**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA-EEL**

PATRICIA MARINS FREIRE TEBERGA

**Avaliação do efeito de diferentes prebióticos sobre o desenvolvimento de
cepas de *Lactobacillus***

Lorena-SP
2017

PATRICIA MARINS FREIRE TEBERGA

**Avaliação do efeito de diferentes prebióticos sobre o desenvolvimento de
cepas de *Lactobacillus***

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Edição reimpressa e corrigida

Lorena – SP
Novembro, 2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Teberga, Patricia Marins Freire

Avaliação do efeito de diferentes prebióticos sobre o desenvolvimento de cepas de *Lactobacillus* / Patricia Marins Freire Teberga; orientador Ismael Maciel de Mancilha - ed. reimp., corr. - Lorena, 2017.

79 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2017
Orientador: Ismael Maciel de Mancilha

1. Alimentos funcionais. 2. probiótico. 3. *Lactobacillus*. 4. Prebiótico. 5. Simbiótico. I. Título. II. Mancilha, Ismael Maciel de, orient.

BIOGRAFIA

Patricia Marins Freire Teberga nasceu no dia 28 de fevereiro de 1991 na cidade de Guaratinguetá, São Paulo. Em 2009 ingressou no curso de Bacharelado em Ciências dos Alimentos da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Campus de Piracicaba pertencente a Universidade de São Paulo. Durante o curso, realizou projetos de iniciação científica nos laboratórios de Óleos e Gorduras, Alimentos Funcionais e Frutas e Hortaliças. Em 2012, realizou intercâmbio na modalidade sanduiche na Universidade Agrosup Dijon, França, onde cursou disciplinas do curso de Engenharia de Alimentos. Em 2014, realizou estágio no laboratório de Polifenóis na Universidade de Salamanca, durante três meses, onde analisou compostos fenólicos em semente, casca e polpa da uva. Em 2015, iniciou seus estudos em nível de Pós- Graduação, mestrado no Programa de Pós graduação em Biotecnologia Industrial da Escola de Engenharia de Lorena EEL –USP, Lorena, SP.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ser meu amparo nos momentos bons e ruins .

À minha família que sempre me incentivou e me deu suporte na busca dos meus sonhos.

Ao departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, pelo apoio à minha participação no mestrado.

Ao professor Dr.Ismael Maciel de Mancilha pela confiança, pela oportunidade e pela orientação.

Ao Fabricio Ferreira e Barbara Pereira pela ajuda inestimável.

Ao Javier Muso, pela colaboração e por estar sempre disposto a ajudar.

Aos colegas de laboratório Livia Carvalho e Moysés Freitas.

À todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram para minha formação.

As empresas Lowçucar, Dupont, Ingredion e Sweet Mix pela doação dos materiais utilizados nesta pesquisa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante o período da realização deste mestrado.

“Mesmo desacreditado e ignorado por todos, não posso desistir, pois para mim, vencer é
nunca desistir.”

Albert Einstein

RESUMO

TEBERGA, P.M.F. **Avaliação do efeito de diferentes prebióticos sobre o desenvolvimento de cepas de *Lactobacillus***. 2017. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

A combinação de compostos prebióticos e cepas de micro-organismos probiótico denomina-se simbiótico, tem como objetivo melhorar as características funcionais dos alimentos intensificando os benefícios proporcionados ao consumidor. Entretanto nem todas as interações de um ingrediente prebiótico e uma cepa de micro-organismo probiótico resultam em efeitos positivos. Neste contexto, no presente trabalho estudos foram desenvolvidos no sentido de contribuir para um melhor entendimento sobre a relação de ingredientes prebióticos e o desempenho de micro-organismos probióticos, visando à formulação de alimentos simbióticos. Assim 5 cepas de *Lactobacillus*: *L.plantarum* ATCC 8014, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV H2B20, *L. fermentum* ATCC 9338, *L. casei* ATCC 7469 foram avaliadas quanto ao desempenho em meio contendo diferentes ingredientes prebióticos, com ênfase para inulina, fruto-oligossacarídeo, estévia, polidextrose, goma arábica e lactitol. O crescimento das cepas foi mensurado por meio da determinação de densidade óptica após 24 horas de incubação a 37°C em caldo MRS contendo os respectivos prebióticos em substituição a glicose. Os resultados mostraram que o melhor desempenho, por parte das cepas avaliadas, foi observado em meio MRS contendo 2% de inulina seguido de fructooligossacarídeo e polidextrose. Observou-se um baixo crescimento em meio contendo 2% de goma arábica, estévia e lactitol. Posteriormente diferentes concentrações de inulina, FOS e polidextrose foram avaliadas, de acordo com um Planejamento Composto Central. Verificou-se a existência de uma interação negativa significativa ($p<0.05$) entre FOS e inulina sobre o crescimento das cinco cepas estudadas. Observou-se que o crescimento máximo estimado para as cepas *L. casei* ATCC 7469 e *L. fermentum* ATCC 9338 correspondeu ao meio MRS contendo 3,5% de inulina, e para as cepas *L.plantarum* ATCC 8014, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV H2B20 em meio MRS contendo 3% de inulina. Verificou-se também que a combinação de 3,5% de FOS com 2% de polidextrose proporcionou crescimento máximo estimado para as cepas avaliadas exceto para *L. acidophilus* ATCC 4356. Assim, a partir dos resultados obtidos conclui-se que a presença de inulina no meio MRS promoveu melhor desempenho das cepas de *Lactobacillus* estudadas.

Palavras-chave: Alimentos funcionais, Probiótico, *Lactobacillus*, Prebiótico, Simbiótico

ABSTRACT

TEBERGA, P.M.F. **Effect of different prebiotic on growth of *Lactobacillus* strains.** 2017. 79 p. Dissertation (Master of Science)-Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

The combination of prebiotic compounds and strains of probiotic microorganisms is called symbiotic, aiming to improve the functional characteristics of foods by enhancing the benefits provided to the consumer. However, not all interactions of a prebiotic ingredient and a probiotic microorganism result in positive effects. In this context, in the present work studies were developed in order to contribute to a better understanding on the relationship of prebiotic ingredients and the performance of probiotic microorganisms, aiming at the formulation of symbiotic foods. Therefore, in this study it was evaluated the ability of 5 *Lactobacillus* strains *L.plantarum* ATCC 8014, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV H2B20, *L. fermentum* ATCC 9338, *L. casei* ATCC 7469 to grow on media containing potential prebiotics, namely inulin, fructooligosaccharides (FOS), gum arabic, stevia and lactitol. Strain growth was measured by optical density determination after 24 hours of incubation at 37 ° C in MRS broth containing the respective prebiotics. The results showed that the best performance by the evaluated strains was observed in MRS medium containing 2% inulin followed by fructooligosaccharide and polydextrose. Low growth was observed in medium containing 2% gum arabic, stevia and lactitol. Subsequently different concentrations of inulin, FOS and polydextrose were evaluated, according to a Central Composite Planning. There was a significant negative interaction ($p < 0.05$) between FOS and inulin for the five strains studied. It was observed that the maximum estimated growth for the strains *L. casei* ATCC 7469 and *L. fermentum* ATCC 9338 would be in MRS medium containing 3.5% inulin, and for *L.plantarum* strains ATCC 8014, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV H2B20 would be in MRS medium containing 3% inulin. It was also found that the combination of 3.5% FOS with 2% polydextrose provided maximum estimated growth for the strains evaluated except for *L. acidophilus* ATCC 4356. The presence of inulin in MRS medium promote the best performance of the *Lactobacillus* strains evaluated in this study.

Keywords: Functional foods, Probiotic, *Lactobacillus*, Prebiotic, Symbiotic

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura Química ácido graxo de cadeia curta	27
Figura 2- Estrutura Química inulina	28
Figura 3- Estrutura Química do Frutooligossacarídeo	30
Figura 4- Estrutura Química da Polidextrose	31
Figura 5- Estrutura Química do Lactitol	33
Figura 6- Estrutura Química da Estévia	35
Figura 7- Superfícies de Resposta referente ao modelo ajustado para cepa <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	49
Figura 8- Superfícies de Resposta referente ao modelo ajustado para cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	52
Figura 9- Superfícies de Resposta referente ao modelo ajustado para cepa <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	55
Figura 10- Superfícies de Resposta referente ao modelo ajustado para cepa <i>Lactobacillus delbrueckii</i> H2B20	58
Figura 11- Superfícies de Resposta referente ao modelo ajustado para cepa <i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos Compostos Prebióticos Avaliados	38
Tabela 2 - Condições de Ensaio de acordo com o planejamento composto central	40
Tabela 3 - Valores de DO (600 nm) relativos ao desempenho de cepas de <i>Lactobacillus</i> em caldo MRS contendo diferentes compostos prebióticos	41
Tabela 4 - Valores de DO (600 nm) relativos ao desempenho de cepas de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469 em caldo MRS contendo diferentes concentrações de inulina, FOS e PDX	47
Tabela 5 - Coeficientes para o modelo quadrático relativo ao crescimento da cepa <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	48
Tabela 6 - Valores de DO (600 nm) relativos ao desempenho de cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 em caldo MRS contendo diferentes concentrações de inulina, FOS e PDX.	51
Tabela 7- Coeficientes para o modelo quadrático relativo ao crescimento da cepa <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	51
Tabela 8-Valores de DO (600 nm) relativos ao desempenho de cepas de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 em caldo MRS contendo diferentes concentrações de inulina, FOS e PDX.	54
Tabela 9 - Coeficientes para o modelo quadrático relativo ao crescimento da cepa <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	54
Tabela 10 - Valores de DO (600 nm) relativos ao desempenho de cepas de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2B20 em caldo MRS contendo diferentes concentrações de inulina, FOS e PDX.	57
Tabela 11 - Coeficientes para o modelo quadrático relativo ao crescimento da cepa <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2B20	57
Tabela 12 - Valores de DO (600 nm) relativos ao desempenho de cepas de <i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338 em caldo MRS contendo diferentes concentrações de inulina, FOS e PDX.	60
Tabela 13 - Coeficientes para o modelo quadrático relativo ao crescimento da cepa <i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	60

LISTA DE ABREVIATURAS

FOS - Frutooligossacárideo

PDX - Polidextrose

DO - Densidade Óptica

TGI - Trato Gastrointestinal

AGCC- Ácido graxo de cadeia curta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	18
2.2 MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA.....	19
2.3 PROBIÓTICOS	21
2.3.1 Espécies de micro-organismos probióticos	21
2.3.2. Mecanismos de ação.....	23
2.3.3 Aplicação tecnológica de bactérias probióticas.....	24
2.4 PREBIÓTICOS.....	25
2.4.1 Mecanismos de ação dos compostos prebióticos	26
2.4.2 Inulina.....	27
2.4.3 Frutooligossacarídeo – FOS.....	29
2.4.4 Polidextrose	30
2.4.5 Goma arábica	31
2.4.6 Lactitol	32
2.4.7 Estévia.....	33
2.5 PRODUTOS SIMBIÓTICOS.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 MICRO-ORGANISMOS.....	37
3.2 COMPOSTOS PREBIÓTICOS.....	37
3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS PREBIÓTICOS SOBRE O CRESCIMENTO DAS CEPAS DE LACTOBACILLUS.....	37
3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	38
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 EFEITO DOS COMPOSTOS PREBIÓTICOS SOBRE O CRESCIMENTO DAS CEPAS DE LACTOBACILLUS	41
4.2 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DAS CEPAS DE LACTOBACILLUS EM CALDO MRS NA PRESENÇA DE INULINA, FOS E PDX.	45
5 CONCLUSÕES.....	64
6. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	66
REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE.....	78

1 INTRODUÇÃO

As descobertas científicas tem evidenciado que muitas doenças crônicas não transmissíveis podem ser prevenidas por meio de uma alimentação saudável. Esses conhecimentos, associados à maior compreensão e exigência por parte do consumidor no tocante à qualidade de vida, tem norteado o mercado de alimentos funcionais no sentido de avaliar novos compostos com alegação funcional, bem como novas formulações simbióticas.

Dentre estes alimentos, destacam-se aqueles direcionados para a saúde do trato gastrointestinal. Neste contexto, é essencial que estes alimentos contenham micro-organismos probióticos e/ou carboidratos não digeríveis nomeados de prebióticos, bem como os alimentos simbióticos que se caracterizam pela combinação de micro-organismos de natureza probiótica com compostos prebióticos.

A sobrevivência e a atividade de um micro-organismo probiótico, muitas vezes pode ser prejudicada por fatores endógenos no trato gastrointestinal, tais como as condições ácidas do estômago, bem como por exclusão competitiva que se caracteriza pela competição por nutrientes exercida por outras espécies de micro-organismo, incluindo patogênicos. Assim, neste ambiente competitivo que caracteriza o trato gastrointestinal humano, é um desafio manter a viabilidade das espécies de micro-organismos desejáveis.

Estudos demonstram que a combinação simbiótica caracterizada pela seleção de compostos prebióticos específicos para estimular o crescimento e atividade de espécies probióticas, atua como um mecanismo para melhorar o funcionamento do trato gastro digestivo do hospedeiro. Neste contexto, destaca-se o interesse pela descoberta de novos compostos com propriedades prebióticas, permitindo o desenvolvimento de novas formulações simbióticas.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de novas formulações simbióticas. Especificamente, avaliou-se o efeito de compostos prebióticos como Inulina, frutooligossacarídeo, polidextrose, goma arábica, lactitol e estévia sobre o crescimento de cepas de *Lactobacillus* : *L.plantarum* ATCC 8014, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV H2B20, *L. fermentum* ATCC 9338, *L. casei* ATCC 7469.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1999) o alimento funcional é definido como “aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutritivas básicas quando consumidos como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e /ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”.

O Japão foi o país pioneiro no desenvolvimento de produtos alimentícios com propriedades funcionais. Em 1984, com o crescimento da população idosa e o aumento de número de casos de doenças crônicas, o governo japonês iniciou um projeto com objetivo de explorar a relação alimento e saúde. Foram identificadas várias substâncias responsáveis pelas funções fisiológicas apresentadas pelos alimentos funcionais. Em 1991, posteriormente às regulamentações sobre o efeito a saúde, os alimentos funcionais foram designados como *Foods for Specified Health Use*, cujo princípio foi rapidamente aceito e disseminado mundialmente (ARAI, 2008).

Contudo, as denominações das alegações bem como os critérios para aprovação variam de acordo com a regulamentação de cada país ou de blocos econômicos (STRINGHETA et al., 2007).

Como exemplos de alimentos funcionais regulamentados pela legislação brasileira ANVISA (2008) enquadram-se os ácidos graxos, carotenoides, probióticos, fibras alimentares, antioxidantes, fitoesteróis, os polióis e as proteínas de soja.

O consumo regular dos alimentos funcionais garante a manutenção da saúde, modulando a fisiologia do organismo, promovendo a manutenção dos níveis saudáveis de triglicerídeos, ação antioxidante, auxilia no bom funcionamento do intestino, redução dos riscos de aterosclerose, anticancerígenos e estimulação do sistema imune (REGO; BULSIONI, 2014).

Assim muitas doenças crônicas que atingem uma grande parcela da população mundial podem ser prevenidas com o consumo diário de alimentos funcionais, ou mesmo reduzir danos consequentes de doenças já existentes (BASHO; BIN 2010).

Uma pesquisa realizada pela Market Research Report (2015) constatou que Ásia-Pacífico e América do Norte são os principais mercados consumidores de alimentos funcionais, sendo observada uma taxa de crescimento de 15% ao ano.

No Brasil, de acordo com a associação brasileira de indústrias de biscoitos, massas alimentícias e pães e bolos industrializados ABIMAPI (2016), o mercado de produtos naturais incluindo alimentos e bebidas orgânicos, funcionais, movimentaram US\$ 27 bilhões em 2015, sendo crescimento acumulados nos últimos anos de 44%.

São diversos os fatores relacionados com o grande crescimento deste mercado, incluindo o maior interesse dos consumidores que buscam cada vez mais incluir em sua dieta produtos alimentícios que proporcionem benefícios à saúde. A extensa pesquisa científica neste setor, apoiada pela divulgação nos meios de comunicação, contribui para o consumidor adquirir conhecimento e interesse sobre os alimentos funcionais. As campanhas realizadas pelos órgãos de saúde para redução da ingestão de alimentos ricos em gordura saturada, gordura trans, açúcar e sódio tem levado as empresas do ramo alimentício desenvolver novos alimentos de caráter funcional, mas que preservem o sabor e textura (REGO; BUCIONE, 2014).

Os alimentos contendo micro-organismos probióticos representam uma grande fatia do mercado de alimentos funcionais que proporcionam uma melhoria na saúde intestinal além de outros benefícios para os consumidores (AHASAN et al., 2015).

2.2 MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

O ser humano contém dez vezes mais células microbianas do que as células humanas. Estes micro-organismos colonizam praticamente todas as regiões do corpo humano expostas ao ambiente externo, incluindo a pele, a cavidade oral, o trato respiratório, urogenital e gastrointestinal, entre estes o trato gastrointestinal (TGI) é o mais densamente colonizado (GERRITSEN et al., 2011).

Segundo Scott et al (2013) são centenas de espécies de bactérias que compõem o trato gastrointestinal, sendo a maioria anaeróbia e pertencente ao filo *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*.

O filo *Bacteroidetes* inclui os gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*, como características possuem a capacidade de utilizar uma gama de substratos e são os principais produtores de propionato. O filo *Firmicutes* incluem várias espécies em destaque os *Lactobacillus* identificados como os produtores dominantes de butirato e consumidores de polissacarídeos não digeríveis. *Actinobactérias* incluem *Bifidobacterium spp* e *Proteobactérias* incluem *Escherichia coli* (GRAF et al., 2015).

De acordo com Louis et al. (2014) há uma diferença em diversidade e número de bactérias entre as regiões do trato gastrointestinal devido aos fatores: tempo de trânsito, pH, exposição ao oxigênio, disponibilidade de nutrientes, secreções do hospedeiro (como bile e enzimas digestivas). O trato gastrointestinal superior (estômago, duodeno, jejuno e íleo superior) apresenta concentrações bacterianas menores que vão de 10^1 a 10^8 organismos / g de conteúdo luminal sendo estes valores resultantes da composição do meio luminal (ácido, bile, secreção pancreática) que é letal para maior parte dos micro-organismos.

Em contraste, o intestino grosso contém um ecossistema microbiano complexo e com altas densidades de bactérias que atingem concentrações de até 10^{12} a 10^{14} células / g de conteúdo luminal. O cólon, uma das partes do intestino grosso, é o ambiente mais favorável para o crescimento bacteriano de espécies benéficas à saúde humana como *Lactobacillus ssp* e *Bifidobacterium ssp*, por apresentar um pH favorável variando de (5,7 a 6,8) e disponibilidade de nutrientes (JANDHYALA et al., 2015).

A colonização microbiana do intestino humano inicia-se no nascimento. Segundo Penders et al. (2006) acredita-se que o intestino do recém-nascido seja estéril ou apresente um nível muito baixo de micro-organismo ao nascer, entretanto é durante e após o parto que o TGI é rapidamente colonizado.

A colonização inicial dos recém-nascidos é proveniente principalmente do canal vaginal, intestinal e da epiderme materna. Entretanto esta colonização pode ser influenciada por vários fatores, incluindo o modo de parto, o tipo de alimentação infantil, a idade gestacional e o uso de certos medicamentos (PENDERS et al., 2006).

A composição da microbiota intestinal é fortemente influenciada por uma série de fatores que incluem as espécies microbianas adquiridas no nascimento, a genética do hospedeiro, a idade, doenças, o uso de antibióticos e também os efeitos dietéticos. Entre estes, a dieta desempenha um impacto significativo no ambiente intestinal (SCOTT et al., 2013).

Nas últimas décadas, o padrão alimentar sofreu grandes mudanças de composição, houve um aumento no consumo de produtos industrializados ricos em gordura e açúcares refinados (AGUS et al., 2016).

Esta dieta associada ao estilo de vida sedentário resulta em modificações na microbiota intestinal, o que pode contribuir para a maior incidência de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, obesidade, depressão, alergias, diabetes e doenças autoimunes. Portanto, para manter um equilíbrio da microbiota intestinal é essencial a

ingestão de alimentos que auxiliam neste equilíbrio, como fibras, prebióticos, probióticos e simbióticos (ORIACH et al.,2016).

2.3 PROBIÓTICOS

Probióticos são definidos como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

Para que o micro-organismo seja considerado probiótico é necessário que apresente características como: ser seguro para o consumo humano , poder ser produzido em larga escala, mantendo sua viabilidade durante o processamento, armazenamento e no organismo do hospedeiro. Deve também apresentar resistência ao suco gástrico e adesão às células intestinais humanas e produzir substâncias antimicrobianas contra patógenos (RUIZ et al.,2013).

As bactérias probióticas conferem uma série de benefícios à saúde do hospedeiro, incluindo a produção de vitaminas (ROSSI et al.,2011). São bactérias capazes de sintetizar a vitamina K, bem como a maioria das vitaminas B solúveis, como a riboflavina e a tiamina, as quais são essenciais para o ser humano (GU; LI, 2016).

Dentre outros benefícios à saúde atribuídos aos probióticos destacam-se o controle e a restabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; promoção da digestão de lactose em indivíduos lactase deficientes; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais (SHAH, 2007)(SAAD et al., 2011).

Estudos demonstram a influência do consumo de probióticos na diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol (SRIDEVI et al., 2009), prevenção de infecções urogenitais (LENOIR-WIKJNKOOP et al., 2007), prevenção de alergias(COCCO et al., 2007), diminuição do risco de câncer (CHONG,2014) , prevenção de doenças relacionadas a saúde bucal (SUGUNAN;NAIR,2013) e no tratamento de doenças psíquicas como ansiedade e depressão (FOSTER;NEUFELD, 2013).

2.3.1 Espécies de micro-organismos probióticos

Espécies de bactérias, especialmente as dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais utilizadas em alimentos devido ao seu papel na alimentação humana e animal, na produção e preservação de alimentos e também pelas propriedades

probióticas apresentadas por algumas cepas. Estas características são de importância crescente e recebe amplo interesse do consumidor e do mercado (FELIS e DELLAGLIO, 2007).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, ressaltam-se *B.bifidum*, *B.breve*, *B.lactis*, *B.animalis*, *B.longum* e *B. thermophilum* e dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. defensius*, *L.lactis*, *L.casei*, *L. rhamnosus* (ANVISA, 2008).

O gênero *Lactobacillus* pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*, família *Lactobacillaceae*. São bactérias Gram-positivas, em forma de bastonetes ou cocobacilos, geralmente imóveis, não formadoras de esporos, anaeróbias mas aerotolerantes, ácido tolerantes e catalase negativa (HOLZAPFEL et al., 2002).

Lactobacillus ssp são encontrados em ambientes com carboidratos disponíveis, tais como alimentos lácteos, carne fermentada, legumes, frutas e bebidas (GIRAFFA, 2003) e no trato respiratório, gastrointestinal e genital dos seres humanos e animais, pois necessitam de um meio rico em nutrientes contendo carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos e vitaminas para crescer (FELIS; DELLAGLIO, 2007).

São espécies fermentadoras de glicose, majoritariamente homofermentativas, em que o produto final é o ácido láctico, mas há representantes heterofermentativos que produzem lactato, CO₂ e etanol (CARR et al., 2002).

Lactobacillus crescem em temperatura ótima em torno de 37°C a 41°C. São acidúricos com pH ótimo de 5,5 a 6,2, sendo a taxa de crescimento reduzida em meios a pH neutros ou alcalinos (BIRADAR et al., 2004).

O gênero *Bifidobacterium* pertence ao filo *Actinobacteria*, ordem *Bifidobacteriales*, família *Bifidobacteraceae*. São bactérias Gram-positivas, em forma de bacilos, não formadores de esporos e anaeróbio estrito (TALWALKAR et al., 2004). A temperatura ótima de crescimento está entre 36-38°C para as espécies de origem humano e 41-43°C para as espécies de origem animal. O pH requerido para seu crescimento oscila entre 6,5 a 7,0 (BALLONGUE, 2004).

Bifidobactérias são um importante grupo de bactérias intestinais comensais em humanos, sendo que em recém-nascidos chega representar a maioria da microbiota intestinal (PACHENARI et al., 2016). Não são patogênicas, mas são conhecidos por inibir outras bactérias patogênicas intestinais devido à sua capacidade para produzir ácido acético, ácido láctico, e ácido propiônico (DYRR; THOMAS, 2000).

A maioria das espécies de *Bifidobacterium* metaboliza uma ampla gama de oligossacarídeos e polissacarídeos não digeríveis como rafinose, lactulose, frutose, isomaltoligossacarídeo, galacto-oligossacarídeos e frutooligossacarídeos (MITSUOKA¹, 1992 apud KAILASAPATHY ; CHIN, 2000).

2.3.2. Mecanismos de ação

O mecanismo de ação dos micro-organismos probióticos é resultante de vários processos que podem atuar associados ou independentes, sendo os principais: produção de substâncias antimicrobianas, modulação do sistema imunológico, aumento da barreira epitelial, aumento da adesão à mucosa intestinal, inibição da adesão de patógenos e exclusão competitiva de micro-organismos patogênicos (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012).

A exclusão competitiva do micro-organismo patogênico se concerne como uma barreira física contra os patógenos por meio da ocupação de locais de fixação, o consumo de nutrientes e a produção de substâncias antimicrobianas (SEKIROV et al., 2010).

A produção e secreção de substâncias antimicrobianas como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio apresenta ação antibacteriana especialmente em relação às espécies patogênicas (Hemaiswarya et al, 2013).

Os ácidos orgânicos, em particular, ácido acético e ácido lático, apresentam forte efeito inibidor contra as bactérias Gram-negativas, e têm sido considerados os principais compostos antimicrobianos responsáveis pela atividade inibidora dos probióticos. Segundo Bermudez-Brito (2012) a forma não dissociada do ácido orgânico penetra na célula bacteriana e dissocia-se dentro do seu citoplasma e a eventual redução do pH intracelular pode conduzir à morte do agente patogênico .

Conforme Hassan et al.(2012) o mecanismo mediado pelas bacteriocinas inclui a inibição da síntese da parede celular bacteriana, já o peróxido de hidrogênio de acordo com Hertzberger,et al.(2014) é produzido pelos *Lactobacillus* na presença de oxigênio por meio do transporte de elétrons via enzima flavina. O peróxido de hidrogênio tem efeito bactericida devido ao forte poder oxidante sobre a célula bacteriana, como também na destruição de ácidos nucleicos.

A competição pelo sítio de ligação na mucosa intestinal seria outro modo de

¹ MITSUOKA, T. Intestinal flora and aging. **Nutrition reviews**, v. 50, n. 12, p. 438-446, 1992.

atuação, onde os probióticos formam uma barreira física às espécies patogênicas impedindo a sua adesão.

De acordo com Hummel et al. (2012) os lactobacilos modulam a regulação de vários genes que codificam as proteínas de adesão, tais como a E-caderina e β -catenina, sendo este segundo o autor um possível mecanismo para reforçar a integridade da barreira intestinal contra patógenos.

Os micro-organismos probióticos também agem na modulação do sistema imune, por meio do aumento dos níveis de anticorpos e na ativação dos macrófagos (KOPPHOOLIHAN, 2000).

2.3.3 Aplicação tecnológica de bactérias probióticas

O principal veículo de administração de culturas probióticas são os produtos lácteos, sendo o segmento dos laticínios funcionais os pioneiros nesta categoria (AHASAN et al., 2015). Porém, graças aos benefícios para a saúde, as bactérias probióticas têm sido cada vez mais incorporadas a uma gama de produtos como sorvetes, iogurtes, queijos, cacau e carnes fermentadas (SAAD, 2011).

Embora a maior parte dos alimentos probióticos existentes no mercado seja constituída de produtos lácteos, existe um crescente interesse no desenvolvimento de produtos probióticos não lácteos, sustentado em problemas como intolerância à lactose e o teor de colesterol elevado observado nestes produtos. Além disso, há uma demanda crescente por produtos probióticos vegetarianos (HEENAN et al., 2004). Isto levou ao desenvolvimento de produtos probióticos a partir de frutas (LAVERMICOCCA, 2006), legumes (YOON et al., 2006), leguminosas (HEENAN et al., 2004) e produtos derivados de cereais (HELLAND et al., 2004).

Um desafio ao formular um alimento com alegação probiótica é manter a viabilidade das bactérias no produto alimentício, pois existem vários fatores relacionados com a baixa sobrevivência em alimentos, incluindo pH, pós acidificação em produtos fermentados, concentração de oxigênio, temperatura de armazenamento e embalagem (TALWALKAR et al., 2004)(OSTLIE et al., 2005).

Consequentemente, pesquisas, como as realizadas por Talwalkar et al.(2004) e Heidebach et al (2010) propõem soluções para manter a viabilidade de células probióticas, incluindo a incorporação de micronutrientes, emprego de agentes redutores, uso de embalagens adequadas e a técnica da microencapsulação.

A legislação recomenda que um produto com alegação probiótica mantenham populações suficientemente elevadas situadas na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (ANVISA, 2008).

Outra área relevante de aplicação de probióticos é na saúde animal. Van Boeckel et al.(2014) estimam que de 2010 a 2030, o uso de antibióticos na cadeia de produção de alimentos e animais aumentará em 67% trazendo riscos diretos a saúde da população. Como alternativa aos antibióticos, os probióticos têm sido estudados com objetivo de proteção dos animais contra patógenos, aumentando a resposta imune (MUSA et al .,2009) No estudo de Timmerman et al (2006) os autores constataram que a inclusão de *Lactobacillus* na nutrição dos frangos de corte resultou no maior índice de produtividade do frango, medido com base no ganho de peso diário, eficiência alimentar e mortalidade

2.4 PREBIÓTICOS

Gibson e Roberfroid (1995) conceituam prebióticos como ingrediente alimentar não digerível que chegam ao cólon, sem ser hidrolisado e são metabolizados seletivamente por bactérias tais como bifidobactérias e lactobacilos exercendo efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro.

De acordo com Gibson et al.(2004) para que um composto possa ser definido como prebiótico deve atender os seguintes requisitos: não ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do trato gastrointestinal; ser utilizado como substrato seletivo para um número limitado de bactérias benéficas presentes no colón, estimulando seletivamente o crescimento e atividade destas bactérias.

Alguns efeitos ao organismo atribuídos aos prebióticos incluem melhor absorção de minerais como cálcio e magnésio; modulação da microbiota intestinal; apresentam efeito bifidogênico, estimulando a predominância de bifidobactérias no colón de forma a ativar o sistema imunológico; reduzem os níveis de bactérias patogênicos no intestino, alívio da constipação, prevenção do câncer de cólon, auxilia na prevenção de doenças cardiovasculares, redução dos sintomas do intestino irritável (ROBERFROID, 2002; GIBSON;ROBERFROID, 2008; SLAVIN, 2013).

Compostos que apresentam efeitos prebióticos podem ser encontrados naturalmente em vários alimentos, incluindo aspargo, chicória, tomate, mel, cebola e leite humano,

sendo comercializados na forma de pó ou xarope sendo incorporados em produtos alimentares, como iogurtes e pães (GIBSON et al., 2010).

Os prebióticos mais estudados e utilizados comercialmente são inulina, frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS) e lactulose. Estes compostos podem ser produzidos enzimaticamente ou encontrados naturalmente em alguns vegetais (CUMMINGS et al., 2001).

De modo a garantir um efeito contínuo para a saúde do consumidor, tanto os alimentos probióticos quanto os prebióticos devem ser ingeridos diariamente. Doses diárias a partir de 4 a 5 g até 20 g de inulina e / ou oligofrutose, administradas durante pelo menos 15 dias mostraram ser eficientes para proporcionar benefícios (SAAD, 2006).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008) estabelece que alimentos que forneçam na porção do produto no mínimo 3 gramas de frutooligossacarídeos (FOS) ou de inulina para alimentos sólidos e 1,5 g para alimentos líquidos possam apresentar alegação de “contribui para o equilíbrio da flora intestinal”.

Os alimentos que a porção do produto pronto para o consumo forneça no mínimo 3 g de lactulose ou polidextrose se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for líquido possam apresentar alegação de “auxiliam o funcionamento do intestino” (ANVISA, 2008).

2.4.1 Mecanismos de ação dos compostos prebióticos

Um importante mecanismo de ação dos prebióticos é a alteração na microbiota intestinal. Os prebióticos atuam seletivamente como fonte de energia para as bactérias benéficas, tais como bifidobactérias e lactobacilos, os quais através da fermentação dos prebióticos produzem gases como hidrogênio e dióxido de carbono e ácidos de graxos de cadeia curta (AGCC) principalmente acetato, propionato e butirato (figura 1) (SAULNIER, 2009).

Figura 1- Estrutura química dos ácidos graxos de cadeia curta

Acetato

Propionato

Butirato

Destes, o butirato é considerado o mais benéfico para saúde do cólon. O butirato demonstrou efeito de inibição (in vitro) no crescimento de células de câncer do cólon sendo este composto fonte primária de energia para os colonócitos (POOL-ZOBEL ; SAUER, 2007).

Os AGCC promovem a redução do pH do cólon o que inibe o crescimento de potenciais agentes patogênicos. Segundo Oliveira Haully e Moscato (2002) o pH baixo diminui a degradação de peptídeos e a formação de compostos tóxicos, tais como amoníaco e aminas que são compostos gerados por bactérias patogênicas.

Segundo Bloemen et al (2009) cerca de 70% do acetato é absorvido pelo fígado, onde além de ser utilizado como fonte de energia, é também utilizado como substrato para a síntese de colesterol e ácidos graxos de cadeia longa e como co-substrato para síntese de glutamato.

Estudos realizados com propionato demonstram que este ácido proporciona um aumento da saciedade reduzindo assim a ingestão de alimentos, por meio do aumento da produção de leptina, considerada o hormônio da saciedade (RUIJSCHOP et al.,2008)

O propionato também apresenta propriedade anticarcinogênica, uma vez que no estudo realizado por Hinnebusch et al (2002) descobriram que o propionato desempenha papel na detenção do crescimento e indução da apoptose de células do câncer colorretal.

2.4.2 Inulina

Inulina é um polissacarídeo do tipo frutano sendo formada por cadeias compostas de resíduos de frutose com ligações β (2-1) frutosil-frutose com resíduo terminal de glicose (Figura 2) e grau de polimerização (DP) variando de 2 a 60 (CHARALAMPOPOULOS RASTALL, 2009).

Figura 2- Estrutura química da Inulina

Fonte: (CHARALAMPOPOULOS; RASTALL 2009)

Além do amido, os frutanos são os polissacarídeos não estruturais mais abundantes encontrados na natureza, sendo utilizada pela planta como reserva energética, Sua síntese é extra-cloroplástica, solúvel em água e armazena-se no vacúolo da célula (CAIRNS, 2003).

. A indústria de alimentos produz inulina em larga escala extraída da raiz de chicória (contém cerca de 20% de inulina), do agave e alcachofra de Jerusalém (FLAMM et al., 2010).

A inulina não é digerida pelas enzimas do trato gastrointestinal superior devido a configuração do carbono secundário, beta anomérico, incapaz de ser hidrolisado pelas enzimas digestivas no intestino delgado, que são enzimas específicas para ligações alfa glicosídicas (KELLY,2008). No entanto espécies de bifidobactérias são capazes de utilizar a inulina por possuírem a enzima β -frutofuranosidase, o que lhes proporciona uma vantagem competitiva em relação às outras bactérias presentes no intestino humano (KOLIDA ; GIBSON,2007)

Comercialmente a inulina está disponível na forma de pó branco, sem odor e alta pureza . A inulina é ligeiramente doce, podendo ser combinada com outros ingredientes sem alterar o sabor dos produtos (SHOAIB et al, 2016)

As principais aplicações de inulina estão relacionadas às suas propriedades nutricionais como fibra dietética, que apresenta propriedade funcional como prebiótico e propriedade tecnológica, como substituto para gordura em produtos lácteos, sobremesas, recheios e molhos (KAUR ; GUPTA, 2002).

A inulina ingerida é fermentada pelas bactérias benéficas presentes no cólon de modo que a energia derivada da fermentação é em grande parte resultado da produção de ácidos graxos de cadeia curta, que são metabolizados e contribuem com 1,5 kcal / g. Outros subprodutos da fermentação incluem biomassa e gases (SAMANTA et al., 2013).

Devido à não-digestibilidade da inulina, vários estudos apontam seu consumo adequados para pacientes diabéticos. Na pesquisa realizada por Pourghassem et al. (2013) a inulina diminuiu os níveis glicose sérica e aumentou os níveis de antioxidantes e não estimulou a secreção de insulina e não influenciou na secreção de glucagon.

Segundo Miremadi e Shah (2012) a eficácia da ingestão de inulina foi demonstrada em diversos estudos in vivo e in vitro evidenciando a inulina como agente bifidogênico, atuando no alívio da constipação, no aumento da absorção de minerais, na modulação do nível hormonal de insulina e glucagon, na redução dos níveis de triglicerídeos no sangue e redução da incidência de câncer de colón.

2.4.3 Frutooligossacarídeo – FOS

Frutooligossacarídeos são oligômeros de frutose compostos de 1-kestose, nistose e frutofuranosil nistose, em que as unidades de frutossil são ligadas na posição beta- 2,1 da sacarose, apresentando grau de polimerização variando entre 2 a 10 (Figura 3). São encontrados em uma grande variedade de plantas, sobretudo em alcachofras, aspargos, beterraba, chicória, banana, alho, mel (SABATER-MOLINA e al.,2009).

Figura 3. Estrutura química FOS (GF₂: 1-kestose, GF₃: nistose, GF₄: 1-frutofuranosil-nistose)

Figura 3-Estrutura Química do Frutooligossacarídeo

Fonte: (PASSOS; PARK, 2003)

O FOS pode ser sintetizado a partir de sacarose através da reação transfrutossilacção catalisada pelas enzimas frutossiltransferase (CE 2.4.1.9) e / ou β -frutofuranosidase (CE 3.2.1.26) derivada a partir de plantas e micro-organismos. A maioria destas enzimas tem sido encontrada em fungos, tais como *Aureobasidium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. (DOMINGUEZ et al., 2012; SANGEETHA et al., 2005). O FOS pode também ser produzido a partir da hidrólise da inulina por endoinulinases (SINGH et al., 2006).

O FOS tem sido empregado para incorporar produtos lácteos e melhorar a umectância de produtos de panificação, diminuir o ponto de congelamento de sobremesas congeladas, fornecer crocância a biscoitos de baixo teor de gordura. Em relação ao poder adoçante, corresponde cerca de 30-50% ao da sacarose e têm sido utilizado como adoçante

funcional, pois apresenta baixa caloria e não cariogenicidade (BIEDRZYCKA e BIELECKA, 2004).

Barrangou et al. (2003) constataram que bifidobactérias sintetizam as enzimas hidrolíticas β -fructosidase, que hidrolisam frutooligossacarídeos, ao contrário das enzimas digestivas de humanos e animais. Assim a utilização do FOS pelos probióticos ocorre em duas etapas, sendo que na primeira os monômeros são hidrolisados pela enzimas e em seguida são fermentados produzindo ácidos graxos voláteis, tais como acetato, propionato e butirato, e gases (H_2 , CO_2 , CH_4). Estes ácidos são fontes de energia de bifidobactérias atuando como promotores do seu crescimento (BORNET et al., 2002).

Além do efeito bifidogênico, a ingestão de FOS tem sido associada com diminuição do nível de colesterol no sangue, melhor absorção de minerais, modulação do sistema imune e alívio da constipação (SABATER-MOLINA, 2009).

O FOS mostrou-se eficaz na inibição da colonização do TGI por *Clostridium difficile* (HOPKINS;MACFARLANE, 2003) *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium* (BUDDINGTON et al., 2002).

2.4.4 Polidextrose

A polidextrose (PDX) é um polímero de glicose altamente ramificado, ligado de forma aleatória (Figura 4), formando cadeias com ligações do tipo α 1-6 predominantemente, com grau de polimerização médio de 12 (PUTAALA, 2013).

Figura 4- Estrutura química da Polidextrose

Fonte: (STOWELL, 2009)

Foi originalmente desenvolvido por cientistas da Pfizer que necessitavam de um agente de volume de baixo teor calórico para ser usado em conjunto com edulcorantes. (STOWELL, 2009).

A polidextrose é regulamentada como aditivo alimentar em mais de 46 países e utilizada há mais de 25 anos em produtos alimentícios como substituto de açúcar e gordura sendo a dose diária recomendada de 50 até 90 gramas (FLOOD et al., 2004) .

A produção de polidextrose se baseia na policondensação térmica a vácuo da glicose com uma pequena quantidade de sorbitol e ácido cítrico como catalisador (CRAIG et al., 2000).

A PDX não é digerida no trato gastrointestinal superior, mas é fermentado lentamente ao longo do cólon. Tem sido amplamente reconhecida como uma fibra solúvel, e em estudos in vitro e in vivo têm demonstrado efeitos fisiológicos associados com esta funcionalidade. Estes efeitos incluem a melhoria do funcionamento do intestino, redução do índice glicêmico e indução da saciedade (TIIHONEN, 2011).

Estudos realizados por Hara et al.(2000), Probert et al.(2004) e Jie et al.(2000), comprovaram o potencial efeito prebiótico de polidextrose como redução do pH fecal , aumento da concentração residual de ácidos orgânicos de cadeia curta, aumento da absorção de cálcio e efeito bifidogênico.

De acordo com Craig et al.(2000) a natureza das ligações glicosídicas na estrutura da polidextrose faz com que esta seja parcialmente fermentada por micro-organismos intestinais e resistente ao ataque enzimático do TGI .

2.4.5 Goma arábica

A goma arábica (ou Goma acácia) é um exsudato seco obtido a partir dos caules e ramos da Acácia Senegal. Apresenta coloração branco-pálido a alaranjado-castanho, sendo comercialmente disponível sob a forma de flocos, grânulos e em pó (PHILLIPS et al., 2008).

É constituída por uma mistura de polissacarídeos (componente principal) além de oligossacarídeos e glicoproteínas; no entanto, a sua composição pode variar de acordo com sua fonte, clima e solo (GOODRUM et al., 2000)(BABIKER et al., 2012).

Possui propriedade tecnológica em alimentos de emulsificante, estabilizante e espessante e tem sido considerado como uma fibra dietética pela *Food and Drug Administration* (FDA), desde a década de 1970 (BABIKER et al., 2012).

Tem sido demonstrado ser uma fibra dietética prebiótica (CALAME et al., 2008) sendo capaz de aumentar seletivamente a proporção de bactérias lácticas e bifidobactérias em indivíduos saudáveis. A goma arábica é fermentada lentamente, produzindo ácidos graxos de cadeia curta. Além disso, a sua tolerância intestinal é elevada e doses diárias podem ser consumidas sem eventos adversos intestinais (CHERBUT et al., 2009).

Alguns dos efeitos da goma arábica na saúde humana incluem a redução no nível de colesterol no plasma em seres humanos (MOHAMED, 2015), o efeito anticancerígeno (NASIR et al., 2010) e efeito antioxidante com um papel de proteção contra doenças hepáticas e cardíacas (AL-MAJED et al., 2002).

2.4.6 Lactitol

Lactitol (4-O- β -D-Galactopiranosil-D-sorbitol) é um poliol solúvel e não absorvível, de baixo valor calórico. (FINNEY et al., 2007) (figura 5).

Figura 5- Fórmula Estrutural do lactitol

Fonte : (ZACHARIS, 2012)

É aprovado para uso em alimentos em muitos países, incluindo o Brasil, União Europeia, Estados Unidos, Canadá, Japão, vários países no Sudeste Asiático, Israel e Suíça (DRAKOULARAKOU et al., 2007)

Pode ser utilizado em combinações com outros adoçantes, pois apresenta cerca de 40% do poder adoçante da sacarose, não cariogenicidade e também exerce a função de prolongar a vida útil dos alimentos sendo um composto que se mantém estável sob condições ácidas e alcalinas e sob altas temperaturas utilizadas no preparo dos alimentos (LIVESEY, 2003).

Como medicamento, o lactitol apresenta efeito laxativo, sendo empregado no tratamento das constipações funcionais e de encefalopatia hepática.

Segundo Drakoularakou et al.(2007) o lactitol apresenta evidências científicas como um prebiótico emergente. Apresenta resistência às enzimas digestivas, sendo que menos de 2 % do lactitol é hidrolisado ou absorvido. Lactitol promove o aumento de ácidos graxos de cadeia curta, como ácido acético e ácido láctico.

O efeito do lactitol sobre a cepa *Lactobacillus Acidophilus* NCFM foi estudado por Mäkituokko et al.,(2010). Através de uma simulação do colón, os autores observaram que houve um aumento da quantidade de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e uma diminuição em agentes patogênicos potenciais, tais como *Clostridium*.

Chen et al.(2007) investigaram os efeitos de lactitol na microbiota intestinal e sobre os níveis de endotoxina em 60 pacientes com hepatite viral crônica durante 3 semanas. Os resultados revelaram que os pacientes que receberam lactitol apresentaram populações de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* significativamente aumentada ($p < 0,01$) e a população de *Clostridium perfringens* foi reduzido significativamente ($p < 0,001$). Os níveis de endotoxinas no plasma diminuíram após o tratamento passando de 72,89 ng / L para 33,33 ng / L no grupo que recebeu lactitol e de 66,00 ng / L para 51,07 ng / L no grupo controle.

Assim como a grande maioria dos poliois, o lactitol quando ingerido exibe uma resposta glicêmica substancialmente menor além de um baixo valor calórico, quando comparado a glicose ou sacarose, sendo assim indicado para pessoas com diabetes (ZACHARIS,2012).

2.4.7 Estévia

Estévia rebaudiana (Figura 6) é uma planta pertencente à família *Asteraceae*. Seu nome provém do botânico espanhol P.J.Stevus, que foi o pioneiro no estudo com as várias espécies pertencentes ao gênero *Stevia* (KUMARI, CHANDRA, 2014).

Existem cerca de 110 espécies dentro da família *Stevia*, porém a *Stevia rebaudiana* apresenta o maior nível de doçura e é atualmente a mais empregada como adoçante natural em vários países (GOYAL et al., 2010).

Figura 6- Estrutura química da *Stevia rebaudiana*

Fonte: (LEMUS- MONDACA, 2012)

Em relação à sua composição química a estévia é uma mistura complexa de oito glicosídeos: isoesteviol, esteviosídeo, rebaudiosides (A, B, C, D, E, F), sendo que o esteviosídeo e rebaudisídeo A são os principais metabólitos, pois apresentam um poder adoçante de 250 a 300 vezes em relação à sacarose. Devido à presença de alguns óleos essenciais, taninos e flavonoides a estévia apresenta um moderado sabor amargo (GUPTA et al., 2013).

Segundo o estudo de Abou-Arab et al (2010) a estévia rebaudiana é fonte de carboidratos, proteína, fibra e minerais como potássio, cálcio, magnésio, manganês, ferro e zinco. Os autores também constataram a presença de aminoácidos essenciais que foram encontrados em quantidades maiores do que os recomendados pela FAO e OMS.

Estudos apontam o uso medicinal da estévia auxiliando no tratamento de doenças como diabetes, doenças cardiovasculares, câncer, doença renal, obesidade, doença inflamatória intestinal e na prevenção de cáries dentárias (GUPTA et al., 2013).

Lopes et al.(2017) constataram em seu trabalho que os resíduos agroindustriais resultantes do beneficiamento da estévia pode ser fonte natural de carboidratos do tipo frutanos como FOS e inulina. A partir deste resíduo os autores obtiveram inulina com grau de polimerização 12 e FOS com grau de polimerização menor do que 6.

Apesar de conter carboidratos do tipo frutano em sua composição, poucos são os trabalhos contidos na literatura que abordam o efeito prebiótico da estévia.

Weber e Hekmat (2013) desenvolveram um iogurte probiótico adoçado com estévia e analisaram o crescimento e a sobrevivência do micro-organismo *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 obtendo resultados que mostraram que a estévia não prejudicou a sobrevivência deste micro-organismo durante o prazo de 28 dias do experimento.

Esmerino et al.(2013) formularam um *petit-suisse* adicionado os probiótico *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* adoçado com estévia , também observaram que a estévia durante o armazenamento do produto durante 30 dias a estévia não afetou o crescimento deste micro-organismos probióticos.

2.5 ALIMENTOS SIMBIÓTICOS

Quando probióticos e prebióticos são usados em combinação, são conhecidos como simbióticos (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

Segundo Kolida e Gibson (2011, p.377) existem dois tipos de abordagem simbiótica:

- Complementar:

Através do qual o probiótico é escolhido com base nos efeitos benéficos desejados específicos no hospedeiro, e o prebiótico é selecionado de forma independente para aumentar seletivamente as concentrações dos micro-organismos benéficos presentes na microbiota intestinal. O prebiótico pode promover o crescimento e atividade do probiótico, mas apenas indiretamente, como parte de sua meta.

- Sinérgica

Quando o probiótico é novamente escolhido com base nos efeitos benéficos específicos sobre o hospedeiro, mas o prebiótico é escolhido especificamente para estimular o crescimento e atividade da cepa probiótica selecionada. Neste caso, o prebiótico é selecionado para ter uma afinidade mais elevada para o probiótico escolhido e para melhorar a sua sobrevivência e crescimento dentro do organismo hospedeiro. Também pode aumentar os níveis de microbiota benéfica do trato-gastrointestinal, mas o alvo principal é o probiótico selecionado.

Um simbiótico contendo *Lactobacillus acidophilus* e FOS foi estudado por Gmeiner et al.(2000), num modelo in vitro do intestino humano em reator SHIME. O simbiótico resultou em níveis mais elevados de lactobacilos (aumento de 0,89 log) no cólon ascendente.

A associação simbiótica entre o probiótico *Bifidobacterium longum* e o prebiótico FOS foi estudada por Colecchia et al.(2006). Um total de 636 pacientes com síndrome do intestino irritável receberam 3 g por dia de um suplemento dietético composto por *Bifidobacterium longum* e FOS durante cinco semanas. Os resultados mostraram aumento da frequência das fezes em pacientes com sintomas de constipação e redução da dor e inchaço abdominal.

O interesse de uma associação simbiótica sobre o sistema imunológico foi confirmada por um estudo duplo-cego randomizado, placebo-controlado realizado por Durand (2009). O autor analisou um grupo de 135 crianças de 3 a 7 anos de idade, que ingeriram diariamente 3.10^9 UFC de *Lactobacillus helveticus* e *Bifidobacterium infantis* e 0,75 g de FOS durante 3 meses do inverno. A redução do risco relativo para uma criança ter pelo menos um problema de saúde, relacionado ao trato respiratório como também ao trato gastrointestinal foi reduzido em 25% com a suplementação simbiótica na comparação com o placebo.

Adebola et al.(2014) avaliaram o efeito do simbiótico constituído de inulina e lactulose juntamente com cinco cepas de lactobacilos probióticos. Observaram que, das cepas avaliadas, três (*L. acidophilus* NCTC 1723, *L. delbrueckii ss bulgaricus* NCTC 12712 e *L. brevis* NCIMB 11973) não utilizaram lactulose e inulina como fonte de carbono, apresentando crescimento inferior a 20% em comparação com o crescimento na presença de glicose. Assim, os autores concluíram que embora preparações simbióticas sejam cada vez mais utilizadas, os benefícios potenciais para a saúde do intestino pode ser limitada, pois apenas combinações específicas podem influenciar positivamente no crescimento e sobrevivência do probiótico.

Ferreira e Teshima (2000) ressaltam que, para a formulação de um alimento simbiótico, é necessária a seleção de linhagens de micro-organismos com melhor capacidade de utilização de um determinado prebiótico, para obter o efeito sinérgico esperado. Assim, é fundamental a condução de estudos com vistas a se identificar a melhor combinação de pro e prebióticos nas respectivas formulações simbióticas.

No mercado americano, há diversos produtos com propriedade simbiótica que podem ser encontrados, de modo a exemplificar: iogurte *Fiber One* (contendo *Lactobacillus acidophilus* com 5 g de inulina), formula infantil *Happy Bellies* (com prebiótico inulina e Fos e probióticos *L.acidophilis*, *L.salivarium*, *L .plantarum*) leite em pó *Nido* (com Inulina e *Lactobacillus paracasei*) e barra de cereal *The complete Bar* (com FOS e *Bifidobacterium*) (ZACARCHENCO et al., 2014).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Probióticos da Escola de Engenharia de Lorena EEL/USP

3.1 MICRO-ORGANISMOS

Neste estudo foram avaliadas 5 cepas de *Lactobacillus* a saber: *L. plantarum* ATCC 8014, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV H2B20, *L. fermentum* ATCC 9338, *L. casei* ATCC 7469 pertencentes a coleção de culturas do Laboratório de Probióticos da Escola de Engenharia de Lorena EEL-USP. As culturas, mantidas em 20% de glicerol, foram reativadas a 37°C por 24 h em caldo MRS esterilizado a 121 °C por 15 min, constituído de peptona (10 g/ L) extrato de carne (10g/L), extrato de levedura (5g/L), glicose (20g/L) fosfato dipotássio (2 g/L), acetato de sódio trihidratado (5g/L), citrato triamônico (2g/L), sulfato de magnésio heptahidratado (0,1 g/L), sulfato de manganês (0,05 g/L) e Tween 80 (1ml/L).

3.2 COMPOSTOS PREBIÓTICOS

Os compostos prebióticos comerciais avaliados no presente trabalho encontram-se apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Características dos compostos prebióticos avaliados

Prebiótico	Marca /Empresa	Grau de Pureza
Inulina	Orafiti/Clarifiant	95%
FOS	NutraFlora/Ingredion	95%
Polidextrose	Litesse/Dupont Danisco	90%
Goma Arábica	Synth	99%
Lactitol	Osmolac	99%
Stevia	Lowçucar	95%

3.3 Avaliação do efeito dos compostos prebióticos sobre o crescimento das cepas de *Lactobacillus*

Nesta etapa o crescimento das referidas cepas de *Lactobacillus* na presença dos respectivos compostos prebióticos comerciais foi determinado por meio da metodologia

descrita por Saminathan et al (2011). Assim, em tubos de ensaio de 20 ml foram adicionados 5 ml do caldo MRS sem glicose, esterilizado a 121°C durante 15 minutos contendo os referidos compostos prebióticos na concentração de 2 %. Esta concentração foi baseada na concentração de glicose (20g/litro) presente no meio MRS basal.

Posteriormente inoculou-se 50 µL de suspensão celular das respectivas cepas de *Lactobacillus* previamente ativadas em caldo MRS, por 24 horas a 37°C contendo aproximadamente 10⁹ UFC/ mL, verificada por meio do plaqueamento *pour plate*.

Na sequência, os tubos, devidamente inoculados, foram incubados a 37 °C por 24 h, após o que foram agitados em vortex por 10 segundos. O desempenho das respectivas cepas foi verificado por meio da determinação, em triplicata, da densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro Genesys 10 s UV-vis da marca Thermo Scientific utilizando como branco caldo MRS contendo 2% dos respectivos compostos prebióticos, sem inoculação. Curvas de calibração para cada cepa de *Lactobacillus* foram devidamente confeccionadas visando estabelecer a relação entre densidade óptica e UFC/mL. Para suspensões celulares com D.O superior a 0.4 foram feitas diluições (1: 25);

3.4 Planejamento experimental

A partir dos resultados obtidos na etapa anterior (3.3), selecionou os três compostos prebióticos que proporcionaram efeito positivo no crescimento das respectivas cepas de *Lactobacillus*. Desta forma, avaliou-se o efeito destes compostos, de forma combinada e variando as concentrações de 0 a 4% de acordo com planejamento composto central (Tabela 2) com três réplicas no ponto central. Esta faixa de concentração de 0 a 4% foi estabelecida em conformidade com os experimentos desenvolvidos por Ivanovska et al.(2012) que avaliaram o efeito de diferentes concentrações de FOS (1,5% 3,0% e 5,0%) sobre a viabilidade de *L.casei* micro encapsulado, constatando declínio do crescimento de *L.casei* na concentração de 5% .

As variáveis independentes, X₁, X₂, X₃, foram estudadas em 5 níveis de concentração (0 % ;0.81 % ; 2 %; 3.19 %; 4 %) sendo estes valores obtidos por meio do programa estatístico Design Expert 6.0 .As superfícies de resposta foram obtidas utilizando o pacote estatístico Design Expert 6.0.

Neste experimento o caldo MRS (sem glicose) foi suplementado com os respectivos pebióticos que foram devidamente pesados nas concentrações estabelecidas pelo planejamento experimental para cada ensaio, totalizando 17 ensaios para cada cepa. O

referido meio (5mL) foi colocado em tubos de ensaio de 20 mL e esterilizada a 121°C por 15 minutos.

Posteriormente, em cada tubo, foram inoculados 50 µl (1%) das culturas de *Lactobacillus* previamente ativadas, contendo aproximadamente 10^9 UFC/ mL, seguido de incubação a 37 ° C por 24 h.

Após 24 h, os tubos foram agitados em vortex por 10 segundos e determinou-se a densidade óptica a 600 nm, realizada em triplicata, em espectrofotômetro Genesys 10 s UV-vis da marca Thermo Scientific utilizando como branco, o caldo MRS contendo os compostos prebióticos nas respectivas concentrações, sem inoculação.

Tabela 2-Planejamento experimental para avaliação do efeito de compostos prebióticos sobre o crescimento das cepas de *Lactobacillus*

Ensaios	Codificada x1	Codificada X2	Codificada X3	Composto 1 (%)	Composto 2 (%)	Composto 3 (%)
1	-1	-1	-1	0.81	0.81	0.81
2	+1	-1	-1	3.19	0.81	0.81
3	-1	+1	-1	0.81	3.19	0.81
4	+1	+1	-1	3.19	3.19	0.81
5	-1	-1	+1	0.81	0.81	3.19
6	+1	-1	+1	3.19	0.81	3.19
7	-1	+1	+1	0.81	3.19	3.19
8	+1	+1	+1	3.19	3.19	3.19
9	-1.68	0	0	0	2	2
10	+1.68	0	0	4	2	2
11	0	-1.68	0	2	0	2
12	0	+1.68	0	2	4	2
13	0	0	-1.68	2	2	0
14	0	0	+1.68	2	2	4
15	0	0	0	2	2	2
16	0	0	0	2	2	2
17	0	0	0	2	2	2

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O efeito dos compostos prebióticos sobre o crescimento das cepas de *Lactobacillus* foi verificado por meio da análise estatística dos resultados através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de significância 95% utilizando o programa de software STATISTICA 7.0.

Os resultados relativos ao planejamento composto central foram estatisticamente avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) ao nível de significância de 95% utilizando o programa de software STATISTICA 7.0 e o programa Design Expert 6.0

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito dos compostos prebióticos sobre o crescimento das cepas de *Lactobacillus*

Os resultados referentes ao efeito dos compostos prebióticos sobre o crescimento das cinco cepas de *Lactobacillus* avaliadas no presente trabalho encontram-se apresentados na Tabela 3. Observa-se que as cepas apresentaram crescimento nos diferentes meios, mostrando melhor desempenho nos meios contendo glicose (controle), inulina e FOS e baixo desempenho nos meios contendo estévia, goma arábica e lactitol. Neste contexto é válido ressaltar que o valor médio de 1 DO equivale a aproximadamente 9.5×10^9 UFC/mL (apêndice A).

Tabela 3- Valores de DO (600 nm) relativos ao desempenho de cepas de *Lactobacillus* em caldo MRS contendo diferentes compostos prebióticos na concentração de 2%, após 24 hrs de incubação a 37°C.

Cepa	Glicose	Inulina	FOS	PDX	Estévia	Goma arábica	Lactitol
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	4,69 ^A ±0.02	3,96 ^B ±0.02	3,16 ^C ±0.00	0,82 ^D ±0.03	0,42 ^E ±0.01	0,38 ^F ±0.02	0,35 ^G ±0.02
<i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20	4,56 ^A ±0.05	4,31 ^B ±0.02	3,90 ^C ±0.01	0,83 ^D ±0.01	0,48 ^E ±0.03	0,40 ^{FG} ±0.05	0,40 ^{GF} ±0.02
<i>L. fermentum</i> ATCC 9338	4,89 ^A ±0.00	4,56 ^B ±0.01	4,04 ^C ±0.03	0,83 ^D ±0.01	0,47 ^E ±0.01	0,40 ^{FG} ±0.00	0,40 ^{GF} ±0.01
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	4,51 ^A ±0.03	4,07 ^B ±0.01	3,35 ^C ±0.02	0,82 ^D ±0.05	0,45 ^E ±0.01	0,36 ^F ±0.01	0,35 ^G ±0.02
<i>L. casei</i> ATCC 7469	4,47 ^A ±0.02	4,56 ^B ±0.03	3,60 ^C ±0.04	0,90 ^D ±0.01	0,60 ^E ±0.05	0,38 ^F ±0.01	0,41 ^G ±0.02

Valores médios da triplicata ± desvio padrão. Letras diferentes = resultados significativamente diferentes (P<0.05). 1 DO = 9.5×10^9 UFC/mL

Considerando o meio MRS contendo glicose (controle) como fonte de carbono e os meios contendo 2% de FOS e 2% de inulina, verifica-se uma boa capacidade de assimilação destes prebióticos pelas cepas estudadas. Verifica-se ainda que para as cinco cepas avaliadas o crescimento nos meios contendo 2% de estévia, goma arábica e lactitol foi estatisticamente inferior em relação ao meio com glicose (controle), correspondendo à aproximadamente a um fator de 10 vezes menor. Este resultado demonstra a deficiência por parte das cepas estudadas em metabolizar estes compostos. Quanto ao desempenho das cepas em meio contendo 2% de polidextrose, verifica-se valores de densidade óptica entre 0.8 e 0.9, cerca de cinco vezes inferior ao crescimento obtido em glicose (controle).

Entretanto estes valores de D.O correspondem a aproximadamente o dobro em relação aos valores obtidos nos meios contendo 2% de estévia, goma arábica e lactitol.

No tocante ao desempenho das cepas de *Lactobacillus* avaliadas em meio MRS contendo 2% de inulina e 2 % de FOS verifica-se que os resultados obtidos foram consistentes com os resultados reportados por Sims et al.(2014), que avaliaram a capacidade das cepas *Lactobacillus rhamnosus* HN001 e *L. acidophilus* NCFM de fermentar fruto-oligossacarídeos (FOS) e inulina em meio MRS na concentração de 1%. Estes autores reportaram, respectivamente, valores de D.O = 2,0 e 2,5 para *L.rhamnosus* HN001 e *L.acidophilus* em meio contendo 1% de inulina e em meio contendo 1% de FOS estes valores corresponderam a D.O = 3.0 e 2,0.

Resultados semelhantes foram reportados por Rurangwa et al. (2009), que avaliaram o desempenho das cepas *Lactobacillus delbrueckii* subsp.lactis e *Lactobacillus plantarum* LMG 9211 em caldo MRS contendo 1 % de FOS e 1 % de inulina, obtendo valor de D.O = 1,6 para a cepa *Lactobacillus delbrueckii* subsp.lactis em meio contendo FOS e inulina e D.O = 1.4 e 1.6 para *Lactobacillus plantarum* LMG 9211, nos respectivos meios, tendo como controle o caldo MRS contendo 1 % de glicose, cuja D.O foi de 2.5

Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a assimilação de carboidratos complexos, por espécies de micro-organismos probióticos. De acordo com Barrangou et al. (2003) para metabolizar FOS e inulina como substrato algumas espécies de micro-organismos devem apresentar a capacidade de hidrolisar as ligações β (2 - 1), resultando na formação de monômeros por meio da ação das enzimas da família β -fructosidase as quais incluem EC 3.2.1.26, inulinase EC 3.2.1.7, levanase EC 3.2.1.65, fructofuranosidase EC 3.2.1.2.6. , frutanase EC 3.2.1.80.

Considerando os resultados mostrados na Tabela 3, conclui-se que o melhor desempenho das respectivas cepas em meio contendo FOS e inulina revela a capacidade das mesmas de sintetizar enzimas da família β -fructosidase.

Rossi et al.(2005) avaliaram o metabolismo de espécies de bifidobacteria na presença de FOS, bem como a indução da síntese de enzimas envolvidas neste processo. Os autores reportaram que as células transportam FOS para o seu interior e depois os hidrolisam por meio de enzimas intracelulares da família β -fructosidase.

Takagi et al.(2014) estudaram o crescimento de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* e *L. paracasei* KTN-5 em meio MRS contendo 2% de inulina avaliando o consumo deste prebiótico por meio de cromatografia em camada fina. Os resultados revelaram que a cepa *L. paracasei* KTN-5 metabolizou inulina por meio de enzimas extracelulares, liberando

moléculas de frutose e sacarose, que posteriormente são transportadas para o interior das células para serem metabolizadas.

O melhor desempenho das cepas de *Lactobacillus* em meio contendo glicose (controle) observado no presente trabalho (Tabela 3) foi também reportado por Saminathan et al.(2010) para as cepas *L. reuteri*, *L.salivarius*, *L.brevis*, *L.gallinarum*. Estes autores observaram melhor desempenho das cepas em meio MRS suplementado com 1% de glicose quando comparado com o meio MRS suplementado com 1% de xilooligossacarídeos, FOS, galactooligossacarídeos, lactulose, isomaltoligossacarídeos. Dentre as cepas avaliadas destaca-se *Lactobacillus salivarius* l 24 que em meio contendo glicose e em meio contendo FOS apresentou valores de DO de 1.85 e 1.55, respectivamente. O crescimento expressivo observado em meio contendo glicose, segundo Yeo e Liong (2010) se deve ao fato da glicose ser um monossacarídeo, facilmente fermentável, não necessitando ser hidrolisado, além de ser metabolizada por uma gama de espécies de micro-organismos.

No que se refere ao crescimento das cinco cepas em meio MRS contendo 2% de polidextrose (Tabela 3), destaca-se que Forssten et al.(2015) também observaram um baixo crescimento das cepas *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus acidophilus* em meio contendo 2% de polidextrose em relação ao controle. No entanto os autores também investigaram o efeito da concentração de 4 % de polidextrose e observaram que esta concentração proporcionou crescimento significativo e concluíram ser necessária uma concentração mais alta para que o PDX seja metabolizado como substrato prebiótico.

Evidencia-se também que polidextrose é uma molécula de estrutura complexa e ramificada que apresenta ligações β 2-1 e ligações α 1-6, diferentemente da inulina e FOS onde prevalecem ligações β 2,1(LAHTINEN et al., 2010). Provavelmente as ligações α 1-6 dificultam a hidrólise total da polidextrose pelas cepas estudadas.

No tocante a assimilação de estévia, verifica-se (Tabela 3) que as cepas de *Lactobacillus* avaliadas não foram capazes de se desenvolver satisfatoriamente na presença deste composto. Neste contexto vale destacar a carência de trabalhos avaliando estévia como prebiótico, sendo este um dos fatores que estimulou na escolha da estévia para ser analisada no presente trabalho, além de se considerar que estévia encontra ampla aplicação na indústria alimentícia como edulcorante natural.

Denina et al.(2013) avaliaram a influência de estévia, em quatro níveis (0.2 %, 0.6% ,1 % e 2%), sobre o crescimento de seis cepas de *Lactobacillus reuteri*, obtendo densidade óptica máxima de 0.6 para concentração de 0.2% sendo que este parâmetro foi

inversamente proporcional a concentração de estévia. Os autores concluíram que estévia exerceu um efeito inibitório no crescimento e também sobre a produção de ácidos orgânicos de cadeia curta por parte das cepas de *L.reuteri* avaliadas.

Em contrapartida, Tomita et al.(1997) avaliaram a atividade bactericida da estévia em relação as bactérias patogênicas *Escherichia coli* , *Salmonella*, *Bacillus cereus* e sobre o crescimento de cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* , *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium longum*. Os autores observaram o efeito bactericida nas concentrações avaliadas variando de 10 a 50% sobre as bactérias patogênicas, embora não identificaram o princípio ativo presente no extrato de estévia responsável por este efeito. No entanto os autores observaram uma elevada acidez e consequente redução do pH para 4.1, fato este que segundo os autores possa ter contribuído para atividade bactericida exercida por este composto. Referente às cepas probióticas, os autores constataram que mesmo em concentrações mais altas não afetaram a sobrevivência destes micro-organismos. De acordo com Gibson et al.(2004) um dos requisitos para um composto ser definido como prebiótico é ser um substrato seletivo para um número limitado de bactérias. Neste contexto, ressalta-se o potencial da estévia neste quesito uma vez que não foi fermentada pelas bactérias patogênicas, além de ter revelado efeito bactericida. Deste modo, novas pesquisas devem ser desenvolvidas visando explorar o potencial prebiótico da estévia.

No que se refere aos resultados referentes ao desempenho das cepas avaliadas em meio contendo goma arábica, verifica-se (Tabela 3) que este foi limitado em relação ao controle.

Resultados diferentes foram obtidos por Calame et al.(2009) e Cherburt (2013), os quais analisaram o efeito da ingestão de 10 gramas de goma arábica por dia, observando um aumento significativo na população de espécies de bifidobactéria e lactobacilos presentes no TGI de seres humanos saudáveis . Ressalta-se que na literatura pesquisada não foram encontrados pesquisas avaliando o efeito prebiótico (*in vitro*) da goma arábica sobre uma única cepa probiótica.

No tocante a avaliação do desempenho das respectivas cepas probióticas em meio contendo lactitol (Tabela 3) observa-se que este composto conferiu o pior crescimento das cepas estudadas. Majunder et al.(2011) analisando o efeito prebiótico do lactitol na concentração de 1% sobre o crescimento da cepa *L. acidophilus* NCFM reportaram uma densidade óptica a 600 nm de 0.4 e para glicose 2.0. Os autores também estudaram o

metabolismo do lactitol, por meio da análise de proteoma, onde constataram que enzimas responsáveis pela utilização de lactitol são as mesmas envolvidas no metabolismo da lactose pela via de Leloir, destacando a ação da enzima galactosidase gerando glicose e galactose. Os autores não encontraram a enzima fosfo- β -galactosidase que resulta na produção de glicose e galactose-6-P. Em relação ao sorbitol, os autores detectaram o composto Glucitol-6-P que deveria ser convertido em β -D-frutose-6-P pela enzima 6-fosfogluconato desidrogenase, a qual não foi identificada na análise de proteoma. Segundo os autores, β -D-Fructose-6-P é o metabolito central que entra na via glicolítica, o que possivelmente a sua ausência teria acarretado no baixo crescimento. Por outro lado, na presença de lactitol observaram-se as proteínas denominadas EF-Tu (cuja sigla significa fator de alongamento Tu) as quais participam dos processos de adesão de micro-organismo no trato gastrointestinal, fato este que elucida porque o lactitol no TGI auxilia na promoção do crescimento da comunidade bacteriana probiótica como constatado no trabalho de Ballongue et al. (1997) que observaram que a ingestão de 10 gramas de lactitol por 36 voluntários proporcionou o aumento das bactérias probióticas do TGI.

Saarela et al. (2003) também estudaram o efeito do lactitol no crescimento das cepas *L.rhamnoseus* E-97800, *L.paracasei* E-97949 e *L.salivarius* E-981006, e observaram que a cepa *L.rhamnosus* apresentou bom desempenho em meio contendo 2% de lactitol (DO = 1.2), no entanto para as cepas *L.paracasei* e *L.salivarius* o crescimento foi menor (DO = 0.6). Considerando os resultados relativos ao desempenho das cepas de *Lactobacillus* avaliadas, mostrados na Tabela 3, selecionou-se inulina, FOS e polidextrose para dar continuidade aos experimentos.

4.2 Avaliação do desempenho das cepas de *Lactobacillus* em caldo MRS na presença de inulina, FOS e PDX.

O efeito destes compostos, em diferentes concentrações, sobre o crescimento de *Lactobacillus casei* ATCC 7469 encontra-se mostrado na Tabela 4. Observa-se melhor desempenho desta cepa nas condições descritas no ensaio 3 (0.81 % de FOS, 3.19 % de inulina e 0.81% de PDX) correspondendo a uma DO de 4.90, seguido das condições estabelecidas no ponto central (ensaios 15, 16 e 17), cuja DO variou entre 4,72 a 4,80. Verifica-se também que o menor crescimento foi observado nas condições estabelecidas no ensaio 1, quando os três prebióticos avaliados encontram-se nas menores concentrações cuja DO correspondeu a 4,07.

Tabela 4 -Valores de DO (600 nm) relativos ao desempenho de cepas de *Lactobacillus casei* ATCC 7469 em caldo MRS contendo diferentes concentrações de inulina, FOS e PDX, Após incubação de 24 hrs a 37°C.

Ensaio	FOS (%)	INULINA (%)	PDX (%)	Crescimento D.O 600 nm
1	0.81	0.81	0.81	4,07
2	3.19	0.81	0.81	4,53
3	0.81	3.19	0.81	4,90
4	3.19	3.19	0.81	4,55
5	0.81	0.81	3.19	4,20
6	3.19	0.81	3.19	4,65
7	0.81	3.19	3.19	4,72
8	3.19	3.19	3.19	4,30
9	0	2	2	4,70
10	4	2	2	4,52
11	2	0	2	4,60
12	2	4	2	4,73
13	2	2	0	4,50
14	2	2	4	4,32
15	2	2	2	4,75
16	2	2	2	4,72
17	2	2	2	4,80

A análise estatística destes resultados revelou a existência de um efeito de interação entre estes três compostos sobre a variável resposta (densidade óptica) conforme mostrado na Tabela 5. Estes resultados permitiram ajustar um modelo quadrático que relaciona o crescimento *L.casei* ATCC 7469 com a concentração dos três prebióticos analisados, resultando na Equação 1, onde I = inulina, F= FOS e P =PDX)

$$\text{Densidade óptica} = 3,16230 + 0,47004 \cdot F + 0,63184 \cdot I + 0,47474 \cdot P - 0,042842 \cdot F^2 - 0,0366 \cdot I^2 - 0,09652 \cdot P^2 - 0,15447 \cdot F \cdot I - 4,41353e^{-003} \cdot F \cdot P - 0,053845 \cdot I \cdot P$$

(1)

Tabela 5-Coeficientes para o modelo quadrático relativo ao crescimento da cepa *Lactobacillus casei* ATCC 7469

Fonte	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	p-valor
FOS e inulina	0.35	1	0.35	0.0004 (significativo)
FOS e PDX	0.0008	1	0.0008	0.7710
Inulina e PDX	0.058	1	0.058	0.0369
Regressão	0.76	9	0.084	0.0056 (significativo)
Residual	0.072	7	0.010	
Falta de ajuste	0.069	5	0.014	0.1094 (não significativo)
Erro puro	0.0032	2	0.0007	-
Total	0.83	16	-	-
R ²	0.91	-	-	-

Os resultados mostrados na Tabela 5 revelam que a falta de ajuste ($p=0.069$) para o modelo não foi significativa ao nível de 95% de confiança, sendo o R^2 igual a 0,91.

A interação significativa ao nível de 95% de significância entre os compostos Inulina e FOS permitiu traçar as superfícies de resposta (Figura 7) onde se manteve a concentração de polidextrose nos níveis de 0% (A) 2% (B) e 4% (C). Nota-se que o crescimento máximo estimado de *L. casei* ATCC 7469 seria observado nas menores concentrações de FOS e maiores concentrações de inulina.

A superfície de resposta mostrada na Figura 7 A revela a existência de uma região ótima de crescimento em concentração de inulina acima de 3,5% e ausência de FOS e PDX. Na presença de 2% de polidextrose (Fig. 7 B) observa-se uma nova região ótima de crescimento em concentração de FOS acima de 3.5% . Mantendo PDX na concentração de 4% (figura 7 C) e FOS ou inulina acima de 3%, observa-se um ligeiro declínio no crescimento da cepa *L.casei* ATCC 7469.

Figura 7- Superfícies de Resposta referente ao modelo ajustado para cepa *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Valor de DO em função da concentração de FOS e inulina, mantendo os valores de PDX em A (0%) B(2%) C (4%).

Fonte: O autor

No tocante ao efeito destes compostos sobre o crescimento de *L.plantarum* ATCC 8014 mostrado na Tabela 6, observa-se melhor desempenho desta cepa nas condições descritas no ensaio 3 (0.81 % de FOS, 3.19 % de inulina e 0.81% de PDX) correspondendo a uma DO de 5.0, seguido das condições estabelecidas no ensaio 7, cuja DO correspondeu a 4.87. Verifica-se também que o menor crescimento estimado seria observado nas condições estabelecidas no ensaio 1, quando os três prebióticos avaliados encontram-se nas menores concentrações cuja DO corresponde a 3.95.

A análise estatística destes resultados mostrando o efeito de interação entre estes três compostos sobre a variável resposta (densidade óptica) encontra-se mostrada na Tabela 7. Assim, estes dados permitiram um ajuste de modelo quadrático que relaciona o crescimento *L.plantarum* ATCC 8014 com os prebióticos analisados, resultando na Equação 2, onde I = inulina F = FOS e P= PDX. Observa-se que a falta de ajuste ($p=0.0566$) para o modelo não foi significativa ao nível de 95% de confiança.

$$\text{Densidade óptica} = 2,66913 + 0,61575 \cdot F + 0,90277 \cdot I + 0,58428 \cdot P - 0,053214 \cdot F^2 - 0,066946 \cdot I^2 - 0,11688 \cdot P^2 + 0,19949 \cdot F \cdot I - 0,019420 \cdot F \cdot P - 0,060024 \cdot I \cdot P \quad (2)$$

Observa-se uma interação significativa ($p < 0.05$) ao nível de 95% de confiança entre os compostos Inulina e FOS cujas superfícies de resposta encontram-se representadas na Figura 8, mantendo a concentração de polidetrose nos níveis de 0% (A) 2% (B) e 4% (C). Nota-se que o crescimento máximo de *L. plantarum* ATCC 8014 seria obtido nas condições equivalentes às menores concentrações de FOS e maiores concentrações de inulina, mantendo PDX nas concentrações 0 e 2%.

A superfície de resposta (Fig. 8 A) revela a existência de uma região ótima de crescimento observada em concentração de inulina acima de 3% e na ausência de FOS e PDX. Na presença de 2% de polidextrose (Fig. 8 B)) observa-se uma nova região ótima com FOS na concentração acima de 3.5% Verifica-se na figura 8 C ainda que mantendo PDX na concentração de 4% e FOS ou inulina acima de 3%, um ligeiro declínio no crescimento da cepa *L.platarum* ATCC 8014.

Tabela 6-Valores de DO (600 nm) relativos ao desempenho de cepas de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 em caldo MRS contendo diferentes concentrações de inulina, FOS e PDX.

Ensaio	FOS (%)	INULINA (%)	PDX (%)	Crescimento DO 600 nm
1	0.81	0.81	0.81	3,95
2	3.19	0.81	0.81	4,52
3	0.81	3.19	0.81	5,00
4	3.19	3.19	0.81	4,50
5	0.81	0.81	3.19	4,10
6	3.19	0.81	3.19	4,62
7	0.81	3.19	3.19	4,87
8	3.19	3.19	3.19	4,20
9	0	2	2	4,75
10	4	2	2	4,46
11	2	0	2	4,40
12	2	4	2	4,70
13	2	2	0	4,51
14	2	2	4	4,19
15	2	2	2	4,78
16	2	2	2	4,83
17	2	2	2	4,82

Tabela 7- Coeficientes para o modelo quadrático relativo ao crescimento da cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014

Fonte	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	ρ-valor
FOS e inulina	0.64	1	0.64	0.0001 (significativo)
FOS e PDX	0.006	1	0.006	0.4409
Inulina e PDX	0.058	1	0.058	0.0395
Regressão	1.36	9	0.15	0.0005 (significativo)
Residual	0.061	7	0.00867	
Falta de ajuste	0.059	5	0.012	0.0566 (não significativo)
Erro puro	0.0014	2	0.0007	-
Total	1.42	16	-	-
R ²	0.93	-	-	-

Figura 8-Superfície de Resposta referente ao modelo ajustado para cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 para o valor de DO em função da concentração de FOS e inulina, mantendo o valor de PDX em A (0%) B(2%) C(4%)

Fonte: O autor

O efeito dos compostos prebióticos, em diferentes concentrações, sobre o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 encontra-se mostrado na Tabela 8. Observa-se melhor desempenho desta cepa nas condições descritas no ensaio 7 (0.81 % de FOS, 3.19 % de inulina e 3.19% de PDX) correspondendo a uma DO de 4.92, seguido das condições estabelecidas no ponto central (ensaios 15, 16 e 17), cuja DO variou entre 4,77 e 4,84. Verifica-se também que o menor crescimento foi observado nas condições estabelecidas no ensaio 1, quando os três prebióticos avaliados encontravam-se nas menores concentrações cuja DO correspondeu a 3.9.

A análise estatística destes resultados mostrando o efeito de interação entre estes três compostos sobre a variável resposta (densidade óptica) encontra-se mostrada na Tabela 9. Estes resultados permitiram um ajuste de modelo quadrático que relaciona o crescimento *L.acidophilus* ATCC 4356 com a concentração dos três prebióticos analisados, resultando na equação 3, onde I= inulina F = FOS e P = PDX. Observa-se que a falta de ajuste ($p > 0.05$) para o modelo não foi significativa ao nível de 95% de confiança. O modelo representado pela equação 3, apresenta um valor de R^2 igual a 0,90.

$$\begin{aligned} \text{Densidade óptica} = & 2,62853 + 0,6642 \cdot F + 0,88214 \cdot I + 0,51556 \cdot P - 0,071249 \cdot F^2 - \\ & 0,086229 \cdot I^2 - 0,099961 \cdot P^2 - 0,18978 \cdot F \cdot I - 0,016771 \cdot F \cdot P - 0,022068 \cdot I \cdot P \end{aligned} \quad (3)$$

Observa-se uma interação negativa significativa ($p < 0.05$) ao nível de 95% de confiança entre os compostos Inulina e FOS cujas superfícies de resposta encontram-se representadas na Figura 9, mantendo as concentrações de polidextrose nos níveis 0% (A) 2% (B) e 4% (C). Nota-se (figura 9 A) que o crescimento máximo estimado da cepa *L. acidophilus* ATCC 4356, é obtido nas menores concentrações de FOS e maiores concentrações de inulina, na ausência de PDX. A adição de 2% polidextrose (figura 9B) não provocou alterações no crescimento da referida cepa, mantendo a mesma região ótima observada na superfície de resposta 9 A. No entanto em concentração de PDX em 4% (figura 9 C) e inulina ou FOS acima de 3% observa-se um ligeiro declínio no crescimento da referida cepa.

Tabela 8-Valores de DO (600 nm) relativos ao desempenho de cepas de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 em caldo MRS contendo diferentes concentrações de inulina, FOS e PDX.

Ensaio	FOS (%)	INULINA (%)	PDX (%)	Crescimento D.O 600 nm
1	0.81	0.81	0.81	3,90
2	3.19	0.81	0.81	4,43
3	0.81	3.19	0.81	4,8
4	3.19	3.19	0.81	4,30
5	0.81	0.81	3.19	4,10
6	3.19	0.81	3.19	4,58
7	0.81	3.19	3.19	4,92
8	3.19	3.19	3.19	4,28
9	0	2	2	4,69
10	4	2	2	4,44
11	2	0	2	4,34
12	2	4	2	4,67
13	2	2	0	4,41
14	2	2	4	4,50
15	2	2	2	4,80
16	2	2	2	4,77
17	2	2	2	4,84

Tabela 9- Coeficientes para o modelo quadrático relativo ao crescimento da cepa *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Fonte	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	ρ-valor
Inulina e FOS	0.58	1	0.58	0.0001 (significativo)
FOS e PDX	0.00451	1	0.00451	0.4506
Inulina e PDX	0.0078	1	0.0078	0.3281
Regressão	1.22	9	0.14	0.0004 (significativo)
Residual	0.048	7	0.00687	
Falta de ajuste	0.046	5	0.00912	0.1233 (não significativo)
Erro puro	0.0024	2	0.0012	-
Total	1.26	16	-	-
R ²	0.90	-	-	-

Figura 9 -Superfície de Resposta referente ao modelo ajustado para cepa *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 para o valor de DO em função da concentração de FOS e inulina, mantendo o valor de PDX A (0%) B (2%) C (4%).

Fonte: O autor

No tocante ao efeito destes compostos, em diferentes concentrações, sobre o crescimento de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 mostrado na Tabela 10, observa-se melhor desempenho desta cepa nas condições descritas no ensaio 3 (0.81 % de FOS, 3.19 % de inulina e 0.81% de PDX) correspondendo a uma DO de 4.89, seguido das condições estabelecidas no ensaio 7, cuja DO foi 4.85. Verifica-se também que o menor crescimento seria observado nas condições estabelecidas no ensaio 1, quando os três prebióticos avaliados encontram-se nas menores concentrações cuja DO corresponde a 4.1.

A análise estatística destes resultados revela o efeito de interação negativa entre estes três compostos sobre a variável resposta (densidade óptica) encontra-se mostrada na Tabela 11. Estes dados permitiram um ajuste de modelo quadrático que relaciona o crescimento de *L.delbrueckii* UFV H2B20 com a concentração dos três prebióticos analisados, resultando na equação 4, onde I = inulina, F = FOS e P = PDX.

Observa-se que a falta de ajuste ($p > 0.05$) para o modelo não foi significativa ao nível de 95% de confiança. O modelo proposto apresenta um valor de R^2 igual a 0,87.

$$\text{Densidade óptica} = 3,08021 + 0,45991 \cdot F + 0,74142 \cdot I + 0,46899 \cdot P - 0,031389 \cdot F^2 - 0,070088 \cdot I^2 - 0,090061 \cdot P^2 - 0,16683 \cdot F \cdot I - 0,013241 \cdot F \cdot P - 0,039722 \cdot I \cdot P$$

(4)

Observa-se uma interação negativa significativa ($p < 0.05$) ao nível de 95% de confiança entre os compostos Inulina e FOS cujas superfícies de resposta encontram-se representadas na Figura 10, mantendo a concentração de polidextrose no nível 0% (A) 2% (B) e 4% (C). Nota-se que o crescimento máximo da cepa *L. delbrueckii* UFV H2B20, seria obtido nas menores concentrações de FOS e maiores concentrações de inulina na ausência de PDX.

A superfície de resposta mostrada na Figura 10 A revela a existência de uma região ótima de crescimento observada com concentração de inulina acima de 3% e ausência de FOS. Na presença de 2 % de polidextrose (Fig. 10 B) uma nova região ótima é observada com FOS na concentração acima de 3.5 %. Mantendo polidextrose em 4% (Fig. 10 C) e FOS acima de 3%, observa-se um ligeiro declínio no crescimento da cepa *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20.

Tabela 10- Valores de DO (600 nm) relativos ao desempenho de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 em caldo MRS contendo diferentes concentrações de inulina, FOS e PDX.

Ensaio	FOS (%)	INULINA (%)	PDX (%)	Crescimento D.O 600 nm
1	0.81	0.81	0.81	4,10
2	3.19	0.81	0.81	4,57
3	0.81	3.19	0.81	4,89
4	3.19	3.19	0.81	4,42
5	0.81	0.81	3.19	4,28
6	3.19	0.81	3.19	4,68
7	0.81	3.19	3.19	4,85
8	3.19	3.19	3.19	4,32
9	0	2	2	4,72
10	4	2	2	4,56
11	2	0	2	4,50
12	2	4	2	4,47
13	2	2	0	4,43
14	2	2	4	4,38
15	2	2	2	4,78
16	2	2	2	4,80
17	2	2	2	4,75

Tabela 11- Coeficientes para o modelo quadrático relativo ao crescimento da cepa *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20

Fonte	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	p-valor
FOS e inulina	0.44	1	0.44	0.0001 (significativo)
FOS e PDX	0.0021	1	0.0021	0.6153
Inulina e PDX	0.023	1	0.023	0.1256
Regressão	0.76	9	0.085	0.0018 (significativo)
Residual	0.050	7	0.00718	
Falta de ajuste	0.049	5	0.0098	0.0618 (não significativo)
Erro puro	0.00126	2	0.000633	-
Total	0.81	16	-	-
R ²	0.87	-	-	-

Figura 10-Superfície de Resposta referente ao modelo ajustado para cepa *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 para o valor de DO em função da concentração de FOS e inulina, mantendo o valor de PDX A (0%) B (2%) e C (4%).

Fonte: O autor

No que se refere ao efeito destes compostos, em diferentes concentrações, sobre o crescimento de *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338, mostrado na Tabela 12, observa-se melhor desempenho desta cepa nas condições descritas no ensaio 3 (0.81 % de FOS, 3.19 % de inulina e 0.81% de PDX) correspondendo a uma DO de 4.9, seguido das condições estabelecidas no ensaio 7, cuja DO foi 4.82. Verifica-se também que o menor crescimento foi observado nas condições estabelecidas no ensaio 1, quando os três prebióticos avaliados encontram-se nas menores concentrações cuja DO correspondeu a 3.9.

A análise estatística destes resultados mostrando o efeito de interação entre estes três compostos sobre a variável resposta (densidade óptica) encontra-se mostrada na Tabela 13. Estes dados permitiram um ajuste de modelo quadrático que relaciona o crescimento *L.fermentum* ATCC 9338 com a concentração dos três prebióticos analisados, resultando na seguinte equação 5, em que I = (inulina) F = (FOS) P = (PDX).

$$\text{Densidade óptica} = 2,78401 + 0,74349 \cdot F + 0,78073 \cdot I + 0,4016 \cdot P - 0,052458 \cdot F^2 - 0,044968 \cdot I^2 - 0,066190 \cdot P^2 - 0,22068 \cdot F \cdot I - 0,037074 \cdot F \cdot P - 0,04413 \cdot I \cdot P \quad (5)$$

Um modelo empírico foi composto para a densidade óptica em função das variáveis estudadas e é apresentado na Equação 5. Embora com uma falta de ajuste significativa ($p < 0,05$), o valor de R^2 obtido para o modelo foi de 0,88, indicando que este pode explicar até 88% da variabilidade experimental.

Observa-se uma interação significativa ao nível de 95% de confiança entre os compostos Inulina e FOS cujas superfícies de resposta encontram-se representada na Figura 10, mantendo concentrações de polidextrose nos níveis 0% (A) 2% (B) e 4% (C). Nota-se que o crescimento máximo do micro-organismo *L. fermentum* ATCC 9338 é obtido nas menores concentrações de FOS e maiores concentrações de inulina.

A superfície de resposta A revela que uma região ótima de crescimento foi obtida com inulina na concentração acima de 3,5 % e ausência de FOS. Uma segunda região ótima de crescimento é observada na concentração de FOS acima de 3,5% e na ausência de inulina. Na presença de 2% de polidextrose (superfície de resposta B) observa-se uma nova região ótima obtida com FOS na concentração acima de 3%

Mantendo polidextrose a 4% (superfície de resposta C) e FOS ou inulina acima de 3,5%, observa-se um ligeiro declínio no crescimento da cepa *L.fermentum* ATCC 9338.

Tabela 12- Valores de DO (600 nm) relativos ao desempenho de cepas de *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 em caldo MRS contendo diferentes concentrações de inulina, FOS e PDX.

Ensaio	FOS (%)	INULINA (%)	PDX (%)	Crescimento D.O 600 nm
1	0.81	0.81	0.81	3,90
2	3.19	0.81	0.81	4,74
3	0.81	3.19	0.81	4,90
4	3.19	3.19	0.81	4,51
5	0.81	0.81	3.19	4,05
6	3.19	0.81	3.19	4,70
7	0.81	3.19	3.19	4,82
8	3.19	3.19	3.19	4,20
9	0	2	2	4,71
10	4	2	2	4,60
11	2	0	2	4,65
12	2	4	2	4,72
13	2	2	0	4,64
14	2	2	4	4,56
15	2	2	2	4,73
16	2	2	2	4,78
17	2	2	2	4,76

Tabela 13- Coeficientes para o modelo quadrático relativo ao crescimento da cepa *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338

Fonte	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	ρ-valor
FOS e inulina	0.78	1	0.78	0.0006 (significativo)
FOS e PDX	0.022	1	0.022	0.3490
Inulina e PDX	0.031	1	0.031	0.2711
Regressão	1.09	9	0.12	0.00173 (significativo)
Residual	0.15	7	0.022	
Falta de ajuste	0.15	5	0.030	0.0076 (significativo)
Erro puro	0.000467	2	0.000233	-
Total	1.24	16	-	-
R ²	0.88	-	-	-

Figura 11- Superfície de Resposta referente ao modelo ajustado para cepa *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 para o valor de DO em função da concentração de FOS e inulina, mantendo o valor de PDX A (0%) B (2%) e C (4%).

Fonte: O autor

A análise dos resultados obtidos por meio do planejamento experimental revelou que o efeito da interação entre FOS e inulina no crescimento das cinco cepas estudadas foi negativamente significativo ($p < 0.05$), ou seja, a combinação entre inulina e FOS afetou negativamente o crescimento das referidas cepas. Observou-se também que as cepas avaliadas não apresentaram bom desempenho na presença dos três prebióticos quando presentes na maior concentração (Fig. 7 – 11 C).

O crescimento ótimo estimado das cinco cepas, evidenciado pela região mais escura das respectivas superfícies de resposta, demonstra que concentrações acima de 3% de inulina foram suficientes. Estes resultados corroboram com aqueles mostrados na Tabela 3, que revelou maior desempenho das cinco cepas em meio MRS contendo 2 % de inulina.

Neste contexto, vale destacar que Dhewa et al. (2014) estudaram a influência da concentração de inulina (0.5%, 1%, 3% e 5%) sobre o crescimento de uma cepa de *Lactobacillus plantarum* e observaram maior taxa de crescimento no meio contendo 3% de inulina. Na concentração de 5 % os autores observaram um declínio de 0.12 % na taxa de crescimento da cepa avaliada.

Singh et al.(2006) avaliando a síntese de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* YS-1 constataram que concentrações acima de 4% de inulina interferem negativamente na produção desta enzima, o que pode ser devido ao efeito da repressão catabólica, exercida pela inulina em altas concentrações.

Ivanovska et al.(2012) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de FOS (1.5% 3% e 5%) sobre a viabilidade de *L.casei* micro encapsulado. Os autores observaram que a viabilidade da referida cepa foi semelhante nas concentrações de 1,5 e 3,0% e menor em meio contendo 5% de FOS. Basavanna e Prapulla (2013) também estudaram o efeito de diferentes concentrações de FOS (0.5 a 2.5%) sobre o desempenho da cepa *L.fermentum* e constataram que o melhor crescimento foi observado entre 2 e 2.5%. No presente trabalho observou-se que concentrações acima de 3% de FOS favoreceram o crescimento das cepas avaliadas.

No tocante a interação negativa significativa ($p > 0.05$) entre inulina e FOS, observado para as cinco cepas de *lactobacillus* avaliadas este efeito pode ser explicado pelo mecanismo descrito por Bruckner e Tigemeyer (2002). Segundo estes autores, na presença de mais de uma fonte de carbono no meio de crescimento as bactérias utilizam

primeiro uma fonte de carbono e posteriormente a outra, tendo em vista que o mecanismo de absorção de carboidratos em bactérias é diversificado e dependente de enzimas envolvidas no sistema de transporte. Assim, segundo estes autores, a utilização “preferencial” de um carboidrato em detrimento do outro ocorre devido à indução da síntese de enzimas específicas e pela exclusão do gene indutor responsável pela síntese de enzimas envolvidas na absorção da outra fonte de carbono. A indução de genes catabólicos específicos ocorre com vistas à utilização de fontes de carbono que necessitam de menos energia. Contudo quando há excesso de fonte de carbono no meio, ocorre a repressão catabólica que atua como um dispositivo auto-regulatório para limitar o consumo de carboidratos, respeitando a capacidade metabólica do micro-organismo.

Neste sentido, Mueller et al. (2016) e Rossi et al. (2005) estudaram o crescimento de varias cepas probióticas do gero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* presentes no inoculo fecal, em meio contendo frutanos de diferentes graus de polimerização e concluíram que os frutanos de menor grau de polimerização, como FOS (grau de polimerização 2 a 10), favoreceram o crescimento dos probióticos em relação aos frutanos de maior grau de polimerização, como a inulina (grau de polimerização de 2 a 60).

Van der Meulen (2004) estudaram o crescimento da cepa *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 em diferentes fontes de carbono e confirmaram a existência do metabolismo “preferencial” de frutanos de cadeia curta (FOS) em relação aos frutanos de cadeia longa (inulina) quando estes estão concomitantemente presentes no meio. Os autores verificaram também que após o esgotamento de FOS no meio, a inulina foi metabolizada, porém em menor intensidade.

No tocante a polidextrose, na concentração de 2%, observou-se que este atuou como coadjuvante no crescimento das cepas estudadas, sobretudo em meio contendo FOS onde verificou-se menor utilização deste composto e melhor desempenho das referidas cepas, com excessão da cepa *L.acidophilus* ATCC 4356.

Neste contexto, Hernot et al (2009) estudaram a interferência dos compostos inulina, FOS, polidextrose e galactooligossacarideo, em conjunto e de forma individual, sobre o desempenho de cepas de bifidobactéria e lactobacilos.. Os autores demonstraram que a mistura de compostos de cadeia curta e cadeia longa diminuíram a taxa de fermentação e observaram que os compostos de cadeia curta foram assimilados "preferencialmente" pela população de bactérias durante as 12 horas de fermentação. Assim, sustentado nos resultados obtidos no presente trabalho, deduz-se que polidextrose

apresenta menor grau de polimerização (3 a 30) que inulina (2 a 60) tendo em vista que PDX contribuiu com o crescimento das cepas estudadas em meio MRS contendo FOS, cujo grau de polimerização também é pequeno.

Segundo Forssten et al. (2015) é necessário doses suficientemente altas para que a PDX atue como prebiótico. Deste modo, infere-se que no meio contendo altas concentrações de PDX, juntamente com FOS ou inulina, **ocorreu** repressão catabólica devido ao excesso de substrato.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições do presente trabalho permitem concluir que:

- As cepas de *Lactobacillus* avaliadas apresentaram melhor desempenho em meio MRS contendo Inulina, FOS e Polidextrose .

- Em meio contendo FOS, Inulina e Polidextrose, de forma combinada e em diferentes concentrações (0 a 4%) evidenciou-se a existência de uma interação significativa ($p < 0.05$) entre inulina e FOS, resultando em um efeito negativo sobre o crescimento das cepas estudadas.

- O máximo crescimento estimado das cepas *L. casei* ATCC 7469 e *L. fermentum* ATCC 9338 foi observado em meio MRS adicionado de 3,5% de inulina.

- O máximo crescimento estimado das cepas *L. plantarum* ATCC 8014, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV H2B20 foi observado em meio MRS contendo 3% de inulina.

- A suplementação do meio MRS com 3,5% de FOS e 2% de inulina proporcionaria crescimento máximo estimado para as cepas estudadas, exceto *L. acidophilus* ATCC 4356.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar o desempenho de outras cepas probióticas, incluindo espécies de *Bifidobacterium* em meio MRS contendo os compostos prebióticos avaliados.

- Estudar o metabolismo da assimilação de estévia, goma arábica e polidextrose.

- Avaliar diferentes combinações simbióticas em alimentos, realizando análise físico-química, microbiológica e sensorial.

REFERÊNCIAS

- ABOU-ARAB, A. E; ABOU-ARAB, A. A; ABU-SALEM, M. Ferial. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. **African Journal of Food Science**, v. 4, n. 5, p. 269-281, 2010.
- ADEBOLA, O. O; CORCORAN, O; MORGAN, W. A. Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of *lactobacilli* probiotics. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 75-84, 2014.
- ADOM, D; NIE, D. Regulation of autophagy by short chain fatty acids in colon cancer cells. In: **Autophagy-A double-edged Sword-Cell Survival or Death?**. Intech, 2013.
- AGUS, A et al. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.
- AHASAN, A. S. M. L. et al. The beneficial role of probiotics in monogastric animal nutrition and health. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 2, n. 4, p. 1-20, 2015.
- AKRAMIENĖ,D; et al. Effects of b-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* 2007.
- AL-MAJED, A.A. et al. Protective effects of oral arabic gum administration on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Pharmacological Research**, v. 46, n. 5, p. 445-451, 2002.
- ANANDHARAJ, M; SIVASANKARI, B; PARVEEN RANI, R. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on hypercholesterolemia: a review. **Chinese Journal of Biology**, v. 2014, 2014.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ ingredientes, substâncias bioativas e probióticos : lista de alegação de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho.2008.
- ARAI, S; YASUOKA, A; ABE, K. Functional food science and food for specified health use policy in Japan: state of the art. **Current opinion in lipidology**, v. 19, n. 1, p. 69-73, 2008.
- BABIKER, R et al. Effects of Gum Arabic ingestion on body mass index and body fat percentage in healthy adult females: two-arm randomized, placebo controlled, double-blind trial. **Nutrition Journal**, v. 11, n. 1, p. 111, 2012.
- BALLONGUE, J. E. A. N. Bifidobacteria and probiotic action. **Food Science and Technology**, v. 139, p. 67-124, 2004.

BALLONGUE, J.; SCHUMANN, C.; QUIGNON, P. Effects of lactulose and lactitol on colonic microflora and enzymatic activity. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 32, n. sup222, p. 41-44, 1997.

BARRANGOU, R et al. Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 15, p. 8957-8962, 2003.

BASAVANNA, G; PRAPULLA, S. G. Evaluation of functional aspects of *Lactobacillus fermentum* CFR 2195 isolated from breast fed healthy infants' fecal matter. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 360-366, 2013.

BASHO, S. M; BIN, M.C. Propriedades dos alimentos funcionais e seu papel na prevenção e controle da hipertensão e diabetes. **Interbio**, v. 4, n. 1, p. 48-58, 2010.

BERMUDEZ-BRITO, M et al. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, n. 2, p. 160-174, 2012.

BIAVATI, B. et al. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. **Annals of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 117-131, 2000.

BIEDRZYCKA, E; BIELECKA, M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 3, p. 170-175, 2004.

BIRADAR,S;BAHAGVATIS; SHEGUNSHI,B. *Probiotics And Antibiotics: A Brief Overview*. **The Internet Journal of Nutrition and Wellness**. Volume 2.2004.

BLOEMEN, J. G. et al. Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery. **Clinical Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 657-661, 2009.

BLOTTIÈRE, H.M. et al. Human intestinal metagenomics: state of the art and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 232-239, 2013.

BOLER, B. M. Vester et al. Carbohydrates blended with polydextrose lower gas production and short-chain fatty acid production in an in vitro system. **Nutrition research**, v. 29, n. 9, p. 631-639, 2009.

BORNET, F. R. J. et al. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, p. S111-S120, 2002.

BRASIL. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 03 nov. 1999.

BRUCKNER, R; TITGEMEYER, F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of

the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, n. 2, p. 141-148, 2002.

BUDDINGTON, R. K. et al. Non-digestible oligosaccharides and defense functions: lessons learned from animal models. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. S2, p. S231-S239, 2002.

BURITI, F.C.A.; CARDARELLI, H.R.; SAAD, S.M.I. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. **RBCF**, v.44, n.1, p.75-84, 2008.

BURKERT, J. F.M.et al. Sensory acceptance of potentially symbiotic dairy beverages. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 4, p. 317-324, 2012.

CAIRNS, A. J. Fructan biosynthesis in transgenic plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 382, p. 549-567, 2003.

CALAME, W.et al. Gum arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose dependent manner. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 6, p. 1269-1275, 2008.

CARDARELLI, H. R. et al. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1037-1046, 2008.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CHARALAMPOPOULOS, D.et al. (Ed.). **Prebiotics and probiotics science and technology**. New York: Springer, 2009.

CHEN, C. et al. Effects of lactitol on intestinal microflora and plasma endotoxin in patients with chronic viral hepatitis. **Journal of Infection**, v. 54, n. 1, p. 98-102, 2007.

CHERBUT, C et al. Acacia gum is a bifidogenic dietary fibre with high digestive tolerance in healthy humans. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 15, n. 1, p. 43-50, 2003.

CHONG, E. S. L. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 30(2), 351-374,2014.

COCCO, R. R. et al. Perspectivas futuras no tratamento da alergia alimentar. **Rev. Bras. Alergia Imunopatol**, v. 30, n. 1, p. 9-12, 2007.

COLECCHIA, A. et al. Effect of a symbiotic preparation on the clinical manifestations of irritable bowel syndrome, constipation-variant. Results of an open, uncontrolled multicenter study. **Minerva Gastroenterologica e Dietologica**, v. 52, n. 4, p. 349-358, 2006.

COPPOLA, M. M; GIL-TURNES, C. Probiotics and immune response. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

COSTA, G.T; GUIMARÃES,S.B; SAMPAIO,H.A.C. Efeitos dos fruto-oligossacarídeos no controle glicêmico. Revisão. **Acta Cirurgica Brasileira**. vol.27 no.3. 2012.

CRAIG, S; HOLDEN, J.F.; KHALED, Maha Y. Determination of polydextrose as dietary fiber in foods. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 4, p. 1006-1012, 2000.

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

DAOU, C; ZHANG, H. Oat Beta-Glucan: Its Role in Health Promotion and Prevention of Diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 4, p. 355-365, 2012.

DELZENNE, N.M.; CANI, Patrice D.; NEYRINCK, A. M. Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. 2547S-2551S, 2007.

DHEWA, T.; PANT, S.; MISHRA, V. Development of freeze dried synbiotic formulation using a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 83-89, 2014.

DENIÑA, I. et al. The influence of stevia glycosides on the growth of *Lactobacillus reuteri* strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 278-284, 2014.

DOHNALEK, M. I. H; OSTROM, K.M; HILTY, M. D. **Use of indigestible oligosaccharides to prevent gastrointestinal infections and reduce duration of diarrhea in humans**. U.S. Patent n. 5,827,526, 27 out. 1998.

DOMINGUEZ, A. et al. New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1174-1179, 2012.

DRAKOULARAKOU, A. et al. Lactitol, an emerging prebiotic: functional properties with a focus on digestive health. **Food Sci Technol Bull Funct Foods**, v. 3, p. 71-80, 2007.

DYRR, L; THOMAS, Seymour. **Mineral water composition**. U.S. Patent n. 6,383,534, 2002.

DURAND, H. Evaluation of the effects of a synbiotic supplement on the incidence of infectious episodes in children: a randomised, placebo controlled multicentre study. In: PROBIOTECH CONF. 2009.

ESMERINO, E. A. et al. The influence of sweeteners in probiotic Petit Suisse cheese in concentrations equivalent to that of sucrose. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 9, p. 5512-5521, 2013.

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

FELIS, G.E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of *lactobacilli* and *bifidobacteria*. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 44, 2007.

FERREIRA, C.LL; TESHIMA, E. Prebióticos, estratégia dietética para a manutenção da microbiota colônica desejável. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. ano III–n**, p. 22-25, 2000.

FINNEY, M et al. Effects of low doses of lactitol on faecal microflora, pH, short chain fatty acids and gastrointestinal symptomology. **European journal of nutrition**, v. 46, n. 6, p. 307, 2007.

FLAMM, G. et al. Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 41, n. 5, p. 353-362, 2001.

FLOOD, M. T.; AUERBACH, M. H.; CRAIG, S. A. S. A review of the clinical toleration studies of polydextrose in food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 9, p. 1531-1542, 2004.

FOSTER, J.A.; NEUFELD, K-A. M. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. **Trends in Neurosciences**, v. 36, n. 5, p. 305-312, 2013.

FORSSTEN, S.D. et al. The effect of polydextrose and probiotic lactobacilli in a *Clostridium difficile*–infected human colonic model. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, n. 1, p. 27988, 2015.

GARCIA-PERIS, P. et al. Effect of a mixture of inulin and fructo-oligosaccharide on lactobacillus and bifidobacterium intestinal microbiota of patients receiving radiotherapy; a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Nutricion Hospitalaria**, v. 27, n. 6, 2012.

GERRITSEN, J.et al. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. **Genes & Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 209, 2011.

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

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, n. 2, p. 259-275, 2004.

GIBSON,G. R;ROBERFROID, M.(Ed).**Handbook of prebiotic**.CRC Press,2008

GIRAFFA, G. et al. Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 163-172, 2003.

GMEINER, M. et al. Influence of a synbiotic mixture consisting of *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and a fructooligosaccharide preparation on the microbial ecology sustained in a simulation of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME reactor). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 2, p. 219-223, 2000.

GOODRUM, L. J. et al. Gum arabic glycoprotein contains glycomodules of both extensin and arabinogalactan-glycoproteins. **Phytochemistry**, v. 54, n. 1, p. 99-106, 2000.

GOYAL, S. K. et al. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 2010.

GRAF, D. et al. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, n. 1, p. 26164, 2015.

GU, Q; LI, P. Biosynthesis of Vitamins by Probiotic Bacteria. **Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health**. InTech, 2016.

GUPTA, E. et al. Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 46, p. 3343-3353, 2013.

HARA, H; SUZUKI, T; AOYAMA, Y. Ingestion of the soluble dietary fibre, polydextrose, increases calcium absorption and bone mineralization in normal and total-gastrectomized rats. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 5, p. 655-661, 2000.

HASCHKE, F. et al. Functional food for infants and children. **Monatsschrift Kinderheilkunde**, v. 149, n. 13, p. S66-S70, 2001.

HASSAN, M. et al. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 4, p. 723-736, 2012.

HERTZBERGER, R et al. H₂O₂ production in species of the *Lactobacillus acidophilus* group: a central role for a novel NADH-dependent flavin reductase. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 7, p. 2229-2239, 2014.

HEENAN, C. N. et al. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. **LWT-Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 461-466, 2004.

HEIDEBACH, T; FÖRST, P; KULOZIK, U. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 309-316, 2010.

HELLAND, M.H.; WICKLUND, T; NARVHUS, J. A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 305-313, 2004.

HERNOT, D.C. et al. In vitro fermentation profiles, gas production rates, and microbiota modulation as affected by certain fructans, galactooligosaccharides, and

polydextrose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1354-1361, 2009.

HEMAISWARYA, S. et al. Mechanism of action of probiotics. **Brazilian archives of Biology and technology**, v. 56, n. 1, p. 113-119, 2013.

HINNEBUSCH, B.F. et al. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 5, p. 1012-1017, 2002.

HOLZAPFEL, W.H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 365s-373s, 2001.

HOPKINS, M.J.; MACFARLANE, G. T. Nondigestible oligosaccharides enhance bacterial colonization resistance against *Clostridium difficile* in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1920-1927, 2003.

HUMMEL, S. et al. Differential targeting of the E-cadherin/ β -catenin complex by Gram-positive probiotic *Lactobacilli* improves epithelial barrier function. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1140-1147, 2012.

IVANOVSKA, T.P et al. Effect of prebiotic content on functional and physicochemical properties of *Lactobacillus casei* loaded chitosan-Ca-alginate microparticles. **Macedonian pharmaceutical**, p. 45.2001.

JANDHYALA, S.M.et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 21, n. 29, p. 8787, 2015.

JIE, Z. et al. Studies on the effects of polydextrose intake on physiologic functions in Chinese people. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 6, p. 1503-1509, 2000.

KAILASAPATHY, K; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n. 1, p. 80-88, 2000.

KAUR, N; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Biosciences**, v. 27, n. 7, p. 703-714, 2002.

KELLY, Greg. Inulin-type prebiotics--a review: part I. **Alternative Medicine Review**, v. 13, n. 4, p. 315-330, 2008..

KNEIFEL, Wo. In vitro growth behaviour of probiotic bacteria in culture media with carbohydrates of prebiotic importance. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 12, n. 1, p. 27-34, 2000.

KOLIDA, S; GIBSON, G.R. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. 2503S-2506S, 2007.

KOLIDA, S; GIBSON, G.R. Synbiotics in health and disease. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p. 373-393, 2011.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, n. 2, p. 229-241, 2001.

KUMARI, Madhumita; CHANDRA, Sheela. *Stevia rebaudiana*: beyond sweetness. **Handbook of medicinal plants and their bioactive**. p. 11-26. Trivandrum: Research Signpost, , 2014.

KUNOVÁ, G. et al. Utilisation of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) by *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* *in vitro* conditions. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 3, p. 251-255, 2014.

LAHTINEN, S.J. et al. Effect of molecule branching and glycosidic linkage on the degradation of polydextrose by gut microbiota. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 74, n. 10, p. 2016-2021, 2010.

LAVERMICOCCA, P. Highlights on new food research. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, p. S295-S299, 2006.

LEMUS-MONDACA, R. et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1121-1132, 2012.

LENOIR-WIJKOOP, I. et al. Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. **Nutrition Reviews**, v. 65, n. 11, p. 469-489, 2007.

LIVESEY, G. Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. **Nutrition Research Reviews**, v. 16, n. 2, p. 163-191, 2003.

LOPES, S. M. S. et al. A new natural source for obtainment of inulin and fructo-oligosaccharides from industrial waste of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Food Chemistry**, v. 225, p. 154-161, 2017.

LOPES, S. R et al. Mapa de preferência de sorvetes ricos em fibras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, 2008.

LOUIS, P; HOLD, G. L.; FLINT, H.J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 661, 2014.

MAJUMDER, A. et al. Proteome reference map of *Lactobacillus acidophilus* NCFM and quantitative proteomics towards understanding the prebiotic action of lactitol. **Proteomics**, v. 11, n. 17, p. 3470-3481, 2011.

MATTILA-SANDHOLM, T. et al. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2, p. 173-182, 2002.

MÄKIVUOKKO, H. et al. Synbiotic effects of lactitol and *Lactobacillus acidophilus*

NCFM™ in a semi-continuous colon fermentation model. **Beneficial microbes**, v. 1, n. 2, p. 131-137, 2010.

MARKET RESEARCH REPORT. Functional foods market analysis by product (Carotenoids, Dietary Fibers, Fatty Acids, Minerals, Prebiotics & Probiotics, Vitamins), by application, By End-Use (Sports Nutrition, Weight Management, Immunity, Digestive Health) and segment forecasts, 2014 To 2024.2015

MIREMADI, F; SHAH, N.P. Applications of inulin and probiotics in health and nutrition. *International Food Research Journal* , 19 (4), p. 1337-1350 2012.

MOHAMED, R. E., GADOUR, M. O., & ADAM, I. The lowering effect of Gum Arabic on hyperlipidemia in Sudanese patients. **Frontiers in physiology**, 6. 2015.

MUELLER, M.et al. Growth of selected probiotic strains with fructans from different sources relating to degree of polymerization and structure. **Journal of functional Foods**, v. 24, p. 264-275, 2016.

MUSA ,H.H WU S.L. , ZHU C.H. , SERI H.I. AND ZHU G.Q., The Potential Benefits of Probiotics in Animal Production and Health. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, 8: 313-321. 2009.

MURPHY, O. Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. S1, p. S47-S53, 2001.

NASIR, O et al. Downregulation of angiogenin transcript levels and inhibition of colonic carcinoma by Gum Arabic (*Acacia senegal*). **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 6, p. 802-810, 2010.

OLIVEIRA.H; MOSCATTO, J.A. Inulina e Oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 23, n. 1, p. 99-112, 2004.

OSTLIE, H.M.; TREIMO, J; NARVHUS, J. A. Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 10, p. 989-997, 2005.

ORIACH, C. S. et al. Food for thought: The role of nutrition in the microbiota-gut–brain axis. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 6, p. 25-38, 2016.

PACHENARI, A et al. A comparative study of bifidobacteria in human babies and adults. **Bioscience of microbiota, food and health**, v. 35, n. 2, p. 97-103, 2016.

PASSOS, L.M. L; PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.

PENDERS, John et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v. 118, n. 2, p. 511-521, 2006.

PHILLIPS, G.O.; OGASAWARA, T; USHIDA, K. The regulatory and scientific approach to defining gum arabic (*Acacia senegal* and *Acacia seyal*) as a dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 1, p. 24-35, 2008.

POOL-ZOBEL, B.L.; SAUER, J. Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. 2580S-2584S, 2007.

POURGHASSEM GARGARI, B et al. Effects of high performance inulin supplementation on glycemic control and antioxidant status in women with type 2 diabetes. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 37, n. 2, p. 140-148, 2013.

PUTAALA, H. Polydextrose in lipid metabolism. In: **Lipid Metabolism**. InTech, 2013.

PROBERT, H.M. et al. Polydextrose, lactitol, and fructo-oligosaccharide fermentation by colonic bacteria in a three-stage continuous culture system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4505-4511, 2004.

REGO, R. A;BUCIONE, A. O setor de ingredientes. In: **Brazil Ingredients Trends 2020**, Vialta, A., 9–45.2014

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, p. S105-S110, 2002.

ROBERFROID, M et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S2, p. S1-S63, 2010.

RÖßLE, C. et al. Development of potentially synbiotic fresh-cut apple slices. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 4, p. 245-254, 2010.

ROSSI, M. et al. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 6150-6158, 2005.

ROSSI, M; AMARETTI, A; RAIMONDI,S.Folate production by probiotic bacteria. **Nutrients**, v. 3, n. 1, p. 118-134, 2011.

RUIJSCHOP, R. M.A.J; BOELRIJK, A.E.M; GIFFEL, M.C. Satiety effects of a dairy beverage fermented with propionic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 9, p. 945-950, 2008.

RUIZ, L; MARGOLLES, A; SÁNCHEZ, B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. **Frontiers in microbiology**, v. 4, 2013.

RURANGWA, E.et al. Selected nondigestible carbohydrates and prebiotics support the growth of probiotic fish bacteria mono-cultures in vitro. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 932-940, 2009.

SAAD, S. M. I. Probiotics and prebiotics: the state of the art. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SAAD,S.M.I; CRUZ,A.G; FARIA,J.A.F. Probiótico e Prebiótico em alimentos. Fundamentos e Aplicações Tecnológicas. São Paulo. Livraria Varela.2011.

SAARELA, M.et al. The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 4, p. 291-302, 2003.

SABATER-MOLINA, M. et al. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 315-328, 2009.

SAMANTA, A. K. et al. Prebiotic inulin: Useful dietary adjuncts to manipulate the livestock gut microflora. **Brazilian Journal of microbiology**, v. 44, n. 1, p. 1-14, 2013.

SAMINATHAN, M. et al. Effect of prebiotic oligosaccharides on growth of *Lactobacillus* strains used as a probiotic for chickens. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 1, p. 57-64, 2011.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 10, p. 442-457, 2005.

SAULNIER, D.M.A et al. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 135-141, 2009.

SCHWAN, A. M et al. Elaboração e avaliação da qualidade de queijos funcionais. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 6, n. 4, 2014.

SCOTT, K. P. et al. The influence of diet on the gut microbiota. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 52-60, 2013.

SEKIROV, I. et al. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 859-904, 2010.

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

SHOAIB, M et al. Inulin: Properties, health benefits and food applications. **Carbohydrate polymers**, v. 147, p. 444-454, 2016.

SIMS, I.M.; RYAN, J.L.J; KIM, S.H. In vitro fermentation of prebiotic oligosaccharides by *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Lactobacillus* spp. **Anaerobe**, v. 25, p. 11-17, 2014.

SINGH, R. S.; DHALIWAL, R; PURI, M. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 1703-1707, 2006.

SLAVIN, J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1417-1435, 2013.

SRIDEVI, N.; VISHWE, P; PRABHUNE, A. Hypocholesteremic effect of bile salt hydrolase from *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 516-520, 2009.

STOWELL, J.D. Prebiotics and Probiotics Science and Technology. **Food Science & Nutrition**, pp 337-352, 2009.

STRINGHETA, P. et al. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 181-194, 2007.

SUGUNAN, B.N.; NAIR, R.M. The promise of probiotics in dentistry. **Archives of Oral Research**, v. 9, n. 1, p. 61-73, 2013.

TAKAGI, R. et al. Comparison of the Growth of *Lactobacillus delbrueckii*, *L. paracasei* and *L. plantarum* on Inulin in Co-culture Systems. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 33, n. 4, p. 139-146, 2014.

TALWALKAR, Akshat; KAILASAPATHY, Kaila. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* **Current issues in intestinal microbiology**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2004.

TALWALKAR, A. et al. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 39, n. 6, p. 605-611, 2004.

TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starch-based dairy desserts. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1104-1112, 2006.

TIIHONEN, K. et al. Polydextrose functional fibre. **Nutrafoods**, v. 10, n. 2, p. 23-28, 2011.

TIMMERMAN, H. M. et al. Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. **Poultry Science**, v. 85, n. 8, p. 1383-1388, 2006.

TOMITA, T. et al. Bactericidal activity of a fermented hot-water extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni towards enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 and other food-borne pathogenic bacteria. **Microbiology and Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1005-1009, 1997.

VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. Antimicrobial resistance in the Netherlands: a natural experiment?. **Frontiers in public health**, v. 2, 2014.

VAN DER MEULEN, R; AVONTS, L; DE VUYST, L. Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 4, p. 1923-1930, 2004.

WANG, X.; GIBSON, G. R. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin

by bacteria growing in the human large intestine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 373-380, 1993.

WEBER, A; HEKMAT, S. The effect of *Stevia rebaudiana* on the growth and survival of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and sensory properties of probiotic yogurt. **Journal of Food Research**, v. 2, n. 2, p. 136, 2013.

YEO, S; LIONG, M. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 2, p. 267-275, 2010.

YOON, K.Y; WOODAMS, E.; HANG, Y.D. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 12, p. 1427-1430, 2006.

YOSHIOKA, H. et al. Development of the Normal Intestinal Flora and Clinical Significance in Infants and Children. **Bifidobacteria and Microflora**, v. 10, n. 1, p. 11-17, 1991.

ZACHARIS, C. Xylitol. **Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology**, p. 347-382, 2012.

APÊNDICE

APÊNDICE A- Curva de crescimento densidade óptica (600 nm) *versus* UFC/ml para cepas *L.fermentum* ATCC 9338, *L.acidophilus* ATCC 4356, *L.delbrueckii* H2B20, *L.casei* ATCC 7469, *L.plantarum* ATCC 8014