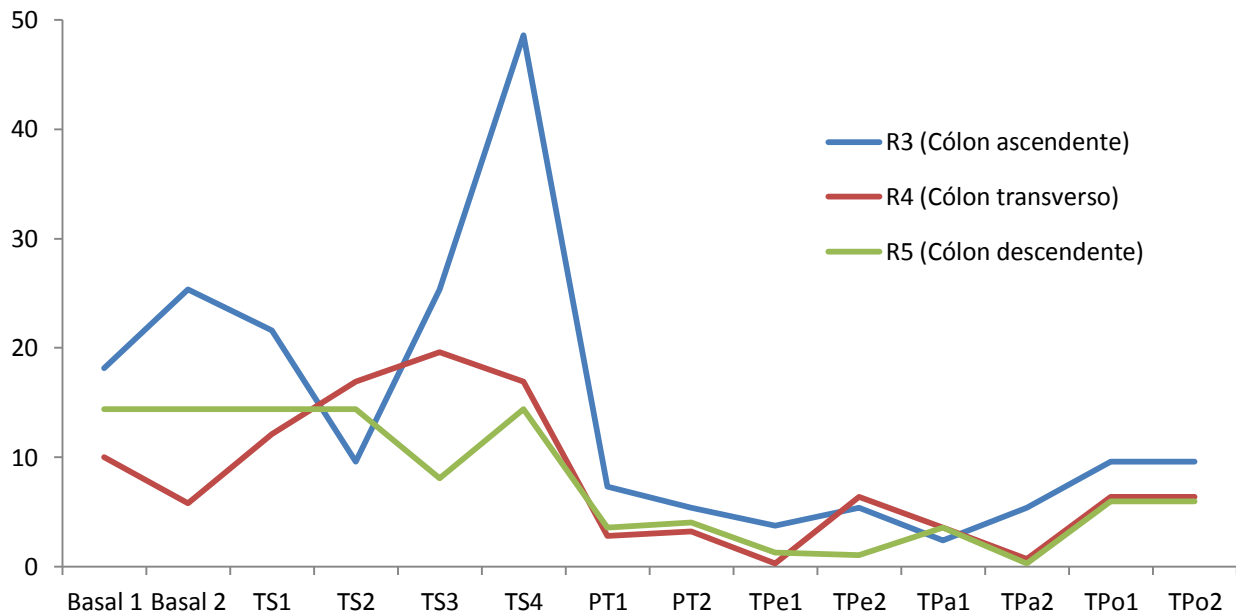
tratamento com a bebida simbiótica, o que, de acordo com Carvalho (2012), indica mudança na composição da microbiota e aumento da diversidade. Em contrapartida, nota-se diminuição do número de bandas durante os períodos de pós tratamento e de tratamento com as demais bebidas (Fig. 6). Resultados semelhantes foram encontrados por Sivieri *et al.* (2011) e Van de Wiele (2004), que relataram efeitos benéficos de probióticos e prebióticos, respectivamente, nas 3 regiões do cólon, limitadas ao período de tratamento, havendo necessidade do uso contínuo do componente estudado para que se possa obter os efeitos benéficos observados em cada estudo.

### **Interpretação ecológica (riqueza e funcionalidade) da população de *Lactobacillus* spp no SEMH**

Com o objetivo de realizar uma interpretação ecológica dos resultados de DGGE, foi utilizada uma abordagem baseada em duas análises, ao de nível de riqueza (Rr), e de organização funcional (Fo) (MARZORATI *et al.*, 2008; MARZORATI *et al.* 2010).

A Figura 9 apresenta os resultados da análise de riqueza da comunidade de *Lactobacillus* spp durante todos os períodos de tratamento, nas diferentes regiões do cólon (ascendente, transversa e descendente).

**Figura 9** - Nível de riqueza nos reatores R3, R4 e R5, os quais simulam as regiões ascendente, transversa e descendente do cólon, em reator SEMH, durante todo período experimental.



B1: Período Basal 1, B2: Período Basal 2, TS: Tratamento simbiótico realizado em 4 semanas (TS1, TS2, TS3 e TS4), PT1: Pós-tratamento semana 1, PT2: Pós-tratamento semana 2, TPe1: Tratamento prebiótico semana 1, TPe2: Tratamento prebiótico semana 2, TPa1: Tratamento placebo semana 1, TPa2: Tratamento placebo semana 2, TPo1: Tratamento probiótico semana 1, TPo2: Tratamento probiótico semana 2.

Observa-se na referida figura um maior enriquecimento na população de *Lactobacillus* spp quando o tratamento é realizado com a bebida simbiótica, tanto no reator que simula o cólon ascendente quanto no que simula o cólon transverso. No cólon descendente, entretanto, nota-se que não houve diferença em relação ao período basal.

De acordo com Morzarati *et al.* (2008), uma população com Rr abaixo de 10 é considerada de baixa riqueza, já uma população com Rr entre 10 e 30 e acima de 30 são consideradas de média e alta riqueza, respectivamente. Esta última caracteriza-se como uma população típica de ambientes muito saudáveis, caracterizada por uma alta diversidade microbiana (MORZARATI *et al.*, 2008).

Desta forma, pode-se afirmar que o reator R3 proporcionou um ambiente mais saudável quando tratado com a bebida simbiótica do que os demais reatores, proporcionando uma riqueza de lactobacilos considerada bastante elevada (acima de 30), alterando a diversidade dessa população de forma positiva. O reator R4 também proporcionou um aumento na riqueza das espécies de lactobacilos, entretanto, esta contribuição foi menor do que a proporcionada pelo R3. No reator R4, a população que inicialmente era considerada de baixa riqueza, passou a ser caracterizada como uma população de média riqueza (Rr entre 10 e 30) durante o tratamento com a bebida simbiótica. Já no reator R5, não houve alteração de riqueza com a utilização da bebida simbiótica.

Estes resultados, de certa forma, eram esperados, já que de acordo com Sivieri *et al.* (2011), o pH no cólon ascendente (entre 5,6 e 5,9) favorece o crescimento de *Lactobacillus* spp, explicando, portanto, os melhores resultados, quanto a riqueza de *Lactobacillus* spp, no reator R3.

Neste estudo, nota-se que as bebidas prebiótica, probiótica e placebo não proporcionaram uma melhora na riqueza de *Lactobacillus* spp, entretanto, mais estudos são necessários para verificar a influencia dessas bebidas no enriquecimento da população de outros gêneros bacterianos, os quais não foram investigados nesta pesquisa.

Além da análise de riqueza da comunidade de *Lactobacillus* spp, foi construída também uma curva de Pareto-Lorenz, buscando uma melhor compreensão do comportamento da população microbiana estudada e sua funcionalidade perante os diferentes tratamentos. De acordo com Marzorati *et al.* (2008), a interpretação destas curvas está baseada na hipótese de que a distribuição das espécies dentro de uma determinada população microbiana relata a capacidade de otimizar e conservar sua funcionalidade, mesmo diante de condições adversas. A organização funcional (Fo) é um valor numérico utilizado para descrever a uniformidade de uma população microbiana como descrito na curva de Pareto-Lorenz (PL) (MARZORATI *et al.*, 2008).

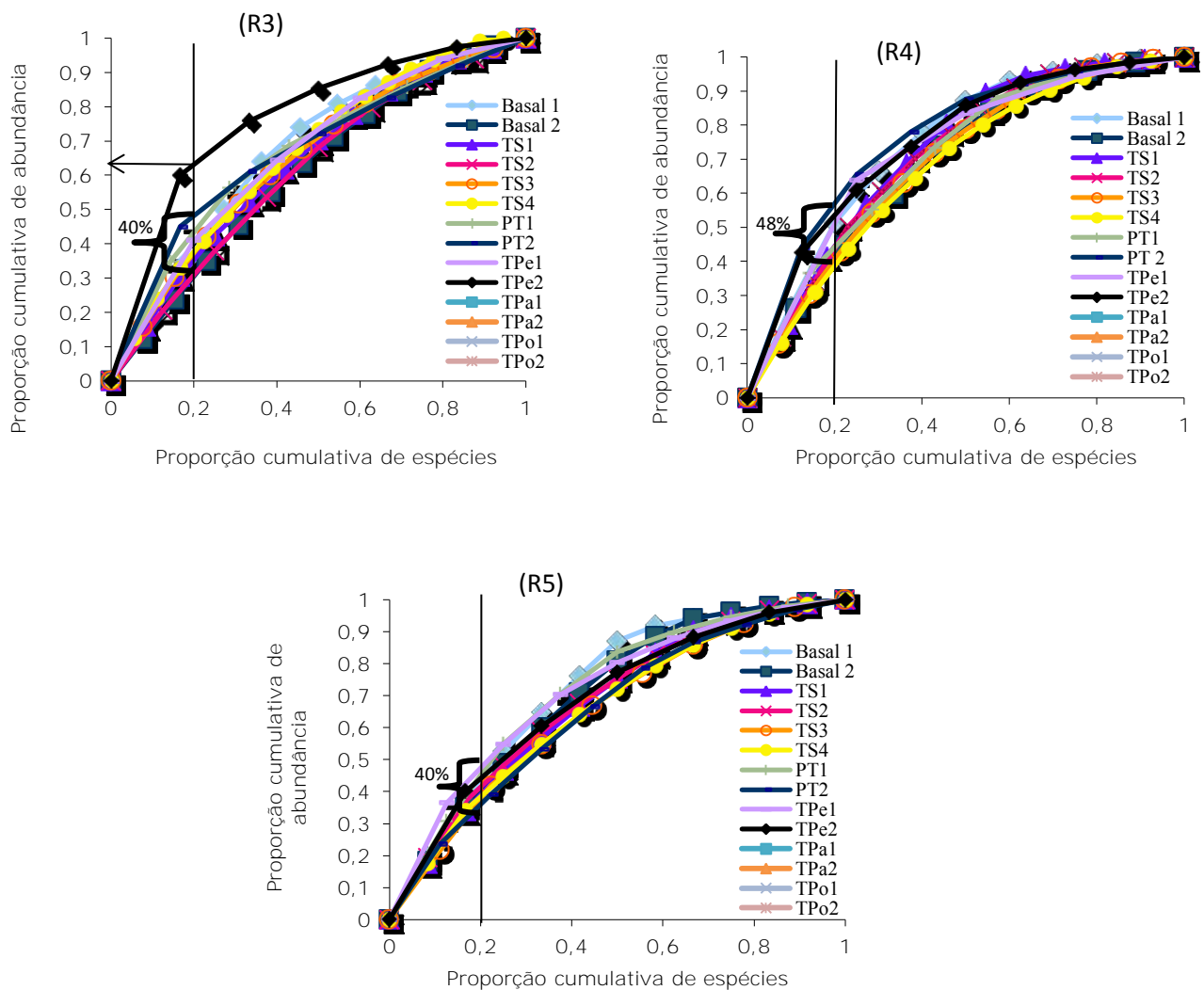
Utilizou-se como padrão de referência o ponto das abscissas de 20% (MARZORATI *et al.*, 2008; WITTEBOLLE *et al.*, 2008).

A Figura 10 mostra os resultados da funcionalidade da população de *Lactobacillus* spp durante cada tratamento em cada um dos compartimentos estudados.

Com exceção do tratamento com a bebida prebiótica na semana 2 (TPe2), no reator 3, que apresentou um ponto um pouco distante dos demais, observou-se em média um valor de coeficiente de funcionalidade de 43% entre os reatores, não havendo grandes alterações na funcionalidade de um reator para o outro e de um tratamento para o outro.

Segundo Marzorati *et al.* (2008) e Carballa *et al.* (2011), em termos ecológicos, uma curva PL ente 20-25% , representa uma comunidade de elevada uniformidade, entretanto não apresenta uma estrutura interna bem estabelecida em termos de espécies dominantes. Como não há espécies presentes em altas concentrações, pode ser necessária uma longa fase lag para combater exposições repentinas ao estresse. Desta forma, esta comunidade é comumente relatada como sendo uma comunidade de baixa organização funcional. Uma curva PL próxima de 45 a 60%, segundo estes autores, representa uma população com baixa uniformidade quando comparada a descrita anteriormente, entretanto é comumente relatada como uma população bastante balanceada, com grande potencial em lidar com alterações ambientais, preservando sua funcionalidade. Em contrapartida, uma curva PL igual ou acima de 80% representa uma comunidade especializada, na qual pequena quantidade de espécies são dominantes e todas as outras estão presentes em baixas quantidades, com grande diferença entre os dois grupos. Esta comunidade apesar de ter uma alta organização funcional, costuma ser frágil à mudanças externas em decorrência da necessidade de uma longa fase lag, assim como a primeira comunidade relatada (MARZORATI *et al.*, 2008; CARBALLA *et al.*, 2011)

**Figura 10** - Curvas de Pareto-Lorenz nos reatores R3, R4 e R5, os quais simulam as regiões ascendente, transversa e descendente do cólon, em reator SEMH, durante todo período experimental.



B1: Período Basal 1, B2: Período Basal 2, TS: Tratamento simbiótico realizado em 4 semanas (TS1, TS2, TS3 e TS4), PT1: Pós-tratamento semana 1, PT2: Pós-tratamento semana 2, TPe1: Tratamento prebiótico semana 1, TPe2: Tratamento prebiótico semana 2, TPa1: Tratamento placebo semana 1, TPa2: Tratamento placebo semana 2, TPO1: Tratamento probiótico semana 1, TPO2: Tratamento probiótico semana 2. R3: Cólon ascendente, R4: Cólon transverso, R5: Cólon descendente.

Diante disto, pode-se classificar a população de lactobacilos, das três regiões do cólon, durante os diferentes tratamentos, como comunidade balanceada, capaz de lidar com diferentes condições ambientais, mantendo sua funcionalidade. Isto indica que mesmo ocorrendo o aumento ou a diminuição de diversas espécies de *Lactobacillus* spp (comprovado tanto por microbiologia convencional por placas quanto por biologia molecular), e o aumento da

população de bifidobactérias e a redução de *Bacteróides* spp e *Clostridium* spp (microbiologia por placas) em certos momentos, de acordo com o tratamento utilizado, não ocorreu grandes alterações na organização funcional da população de *Lactobacillus* spp, indicando que ela permaneceu estável e equilibrada durante o estudo. Nota-se na figura 6, que houve uma dominância do *Lactobacillus casei* frente as outras espécies de lactobacilos no tratamento com a bebida probiótica, entretanto esta dominância não afetou o equilíbrio da população estudada em nenhum dos reatores.

Cabe ressaltar que não foi realizada análise molecular de outros gêneros de bactérias, por não estar no escopo deste trabalho, e que por tanto, não se sabe qual foi a influencia, ao nível molecular, do *Lactobacillus casei* Lc-01, em relação ao comportamento dos outros gêneros bacterianos que desempenham funções importantes na microbiota do cólon.

### **Concentração de íons amônia**

Observa-se na Tabela 6, uma redução significativa na produção de íons amônia em todos os reatores durante o período de tratamento com a bebida simbiótica, com maior intensidade no reator 3 (cólon ascendente). Estes valores continuaram baixos até a primeira semana de pós tratamento, obtendo elevado aumento, não superior aos valores do período controle, apenas na segunda semana de pós tratamento.

**Tabela 6** - Média e desvio da concentração de íons amônio (ppm) produzidos nos reatores R3, R4 e R5, os quais simulam as regiões ascendente, transversa e descendente do cólon, em SEMH, durante todo período experimental.

	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>
<b>Período basal</b>	580,91±109,71 <sup>A</sup>	614,91±60,22 <sup>A</sup>	680,58±49,38 <sup>A</sup>
<b>Tratamento Simbiótico</b>	65,30±14,05 <sup>C</sup>	311,13±25,15 <sup>B</sup>	434,41±44,43 <sup>B</sup>
<b>Pós-tratamento 1</b>	95,20±7,46 <sup>C</sup>	252,00±6,24 <sup>B</sup>	360,66±8,32 <sup>B</sup>
<b>Pós tratamento 2</b>	508,66±20,30 <sup>A</sup>	593,00±17,57 <sup>A</sup>	663,3±15,27 <sup>A</sup>
<b>Tratamento Prebiótico</b>	255,83±140,24 <sup>B</sup>	565,50±101,12 <sup>A</sup>	639,17±28,05 <sup>A</sup>
<b>Tratamento Placebo</b>	277,66±12,66 <sup>B</sup>	664,00±17,34 <sup>A</sup>	732,33±24,17 <sup>A</sup>
<b>Tratamento Probiótico</b>	332,66±0,70 <sup>B</sup>	588,33±16,50 <sup>A</sup>	693,50±46,90 <sup>A</sup>

R3: Reator 3 (cólon ascendente), R4: Reator 4 (cólon transversal), R5: Reator 5 (cólon descendente). Letras maiúsculas na mesma coluna representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes fases de tratamento.

Este resultado é considerado benéfico uma vez que a amônia pode alterar a morfologia e o metabolismo intermediário das células intestinais, aumentando a síntese de DNA e promovendo carcinogênese (ICHIKAWA; SAKATA, 1998).

Nos tratamentos com a bebida prebiótica e probiótica, houve redução significativa de íons amônia apenas no reator R3, entretanto, esta redução foi significativamente menor quando comparada à bebida simbiótica. Não houve diferença estatística entre as bebidas prebiótica, probiótica e placebo em nenhum dos 3 compartimentos, no entanto todas se diferiram estatisticamente da bebida simbiótica.

Kontula *et al.* (2002) avaliaram o efeito do prebiótico lactulose na sobrevivência do *Lactobacillus rhamnosus* em um simulador do ecossistema microbiano humano (SEM), dividindo o período de tratamento em três etapas, a primeira utilizando somente o micro-organismo, a segunda o probiótico em conjunto com o prebiótico e a terceira utilizando apenas o prebiótico. Estes autores verificaram uma leve redução na produção de amônia, apenas no reator 3, ao utilizarem o micro-organismo isolado, porém na presença do micro-organismo junto ao prebiótico, uma redução elevada na produção de amônia foi observada nos três reatores

(ascendente, transverso e descendente). Van de Wiele *et al.* (2004) avaliaram o efeito prebiótico da inulina da chicória no simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH) e também observaram redução significativa na produção de amônia porém apenas no reator R3 durante o período de tratamento. Sivieri *et al.* (2011) investigaram os efeitos do *Enterococcus faecium* CRL 183 na capacidade fermentativa da microbiota do cólon utilizando o SEMH e observaram aumento na produção de amônia em todos os reatores durante o período de tratamento. Estes autores atribuíram estes resultados à atividade de uréase presente neste micro-organismo que se utiliza deste artifício para obtenção de fonte de nitrogênio (LAUKOVÁ; KUNCOVÁ, 1991).

Uma das maneiras de se reduzir a concentração de amônia, de acordo com Fuskevag *et al.* (2012), é a utilização medicamentosa de fenilacetato. Segundo estes autores, as bactérias do gênero *Lactobacillus* sintetizam naturalmente o fenilacetato, que contribui com a redução da amônia, por meio da ligação com a glutamina, dando origem a fenilacetilglutamina, que será eliminada na urina.

Em todos os experimentos citados, incluindo os estudos conduzidos por Possemiers *et al.* (2004), nota-se que R3 e R5 apresentaram as menores e as maiores quantidades de íons amônia respectivamente, independente do período experimental. De acordo com Macfarlane *et al.* (1992), a concentração de amônia no lúmen intestinal aumenta progressivamente do cólon ascendente para o descendente, o que segundo Davila *et al.* (2013), está relacionado a maior taxa de fermentação proteica no cólon descendente comparada ao cólon ascendente. Smith e Macfarlane (1998) atribuem a menor produção de amônia do cólon ascendente em razão do baixo pH e da alta disponibilidade de carboidrato neste compartimento.

### **Análise de Ácidos graxos de Cadeia Curta (AGCC) durante as fases experimentais**

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), provenientes do subproduto da fermentação bacteriana de polissacarídeos não amiláceos no intestino grosso (VINOLO, 2010; TOPPING;

CLIFTON, 2001), constituem a principal fonte de energia para os enterócitos, além de servirem como substrato bacteriano. Estimulam ainda, o fluxo sanguíneo visceral e intensificam a absorção de sódio e água, ajudando a reduzir a carga osmótica de carboidrato acumulado (MATHAI, 2002). A produção de AGCC depende do substrato disponível e dos micro-organismos presentes no trato gastrointestinal (BEDANI; ROSSI, 2009).

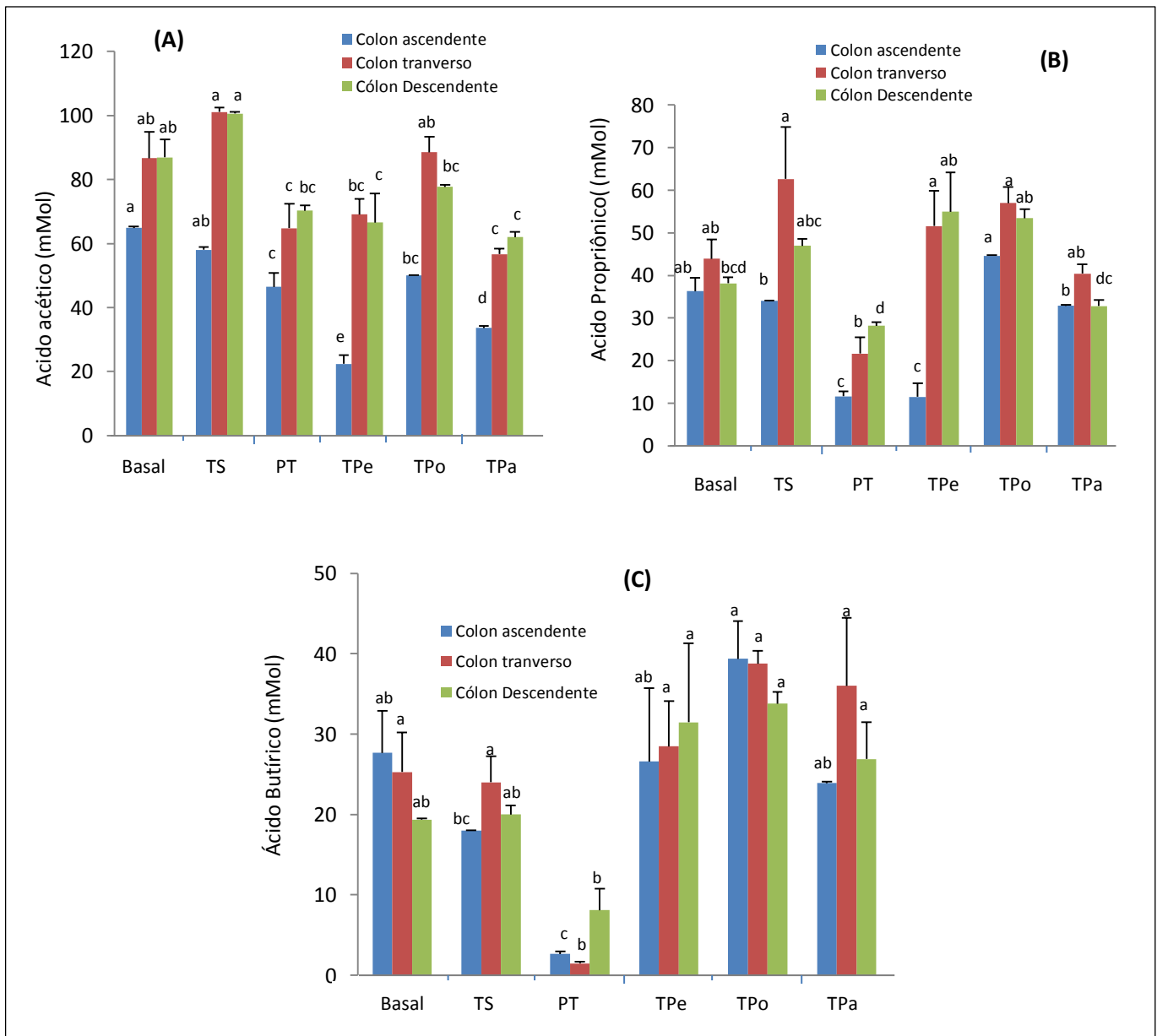
A Figura 11 representa a produção de AGCC (butirato, acetato e proprianato) nos reatores R3 (cólon ascendente), R4 (cólon transverso) e R5 (cólon descendente), nos tratamentos com as bebidas simbiótica (TS), prebiótica (TPe), probiótica (TPo) e placebo (TPa) e nos períodos basal (B) e de pós tratamento (PT).

Apesar do R3 (cólon ascendente) ter apresentado melhores resultados microbiológicos e uma maior redução na produção de íons amônia, principalmente na presença da bebida simbiótica, neste compartimento houve uma menor produção de ACCG quando comparado aos demais compartimentos do cólon, entretanto, não houve aumento significativo na produção de AGCC em nenhum dos compartimentos do cólon (ascendente, transverso e descendente) durante os tratamentos quando comparados ao período basal.

Apesar do prebiótico FOS e do probiótico *Lactobacillus casei* Lc-01 terem, em associação ou não, estimulado o crescimento de outras espécies de *Lactobacillus*, esta estimulação não foi suficiente para que ocorresse o aumento na produção de AGCC, tendo em vista também, que nos reatores simuladores do ecossistema microbiano humano, a quantidade de nutrientes é limitada. Ao mesmo tempo, o aumento de outras espécies de *Lactobacillus*, bem como de outros gêneros bacterianos como *Bifidobacterium*, provavelmente geraram o aumento de metabólitos da fermentação e de bacteriocinas, o que provavelmente contribuiu com a redução de *Clostridium* e Bacteróides. De acordo com Archer e Kirsop (1990), estes micro-organismos participam de forma intensa na formação de AGCC. Este fato, pode ser umas das

explicações para os resultados, já que houve redução de *Clostridium* em todos os compartimentos, utilizando as bebidas probiótica, prebiótica e simbiótica.

**Figura 11-** Concentração de AGCC (Mmol) produzido nos reatores R3, R4 e R5, os quais simulam as regiões ascendente, transversa e descendente do cólon, em reator SEMH, durante todo período experimental.



Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos B: período basal, TS: Tratamento simbiótico, PT: Pós-tratamento, Tpe; Tratamento com a bebida prebiótica, Tpo: Tratamento com a bebida prebiótica e Tpa: Tratamento com a bebida placebo. (A): Produção de ácido acético, (B): produção de ácido propiônico, (C): produção de ácido butírico nas três regiões do cólon.

Estudos conduzidos por Sivieri *et al.* (2011) obtiveram aumento de ácido acético, propiônico e butírico em Simulador do Ecossistema Microbiano Humano, utilizando *Enterococcus faecium* CRL 183, entretanto, observou-se aumento ou manutenção de *Clostridium* dependendo da região do colón e do período de tratamento.

Outra possível explicação seria de que os *Lactobacillus* são micro-organismos sacarolíticos e geram como produtos da fermentação, o lactato, o etanol e o succinato, que são produtos intermediários do processo global de fermentação da microbiota e, são metabolizados à AGCC por outras espécies do ecossistema, chamadas de “cross-feeding” espécies. Estes AGCC muitas vezes não acumulam no intestino, devido à pequena ou insuficiente produção (MACFARLANE; MACFARLANE, 2003). Neste sentido, se não houver condições nutricionais suficientes, estes micro-organismos não conseguem continuar seu ciclo ou o fazem de forma reduzida, diminuindo, assim, o acúmulo de AGCC.

De acordo com Topping e Clifton (2001), a concentração de AGCC são uma simples situação passageira, uma vez que a maioria dos AGCC formado durante a fermentação serão imediatamente utilizadas pelos colonócitos, ou serão imediatamente utilizados por outras bactérias intestinais. Segundo Macfarlane e Gibson (1994), a formação de AGCC no intestino depende de vários fatores. Do ponto de vista microbiológico, alguns fatores podem ser citados, tais como a composição química, física e a quantidade de substratos disponíveis, que afetam a fermentação bacteriana, que por sua vez, depende do tipo e do número de diferentes populações bacterianas do trato intestinal, bem como a interação competitiva e cooperativa entre as diferentes espécies presentes na microbiota.

No geral, pôde-se notar que os tratamentos com a bebida simbiótica (TS) e probiótica (Tpo) apresentaram, em termos absolutos, as maiores médias de AGCC, com menor intensidade no R3 e, que no pós-tratamento e no período de tratamento placebo, a produção de AGCC diminui, apesar de não ser uma queda significativa em alguns dos reatores. Isso mostra que,

apesar de não ter ocorrido diferença estatística entre os tratamentos e o período basal, a utilização das bebidas adicionadas de probiótico e/ou o prebiótico contribuiu para que não houvesse queda significativa de AGCC nos três compartimentos que simulam o cólon ascendente, transverso e descendente.

## CONCLUSÃO

A nova bebida simbiótica à base de extrato aquoso de soja e de quinoa, fermentada com *Lactobacillus casei* Lc-01 e adicionada de FOS, teve ação benéfica, sob a microbiota intestinal, confirmada por meio do SEMH. A bebida mostrou efeitos mais significativos no cólon ascendente, aumentando a população de *Lactobacillus* spp e de *Bifidobacterium* spp e reduzindo diversos gêneros considerados prejudiciais ao hospedeiro, tais como *Clostridium* spp e Bacteróides. Reduziu, ainda, de forma bastante significativa, a produção de íons amônia neste compartimento, melhorou a diversidade e enriqueceu a comunidade de *Lactobacillus* spp sem afetar sua funcionalidade. Apesar das bebidas prebiótica e probiótica apresentarem alguns bons resultados em relação à redução de íons amônia e de micro-organismos patogênicos, bem como o aumento de bactérias comensais, estes resultados não foram tão satisfatórios quanto os proporcionados pela bebida simbiótica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L. B.; BELDERRAIN, M. C. N.; SCARPEL, R. A. Tratamento multivariado de dados por análise de correspondência e análise de agrupamentos. **Anais do 13º Encontro de iniciação científica e pós-graduação do ITA- XII ENCITA**, 2007.

ANDO, H.; CHEN, YI-CHUN; TANG, H.; SHIMIZU, M.; WATANABE, K.; MITSUNAGA, T. Food Components in Fractions of Quinoa Seed. **Food Science Technology Research**, v.8, n.1, p.80-84, 2002.

ARCHER, D. B.; KIRSOP, B. H. The microbiology and control of anaerobic digestion. *In*: WHETLEY, A. (Ed.). **Anaerobic digestion: a waste treatment technology**, Michigan: Elsevier Applied Science, 1990. p.43-91.

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

BEDANI, R. ; ROSSI, E. A. . Microbiota intestinal e probióticos: implicações para o câncer de cólon. **Jornal Português de Gastreterologia**, v.16, n.1, p.19-28, 2009.

BEDANI R. **Influência do consumo de “iogurte” de soja fermentado com enterococcus faecium CRL 183 na microbiota intestinal de animais e humanos**. 2008. 140f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2008.

BEDANI, R. ; SILVEIRA, N. P. D. ; ROSELINO, M. N. ; VAALDEZ, G. F. ; ROSSI E. A. Effect of fermented soy product on the fecal microbiota of rats fed on a beef-based animal diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, n.2, p.233–238, 2010.

BRIGIDI, P; VITALI, B; SWENNEN, E; BAZZOCCHI, G; MATTEUZZI, D. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. **Research in Microbiology**. v. 152, n.8, p. 735-74, 2001.

CARBALLA, M.; SMITS, M.; ETCHEBEHERE, C.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Correlations between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic reactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89, n.2, p.303–314, 2011.

CARNICER, T. R.; PIÑA, I. D.; MAYANS, R. E.; COMAS, B. R. Intake of fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114 001 and its effect on gut flora. **Anales de Pediatría**. v.65, n.5, p.448-53, 2006.

CARVALHO, I. I. R. **Análise da diversidade da microbiota fecal de crianças de zero a doze meses de idade usando o método de eletroforese em gel com gradiente desnaturante**. São Paulo- SP, USP, 2012. 104 p. Tese (doutorado em análises clínicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, 2012.

DAVILA, A-M.; BLACHIERA, F.; GOTTELAND, M.; MIREILLE ANDRIAMIHAJA, M.; BENETTIA, P-H.; SANZC, Y.; TOMÉ, D. Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. **Pharmacological Research**, v.68, n.1, p.95-107, 2013.

EDLUND, C.; BEYER, G.; HIEMER-BAU, M.; ZIEGE, S.; LODE, H.; NORD, C. E. Comparative effects of mixifloxacin and clarithromycin on normal intestinal microflora. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.32, n.1, p.81-85, 2000.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. **British Journal of Nutrition**, v.88, n.1, p.39–49, 2002.

- FRICK, J. S.; AUTENRIETH, I. B. The gut microflora and its variety of roles in health and disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.358, n.1, p.273-289, 2013.
- FUSKEVAG, O.; BROSKER, M.; DAVIES, A.; CUDMORE, N.; HODGES, T.; GRIFFIN, T. MURRAY. *Lactobacillus casei* Shirota modulation of Ammonia Metabolism in Physical Exercise. **International Journal of Probiotics & Prebiotics**, v.7, n.1, p.121-125, 2012.
- GILLILAND, S. E. Importance of bile tolerance in lactobacilli used as dietary adjunct. *In*: LYONS, T.P. (Ed.), **Biotechnology in the Feed Industry**. Lexington: Alltech Feed Co, 1987. p.149–155
- GOMES, A. S.; FERREIRA, S. P. **Análise de Dados Ecológicos**. Universidade Federal Fluminense Instituto de Biologia Centro de Estudos Gerais Departamento de Biologia Marinha. Niterói, 2004. Disponível em: < [www.uff.br/ecosed/apostila.pdf](http://www.uff.br/ecosed/apostila.pdf) > Acesso em: 28 jun. 2013.
- GUERGOLETTI, K. B.; MAGNANI, M.; JUCA SAN MARTIN, J. S.; ANDRADE, C. G. T., GARCIA, S. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers, **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, n.2, p.415–421, 2010.
- GUO, Z.; WANG, J.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X.; ZHANG, H. *In vitro* comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. **Food Science and Technology**, v.42, n.10, p.1640-1646, 2009.
- HANDWERGER, S.; SKOBLE, J. Identification of chromosomal mobile element conferring highlevel vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.11, p.2446-53, 1995.
- HAULY, M. C. O.; FUCHS, R. H. B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S. H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Revista de Nutrição**, v.18, n.5, p.613-622, 2005.
- HEILIG, H. G. H. J.; ZOETENDAL, E. G.; VAUGHAN, E. E.; MARTEAU, P.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.1, p.114–123, 2002.
- ICHIKAWA, H.; SAKATA, T. Stimulation of epithelial cell proliferation of isolated distal colon of rats by continuous colonic infusion of ammonia or short-chain fatty acids is nonadditive. **Journal of Nutrition**, v.128, n.5, p.843–847, 1998.
- ITSARANUWAT, P.; AL-HADDAD, K.; ROBINSON, R. K. The potential therapeutic benefits of consuming ‘health-promoting’ fermented dairy products: A brief update. **International Journal of Dairy Technology**, v.56, n.4, p. 203–210, 2003.
- KONTULA, P.; NOLLET, L.; SAARELA, M.; VILPPONEN-SALMELA, T.; VERSTRAETE, W.; MATTILA-SANDHOLM, T.; WRIGHT, A. V. The Effect of Lactulose on the Survival of *Lactobacillus rhamnosus* in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) and *in vivo*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.14, n.2, p.90–96, 2002.

KURMANN, J. A.; RASIC, J. L. The health potential of products containing bifidobacteria. In: Robinson, R.K. (Ed.), **Therapeutic properties of fermented milks**. London: Elsevier, 1991. p. 117–158

LAUKOVÁ, A.; KUNCOVÁ, M. Lactic acid production and urease activity in strains of *Enterococcus faecium* found in the rumen and their genetic stability. **Veterinary Medical**, v.36, n.6, p.335-340, 1991.

LIVINGSTON, S. J.; KOMINOS, S. D.; YEE, R. B. New medium for selection and presumptive identification of *Bacteroides fragilis* group. **Journal of Clinical Microbiology**, v.7, n.5, p.448-453, 1978.

LORENZ, M. O. Methods of measuring concentration of wealth. **Journal of American Statistical Association**, v.9, n.70, p.209–219, 1905.

MACFARLANE, G. T.; GIBSON, G. R.; CUMMINGS, J. H. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, n.1, p.57–64, 1992.

MACFARLANE, G. T.; GIBSON, G. R. Metabolic activities of the normal colonic flora. In: GIBSON, S. (Ed.). **Human Health: The Contribution of Microorganisms**. London: Springer, 1994. p.17–52 .

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T. Regulation of short-chain fatty acid production. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.62, n.1, p.67–72, 2003.

MARTEAU P. L'importance clinique du microbiote intestinal The clinical importance of intestinal microbiota. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v.34, n.1, p.99-103, 2010.

MARZOTTO, M.; MAFFEIS, C.; PATERNOSTER, T.; FERRARIO, R.; RIZZOTTI, L.; PELLEGRINO, M.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. *Lactobacillus paracasei* A survives gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of healthy infants. **Research in Microbiology**, v.157, n.9, p. 857-866, 2006.

MARZORATI, M.; WITTEBOLLE, L.; BOON, N.; DAFFONCHIO, D.; VERSTRAETE, W. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools fo Environmental Microbiology. **Environmental Microbiology**, v.10, n.6, p.1571–1581, 2008.

MARZORATI, M., VERHELST, A.; LUTA, G.; SINNOTT, R.; VERSTRAETE, W.; VAN DE WIELE, T.; POSSEMIERS, S. In vitro modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements. **International Journal of Food Microbiology**, v.139, n.3, p.168–176, 2010.

MATHAI, K. Nutrição na idade adulta. In: MAHAN, N.K. (Ed.). **Krause – Alimentos Nutrição e Dietoterapia**. 10 ed. São Paulo: Roca, 2002. p.261-275.

MERTENS, B.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Stereospecific effect of hexachlorocyclohexane on activity and structure of soil methanotrophic communities. **Environmental Microbiology**, v.7, n.5, p. 660–669, 2005.

MILLS, S.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. **Microbial Cell Factories**, v.10, n.1, p.1-19, 2011.

MINEKUS, M.; SMEETS-PEETERS, M.; BERNALIER, A.; MAROL-BONNIN, S.; HAVENAAR, R.; MARTEAU, P.; ALRIC, M.; FONTY, J.; VELD, J. A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, n.1, p.108–114, 1999.

MISHRA, V.; PRASAD, D.N. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, n.1, p.109–115, 2005.

MITRE, P. A. G. **Propriedades terapêuticas de *bifidobacterium spp.* utilizadas na produção de derivados lácteos**. 2009. Monografia (Especialização em Microbiologia)- Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2009.

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

MOLLY, K.; VANDEWOESTYNE, M.; DESMET, I.; VERSTRAETE, W. Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganism associated activities. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.7, n. 4, p. 191–200, 1994.

MONTESI, A.; GARCIA-ALBIACH, R.; POZUELO, M.J.; PINTADO, C.; GONI, I.; ROTGER R. Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.98, n.3, p.281-289, 2005.

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

PARETO, V. **Le cours d'économie politique**. London: Macmillan, 1897. 589 p.

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

PAYNE, A. N.; ZIHLER, A.; CHASSARD, C.; LACROIX, C. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. **Trends in Biotechnology**, v.30, n.1, p.17-25, 2011.

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

POZZA, M. S. S.; MIGLIORANZA, L. H. S.; GARCIA, J. E.; GARCIA, S.; POZZA, P. C. Human gastrointestinal tract resistance of *Lactobacillus* strains isolated from infant faeces. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.3, p.1021-1032, 2011.

QIAGEN. **QIAamp® DNA Stool Handbook**. 2 ed. Disponível em: <www.qiagen.com>. Acesso em: 2 jul. 2013.

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

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

ROSSI, E. A.; REDDY, K. V.; SILVA, R. S. S. F. Formulation of soy-whey yogurt, using response surface methodology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.27, n.3, p.387-390, 1984.

ROSSI, E. A.; VENDRAMINE, R. C.; CARLOS, I. Z.; PEI, Y. C.; VALDEZ, G. F. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties, **European Food Research Technology**, v.209, n.5, p.305-307, 1999.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MATTO, J; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, n.3, p.197–215, 2000.

SANDERS, M. E., KLAENHAMMER, T. R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.2, p. 319-331, 2001.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v.17, n.5, p.915–919, 1994.

SANTOS, C. D. M. **Staphylococcus sp e enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia-MG**: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Uberlândia- MG, UFU, 2006, 69 p. Dissertação (mestrado em Ciências veterinárias – Área de Produção animal). Universidade Federal de Uberlândia, 2006.

SENOK, A. C.; ISMAEEL, A. Y.; BOTTA, G. A. Probiotics: facts and myths. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, n.12, p.958-966, 2005.

SILVA, A. M; BARBOSA, F. H.; DUARTE, R.; VIEIRA, L. Q.; ARANTES, R. M.; NICOLI, J. R. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, n.1, p.29-37, 2004.

SIVIERI, K. ; BIANCHI, F ; ROSSI, E.A. Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183. **Functional Foods in Health and Disease**, v.10, n.1, p.389-402, 2011.

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

SMITH, E. A.; MACFARLANE, G. T. Enumeration of amino acid fermenting bacteria in the human large intestine: effects of pH and starch on peptide metabolism and dissimilation of amino acids. **FEMS Microbiology Ecology**, v.25, n.4, p.355–368, 1998.

TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiological Reviews**, v.81, n.3, p.1031-1064. 2001.

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

VAN DE WIELE, T.; BOON, N.; POSSEMIERS, S.; JACOBS, H.; VERSTRAETE, W. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, n.2, p.452–460, 2007.

VEGA-GÁLVEZ, A.; MIRANDA, M.; VERGARA, J.; URIBE, E.; PUENTE, I.; MARTÍNEZ, E.A. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient andean grain: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, n.15, p.2541-2547, 2010.

VINOLO, M. A. R. **Efeito dos ácidos graxos de cadeia curta sobre neutrófilos**. São Paulo – SP, USP, 2010. 40 p. Tese (doutorado em Ciências- Fisiologia humana) Universidade de São Paulo –USP, 2010.

WHO/FAO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Geneva: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2001.

WITTEBOLLE, L.; VERVAEREN, H.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.1, p.286-293, 2008.

WOLTMANN, A.; GANGLOFF, S. C.; BRUCH, H. Y. P.; RIETSCHER, E. T.; WERNER, S.; SILVER, J.; GOYERT, S. M. Reduced bacterial dissemination and liver injury in CD14-deficient mice following a chronic abscess-forming peritonitis induced by *Bacteroides fragilis*. **Medical Microbiology and Immunology**, v.187, n.3, p.149-146, 1999.

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

XANTHOPOULOS, V.; LITOPOULOU-TANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. **Food Microbiology**, v.17, n.2, p.205-215, 2000.

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

## ***CAPÍTULO IV***

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento e finalização deste trabalho permitiu o estabelecimento de algumas conclusões, tais como:

- A bebida elaborada com extrato de quinoa e soja, proporcionou alguns bons resultados como a redução no tempo de fermentação das bebidas, aumento de viscosidade, redução na perda de estrutura do produto além de uma bebida adequada em relação à composição centesimal;
- É viável a utilização da cepa de *Lactobacillus casei* Lc-01, principalmente em associação ao prebiótico (FOS), tendo em vista a elevada viabilidade do micro-organismo no produto, durante 28 dias de armazenamento, bem como sua resistência à passagem pelo estômago e duodeno, afetando a população de *Lactobacillus* spp do cólon (principalmente do cólon ascendente) de forma benéfica;
- A bebida simbiótica avaliada (com 30% de extrato de quinoa-70% extrato de soja) teve ação benéfica comprovada em Simulador do Ecosistema Microbiano Humano sob a microbiota do cólon, principalmente no cólon ascendente, reduzindo íons amônia e melhorando a constituição microbiana do cólon, sendo por tanto, indicada ao consumo humano.

Alguns resultados referentes à primeira e a segunda etapa do projeto mostrou que mais estudos seriam interessantes para esclarecer alguns pontos da pesquisa. Aponta-se, por tanto, algumas perspectivas futuras de estudo, tais como:

- Teste de associação do *Lactobacillus casei* à outras culturas, para verificação de redução no tempo de fermentação e melhora nas características sensoriais do produto;

- Adição de polpa e/ou aromatizantes ao produto, considerado o melhor dentre as 5 formulações, com a finalidade de melhorar as características sensoriais da bebida fermentado com extratos aquosos de soja e quinoa.
- Realização de análise molecular (PCR-DGGE) de outros gêneros de bactérias, tais como *Clostridium*, *Bifidobacterium*, bem como de bactérias totais, com o intuito de verificar a influência da bebidas simbiótica, probiótica, prebiótica e placebo sob o ecossistema microbiano intestinal;
- Realização a análise da produção de ácido lático e outros metabólitos microbianos para comprovar a hipótese de redução de *Clostridium* e a produção não acumulada de AGCC.