

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

UNESP

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus Araraquara

Thaís Fávaro Bucci

**Avaliação da Adição de Inulina sobre a Microbiota Intestinal residente em
Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH)**

Araraquara

2016

Thaís Fávaro Bucci

**Avaliação da Adição de Inulina sobre a Microbiota Intestinal residente em
Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH)**

TCC apresentado ao curso de Farmácia-
Bioquímica como pré-requisito para obtenção
do grau de Farmacêutica-Bioquímica pela
Universidade Estadual Paulista “UNESP”

Prof. Dr. João Bosco Faria - Orientador

Profa. Dra. Katia Sivieri – Coorientadora

Araraquara

2016

Dedicatória

Dedico este trabalho de conclusão de curso aos meus pais, Luís Alberto e Marilene, os quais sempre me deram todo suporte para realizar a faculdade e sempre me mostraram a importância de estudar.

Dedico também ao Departamento de Alimentos e Nutrição, em especial à minha coorientadora, Profa. Dra. Katia Sivieri, a qual atenciosamente se dedicou a me ensinar e ajudar, permitindo a conclusão deste projeto. Não poderia esquecer das técnicas do laboratório, Roseli e Josiane, que me auxiliaram o tempo todo me ensinando a utilizar equipamentos e boas práticas de laboratório. Além delas, todas as mestrandas e doutorandas do laboratório que sempre se mostraram dispostas a esclarecer minhas dúvidas e me ajudarem a realizar as análises.

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) de Araraquara pelo suporte durante todos os anos de faculdade.

Agradeço também aos verdadeiros amigos de turma que fiz durante esses anos marcados pelo companheirismo. Agradeço também à minha república, a qual se tornou meu porto seguro de Araraquara, composta de amigas que se tornaram irmãs de consideração sempre compreensivas e incentivadoras.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para a conclusão do meu curso.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Imagem do Simulador computadorizado do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH) sediado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP. 15
- Figura 2.** Esquema representando o protocolo experimental. 16
- Figura 3.** 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 1 (equivalente a 5 g de inulina/dia). 27
- Figura 4.** 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 1 (equivalente a 2,5 g de inulina/dia). 27

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores de volume, tempo de residência e pH estabelecidos em cada um dos reatores do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH)	14
Tabela 2. Composição do meio alimentar basal dissolvidos em água destilada	15
Tabela 3. 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, transverso e descendente durante todo período experimental 1 (equivalente a 5 g de inulina/dia).....	22
Tabela 4. 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, transverso e descendente durante todo período experimental 2 (equivalente a 2,5 g de inulina/dia).....	23
Tabela 5. Atividade metabólica de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): acético, propiônico e butírico nas diferentes regiões simuladas do cólon como resultado do tratamento 1 (equivalente a 5 gramas de inulina/dia).....	25
Tabela 6. Atividade metabólica de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): acético, propiônico e butírico nas diferentes regiões simuladas do cólon como resultado do tratamento 2 (equivalente a 2,5 gramas de inulina/dia).....	26

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	8
1.1	Microbiota Intestinal.....	8
1.2	Prebióticos.....	9
1.3	Modelos de Simuladores Intestinais.....	10
2	DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1	Objetivos Gerais.....	13
2.1.1	Objetivos específicos.....	13
2.2	Materiais e Métodos.....	13
2.2.1	Simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH).....	13
2.2.2	Protocolo Experimental.....	16
2.2.3	Análises microbiológicas.....	17
2.2.4	Análise de íons amônio.....	17
2.2.5	Análise de ácidos graxos de cadeia curta.....	18
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
3.1	Análise Microbiológica.....	19
3.2	Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC).....	24
3.3	Íons Amônio (NH_4^+).....	26
4	CONCLUSÃO.....	28
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

Resumo

Durante a última década, o interesse por alimentos nutritivos e funcionais aumentou exponencialmente, tanto pelos consumidores quanto pelas indústrias alimentícias. Dessa forma, pesquisas com ingredientes prebióticos, os quais comprovem os efeitos benéficos para a saúde tem se tornado essenciais. O objetivo deste trabalho consiste em avaliar a ação da ingestão de inulina sob a microbiota intestinal por meio de sistema dinâmico *in vitro* - Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH). Foram realizados dois experimentos no SEMH, sendo um com 2,5 g de inulina/dia (Tratamento 1) e outro com adição de 1,25 g de inulina/dia (Tratamento 2). Nos dois experimentos, a inulina entrou uma vez ao dia, durante duas semanas no SEMH, onde as condições de pH, tempo de residência e temperatura foram controladas e semelhantes ao trato gastrointestinal humano. A análise da composição da microbiota intestinal foi baseada na enumeração de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., Anaeróbios totais, Anaeróbios facultativos, *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp. e Enterobactérias. A produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi verificada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a produção de íons de amônio por medidor de íon seletivo. Durante o período de tratamento 1, um aumento significativo nas populações de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. foi observado, bem como um crescimento de *Clostridium* spp. A análise mostrou um aumento de AGCC expressiva na produção de acetato, propionato e butirato em todos os segmentos do cólon ($p < 0,01$). Além disso, as concentrações de amônio diminuíram ($p < 0,05$) durante o mesmo período na maioria dos compartimentos. Já os resultados do tratamento 2 apontaram um leve aumento nas populações de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. e na de *Clostridium* spp. Os AGCC que mais apresentaram aumento foram propionato e butirato e houve um pequeno aumento dos íons de amônio em todos os compartimentos. Este estudo suporta pesquisas sobre os efeitos benéficos da inulina na microbiota e, além disso, mostra a eficácia da utilização de métodos *in vitro* que simulam a região do cólon para avaliar alterações na microbiota.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microbiota Intestinal

Cada indivíduo apresenta uma microbiota intestinal única, a qual é formada por um grande número de espécies, variando conforme as regiões do cólon (ROBLES-ALONSO e GUARNER, 2013). O estômago e o duodeno apresentam uma baixa concentração (até 10^3 UFC/mL) devido ao baixo pH (PAYNE et al., 2011), o jejuno e o íleo apresentam uma concentração um pouco maior (10^4 – 10^8 UFC/mL), porém devido a rápida passagem do alimento e a secreção de bile e de suco pancreático, o crescimento é limitado. O cólon apresenta a maior concentração de micro-organismos do trato (até 10^{14} UFC/mL) devido às condições favoráveis de crescimento, como tempo de retenção do alimento no cólon, disponibilidade de nutrientes e pH favorável (MONTALTO et al., 2009).

As diferenças encontradas na microbiota intestinal de cada indivíduo podem ser consequências de variações na dieta, idade, condições patológicas (como infecções entéricas), uso de antibióticos, tratamento anti-ácido ou imunossupressão (ROBLES-ALONSO e GUARNER, 2013).

A microbiota intestinal apresenta cerca de 800 espécies diferentes de bactérias, sendo que os principais gêneros de bactérias anaeróbias são *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Clostridium* spp. e *Lactobacillus* spp., enquanto as principais bactérias aeróbias Gram-negativa são *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. e as Gram-positiva, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Além disso, há presença de espécies fúngicas, como *Candida albicans* (MONTALTO et al., 2009).

Logo após o nascimento do indivíduo, tem início a colonização bacteriana do intestino, que apresenta uma composição relativamente simples até a infância, com baixa diversidade, tornando-se mais complexa com o avanço da idade (MONTALTO et al., 2009). A colonização bacteriana logo após o nascimento é essencial para a resposta de defesa do organismo, pois permite o desenvolvimento de tolerância imunológica a uma variedade de antígenos, o que resulta na diminuição de processos alérgicos e inflamatórios (MATAMOROS et al., 2013).

Apesar de a microbiota intestinal ser de grande importância, muitas vezes sua relação com o corpo humano, por falta de conhecimento, é descrita como comensalismo (em que apenas uma parte se beneficia e a outra não é afetada positiva e nem negativamente), ao invés de ser conhecida como mutualismo (em que as duas partes se beneficiam). A relação de mutualismo pode ser explicada devido suas funções biológicas, como homeostase e proteção contra agentes patogênicos, além disso, a microbiota está envolvida em reações metabólicas, como fermentação de fibras obtidas pela dieta que não são digestíveis, biotransformação de ácidos biliares conjugados, degradação de complexos à base de oxalato e síntese de algumas vitaminas, como B₁₂ e K. A microbiota intestinal também apresenta efeitos no epitélio intestinal desenvolvendo um papel essencial na maturação das respostas imune inata e adaptativa do hospedeiro (MONTALTO et al., 2009).

A homeostase da microbiota intestinal é o resultado das interações do hospedeiro com as bactérias e das interações entre bactérias. Este equilíbrio pode ser alterado através de atividades metabólicas bacterianas, como produção de ácidos graxos de cadeia curta, modificação de potencial redox e síntese de bacteriocinas. Portanto, essas atividades podem alterar o ecossistema intestinal, fazendo com que o ambiente fique apropriado para algumas bactérias e hostil para outras (BISCHOFF, 2011).

1.2 Prebióticos

Prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que afetam positivamente a saúde indivíduo, estimulando seletivamente o crescimento e/ou a atividade de bactérias saudáveis para o cólon (VAN de WIELE et al., 2004). Os prebióticos devem resistir à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas e à absorção gastrointestinal, para que grande parte do alimento chegue ao cólon intacto. O alimento é fermentado pela microbiota intestinal residente, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade metabólica das bactérias intestinais associadas à saúde e bem estar (GIBSON e RASTALL, 2006).

Vários ingredientes alimentares atendem a esses requerimentos, os oligossacarídeos, tais como fruto-oligossacarídeo (FOS) e a inulina (VAN de WIELE et al., 2004).

A inulina e o FOS são carboidratos compostos por uma mistura de oligossacarídeos ou de oligossacarídeos com polissacarídeos. A inulina é completamente hidrolisada e fermentado pela microbiota intestinal no cólon, levando a produção de gases (H_2 , CO_2 e CH_4) e de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o acetato, propionato e butirato (GIBSON e RASTALL, 2006). A inulina está presente como reserva de carboidrato com a função de armazenar energia, em plantas como a chicória, alcachofra, dália e batata yacon (CHI et al., 2011).

Inulina e o FOS podem influenciar no processo de digestão durante sua passagem no trato intestinal superior, modificando respostas metabólicas, como digestão de dissacarídeos, transporte de glicose, e absorção de leucina, prolina e glicil-sarcosina (GIBSON e RASTALL, 2006).

Foi observado em modelos experimentais e confirmado em experimentos com dieta humana, que a ingestão de inulina pode estimular o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos, suprimir o de patógenos e melhorar o funcionamento do intestino (como o volume de fezes, frequência que as fezes são eliminadas, redução de infecções e de stress inflamatório) (GIBSON e RASTALL, 2006). Além disso, outras funções fisiológicas são melhoradas em consequência da alteração da composição e atividade metabólica do cólon. Pode ser observado um aumento na absorção de minerais vindos da dieta, principalmente aqueles relacionados à força da estrutura óssea; à modulação do sistema imune, resultando em maior resistência à infecção e redução do risco de câncer intestinal, assim como de outros tipos de câncer sistêmicos (GIBSON e RASTALL, 2006). Também, foi verificado que efeitos benéficos na homeostase energética, regulação da saciedade e ganho de peso corporal demonstraram que a composição da microbiota intestinal (especialmente o número de bifidobactérias) pode contribuir à regulação de processos metabólicos associados especialmente a obesidade e diabetes tipo 2 (ROBERFROID et al., 2010).

Para se obter um efeito prebiótico, a quantidade média recomendada de ingestão de inulina é de 1 a 5 g/dia (VAN de WIELE et al., 2004).

1.3 Modelos de Simuladores Intestinais

Experimentos utilizando modelos animais e ensaios clínicos são indicados para avaliar os efeitos de prebióticos, pois é possível verificar parâmetros fisiológicos e interações com todo o organismo, porém apresentam um custo elevado e consomem

bastante tempo, além de, no caso de humanos, apenas analisarem a microbiota das fezes, o que não representa a composição microbiota de diversas partes do intestino (VAN de WIELE et al., 2004).

Experimentos *in vitro*, realizados em sistemas que simulam as regiões proximal e distal do cólon, como o SEMH (Simulador do Ecossistema Microbiano Humano) são considerados muito úteis para o estudo da microbiota intestinal humana, pois propiciam resultados reprodutivos e permitem estudos com diversos parâmetros sob controle. Sendo assim, métodos de estudo *in vitro* são válidos para o estudo da influência de prebióticos na população da microbiota intestinal, considerando a atividade de fermentação e a estrutura da comunidade no cólon ascendente, transversal e descendente (VAN de WIELE et al., 2004).

Existem vários modelos de fermentação *in vitro* (estáticos ou dinâmicos), que apresentam uma tecnologia inovadora. Os modelos de fermentação colônica são caracterizados pela inoculação de microbiota fecal em reatores individuais ou múltiplos e funcionam em temperatura fisiológica (aproximadamente 37 °C), sob condições anaeróbicas e controle do pH (PAYNE et al., 2011). Nestes modelos são utilizadas diferentes técnicas de inoculação fecal. Esses modelos são aptos a estabilizar o cultivo da microbiota intestinal por um tempo definido e para a seleção do modelo deve-se levar em consideração o objetivo do estudo, suas vantagens e limitações (PAYNE et al., 2011).

Os modelos estáticos descrevem o crescimento de uma suspensão bacteriana pura ou mista em um meio selecionado sem a adição de nutrientes. São modelos fechados com reatores contendo suspensão de material fecal, que é mantida em condições anaeróbicas. Podem ser usados para verificar a ação da inulina como prebiótico e da produção de ácidos graxos de cadeia curta a partir do metabolismo dos componentes da dieta, uma vez que se trata de um sistema conveniente e não apresenta um alto custo, além de ser possível testar amostras de fezes rapidamente. O crescimento microbiano depende da densidade da inoculação e da taxa de decaimento do substrato. Sistemas que utilizam inoculação com células de baixa densidade apresentam uma curva de crescimento que vai caindo ao longo do tempo devido ao acúmulo de produtos tóxicos. Ao contrário, quando utilizadas células de alta densidade, apresenta um crescimento limitado no cólon. Para a verificação da evolução da microbiota intestinal e as modulações do seu metabolismo, é preciso o

reabastecimento contínuo do substrato, pois sua diminuição faz com que o experimento dure muitas horas, além de não garantir as condições ideais de um sistema *in vitro* (PAYNE et al., 2011).

Já os modelos contínuos são sistemas que podem apresentar um único ou vários estágios e são utilizados para estudos de longo prazo, uma vez que a reposição de substrato e a remoção de produtos tóxicos são facilitados. Esses modelos são usados normalmente para verificar a função do cólon proximal e da atividade metabólica da digestão que ocorre no ceco e no cólon ascendente. Os modelos contínuos reproduzem propriedades espacial, temporal, nutricional e química da microbiota através da simulação de três compartimentos: Reator 1 (R1 - cólon proximal / ascendente), Reator 2 (R2 - cólon transversal) e Reator 3 (R3 - cólon descendente). A maior diferença entre os modelos contínuos existentes é a técnica usada na inoculação fecal. A maioria dos sistemas utiliza uma suspensão de líquido fecal como inóculo (PAYNE et al., 2011).

Experimentos com modelos dinâmicos podem avaliar dietas com um único ou vários componentes, observando seus impactos nas populações da microbiota intestinal e consequentemente, mudanças no metabolismo, como funções da própria dieta e estudos de sobrevivência sobre as interações de patógenos comensais. Outros tipos de aplicação incluem estudos, que são restritos *in vivo*, sobre substâncias potencialmente letais, como biotransformação de drogas ou de compostos tóxicos e o impacto da radioatividade na microbiota intestinal. Apesar de serem bem aceitos, esses modelos não simulam os mecanismos de resposta imune e nem as interações fisiológicas da microbiota com o hospedeiro (PAYNE et al., 2011).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a influência da inulina sobre a microbiota intestinal utilizando o simulador do ecossistema microbiano humano.

2.1.1 Objetivos específicos

- o Avaliar a influência de diferentes concentrações de inulina na estimulação do crescimento de bactérias comensais e patogênicas,
- o Avaliar o efeito da administração de inulina sobre a produção de ácidos graxos de cadeia curta,
- o Avaliar o efeito da administração de inulina sobre a produção de íons amônio.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH)

O simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH) consiste em uma sucessão de cinco reatores conectados que representam as diferentes partes do trato gastrointestinal humano com seus respectivos valores de pH, tempo de residência e capacidade volumétrica (Tabela 1), com um total de retenção de 76h nos três últimos compartimentos. Os cinco reatores foram continuamente agitados magneticamente e mantidos a temperatura de 37°C por meio de um termostato. O meio foi mantido em anaerobiose, pela injeção diária de N₂ durante 30 minutos. O pH adequado de cada porção do trato foi automaticamente controlado pela adição de NaOH 1N ou HCL concentrado (POSSEMIERS et al., 2004; MOLLY et al., 1994).

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

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

Reator	Volume (ml)	Tempo de residência (h)	pH
R1: Estômago	200	2,5	2,0
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)

No início do experimento, os reatores que simulam os cólons ascendente, transverso e descendente foram inoculados com amostras de fezes de um voluntário adulto não produtor de gás metano (<3 ppm) e que não utilizou antibióticos nos últimos 2 anos. A preparação do inóculo de fezes foi realizada de acordo com Possemiers *et al.* (2004). Foram coletadas 20g de fezes e diluídas dez vezes com tampão fosfato contendo 0,05 mol/l de Na_2HPO_4 , 0,05 mol/l de NaH_2PO_4 e 0,1% de Na-thioglicolato (pH=6,5). Posteriormente, agitada em homogeneizador de amostras por 10 min, a amostra diluída foi centrifugadas por 5min a 3000 rpm. Do sobrenadante, 40 mL foram adicionados aos reatores R3, R4 e R5.

O inóculo foi estabilizado durante duas semanas em um meio à base de carboidratos (Tabela 2), previamente descrito por Payne *et al.* (2003), de modo a permitir a adaptação da comunidade microbiana às condições específicas de cada reator que simula as diferentes regiões do cólon.



Figura 1. Imagem do Simulador computadorizado do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH) sediado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP.

Tabela 2 Composição do meio alimentar basal dissolvido em água destilada

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

Fonte: PAYNE *et al.* (2003)

2.2.2 Protocolo Experimental

Após o período de 2 semanas de estabilização da microbiota (período controle), foram iniciados os períodos de tratamento 1 e 2 separadamente. Nestes períodos foram adicionados no sistema 200 mL de meio à base de carboidratos duas vezes ao dia e 2,5g inulina/ dia para o experimento 1, equivalente à ingestão de 5 gramas inulina/ dia em humanos e 1,25g inulina/ dia para o experimento 2, equivalente a 2,5 gramas inulina/ dia em humanos, durante duas semanas. A concentração de inulina que é aplicada no SEMH equivale à metade que seria ingerida por humanos, devido a capacidade volumétrica do SEMH representar a metade da capacidade volumétrica real. A inulina foi ingerida através de uma solução feita com água destilada. Para o primeiro experimento, 5 gramas de inulina em pó foram diluídos em 10 mL de água e foram colocados 5 mL dessa solução no Reator 3. Para o experimento 2, foram adicionados 2,5 gramas de inulina em 10 mL e utilizados 5 mL dessa solução igualmente no Reator 3. Essas duas concentrações foram escolhidas para o estudo, uma vez que a quantidade média recomendada de ingestão de inulina para se obter o efeito prebiótico é de 1 a 5 g/ dia (VAN de WIELE et al., 2004), o objetivo foi comparar os resultados das duas concentrações afim de saber se há diferença quando se ingere a maior quantidade recomendada de inulina. Após o período de tratamento com inulina foi realizado um período pós tratamento durante duas semanas, onde apenas o meio à base de carboidratos foi adicionado no sistema (200 mL/ três vezes ao dia). A figura 2 esquematiza o protocolo experimental utilizado no SEMH.

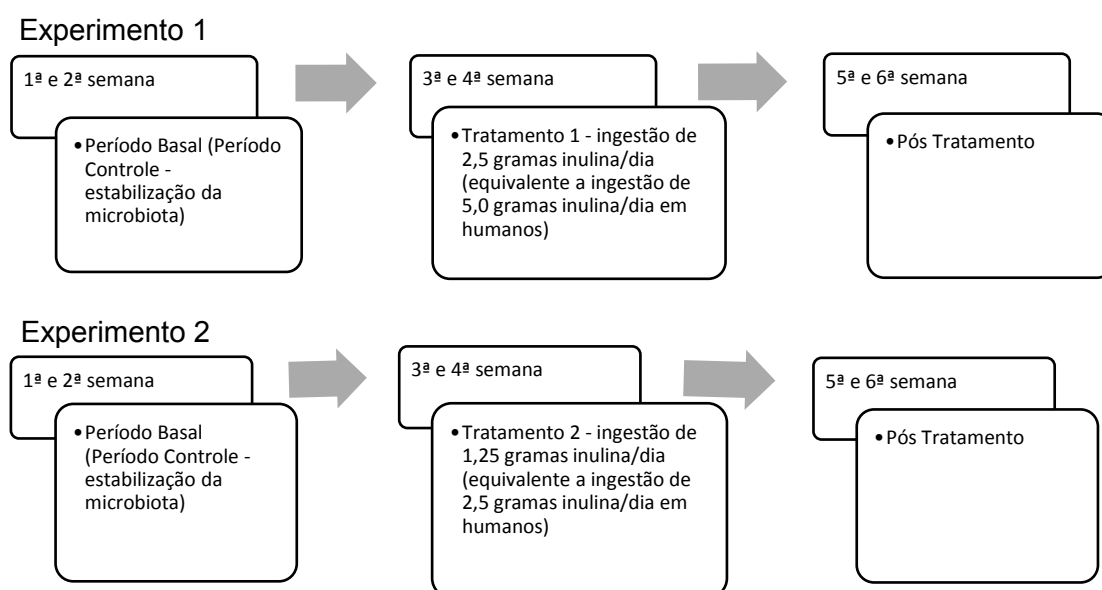


Figura 2. Esquema representando o protocolo experimental.

2.2.3 Análises microbiológicas

Semanalmente, durante todo o período experimental (controle, tratamento e pós tratamento), 5 mL de amostras foram coletadas dos reatores para as análises microbiológicas. A análise da composição da microbiota intestinal foi baseada na enumeração de bactérias aeróbias e anaeróbias totais, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., Enterobactérias, *Clostridium* spp., Aeróbios totais e Aeróbios facultativos. Um mL de amostra de cada reator foi suspenso em 9 mL de água peptonada. Diluições seriais foram preparadas e a inoculação foi realizada em meios de cultura seletivos: aeróbios e anaeróbios totais: -ágar Standard Methods (Acumedia, EUA; 37 °C/ 48 h); *Enterococcus* spp.: -ágar KF Streptococcus (Acumedia, EUA; 37 °C/ 48 h) (EDLUND et al., 2000); *Lactobacillus* spp.: -ágar MRS (Merck, Alemanha; 37 °C/ 48 h, anaerobiose) (YOSHIOKA et al., 1983); *Bifidobacterium* spp.: -Bifidobacterium medium 25–BIM-25 (procedência, 37 °C/ 72 h, anaerobiose) (Munoa; Pares, 1988), Enterobactérias:-ágar MacConkey (Acumedia, EUA; 37 °C/ 48 h) (BRIGIDI et al., 2001) e *Clostridium* spp.: -ágar RCA (Difco, França; 37 °C/ 48 h, anaerobiose) (MARZOTTO et al., 2006).

2.2.4 Análise de amônio

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

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

2.2.5 Análise de ácidos graxos de cadeia curta

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

Os AGCC foram extraídos com dietil éter e determinados com cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ionização de chama e injetor capilar split/splitless (Shimadzu GC2010) e coluna HP-INNOWAX, de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, usando hidrogênio como gás de arraste com um fluxo de 1,56 mL/min. As temperaturas da coluna, do injetor e do detector foram 170, 250 e 280 °C, respectivamente (VAN de WIELE et al., 2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise Microbiológica

Prebióticos resistem à digestão no estômago e no intestino delgado e se tornam disponíveis no cólon onde são seletivamente fermentados por grupos bacterianos específicos, como *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. Tais micro-organismos são associados a uma série de efeitos benéficos à saúde, como aumento da colonização resistente contra patógenos, estimulação do sistema imune e fermentação de produtos que provem energia aos colonócitos e induzem apoptose às células cancerígenas (VAN de WIELE et al., 2006).

Nesse estudo, foi avaliada a influência de inulina no crescimento de diversos grupos microbianos. Durante o experimento 1 (equivalente a 5 gramas de inulina por dia) (Tabela 3), observou-se um aumento de 4 ciclos log para a população de *Lactobacillus* spp. no período de tratamento nos reatores do cólon ascendente e transversal e um aumento de 5 ciclos log no reator que simula o cólon descendente. No período pós tratamento, notou-se uma redução de 5 ciclos log nos três reatores. Já durante o experimento 2 (equivalente 2,5 gramas de inulina por dia) (Tabela 4), o aumento de ciclos log foi menor. Houve um aumento de 2 ciclos log no reator do cólon ascendente e de apenas 1 ciclo log nos reatores dos cólons transversal e descendente. Porém, no período pós tratamento, a redução também foi menor, de apenas 1 ciclo log no reator do cólon ascendente e de 2 ciclos log nos reatores transversal e descendente.

Para a população de *Bifidobacterium* spp. durante o experimento equivalente a 5 gramas de inulina/dia (Tabela 3), houve um aumento de 3, 4 e 5 ciclos log nos reatores que simulam o cólon ascendente, transversal e descendente, respectivamente. Durante o período pós tratamento, uma redução de 4 ciclos log no cólon ascendente e de 5 ciclos log nos reatores transversal e descendente foi observada.

Para o experimento 2 (Tabela 4), houve aumento de 1 ciclo log nos cólons ascendente e descendente e não houve aumento no cólon transversal. Já no período pós tratamento, observa-se uma redução de 1 ciclo log nos cólons ascendente e transversal e de 2 ciclos log no cólon descendente.

Os resultados encontrados estão de acordo com de Wiele et al. (2006), no qual foi avaliado o efeito de inulina utilizando modelo dinâmico SEMH.

Já para a população de *Clostridium* spp., durante o experimento 1 (equivalente a 5 g de inulina/dia), observa-se um aumento de 4 ciclos log nos cólons ascendente e transversos e de 5 ciclos log no cólon descendente e uma redução de 3, 4 e 4 ciclos log nos respectivos cólons durante o período pós tratamento, ou seja quando o tratamento com inulina foi cessado. No experimento com menor concentração de inulina (Tabela 4), também houve aumento de 1 ciclo log nos cólons ascendente e descendente, porém a contagem permaneceu a mesma no cólon transversal. No período pós tratamento, houve redução de 1 ciclo log no cólon ascendente e não houve variação significativa nos cólons transversos e descendentes. Apesar das bactérias desse grupo serem geralmente conhecidas por seus efeitos nocivos ao organismo, como produção de toxinas causadoras de diarreia, promoção da invasão na mucosa e ativação de carcinógenos (PICARD et al., 2005), há estudos que comprovam efeitos benéficos como produção de ácido butírico em algumas espécies desse grupo, promovendo atividades imunomodulatórias ao organismo (VAN den ABEELE et al., 2013).

Abhari et al. (2015) avaliou o efeito de inulina em ratos, comparando as contagens de enterobactérias, aeróbios totais e bactérias anaeróbias durante o período controle e tratamento. A contagem de enterobactérias foi menor depois de 10 dias de tratamento com inulina, diferentemente dos resultados deste estudo, em que houve aumento de 1 ciclo log no cólon transversal durante o tratamento equivalente a 5 gramas de inulina por dia e aumento de 1 ciclo log no cólon ascendente durante o tratamento equivalente a 2,5 gramas de inulina por dia. As contagens dos outros cólons se mantiveram praticamente as mesmas do período controle.

De acordo com Abhari et al. (2015), a população de bactérias totais se manteve a mesma durante o período de ingestão de inulina. O mesmo resultado foi verificado nos reatores dos três cólons durante o tratamento equivalente a 5 gramas de inulina por dia e no reator do cólon ascendente durante o tratamento com menor concentração de inulina. Nos outros dois reatores, a contagem foi menor quando comparado ao controle.

A população de bactérias anaeróbias também se manteve praticamente a mesma comparada com a contagem no período controle no estudo de Abhari et al., (2015). Pode-se observar o mesmo nos cólons transversos e descendentes no tratamento equivalente a 5 gramas de inulina/dia e no cólon ascendente no tratamento equivalente a 2,5 gramas de inulina/dia. As contagens dos outros cólons foram menores do que do período controle.

Tabela 3 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, transverso e descendente durante todo período experimental 1 (equivalente a ingestão de 5 g de inulina/dia).

	Cólon ascendente (R3)	Cólon transverso (R4)	Cólon descendente (R5)
Basal			
<i>Enterococcus</i> spp.	7,88 ^a $\pm$ 0,12	7,70 ^a $\pm$ 0,04	6,62 ^a $\pm$ 0,02
Enterobacteria	6,55 ^a $\pm$ 0,40	5,17 ^c $\pm$ 0,1	6,90 ^c $\pm$ 0,20
<i>Lactobacillus</i> spp.	8,40 ^b $\pm$ 0,03	8,19 ^a $\pm$ 0,33	6,97 ^b $\pm$ 0,32
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,12 ^b $\pm$ 0,05	7,94 ^b $\pm$ 0,22	6,95 ^b $\pm$ 0,09
<i>Clostridium</i> spp.	7,95 ^c $\pm$ 0,30	7,92 ^b $\pm$ 0,41	6,97 ^c $\pm$ 0,05
Aeróbios totais	7,30 ^a $\pm$ 0,45	7,65 ^b $\pm$ 0,22	7,07 ^a $\pm$ 0,12
Anaeróbios facultativos	7,30 ^b $\pm$ 0,27	7,57 ^b $\pm$ 0,07	7,24 ^b $\pm$ 0,13
Tratamento			
<i>Enterococcus</i> spp.	7,30 ^a $\pm$ 0,09	7,47 ^a $\pm$ 0,12	7,30 ^b $\pm$ 0,08
Enterobacteria	6,30 ^a $\pm$ 0,22	6,77 ^b $\pm$ 0,20	7,23 ^a $\pm$ 0,22
<i>Lactobacillus</i> spp.	12,80 ^a $\pm$ 0,02	12,30 ^a $\pm$ 0,34	12,50 ^a $\pm$ 0,32
<i>Bifidobacterium</i> spp.	11,39 ^a $\pm$ 0,02	11,48 ^a $\pm$ 0,32	11,59 ^a $\pm$ 0,34
<i>Clostridium</i> spp.	11,40 ^a $\pm$ 0,06	11,00 ^a $\pm$ 0,33	11,76 ^a $\pm$ 0,32
Aeróbios totais	6,47 ^a $\pm$ 0,14	7,04 ^b $\pm$ 0,08	7,37 ^a $\pm$ 0,03
Anaeróbios facultativos	6,30 ^c $\pm$ 0,18	6,95 ^c $\pm$ 0,09	7,36 ^b $\pm$ 0,19
Pós Tratamento			
<i>Enterococcus</i> spp.	7,30 ^b $\pm$ 0,01	6,65 ^b $\pm$ 0,22	6,39 ^a $\pm$ 0,23
Enterobacteria	7,67 ^a $\pm$ 0,34	7,59 ^a $\pm$ 0,04	7,07 ^b $\pm$ 0,11
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,32 ^c $\pm$ 0,33	6,81 ^c $\pm$ 0,12	7,04 ^b $\pm$ 0,08
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7,60 ^c $\pm$ 0,55	6,69 ^c $\pm$ 0,28	6,92 ^b $\pm$ 0,09
<i>Clostridium</i> spp.	8,17 ^b $\pm$ 0,12	7,57 ^b $\pm$ 0,21	7,69 ^b $\pm$ 0,36
Aeróbios totais	8,67 ^a $\pm$ 0,09	8,21 ^a $\pm$ 0,08	7,54 ^a $\pm$ 0,15
Anaeróbios facultativos	8,65 ^a $\pm$ 0,18	7,90 ^a $\pm$ 0,22	7,90 ^a $\pm$ 0,06

*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ($p < 0,05$) entre um mesmo grupo bacteriano nos diferentes períodos para a mesma região do cólon.

Tabela 4 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, transverso e descendente durante todo período experimental 2 (equivalente a 2,5 g de inulina/dia).

Grupos bacterianos	Cólon ascendente	Cólon transverso	Cólon descendente
Basal			
<i>Enterococcus</i> spp.	6,68 ^b $\pm$ 0,24	6,64 ^b $\pm$ 0,30	7,07 ^b $\pm$ 0,30
Enterobacteria	6,52 ^a $\pm$ 0,26	7,03 ^a $\pm$ 0,20	7,69 ^a $\pm$ 0,59
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,70 ^a $\pm$ 0,17	6,45 ^b $\pm$ 0,15	6,63 ^b $\pm$ 0,33
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7,10 ^a $\pm$ 0,09	7,08 ^b $\pm$ 0,19	6,45 ^b $\pm$ 0,45
<i>Clostridium</i> spp.	7,84 ^a $\pm$ 0,47	7,55 ^a $\pm$ 0,34	8,23 ^b $\pm$ 0,28
Aeróbios totais	7,12 ^b $\pm$ 0,18	7,43 ^b $\pm$ 0,17	8,27 ^b $\pm$ 0,05
Anaeróbios facultativos	7,34 ^b $\pm$ 0,15	7,78 ^b $\pm$ 0,30	8,48 ^b $\pm$ 0,14
Tratamento			
<i>Enterococcus</i> spp.	5,69 ^a $\pm$ 0,16	5,66 ^a $\pm$ 0,13	5,54 ^a $\pm$ 0,21
Enterobacteria	7,39 ^b $\pm$ 0,09	6,99 ^a $\pm$ 0,40	6,58 ^a $\pm$ 0,62
<i>Lactobacillus</i> spp.	8,21 ^b $\pm$ 0,13	7,92 ^c $\pm$ 0,08	7,17 ^c $\pm$ 0,06
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,01 ^b $\pm$ 0,03	7,61 ^b $\pm$ 0,08	7,24 ^c $\pm$ 0,24
<i>Clostridium</i> spp.	8,46 ^a $\pm$ 0,08	7,48 ^a $\pm$ 0,28	7,55 ^a $\pm$ 0,04
Aeróbios totais	6,52 ^a $\pm$ 0,20	6,59 ^a $\pm$ 0,14	7,46 ^a $\pm$ 0,23
Anaeróbios facultativos	6,83 ^a $\pm$ 0,13	6,57 ^a $\pm$ 0,28	7,34 ^a $\pm$ 0,04
Pós Tratamento			
<i>Enterococcus</i> spp.	5,67 ^a $\pm$ 0,12	5,75 ^a $\pm$ 0,09	5,59 ^a $\pm$ 0,52
Enterobacteria	7,28 ^b $\pm$ 0,16	6,82 ^a $\pm$ 0,03	6,81 ^a $\pm$ 0,14
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,11 ^c $\pm$ 0,14	5,95 ^a $\pm$ 0,07	5,29 ^a $\pm$ 0,09
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7,37 ^a $\pm$ 0,30	6,32 ^a $\pm$ 0,40	5,37 ^a $\pm$ 0,04
<i>Clostridium</i> spp.	7,72 ^a $\pm$ 0,24	7,43 ^a $\pm$ 0,13	7,18 ^a $\pm$ 0,11
Aeróbios totais	7,88 ^c $\pm$ 0,07	7,45 ^b $\pm$ 0,08	7,17 ^a $\pm$ 0,10
Anaeróbios facultativos	8,07 ^c $\pm$ 0,24	7,46 ^b $\pm$ 0,17	7,29 ^a $\pm$ 0,27

*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ($p < 0,05$) entre um mesmo grupo bacteriano nos diferentes períodos para a mesma região do cólon.

3.2 Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC)

As bactérias intestinais, diferentemente das células hospedeiras, possuem enzimas para quebrar os hidratos de carbono, transformando-os em diferentes metabólitos úteis. Normalmente, fibras não digeríveis, como é o caso da inulina, podem ser fermentadas no ceco e no cólon pelas bactérias intestinais. Os principais produtos destas reações de fermentação são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), sendo o acetato, butirato e propionato. Diversos fatores, incluindo a dieta, diversidade da microbiota intestinal e quantidade de bactérias comensais desempenham um papel vital na produção de AGCC. Depois de serem absorvidos, os AGCC são utilizados pelas células do cólon ou transportados para circulação do sangue e outros órgãos. Após entrarem na circulação, os AGCC afetam o metabolismo e a função dos tecidos periféricos, tais como a modulação do tecido adiposo, fígado e músculo esquelético. Além disso, AGCC estão associados a um risco reduzido de várias doenças, incluindo inflamação no intestino e desequilíbrio da microbiota intestinal (SUN et al., 2016).

Os AGCC podem modular funções de diferentes sistemas, tais como intestinal, nervoso, endócrino e do sangue, que serve como um fator chave para regular desordens metabólicas e imunidade. Estudos demonstram que o butirato pode reduzir o cancro colorectal e inflamação do cólon. O propionato também apresenta potenciais efeitos benéficos à saúde, os quais incluem ações anti-lipogênica, anti-inflamatória e anti-cancerígena e redução do colesterol (REICHARDT et al., 2014).

Assim como observado por Van de Wiele et al. (2006), os tratamentos 1 e 2, com concentrações diferentes de inulina, estimularam a produção de ácidos graxos de cadeia curta, principalmente dos ácidos acético e propiônico (Tabelas 5 e 6). Nota-se também que durante o período pós tratamento, a maioria dos níveis de AGCC diminuiu ($p < 0,05$) em relação ao período de tratamento, como também demonstrado no estudo de Van de Wiele et al. (2006), sendo assim, conclui-se que o ideal seria a ingestão contínua do prebiótico para manter os efeitos benéficos exercidos por tais ácidos graxos.

Tabela 5 Atividade metabólica de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): acético, propiônico e butírico nas diferentes regiões simuladas do cólon como resultado do tratamento 1(equivalente a 5 gramas de inulina/dia).

	Cólon ascendente (R3)	Cólon transverso (R4)	Cólon descendente (R5)
Basal (mMol)			
Butirato	8,43 ^a ± 2,02	9,69 ^a ± 3,41	10,47 ^a ± 4,59
Propionato	6,08 ^a ± 0,61	7,53 ^a ± 1,61	12,59 ^{ab} ± 3,21
Acetato	46,73 ^a ± 12,37	55,96 ^a ± 3,42	80,62 ^a ± 1,45
Tratamento (mMol)			
Butirato	20,74 ^b ± 6,08	12,57 ^a ± 5,77	34,83 ^b ± 7,46
Propionato	7,47 ^a ± 1,33	10,81 ^a ± 0,98	18,51 ^b ± 3,03
Acetato	102,4 ^b ± 9,44	88,43 ^b ± 16,20	108,00 ^b ± 10,43
Pós Tratamento (mMol)			
Butirato	14,77 ^{ab} ± 3,87	13,16 ^a ± 3,24	9,96 ^a ± 4,75
Propionato	9,62 ^a ± 2,10	10,71 ^a ± 2,19	9,23 ^a ± 1,87
Acetato	46,83 ^a ± 5,25	59,90 ^a ± 7,00	65,48 ^a ± 11,89

*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ($p < 0,05$) na produção de AGCC nos diferentes períodos para a mesma região do cólon.

Tabela 6 Atividade metabólica de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): acético, propiônico e butírico nas diferentes regiões simuladas do cólon como resultado do tratamento 2 (equivalente a 2,5 gramas de inulina/dia).

	Cólon ascendente (R3)	Cólon transverso (R4)	Cólon descendente (R5)
Basal (mMol)			
Butirato	2,11 ^a ± 0,01	13,14 ^a ± 0,11	21,45 ^b ± 0,13
Propionato	0,13 ^c ± 0,03	0,09 ^c ± 0,00	0,39 ^b ± 0,04
Acetato	45,48 ^b ± 0,11	84,85 ^b ± 0,12	81,47 ^b ± 0,21
Tratamento (mMol)			
Butirato	2,16 ^a ± 0,02	8,43 ^c ± 0,04	23,17 ^a ± 0,09
Propionato	8,25 ^a ± 0,11	2,09 ^a ± 0,08	3,10 ^a ± 0,01
Acetato	90,85 ^a ± 0,33	101,34 ^a ± 0,11	125,79 ^a ± 0,17
Pós Tratamento (mMol)			
Butirato	2,66 ^a ± 0,07	10,17 ^b ± 0,21	8,30 ^c ± 0,01
Propionato	3,72 ^b ± 0,09	0,16 ^b ± 0,11	0,08 ^c ± 0,05
Acetato	40,65 ^b ± 0,11	33,49 ^c ± 0,11	45,25 ^c ± 0,03

*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ($p < 0,05$) na produção de AGCC nos diferentes períodos para a mesma região do cólon.

3.3 Íons de Amônio (NH₄⁺)

Através da análise dos resultados de íons de amônio, observa-se uma diminuição ($p < 0,05$) na produção de NH₄⁺ no cólon ascendente na maior concentração de inulina avaliada, assim como observado por Van de Wiele et al. (2004). A redução de NH₄⁺ é considerada benéfica, uma vez que a amônia pode alterar a morfologia e o metabolismo intermediário das células intestinais, aumentar a síntese de DNA e promover a tumorigênese (VAN de WIELE et al., 2004). Na Figura 3 é possível observar uma redução de NH₄⁺ durante o tratamento equivalente a 5,0 gramas inulina/dia. Entretanto, no tratamento equivalente a 2,5 g inulina/ dia houve um aumento em todos os cólons na produção de NH₄⁺ (Figura 4). Durante o período

pós tratamento, os níveis de amônio aumentaram em todos os cólons nas duas concentrações de inulina avaliadas.

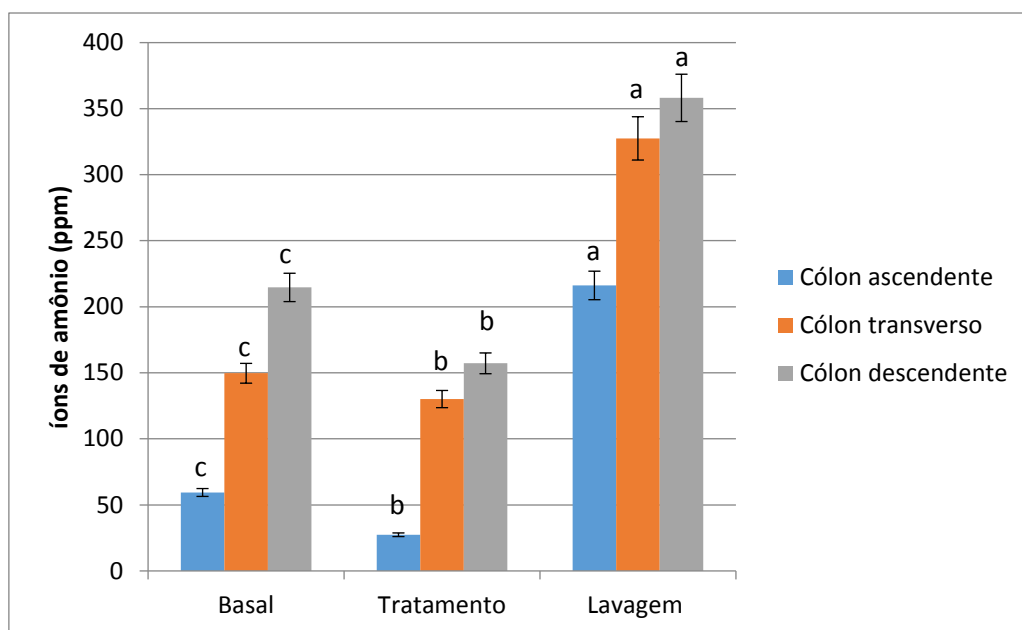


Figura 3 Média e desvio da concentração de íons amônio (ppm) produzidos nos reatores R3, R4 e R5, os quais simulam as regiões ascendente, transversa e descendente do cólon, em SEMH, durante todo período experimental 1 (equivalente a 5 g de inulina/dia).

*Letras minúsculas diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$) na produção de íons de amônio nos diferentes períodos para a mesma região do cólon.

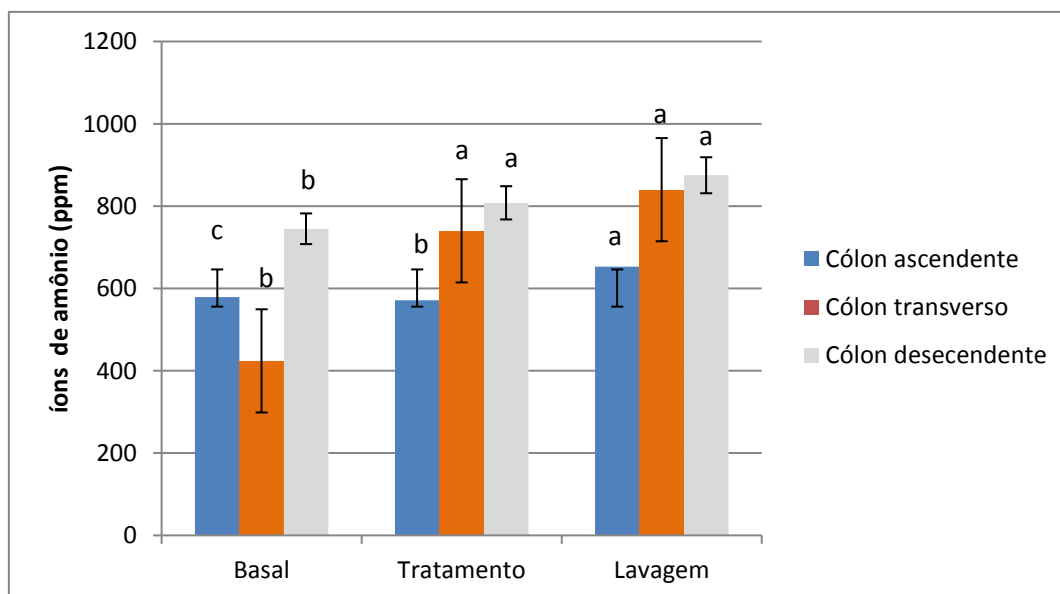


Figura 4 Média e desvio da concentração de íons amônio (ppm) produzidos nos reatores R3, R4 e R5, os quais simulam as regiões ascendente, transversa e descendente do cólon, em SEMH, durante todo período experimental 1 (equivalente a 2,5 g de inulina/dia).

*Letras minúsculas diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$) na produção de íons de amônio nos diferentes períodos para a mesma região do cólon.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo avaliou-se o impacto da ingestão equivalente a 5,0 e 2,5g de inulina/ dia sobre a população e metabolismo da microbiota intestinal utilizando Simulador do Ecossistema Microbiano Humano . Os resultados da ação da inulina confirmaram que a ingestão de tal prebiótico auxiliou na promoção de saúde intestinal, uma vez que estimulou o crescimento de bactérias comensais, como *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., o aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta e a diminuição de íons de amônio. Comparando os efeitos das duas concentrações, pode-se afirmar que a concentração equivalente a 5,0 gramas inulina/dia apresentou resultados mais expressivos de aumento da população de bactérias comensais, bem como no metabolismo da microbiota intestinal. Portanto, este estudo sugere que o consumo diário ideal de inulina é de 5,0 gramas/dia em adultos para a obtenção de efeitos benéficos na microbiota intestinal. Além disso, este estudo mostrou a eficácia da utilização de métodos *in vitro* que simulam o trato gastrointestinal na avaliação alterações na microbiota intestinal.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABHARI, K., SHEKARFOROUSH, S. S., SAJEDIANFARD, J., HOSSEINZADEH, S., NAZIFI, S. The effects of probiotic, prebiotic and synbiotic diets containing *Bacillus coagulans* and inulin on rat intestinal microbiota. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v. 16, n. 3, ser. 52, p. 267-273, 2015.
- 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.
- BISCHOFF, S., C. ‘Gut health’: a new objective in medicine? *BMC Medicine*, v. 9, n. 24, p. 1 – 24, 2011.
- CHI, Z., ZHANG, T., CAO, T., LIU X., CUI, W., ZHAO, C. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4295 – 4303, 2011.
- GIBSON, G. R., RASTALL, R. A. Prebiotics: Development & Application. Chichester: *John Wiley & Sons Ltd*, 2006, p. 57-100.
- 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.
- MATAMOROS, S., GRAS-LEGUEN, C., VACON, F., POTEL, G., COCHETIERE, M. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in Microbiology*, April 2013, v. 21, n. 4
- 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.
- 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.

MONTALTO, M., D'ONOFRIO, F., GALLO, A., CAZZATO, A., GASBARRINI, G. Intestinal microbiota and its functions. *Digestive and Liver Disease Supplements*, v. 3, p. 30–34, 2009.

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.

PAYNE, A. M., ZIHLER, A., CHASSARD, C., LACROIX, C. Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling. *Trends in Biotechnology*, p. 1-9, 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.

PICARD, C., FIORAMONTI, J., FRANCOIS, A., ROBINSON, T., NEANT, F., MATUCHANSKY, C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther*, v. 22, p. 495-512, 2005.

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

REICHARDT, N., DUNCAN, S. H., YOUNG, P., BELENGUER, A., LEITCH, C. M., SCOTT, K. P., FLINT, H. J., LOUIS, P. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *International Society for Microbial Ecology*, 1751-7362/14, p. 1-13, 2014.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic concept and health. *NS British Journal of Nutrition*, v. 104, n. S2, p. 1-63, 2010.

ROBLES-ALONSO, V., GUARNER, F. Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana. *Nutrición Hospitalaria*, v. 28, n.3, p. 553-557, 2013.

SUN, M., WU, W., LIU, Z., CONG, Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *Japanese Society of Gastroenterology*, 2006.

VAN den ABBEELE, P., BELZER, C., GOOSSENS, M., KLEEREBEZEM, M., VOS, W. M., THAS, O., WEIRDT, R., KERCKHOF, F., VAN de WIELE, T. Butyrate-producing *Clostridium* cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *The ISME Journal*, v. 7, p. 949–961, 2013.

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 prebiotics effects. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, p. 452-460, 2006.

VAN de WIELE, T., BOON, N., POSSEMIERS, S., JACOBS, H., VERSTRAETE, W. Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, v.51, p. 143–153, 2004.

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

Araraquara, 09 de janeiro de 2017.

Thaís Fávaro Bucci

De acordo,

João Bosco Faria