

LORENA MARIA YBARRA

**INFLUÊNCIA DE PREBIÓTICO E SULFATO FERROSO NA
MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA E
MURINA E DO PREBIÓTICO ASSOCIADO AO CÁLCIO NA
BIODISPONIBILIDADE DE MINERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

Ybarra, Lorena Maria, 1971-

Y36i

2003

Influência de prebiótico e sulfato ferroso na modulação da microbiota intestinal humana e murina e do prebiótico associado ao cálcio na biodisponibilidade de minerais / Lorena Maria Ybarra. – Viçosa : UFV, 2003

245p. : il.

Orientador: Célia Lúcia de Luces F. Ferreira
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Viçosa

1. Microbiota intestinal - Modulação.- Prebióticos. 2. Microbiota intestinal - Modulação - Probióticos. 3. Microbiota intestinal - Modulação - Sulfato ferroso. 4. *Bifidobacterium*. 5. Biodisponibilidade de minerais - Efeito de prebióticos. 6. Interação cálcio-ferro. 7. Interação cálcio-magnésio. I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 19.ed. 589.95


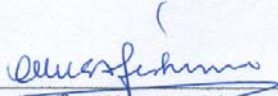
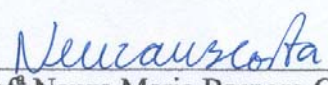
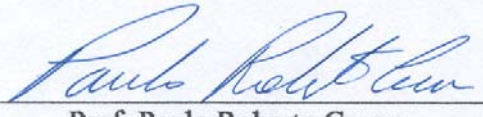
CDD 20.ed. 589.95

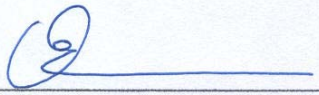
LORENA MARIA YBARRA

**INFLUÊNCIA DE PREBIÓTICO E SULFATO FERROSO NA
MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA E
MURINA E DO PREBIÓTICO ASSOCIADO AO CÁLCIO NA
BIODISPONIBILIDADE DE MINERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”.

APROVADA: 17 de março de 2003.

 _____ Dr. Anne L. McCartney	 _____ Prof.ª Elisa Teshima
 _____ Prof.ª Neuza Maria Brunoro Costa (Conselheira)	 _____ Prof. Paulo Roberto Cecon (Conselheiro)



Prof.ª Célia Lúcia de Luces F. Ferreira
(Orientadora)

A toda minha família, que sempre acreditou no meu potencial e me apoiou nos estudos, trabalho, estando ao meu lado, ainda que distante, em todas as etapas da minha vida.

A Deus, sempre presente em minha vida.

“Uma viagem de 1000 km começa com apenas 1 passo”

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo, no Brasil e no exterior.

A Departamento de Nutrição e Saúde, pela cessão de materiais, equipamentos, animais e do espaço para realização da pesquisa.

Às professoras Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, Neuza Maria Brunoro Costa e Dra. Anne L. McCartney, pela valiosa orientação, pelo estímulo e pelo incentivo profissional.

Ao professor Paulo Roberto Cecon, pela disponibilidade e pelo auxílio prestimoso.

Ao Prof. Glenn R. Gibson, Food Microbial Science Unit, School of Food Biosciences, Science and Technology Centre da Universidade de Reading, pela oportunidade de trabalhar e aprender em seu laboratório, no Reino Unido.

Aos professores participantes da banca examinadora, Nélio José de Andrade, Elisa Teshima e Dra. Gabriela Perdigón, pelas sugestões, pela atenção e pela receptividade ao convite.

À Prof. Mônica Maria O. Pinho Cerqueira, que indicou o curso, o orientador, participou da qualificação e sempre me apoiou.

Aos colegas do Laboratório de Culturas Láticas, pelo apoio e companheirismo, em especial a Ferlando Lima Santos, companheiro do doutorado e Luciana.

Aos amigos de Reading, que me acolheram e ajudaram em um país estranho, em especial a Javier Castillo, Thea Scantlebury-Manning e Sophie Kolida.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos e do Departamento de Nutrição e Saúde, pela atenção, ajuda, alto astral e bom relacionamento.

Ao Prof. Victor Hugo, do Departamento de Solos, e ao funcionário Carlos, pelas análises das amostras, Luiz Carlos, do Departamento de Veterinária, pela obtenção de material para parte dos experimentos e ao Adão Custódio do biotério/DNS.

À Prof. Renata, do Departamento de Biologia Vegetal, que permitiu a realização das análises histológicas no seu laboratório, e à Vânia, do Laboratório PREVENT, pela confecção das lâminas.

Às amigas Luciane e Janete e a todos que, de alguma maneira, seja pelo apoio, por um sorriso amigo ou uma mão estendida no momento de ansiedade e desânimo, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LORENA MARIA YBARRA, filha de Gabriel Ricardo Ybarra e Monica Irene Beatriz Pistarelli de Ybarra, nasceu em Buenos Aires, Argentina, em 28 de novembro de 1971.

Em dezembro de 1992, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte - MG.

Em 1993 incorporou-se ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Escola de Veterinária da UFMG, em nível de Mestrado, que foi submetida à aprovação em junho de 1995.

Em 1996 e 1997 trabalhou como pesquisadora na Universidade de Milão, Itália e posteriormente, ainda na Itália, como consultora na utilização de ingredientes para indústria alimentar.

Em abril de 1999, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 17 de março de 2003.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. Efeito de Prebiótico e Probiótico na Microbiota Intestinal	
1.1. Introdução	1
1.2. Composição e distribuição da microbiota intestinal	3
1.3. Colonização e desenvolvimento da microbiota	5
1.4. Probióticos	7
1.5. Efeito de probióticos na composição e metabolismo da microbiota	8
1.6. Prebióticos	13
1.6.1. <i>Importância de produtos da fermentação colônica</i>	15
1.6.2. <i>Característica de alguns prebióticos</i>	18
1.6.3. <i>Efeito de prebióticos sobre a microbiota intestinal e sobre o organismo</i>	20
1.7. Perspectiva de utilização de probióticos e prebióticos em medicina	25
1.8. Referências bibliográficas	29
2. Influência de Probióticos e Prebióticos na Absorção de Minerais	
2.1. Introdução	36
2.2. Probióticos, prebióticos e biodisponibilidade de minerais	36
2.2.1. <i>Importância nutricional da absorção de cálcio, magnésio e ferro</i>	37
2.2.2. <i>Estudos com prebióticos, probióticos e minerais em animais</i>	38
2.2.3. <i>Estudos com prebióticos, probióticos e minerais em humanos</i>	46
2.3. Possíveis mecanismos envolvidos no aumento da biodisponibilidade de minerais ..	47
2.4. Considerações finais	50
2.5. Referências bibliográficas	52
3. Interação entre cálcio e ferro	
3.1. Introdução	57
3.2. Ferro	57
3.3. Cálcio	61
3.4. Interação cálcio e ferro	64
3.4.1. <i>Estudos com animais</i>	65
3.4.2. <i>Estudos com humanos</i>	68
3.4.3. <i>Mecanismos envolvidos na interação cálcio-ferro</i>	75
3.5. Considerações finais	76
3.6. Referências bibliográficas	78

4. Efeito de Prebiótico (FOS), probiótico (<i>Bifidobacterium longum</i>) e simbiótico (FOS + <i>B. longum</i>) na biodisponibilidade de ferro, histologia intestinal e modulação de alguns grupos microbianos em ratos	
4.1. Introdução	84
4.2. Material e métodos	86
4.2.1. Origem e manutenção da cultura probiótica	86
4.2.2. Obtenção do concentrado de células de <i>Bifidobacterium longum</i> para administração aos animais	86
4.2.3. Biodisponibilidade de ferro	86
4.2.3.1. Preparo das dietas experimentais	87
4.2.3.2. Dosagem do teor de ferro das dietas experimentais	88
4.2.3.3. Dosagens sanguíneas	88
4.2.4. Análise Histológica	89
4.2.5. Avaliação da microbiota intestinal murina, por meio de contagem de anaeróbios totais, aeróbios totais, bifidobactérias e <i>Escherichia sp</i>	89
4.2.6. Análises estatísticas	90
4.3. Resultados	91
4.3.1. Ganho de peso dos animais	91
4.3.2. Nível de hemoglobina e ganho de hemoglobina	92
4.3.3. Superfície de absorção e comprimento das vilosidades do íleo	95
4.3.4. Peso do ceco	97
4.3.5. Efeito sobre a microbiota intestinal murina	99
4.4. Conclusões	107
4.5. Referências bibliográficas	107
5. Efeito de prebiótico na biodisponibilidade de ferro, cálcio e magnésio em ratos	
5.1. Introdução	113
5.2. Material e métodos	114
5.2.1. Delineamento experimental	114
5.2.2. Dosagens sanguíneas	114
5.2.3. Determinação do teor de cálcio e magnésio no fêmur	115
5.2.4. Análise estatística	115
5.3. Resultados	115
5.3.1. Ganho de peso e consumo alimentar dos animais	115
5.3.2. Efeito de FOS e cálcio no nível de hemoglobina, hematócrito, magnésio e cálcio.....	116

5.4. Conclusões	124
5.5. Referências bibliográficas	124
6. Efeito de Prebiótico (FOS), <i>Bifidobacterium longum</i> e simbiótico (FOS + <i>B. longum</i>) associados a diferentes níveis de ferro na modulação da microbiota humana e na produção de ácidos orgânicos: estudo <i>in vitro</i>	
6.1. Introdução	130
6.2. Material e métodos	131
6.2.1. Origem da cultura utilizada como probiótico	131
6.2.2. Obtenção do concentrado de células de <i>Bifidobacterium longum</i>	131
6.2.3. Delineamento experimental	132
6.2.4. Montagem do experimento	132
6.2.5. Hibridização Fluorescente <i>In Situ</i> – FISH	133
6.2.5.1. <i>Preparo da amostra</i>	133
6.2.5.2. <i>Hibridização</i>	134
6.2.5.3. <i>Enxagüe</i>	134
6.2.5.4. <i>Contagem</i>	135
6.2.5.5. <i>Cálculo das concentrações microbianas</i>	135
6.2.6. Determinação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta.	135
6.2.6.1. <i>Preparo das amostras</i>	136
6.2.6.2. <i>Preparo dos padrões externos de ácidos orgânicos</i>	136
6.2.6.3. <i>Cálculo das concentrações de ácidos orgânicos</i>	137
6.2.7. Análise estatística	138
6.3. Resultados	139
6.3.1. Contagem total de células (DAPI), bifidobactérias, bacteróides e clostrídios determinados pelo método de FISH	139
6.3.2. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta	149
6.4. Conclusões	161
6.5. Referências bibliográficas	162
7. Efeito de Prebiótico (FOS) associado a diferentes níveis de ferro na modulação de microbiota humana e produção de ácidos orgânicos: estudo em modelo intestinal	
7.1. Introdução	167
7.2. Material e métodos	168
7.2.1. Contagem microbiológica de bactérias anaeróbicas totais, <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Bifidobacterium</i> sp. e enterobactérias	169

7.2.2. Contagem total celular (DAPI), bacteróides, bifidobactérias, clostrídios e bactérias sulfato redutoras pelo método de FISH	169
7.2.2.1. Preparo da amostra	169
7.2.2.2. Hibridização	170
7.2.2.3. Enxagüe	171
7.2.2.4. Contagem	171
7.2.2.5. Cálculo das concentrações microbianas	172
7.2.3. Determinação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta.	172
7.2.3.1. Preparo das amostras	172
7.2.3.2. Preparo dos padrões externos de ácidos orgânicos	173
7.2.3.3. Cálculo das concentrações de ácidos orgânicos	174
7.2.4. Análise estatística	175
7.3. Resultados e discussão	175
7.3.1. Contagem celular total (DAPI), bacteróides, bifidobactérias, clostrídios e bactérias sulfato redutoras pelo método de FISH e contagem microbiológica de bactérias anaeróbicas totais, <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Bifidobacterium</i> sp. e enterobactérias	175
7.3.2. Produção de ácidos graxos de cadeia curta	194
7.4. Conclusões	205
7.5. Referências bibliográficas	206
8. Resumo e conclusões gerais	210
9. Anexos	
9.1. Dados analíticos do prebiótico utilizado (Raftilose [®] P95)	213
9.2. Composição dos meios de cultura utilizados	215
9.3. Preparo de vidraria para determinação dos teores de ferro	221
9.4. Composição da mistura salina e mistura vitamínica (dieta AIN-93G) para roedores	222
9.5. Tabelas de análise de variância	223
9.6. Dados microbiológicos brutos	228
9.7. Cromatogramas	242

RESUMO

YBARRA, Lorena Maria, D.S. Universidade Federal de Viçosa, março de 2003. **Influência de prebiótico e sulfato ferroso na modulação da microbiota intestinal humana e murina e do prebiótico associado ao cálcio na biodisponibilidade de minerais.** Orientadora: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira. Conselheiros: Neuza Maria Brunoro Costa e Paulo Roberto Cecon.

O presente trabalho teve como objetivos verificar o efeito de prebiótico (Raftilose® P95 - FOS), (1 e 5%), probiótico (*Bifidobacterium longum* - 10^8 UFC/dia) e simbiótico (5% FOS + *B. longum*) na biodisponibilidade de ferro, cálcio e magnésio em ratos e na modulação da microbiota murina (aeróbios totais, anaeróbios totais, bifidobactérias e coliformes); o efeito de cálcio (2,5, 5,0 e 10,0g/kg) sobre a biodisponibilidade de ferro e magnésio, em 2 estudos *in vivo*: biodisponibilidade de ferro (12 grupos experimentais, n=8) com duração de 35 dias, sendo um período de repleção de 14 dias (AOAC, 1994, modificado) e biodisponibilidade de minerais (7 grupos experimentais, n=10). Foram verificados os efeitos *in vitro* (culturas em série e modelos intestinais) de diferentes níveis de sulfato ferroso (11, 22 e 33 mg/Kg, correspondentes a 50, 100 e 150% dos níveis utilizados na composição do meio de cultura) sobre a microbiota colônica humana e sua utilização de FOS, por meio de análise da contagem celular total, bacteróides, bifidobactérias, clostrídios e bactérias sulfato redutoras pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), e contagem microbiológica de enterobactérias, lactobacilos, anaeróbios totais e bifidobactérias; a produção de ácidos orgânicos de cadeia curta: acético, propiônico, isobutírico, n-butírico, isovalérico, n-valérico, caprótico, D- e L-lactato, determinados por meio de cromatografia gasosa. Os resultados indicaram que a suplementação com FOS (1%) não afetou a biodisponibilidade de ferro em animais submetidos a dietas deficientes em ferro, porém aumentou a absorção de magnésio ($p<0,05$) e cálcio ($p<0,05$). Foi demonstrada interação negativa entre cálcio e ferro ($p<0,01$) e entre cálcio e magnésio ($p<0,05$). Doses de 5% de FOS resultaram em diarreia nos animais e não aumentaram ($p>0,05$) a biodisponibilidade de ferro de animais anêmicos. A suplementação com *B. longum* tampouco influenciou ($p>0,05$) a recuperação da anemia dos animais nem alterou ($p>0,05$) as contagens dos diferentes grupos bacterianos intestinais. Em dietas controle verificou-se diminuição do grupo dos coliformes cecais com aumento do teor de ferro da dieta ($p<0,01$). O efeito de FOS sobre a microbiota humana e produção de ácidos orgânicos depende do teor de ferro e do segmento intestinal estudado. Baixo teor de sulfato ferroso (11 mg/L) resultou em diminuição ($p<0,01$) de enterobactérias, em

experimentos em modelo intestinal. A incorporação de FOS estimulou esse grupo bacteriano ($p < 0,01$) em dietas com baixo teor de ferro, bem como bifidobactérias e lactobacilos em todos os segmentos e dietas. Dietas com alto teor de sulfato ferroso (33 mg/kg) e FOS estimularam o grupo dos clostrídios. A incorporação de FOS a dietas com 11mg FeSO_4/L resultou em aumento da produção de acetato ($p < 0,01$), isobutirato ($p < 0,05$), n-butirato ($p < 0,05$) e isovalerato ($p < 0,01$) no recipiente que simula o cólon ascendente; acetato ($p < 0,05$) no cólon transversal e isobutirato ($p < 0,05$) e caproato ($p < 0,01$) no cólon descendente. A incorporação de FOS a dietas com 33mg FeSO_4/L resultou na diminuição de n-valerato ($p < 0,05$) no cólon ascendente; aumento de propionato ($p < 0,05$) e isobutirato ($p < 0,05$) no cólon transversal e diminuição de acetato ($p < 0,05$), propionato ($p < 0,05$), n-butirato ($p < 0,01$), isovalerato ($p < 0,05$) e n-valerato ($p < 0,05$) no cólon descendente. Dietas com baixo teor de sulfato ferroso + FOS resultaram em maior produção de n-valerato ($p < 0,05$) no cólon ascendente; menor produção de propionato ($p < 0,05$), isovalerato ($p < 0,05$) e n-valerato ($p < 0,05$) no cólon transversal; e maiores concentrações de acetato ($p < 0,05$), isobutirato ($p < 0,05$), n-butirato ($p < 0,05$), n-valerato ($p < 0,01$) e caproato ($p < 0,05$) no cólon descendente, quando comparadas com dietas com alto teor de sulfato ferroso + FOS. Os experimentos indicam que a concentração mineral presente em uma dieta pode vir a influenciar a saúde do hospedeiro, não apenas devido à biodisponibilidade *per se*, mas por também influenciar a ecologia microbiana. Sugere-se um cuidadoso estudo das doses de prebióticos a serem utilizadas, para evitar efeitos colaterais, como diarreia, que possam vir a influenciar nos resultados fisiológicos e novos estudos na área, com outros microorganismos probióticos, como *Lactobacillus* sp. ou outras espécies de bifidobactérias, devido a diferenças de metabolismo e adaptação dos mesmos às condições experimentais, outras substâncias prebióticas, que possam influenciar diferentes grupos microbianos e, ou, fontes dietéticas de minerais, como dietas baseadas em arroz/feijão, multimisturas, mais próximas da realidade populacional, em vez de suplementação com minerais inorgânicos.

ABSTRACT

YBARRA, Lorena Maria, D.S. Universidade Federal de Viçosa, March 2003. **Prebiotic and iron sulphate influence on rat's and human intestinal microflora modulation and prebiotic and calcium effects on mineral bioavailability.** Advisor: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Committee members: Neuza Maria Brunoro Costa and Paulo Roberto Cecon.

The aim of this work is to verify prebiotic (Raftilose[®] P95 - FOS), (1 e 5%), probiotic (*Bifidobacterium longum* - 10^8 UFC/day) and synbiotic (5% FOS + *B. longum*) effects on rats' iron, calcium and magnesium bioavailability and on their microflora modulation (total aerobes, anaerobes, bifidbacteria and coliforms); calcium effect (2,5, 5,0 and 10,0g/kg) on iron and magnesium bioavailability, through 2 *in vivo* studies: iron bioavailability (12 experimental groups, n=8) during 35 days, with repletion period of 14 days (AOAC, 1994, modified) and mineral bioavailability (7 experimental groups, n=10). The effects of *In vitro* experiments (batch cultures and gut models) using different iron sulphate levels (11, 22 and 33 mg/Kg, corresponding to 50, 100 and 150% of levels used in composition of culture medium) on human colonic microflora and its FOS supplementation were evaluated. Microflora modulation was analysed through total cellular count analysis, bacteroides, bifid bacteria, clostridia and reducing sulphate bacteria through fluorescent *in situ* hybridization (FISH), and microbiological count of enterobacteria, lactobacilli, total anaerobes and bifid bacteria. Short-chain fatty acids production – SCFA (acetic, propionic, isobutyric, n-butyric, isovaleric, n-valeric, caproic, D- and L-lactate) was determined through gas-chromatography. Results have shown that FOS supplementation (1%) did not affect iron bioavailability in animals on low iron content diets, but magnesium ($p<0.05$) and calcium ($p<0.05$) absorption increased. Negative interaction between calcium and iron ($p<0.01$) and between calcium and magnesium ($p<0.05$) was proved. FOS (5%) resulted in diarrhoea in anaemic animals and did not increase ($p>0.05$) iron bioavailability. *B. longum* supplementation ($p>0.05$) did not influence anaemia recovery of animals nor changed ($p>0.05$) counts of different intestinal bacterial groups. On control diets coliforms group was reduced with increase of dietetic iron level ($p<0.01$). FOS effect on human microbiota and SCFA production depends on iron content and on gut segment analysed. Low content of iron sulphate (11 mg/L) resulted in enterobacteria decrease ($p<0.01$), in gut model experiments. FOS addition stimulated

this bacterial group ($p < 0.01$) on low iron content diets as well as bifid bacteria and lactobacilli on all segments and diets. High iron sulphate diets (33 mg/kg) and FOS stimulated clostridia group. FOS addition to 11mg FeSO_4/L diets resulted in increase in acetate ($p < 0.01$), isobutyrate ($p < 0.05$), n-butyrate ($p < 0.05$) and isovalerate ($p < 0.01$) productions in recipients that simulate ascendant colon; acetate ($p < 0.05$) in transversal colon and isobutyrate ($p < 0.05$) and caproate ($p < 0.01$) in descendant no colon. FOS addition to 33mg FeSO_4/L diets resulted in n-valerate ($p < 0.05$) decrease in ascendant colon; propionate ($p < 0.05$) and isobutyrate ($p < 0.05$) increase in transversal colon and acetate ($p < 0.05$), propionate ($p < 0.05$), n-butyrate ($p < 0.01$), isovalerate ($p < 0.05$) and n-valerate ($p < 0.05$) decrease in descendant colon. Low iron sulphate content diets supplemented with FOS resulted in higher n-valerate production ($p < 0.05$) in ascendant colon; lower propionate ($p < 0.05$), isovalerate ($p < 0.05$) and n-valerate ($p < 0.05$) production in transversal colon; higher acetate ($p < 0.05$), isobutyrate ($p < 0.05$), n-butyrate ($p < 0.05$), n-valerate ($p < 0.01$) and caproate ($p < 0.05$) concentration in descendant colon, when compared to high iron sulphate content supplemented with FOS diets. Experiences have shown that dietetic mineral can not only influence host's health because of their bioavailability but that they can also influence microbial ecology. We suggest detailed studies of prebiotic doses to avoid collateral effects such as diarrhoea, which could influence physiologic results. We also suggest new studies on this area with other probiotic microorganisms, such as *Lactobacillus* sp or with other species of bifidbacteria, due to strains' metabolic differences and adaptation's to experimental conditions; other prebiotic substances, that could influence different microbial groups and/ or mineral sources such as rice/beans, multi mixtures that could be closer to population dietetic base instead of such inorganic minerals.

Efeito de Prebiótico e Probiótico na Microbiota Intestinal

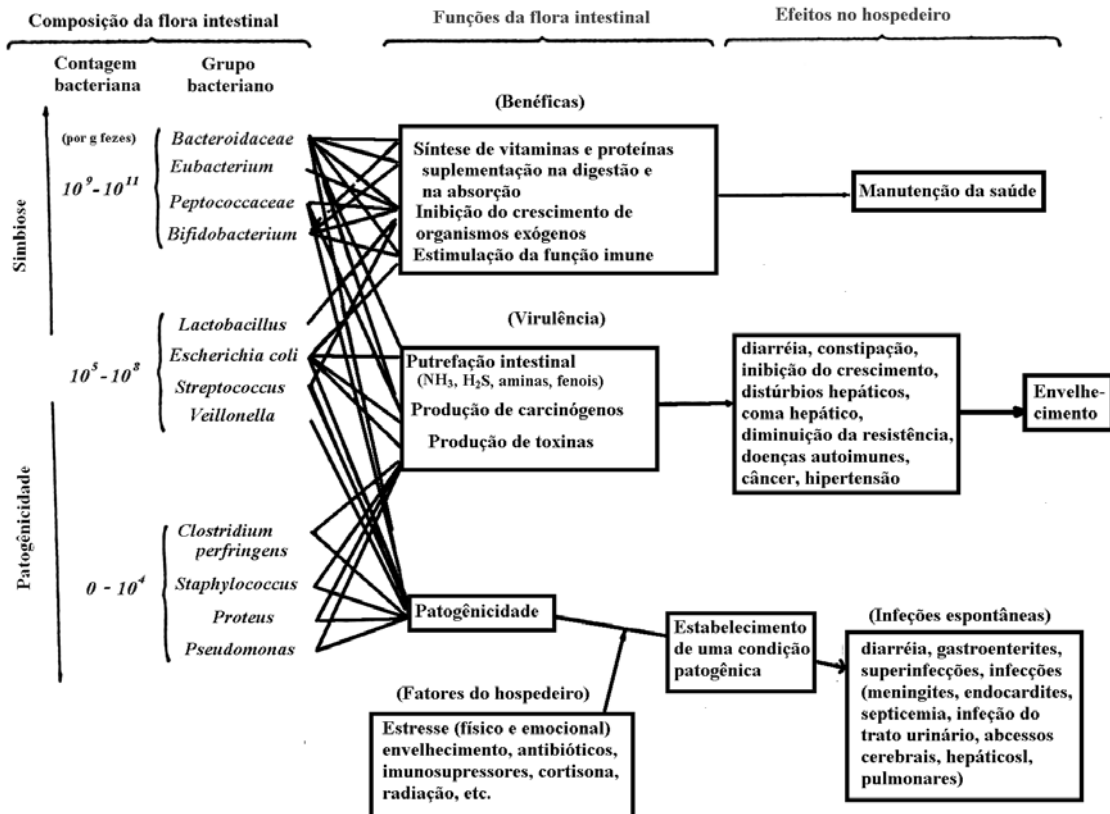
1. Introdução

A comunidade microbiana que habita o trato gastrointestinal é caracterizada pela sua alta densidade populacional, grande diversidade e complexidade de interações. As células bacterianas exercem grande influência nos processos imunológicos, nutricionais, fisiológicos e protetores do hospedeiro (MACKIE et al., 1999).

A quantidade total de bactérias por grama de fezes humanas é superior a 10^{11} . A microbiota fecal dominante consiste de anaeróbios estritos, como *Bacteroidaceae*, *Eubacterium*, *Peptococcaceae* e *Bifidobacterium*. Embora em indivíduos saudáveis a composição da microflora intestinal seja relativamente estável, esta pode ser alterada com fatores como idade, estado fisiológicos, drogas, doenças, dieta, estresse (MITSUOKA, 1992).

Os microrganismos podem fazer parte da flora dominante, com níveis ao redor de 10^{10} - 10^{12} UFC/g de conteúdo, basicamente anaeróbios como *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium* e *Peptostreptococcus*; flora sub-dominante (intermediária), onde são encontrados os anaeróbios facultativos, como *Enterobacteriaceae*, *Streptococci* e *Lactobacilli*; ou flora residual, composta por um grupo menor de microrganismos patogênicos e oportunistas, sempre presentes em números inferiores a 10^7 UFC/g (HOLZAPFEL et al., 1998). Além disso, os microrganismos intestinais podem ser divididos em três grupos, dependendo da relação com o hospedeiro (Figura 1). O primeiro grupo consiste em organismos simbióticos e constituem a flora predominante; o segundo grupo inclui os organismos ubiquitários, como *E. coli* ou grupo dos *Streptococcus*, mas que não são predominantes no indivíduo saudável e o terceiro grupo de bactéria consiste nas patogênicas, algumas vezes produtoras de infecções autógenas, normalmente encontrados em pequeno número (MITSUOKA, 1982).

Figura 1 – Interrelações entre Bactérias Intestinais e Hospedeiro



Fonte: MITSUOKA (1992)

Embora normalmente estável, diversos fatores, extrínsecos e intrínsecos, podem afetar o desenvolvimento da colonização e manutenção da microbiota. Os fatores extrínsecos incluem a microbiota do ambiente e dos alimentos, hábitos alimentares e composição da microbiota materna, além de estresse dietético e de temperatura. A fisiologia do hospedeiro, pH intestinal, potencial redox, peristaltismo, secreções intestinais, sais biliares, resposta imune, fatores microbianos como capacidade de adesão, motilidade, flexibilidade nutricional, tempo de geração e interações microbianas (sinergismo, antagonismo, estimulação) seriam exemplos de fatores intrínsecos (HOLZAPFEL et al., 1998; MACKIE et al., 1999).

A manipulação do desenvolvimento da microbiota entérica pode ser realizada por meio de controle de fatores externos que têm efeito direto na composição da microbiota, como dieta e medicamento (MACKIE et al., 1999). A administração oral de preparados de células bacterianas desejáveis e viáveis, denominados de probióticos, ou de prebióticos, substâncias que atuam estimulando seletivamente um grupo microbiano específico pode

ser benéfica ao hospedeiro. Oportunidades para a administração de probióticos são criadas durante períodos de estresse ou antibioticoterapia, onde a administração de um microrganismo benéfico pode prevenir a colonização por um microrganismo transiente ou patogênico. Além disso, os probióticos podem auxiliar ou promover o restabelecimento da microbiota indígena. O objetivo desta revisão é resumir os conhecimentos adquiridos sobre o efeito da administração de probióticos e prebióticos na composição e atividade enzimática da microflora intestinal.

2. Composição e distribuição da microbiota intestinal

O trato digestório do ser humano consiste em boca, cavidade oral, esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso (ceco, cólon ascendente, cólon transversal, cólon descendente, cólon sigmoidal) e reto (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991).

O material intestinal apresenta uma elevada quantidade de microrganismos, alcançando 400 bilhões por grama de conteúdo (peso seco), correspondendo a cerca de 300-400 espécies cultiváveis e mais de 190 gêneros (HOLZAPFEL et al., 1998). Em fezes de humanos adultos, os microrganismos predominantes são anaeróbios estritos, com prevalência de *Bacteroidaceae*, seguido por *Eubacteria*, *Lactobacilli* anaeróbios, *Peptococcaceae* e bifidobactérias. Outros anaeróbios encontrados pertencem às famílias *Clostridia*, *Megasphareae* e *Veillonellae*. A flora aeróbia é representada por coliformes, *Streptococci* e *Lactobacilli* anaeróbios facultativos (MITSUOKA, 1982).

As bactérias endógenas não são distribuídas aleatoriamente no trato gastrointestinal, ao contrário, são distribuídas, em nível de espécies e densidade populacional, caracteristicamente em regiões específicas do trato, com maior densidade populacional no intestino grosso. Esta distribuição (Tabela 1) ocorre em função das condições de cada região do trato, como disponibilidade de nutrientes, pH, potencial redox, fatores químicos e físicos (MACKIE et al., 1999).

O estômago e o intestino delgado proximal contêm uma quantidade relativamente pequena de microrganismos devido ao baixo pH, danoso para a maioria dos microrganismos, e rápido fluxo alimentar dessas regiões (MACKIE et al., 1999). A população média nesses segmentos intestinais é da ordem de 10^2 a 10^5 UFC/mL de conteúdo, e dominada principalmente por bactérias gram-positivas como *Streptococci* e

Lactobacilli ácido-tolerantes, além de leveduras (LAMBERT e HULL, 1996; HOLZAPFEL et al., 1998).

Tabela 1 – Distribuição e composição da microbiota intestinal

Sítio	Composição	UFC/ ml ou g de conteúdo	PH	Potencial Oxi-redox (mV)
Estômago	<i>Lactobacillus</i>	0-10 ³	< 3,0	+ 150
	Leveduras			
	<i>Streptococcus</i>			
Duodeno-Jejuno	Similar ao estômago	10 ² – 10 ⁴	6,0 – 7,0	– 50
Jejuno – Íleo	<i>Bacteroides</i>	10 ⁵ - 10 ⁷	6,0 – 7,0	– 50 a – 150
	<i>Bifidobacterium</i>			
	<i>Enterobacteriaceae</i>			
	<i>Fusobacterium</i>			
	<i>Lactobacillus</i>			
	<i>Streptococcus</i>			
Íleo – ceco	<i>Bacteroides</i>	10 ⁵ – 10 ⁸	7,0 – 7,5	– 150 a – 200
	<i>Bifidobacterium</i>			
	<i>Clostridium</i>			
	<i>Enterobacteriaceae</i>			
	<i>Fusobacterium</i>			
	<i>Lactobacillus</i>			
Cólon	<i>Streptococcus</i>	10 ¹⁰ – 10 ¹²	7,0 – 7,5	– 200 a – 250
	<i>Bacteroides</i>			
	<i>Bifidobacterium</i>			
	<i>Clostridium</i>			
	<i>Enterobacteriaceae</i>			
	<i>Eubacterium</i>			
	<i>Fusobacterium</i>			
	<i>Peptococcus</i>			
	<i>Peptostreptococcus</i>			
	<i>Proteus</i>			
	<i>Pseudomonas</i>			
	<i>Ruminococcus</i>			
	<i>Staphylococcus</i>			
<i>Streptococcus</i>				
<i>Veillonella</i>				

Fonte: adaptação de dados a partir de HOLZAPFEL et al. (1998); GOLDIN et al. (1994).

Em pessoas normais, a microbiota do intestino delgado é relativamente simples e não é encontrado grande número de microrganismos, com contagens geralmente inferiores a 10⁴ UFC/g de conteúdo. As principais espécies no duodeno e jejuno são *Streptococci*, *Lactobacilli* e *Veillonellae* (MITSUOKA, 1982)

Seguindo em direção ao íleo, observa-se um aumento no número de *E. coli* e de bactérias anaeróbias, com um aumento no número e variedade de microrganismos, até

alcançar a válvula ileo-cecal (MITSUOKA, 1982). A população no jejuno-íleo é estimada entre 10^4 a 10^6 UFC/mL, podendo alcançar 10^8 UFC/g ou mL de conteúdo e é composta por *Lactobacilli*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococci*, *Bacteroides*, *Bifidobacteria* e *Fusobacteria* (HOLZAPFEL et al., 1998; MACKIE et al., 1999).

O intestino grosso (cólon) é o sítio primário da colonização microbiana. Uma vez que o alimento digerido passa da válvula ileocecal para o ceco, a velocidade de trânsito é repentinamente reduzida e o número total de bactérias aumenta abruptamente a níveis de 10^{10} a 10^{12} UFC/ g ou mL de conteúdo. Essas bactérias colonizam o intestino grosso utilizando o conteúdo fecal proveniente do intestino delgado como meio de crescimento. Outros fatores que favorecem o crescimento são o baixo potencial redox e uma concentração relativamente alta de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (MACKIE et al., 1999). A microbiota é semelhante à das fezes, sendo *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobactérias*, *Peptostreptococcus* os principais grupos bacterianos do cólon, com a ocorrência de um grupo menor de aeróbios facultativos como coliformes, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Veillonella* em níveis de 10^5 a 10^8 UFC/g de conteúdo (HOLZAPFEL et al., 1998; MACKIE et al., 1999).

3. Colonização e Desenvolvimento da Microbiota

O termo colonização descreve uma população bacteriana no trato gastrointestinal que apresenta tamanho estável, no tempo, sem necessidade de reintrodução periódica, quer seja por utilização de doses orais constantes ou por outros meios. Isso implica na multiplicação da bactéria colonizante em um nicho intestinal particular e em uma taxa que iguala ou excede a taxa de lavagem ou eliminação no sítio (MACKIE et al., 1999).

No interior do útero materno, o intestino do feto é estéril. No momento do nascimento este é contaminado por várias bactérias, originárias do canal vaginal e da pele da mãe, das mãos de enfermeiras e do ar ambiental, que começam a proliferar na mucosa da pele, trato digestório e respiratório da criança. O tipo de parto (cesáreo, normal) e forma de alimentação (aleitamento materno ou utilização de fórmulas infantis) também influencia no tipo de microrganismos que irão colonizar o trato gastrointestinal (MACKIE et al., 1999).

Cerca de 24 horas após o nascimento, as fezes da maioria dos recém-nascidos contêm uma grande variedade de bactérias, incluindo coliformes, *Enterococcus*, *Clostridia* e *Staphylococci* em variadas proporções (MITSUOKA, 1992). O intestino é inicialmente colonizado por bactérias do ácido láctico, *Enterobacteriaceae* e *Streptococci*. Após a

introdução de alimentos sólidos, anaeróbios estritos aumentam em número e diversidade até alcançarem patamar semelhante ao dos adultos. (MACKIE et al., 1999).

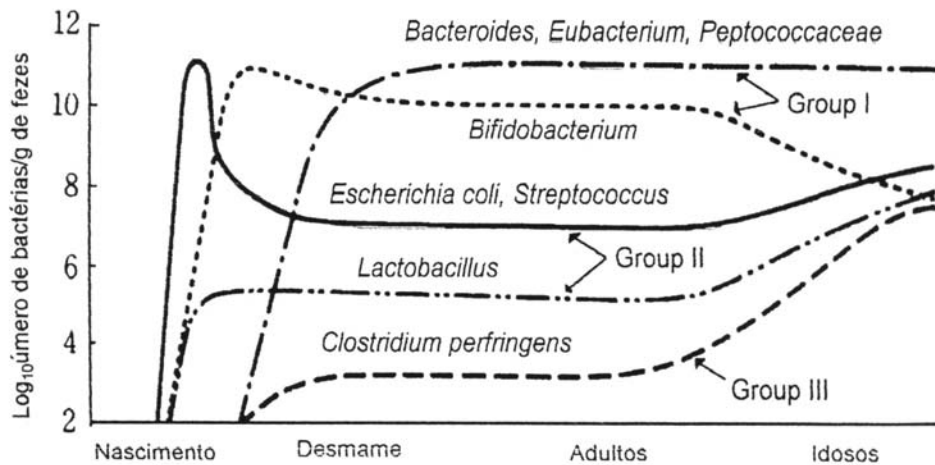
Três a quatro dias após o nascimento começa a proliferação de *Bifidobacterium* spp. Em resposta ao aumento dessas bactérias, coliformes, *Enterococcus* e bactérias putrefativas são restringidas e diminuem gradualmente. A microbiota intestinal de recém-nascidos se estabiliza a partir da primeira semana, com predominância de bactérias bífidas, acreditando-se que essa predominância tenha efeito na prevenção de infecções intestinais (MITSUOKA, 1989).

Em bebês amamentados ao peito, a microbiota fecal consiste principalmente de bifidobactérias, com cerca de 1% de *E. coli*, *Enterococci* e *Lactobacilli*. Já em bebês alimentados com formulas infantis, embora bifidobactérias ainda constituam a maior parte da flora, ocorre um aumento significativo de bactérias aeróbias como *E. coli* e *Streptococci*, além de anaeróbios como *Bacteroides*, *Eubacteria* e *Peptococcaceae* (MITSUOKA, 1982).

Ao alcançarem os 2 anos, a microflora de crianças se assemelha à dos adultos, onde o número de *Bacteroidaceae*, *Eubacteria* e *Peptococcaceae* pode ser maior do que de bifidobactérias e os números de *E. coli* e *Streptococci* diminuem para valores inferiores a 10^6 UFC/ g (MITSUOKA, 1982).

Em idosos normalmente há uma diminuição ou desaparecimento de bifidobactérias e aumento de *Clostridia*, *Lactobacilli*, *Streptococci* e *Enterobacteriaceae*. Essas mudanças são consideradas decorrentes do envelhecimento, mas podem auxiliar a acelerar o processo de senescência. Existem evidências de que a presença de bifidobactérias no intestino grosso auxilia na manutenção da saúde humana (MITSUOKA, 1992). O Gráfico 1 resume os efeitos da idade sobre a composição da microflora humana.

Gráfico 1 – Mudança da microbiota fecal com a idade



Fonte: MITSUOKA (1992)

4. Probióticos

O termo “probiótico” (pro = a favor de; biótico - do grego “bios”- = vida) foi primeiramente utilizado em 1965 por Lilly e Stillwell para descrever o efeito promotor do crescimento de um microorganismo em outro. Em 1989 FULLER, definiu “probióticos” como sendo microorganismos vivos, habitantes normais do trato intestinal e originários da espécie à qual se destinam, utilizados como aditivos alimentares com o objetivo de melhorar o balanço microbiano e, assim, promover a saúde e o bem estar do hospedeiro.

O consumo de probióticos vem sendo utilizado para a manutenção ou recuperação do equilíbrio da microbiota intestinal (GILLILAND, 1989). A seleção de microrganismos probióticos baseia-se em certas características fisiológicas e tecnológicas como: resistência ao suco gástrico e sais biliares de forma a sobreviver à passagem pelo tubo digestivo superior; capacidade de crescimento e sobrevivência no intestino; produção de efeitos benéficos quando no intestino; sobrevivência às condições de processamento mantendo viabilidade no alimento antes do consumo; ausência de patogenicidade ou toxicidade (KIM, 1988; GILLILAND, 1989). Algumas das bactérias mais utilizadas como probióticos, em produtos derivados do leite são: *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GG, *Bifidobacterium bifidum* (*B. bifidum*), *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *Enterococcus*, *Pediococcus acidilactici* (HULL et al., 1992; SANDERS, 1998; MACFARLANE e CUMMINGS, 1999).

5. Efeito de probióticos na composição e metabolismo da microbiota

Além da reposição da microbiota intestinal, os probióticos estão associados com modulação do sistema imune (PERDIGÓN et al., 1986; KATO et al., 1994), aumento da tolerância à lactose, atividade antitumoral (REDDY, 1998; HIRAYAMA e RAFTER, 2000), efeito hipocolesterolemiante (AKALIN et al., 1997) e inativação de compostos tóxicos aminados (ZHANG e OHTA 1991; GUERIN-DANAN et al., 1998). Além disso, os probióticos estão sendo pesquisados como veículos na produção de vacinas (WELLS et al., 1996; MERCENIER, 1999) e como moduladores da biodisponibilidade de alguns minerais como cálcio, magnésio e ferro (OHTA et al., 1994; OHTA et al., 1995; TAKAHARA et al., 2000; SAKAI et al., 2000).

Muitas espécies de lactobacilos estão sendo relacionadas com atividade antagonista contra organismos enteropatogênicos como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, *S. aureus*. A ação antibacteriana foi associada com a produção de peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos, que podem inibir outros microrganismos, além de produção de substâncias com ação antibiótica, como acidofilina isolada de *L. acidophilus* e bulgarican, isolada de *L. bulgaricus* (SHAHANI e AYEBO, 1980), enquanto *Bifidobacterium sp.* produz substâncias com efeito inibitório sobre *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter* e *Shigella*. *Bifidobacterium infantis* produz ácidos orgânicos, como lactato e acetato, que inibem *E. coli* e *Clostridium perfringens* (GIBSON e WANG, 1994).

Quando animais ou humanos são suplementados com bactérias produtoras de ácido láctico, normalmente ocorre um aumento detectável na contagem do organismo que foi administrado (BERTAZZONI-MINELLI et al., 1996; SPANHAAK et al., 1998; FULLER, 1999), porém os efeitos são transitórios e desaparecem alguns dias após o término do tratamento (GILLILAND et al., 1978; BERTAZZONI-MINELLI et al., 1996; BOUHNİK et al., 1996; SPANHAAK et al., 1998), indicando que, embora sobrevivam ao trato gastrointestinal, as estirpes utilizadas não conseguem colonizar o intestino.

Os efeitos sobre os outros grupos bacterianos variam com a cepa administrada e mostram-se controversos e não conclusivos. GALLAHER et al. (1996) observaram que a administração de Bifidobactérias e, ou, *Lactobacillus acidophilus* não apresentou alteração na contagem dos respectivos grupos bacterianos, porém foi verificada uma diminuição no número de *C. perfringens*,

Estudos *in vitro* com estirpes de *L. plantarum*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. rhamnosus* e *Bifidobacterium sp.* mostraram mudanças na composição da microbiota. Foi encontrado um aumento marcante, embora temporário, no número de bactérias do ácido

lático e bifidobactérias. As mudanças na produção de ácido graxos de cadeia curta foram pequenas. Os resultados mostraram um aumento do número de bactérias do ácido lático que, no entanto, diminuiu após o término do tratamento, voltando aos valores iniciais. A contagem de *Enterobacteriaceae* diminuiu acentuadamente enquanto *Enterococci* diminuíram durante o tratamento, mas aumentaram novamente ao término da suplementação, alcançando níveis ainda maiores do que os iniciais. A produção de AGCC total aumentou durante o tratamento e retornou aos valores iniciais ao término do mesmo (ALANDER et al., 1999). Camundongos neonatos que receberam lactobacilos apresentaram uma redução significativa na contagem de coliformes aos 5 dias, porém os efeitos não foram permanentes e desapareceram aos 10 dias (FULLER, 1999).

Conforme citado anteriormente, o tipo de aleitamento influi na composição da microflora intestinal e bebês amamentados apresentam *Bifidobacteria* como flora dominante, o que está associado a uma maior resistência a diarreia. A administração de *B. bifidum* para bebês (6 meses a 3 anos) resultou em um aumento considerável da população de bifidobactérias (MISRA e KUILA, 1994). Em 1995 foi realizado um estudo com grupos de bebês alimentados com fórmula infantil padrão, fórmula infantil biologicamente modificada contendo *Bifidobacterium bifidum* e aleitamento materno. Os resultados mostraram que o grupo alimentado com *B. bifidum* apresentou, após 1 mês, contagens de bifidobactérias e valores de pH cecal e colonização por *Enterococcus faecalis* semelhantes à de bebês com aleitamento materno e superiores aos de bebês alimentados com fórmula infantil padrão - sem o probiótico (LANGHENDRIES et al., 1995). A suplementação de bebês (10 a 18 meses) com *L. casei* durante 1 mês levou ao aumento na quantidade de crianças com mais de 10^6 UFC de lactobacilos/g de fezes (GUERIN-DANAN et al., 1998).

O consumo de *L. acidophilus* resultou em um aumento no número de lactobacilos facultativos nas fezes, número que diminuiu após a parada do consumo. Não houve mudanças significativas nos outros grupos de microrganismos, provavelmente porque os indivíduos estavam saudáveis, não apresentando distúrbios intestinais (GILLILAND et al., 1978). Este resultado não foi confirmado por AYEBO et al. (1980), os quais verificaram que a administração de leite acidófilo em um grupo de voluntários por um período de quatro semanas resultou na diminuição da contagem de coliformes, mantida por 1 mês após o término da suplementação, além de aumento na contagem de *Lactobacillus*.

Em outro trabalho com humanos, a suplementação com *L. acidophilus* e *B. bifidum* levou ao aumento do número de anaeróbios totais, lactobacilos aeróbios e de bifidobactérias fecais, mas não mostrou alteração na contagem de *Enterobacteriaceae*,

cocos anaeróbios, *Bacteroides*, fungos e *Staphylococcus*. Dois meses após o início do tratamento, foi verificado um aumento significativo de *E. coli* e diminuição de níveis médios de enterococos. Como em outros trabalhos, o efeito da administração de probióticos cessou após o término do tratamento (BERTAZZONI-MINELLI et al., 1996).

Japoneses saudáveis que consumiram iogurte contendo *Lactobacillus* GG apresentaram aumento no número de bifidobactérias e *Lactobacillus* GG fecais, e diminuição do pH, do número de clostrídios lecitinase negativa e da concentração fecal de amônia. Como consequência, a porcentagem de bifidobactérias na microbiota fecal aumentou de 16,9% para 36,0%. Bactérias aeróbias, *Enterobacteriaceae* e *Enterococcus* apresentaram pequena diminuição durante a administração do iogurte. Duas semanas após o término do tratamento houve o retorno aos valores iniciais de bifidobactérias. Não houve diferença entre as contagens totais de *Bacteroidaceae*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella* e *Megasphaera*, nem mudanças na atividade de enzimas bacterianas (B-glucuronidase, B-glucosidase, urease) (BENNO et al., 1996).

A administração de *L. casei* Shirota, sob a forma de leite fermentado, levou a um aumento significativo na contagem fecal desta espécie, além de um aumento da contagem de lactobacilos totais, durante o período de tratamento, indicando que o consumo de maior número de lactobacilos leva a aumento da população e não a uma simples substituição dos lactobacilos endógenos. Após o término da administração, os valores de *L. casei* Shirota retornaram aos níveis anteriores ao tratamento. Neste trabalho tampouco foi verificada alteração significativa de contagem de *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *S. aureus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* e leveduras (SPANHAAK et al., 1998).

A ingestão de *B. lactis* Bb-12 por crianças saudáveis também levou a alteração na composição da microbiota fecal. Antes da ingestão do probiótico, as bifidobactérias eram o segundo grupo bacteriano predominante, correspondendo a 23% do total bacteriano nas amostras fecais, sendo que *B. lactis* Bb-12 não tinha sido detectada em nenhuma amostra. Durante a ingestão, o número de bifidobactérias aumentou, alcançando 35% do total. A estirpe administrada foi encontrada em 53% das amostras, porém 7 dias após o término do tratamento *B. lactis* não foi mais detectada em amostras e o número total de bifidobactérias diminuiu. Não foi detectada alteração nos outros grupos bacterianos (FUKUSHIMA et al., 1998).

A suplementação com *Bifidobacterium bifidum* ou *Lactobacillus acidophilus* levou ao aumento de, respectivamente, $10^{7,82}$ para 10^9 UFC de *Bifidobacteria*/g fezes e de $10^{5,42}$ para $10^{6,46}$ UFC de *Lactobacilli*/g, em humanos (FULLER, 1999).

Também pode ocorrer que a administração de uma determinada espécie aumente os níveis de outra considerada benéfica. A suplementação de leitões com *Enterococcus faecalis* induziu um aumento na contagem de *Bifidobacteria* viáveis, enquanto humanos que receberam leite fermentado com *L. acidophilus* apresentaram um aumento significativo tanto no número de *Lactobacilli* quanto de *Bifidobacteria* (FULLER, 1999). A administração de *L. casei* ou *L. casei* Shirota em humanos foi associada com um aumento significativo na contagem de *Bifidobacterium* (DJOUZI et al., 1997; SPANHAAK et al., 1998), mas não apresentou efeito significativo na contagem de outros microrganismos (SPANHAAK et al., 1998).

Alguns dos efeitos benéficos de probióticos sobre a saúde do hospedeiro podem estar associados a alterações na atividade de enzimas bacteriana. As mais estudadas são β -glucuronidase, azoredutase, nitroreductase, enzimas microbianas associadas à produção de compostos metabólicos tóxicos, β -galactosidase e α - e β -glucosidase, enzimas associadas ao processo fermentativo. A nitroreductase fecal é uma enzima que pode converter compostos aromáticos nitrificados em aminas potencialmente danosas enquanto a azoredutase catalisa a formação de aminas aromáticas, algumas das quais apresentam propriedades carcinogénicas, a partir de azocompostos. A β -galactosidase está associada a melhoria na digestão de lactose e α -glucosidase melhora a fermentação de amidos resistentes, o que leva à produção de butirato. A função de β -glucosidase é controversa, sendo implicada tanto na geração de toxinas e quanto de derivados bacterianos, que podem ter efeito protetor contra agentes químicos que podem induzir câncer.

Os efeitos sobre as enzimas variam de acordo com as cepas testadas. Os trabalhos mostram que a atividade de β -glucuronidase é reduzida com a utilização de probióticos como *Lactobacillus* GG (FULLER, 1999); *L. casei* (DJOUZI et al., 1997; GUERIN-DANAN et al., 1998), *L. casei* Shirota (SPANHAAAR et al., 1998), *L. acidophilus* (AYEBO et al., 1980; GOLDIN e GORBACH, 1984; FULLER, 1999) e *Bifidobacterium bifidum* (FULLER, 1999).

Aparentemente, é necessário um período de pelo menos 10 dias para que ocorra o efeito da suplementação com lactobacilos na atividade das enzimas, enquanto o efeito observado dura por pelo menos 10 dias após cessar o consumo (GOLDIN e GORBACH,

1984). A administração de *L. acidophilus* (cepas NCFM e N2) a voluntários resultou em uma diminuição significativa e consistente da atividade de β -glucuronidase, nitroreductase e azoredutase, que retornaram aos níveis normais quando a administração de probiótico cessou (GOLDIN e GORBACH, 1984). O retorno aos níveis normais de atividade foi primeiramente observado por AYEBO et al. (1980). A administração de leite acidófilo em um grupo de voluntários por um período de 4 semanas resultou em diminuição da atividade metabólica de β -glucosidase e β -glucuronidase, que recuperaram os valores iniciais após o término do tratamento.

A associação de *L. acidophilus* e *B. bifidum* levou a uma redução significativa na atividade de nitroreductase, embora não tivesse efeito sobre a atividade de azoredutase e de β -glucuronidase, enquanto *Lactobacillus* GG reduziu a atividade de nitroreductase (FULLER, 1999). A associação de iogurte e *L. casei* não alterou pH ou atividade de β -glucuronidase, porém foi observado um aumento na atividade de β -galactosidase e α - e β -glucosidase, além de aumento na concentração de AGCC total (DJOUZI et al., 1997). A suplementação de bebês de 10 a 18 meses, com *L. casei* levou a uma diminuição da atividade de β -glucuronidase e β -glucosidase (GUERIN-DANAN et al., 1998), resultado similar ao obtido com *L. casei* Shirota (SPANHAAK et al., 1998).

O efeito de um produto lácteo fermentado contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus lactis* e *S. cremoris* foi estudado por MARTEAU et al. (1990). O ensaio incluiu os períodos anterior e posterior à ingestão do produto por nove voluntários (30 a 42 anos de idade). Ao contrário dos outros trabalhos, os autores não observaram alteração na atividade de β -glucuronidase. Tampouco foi verificada alteração na atividade de β -galactosidase e azoredutase, enquanto nitroreductase diminuiu significativamente durante o período de ingestão, pela ação de *L. acidophilus* viáveis que induziriam a diminuição da atividade desta enzima, que manteve seu nível reduzido nas 3 semanas seguintes ao término da administração. A atividade de β -glucosidase aumentou significativamente durante a administração, provavelmente devido ao aumento de *B. bifidum*, retornando aos valores normais após o término da suplementação (MARTEAU et al., 1990).

Outro benefício associado ao consumo de *Lactobacillus acidophilus* é a redução dos níveis de amônia em pacientes com encefalopatia hepática, melhorando a sintomatologia desta doença. Uma redução similar nos níveis de amônia foi verificada em pacientes que receberam preparação contendo *B. breve* e *B. bifidum* (FULLER, 1999). A regulação da

atividade intestinal e o estímulo do crescimento de bifidobactérias e lactobacilos diminuiria a produção de amônia intestinal e sua conseqüente absorção.

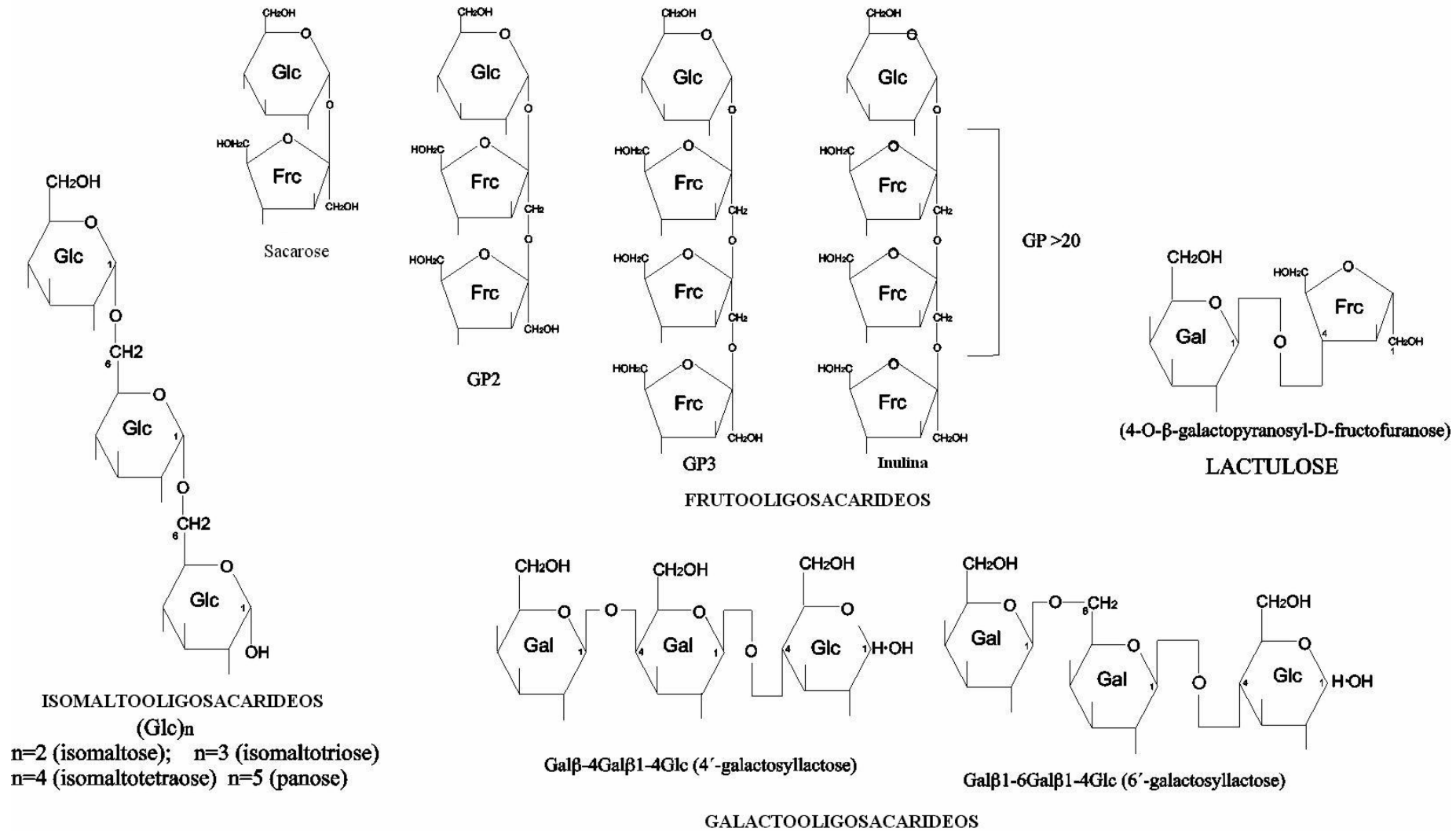
Além de alterar a atividade enzimática, a administração de *L. casei* Shirota também levou a um aumento no conteúdo de umidade da massa fecal e diminuição significativa da concentração de ácido graxos de cadeia curta nas fezes. O mecanismo sugerido para estas alterações seria uma redução do tempo de trânsito intestinal, que teria como benefício a melhoria no estado de constipação e efeito protetor com relação ao risco de desenvolvimento de câncer de cólon, devido ao aumento na taxa de eliminação de compostos tóxicos (SPANHAAK et al., 1998).

6. Prebióticos

Em 1975, Burkitt e Trowell sugeriram a hipótese da fibra dietética, pela qual uma dieta deficiente em fibras aumentaria o risco de desenvolvimento de desordens intestinais como constipação, doença diverticular, hemorróidas e câncer de cólon, além de desordens sistêmicas que incluem doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade (JENKINS et al., 1999). Em 1995 foi introduzido o conceito de prebiótico, como sendo um ingrediente alimentar, geralmente carboidrato ou fibra, não digerível pelas enzimas do trato gastrointestinal, que afeta de forma benéfica o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e,ou, atividade de um ou um limitado número de bactérias no cólon que podem melhorar a saúde do hospedeiro (GIBSON e ROBERFROID, 1995).

Os prebióticos mais estudados e suas estruturas químicas são mostrados na Figura 2. Desses os mais utilizados são lactulose, frutooligossacarídeo (FOS) e inulina.

Figura 2 - Estrutura química dos oligossacarídeos mais estudados



Legenda: Glc=glucose; Gal=galactose; Frc=frutose; Xyl=xilose; GP=grau de polimerização

A lactulose, associada ao aumento da atividade lactofermentativa de *Lactobacillus*, e os fructooligossacarídeos e inulina, que estimulam o crescimento de *Bifidobacterium*, são os prebióticos mais estudados e comercializados, porém outros carboidratos como galactooligossacarídeos (GOS), glicooligossacarídeos, xilooligossacarídeos e oligossacarídeos de soja estão despertando interesse nos últimos anos (O'SULLIVAN, 1996).

Nas últimas décadas vários oligossacarídeos têm sido estudados no Japão. Essas substâncias não são digeridas por enzimas humanas, mas são hidrolizadas em vários graus por bactérias do cólon, com a produção de ácidos orgânicos, principalmente ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). A maioria dos oligossacarídeos são fermentados *in vitro* por bactérias do gênero *Bifidobacterium* (exceto *B. bifidum*) e em grau limitado por *Lactobacillus salivarius*, *Mitsuokella multiacida*, *Megamonas hypermegas*, grupo do *Bacteroides fragilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus* e algumas espécies de *Clostridium* e *Peptococcus*, mas não são fermentados por *C. perfringens* e *E. coli* (MITSUOKA, 1992)

6.1. Importância de produtos da fermentação colônica

Os principais produtos de fermentação no intestino grosso de animais e seres humanos são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente acetato, propionato e butirato. Em menor grau ocorre a produção de lactato, succinato, ácidos graxos ramificados, isobutirato, 2-metilbutirato e isovalerato, produtos de fermentação de aminoácidos. Outros produtos da fermentação microbiana incluem indol, fenol, aminas e amônia, geradas durante o catabolismo de aminoácidos, além de gases como H₂, CO₂ e CH₄ (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991).

Os AGCC são absorvidos pelo intestino e permitem que o organismo recupere energia de componentes dietéticos não digeridos nas partes superiores do trato gastrointestinal. Esta energia recuperada pode variar de 10 a 30% das necessidades metabólicas basais do organismo (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991).

A absorção de AGCC parece ser dependente da concentração e o transporte é associado com o aparecimento de íons de bicarbonato e estímulo da absorção de sódio. A principal via de absorção é a difusão passiva do forma protonada através da membrana do colonócito (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991).

A formação de AGCC tem importância especial por serem estas fonte de energia e substrato para o crescimento bacteriano, serem precursores da biossíntese lipídica na mucosa do enterócito e estarem relacionados a diversos efeitos orgânicos, locais e sistêmicos, resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Benefícios atribuídos a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos pela microbiota intestinal.

AGCC	Efeitos específicos	Benefícios
AGCC totais	Diminuição do pH	Diminuição da biodisponibilidade de compostos alcalinos citotóxicos Inibição do crescimento de microrganismos sensíveis ao pH
Acetato	Possivelmente aumenta a absorção de cálcio e magnésio Diminuição da resistência dos vasos sanguíneos Metabolizado pelos músculos cardíaco e esquelético e pelo cérebro	Diminuição das perdas fecais de cálcio e magnésio Aumento do fluxo venoso portal hepático e do cólon Fonte de energia
Propionato	Aumento da contração muscular do cólon Diminuição da resistência dos vasos sanguíneos Estímulo ao transporte de eletrólitos no cólon Proliferação do epitélio do cólon Precursor de gliconeogênese Inibição da síntese do colesterol hepático e, ou, redistribuição do colesterol do plasma para o fígado.	Laxação mais fácil, aliviando a constipação Aumento do fluxo venoso portal hepático e do cólon Maior absorção de íons e fluídos, prevenindo a diarreia Possível aumento da capacidade de absorção Fonte de energia Diminuição do colesterol sérico (ratos e suínos)
Butirato	Diminuição da resistência dos vasos sanguíneos Metabolizado pelas células epiteliais do cólon Manutenção do fenótipo normal de colonócitos Estímulo do transporte de eletrólitos no cólon Modulação do metabolismo de ácidos nucleicos Inibição da ação enzima histona deacetilase no núcleo celular	Aumento do fluxo venoso portal hepático e do cólon Manutenção da integridade da mucosa, reparo de colites ulcerativas, proliferação de colonócitos Diminui o risco de malignidade Maior absorção de íons e fluídos, prevenindo a diarreia. Quando em baixas concentrações, leva à redução da síntese de DNA Facilita o reparo de DNA, diminuindo a taxa de mutações.

Fonte: adaptado de CUMMINGS e MACFARLANE (1991) e TOOPING (1996).

Os AGCC possuem a capacidade de diminuir o pH colônico, mudança relacionada com proteção contra carcinogênese colônica, por meio da redução da biodisponibilidade de amins tóxicas (TOOPING, 1996).

O butirato é a principal fonte de energia das células epiteliais da mucosa colônica e atua na modulação do metabolismo de ácidos nucleicos, com efeito principalmente na regulação da expressão gênica e crescimento. Baixas concentrações deste ácido reduzem a síntese de DNA e suprimem a proliferação de vários tipos celulares. O butirato inibe a ação da enzima histona deacetilase no núcleo celular, permitindo que ocorra a hiperacetilação de proteínas histonas. Esta hiperacetilação leva à abertura da estrutura do DNA, facilitando o acesso de enzimas que reparam danos no DNA (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991; TOOPING, 1996).

O propionato é o maior precursor de gliconeogênese em ruminantes e a sua suplementação está associada à diminuição do colesterol sérico em ratos e suínos, pela inibição da síntese do colesterol hepático e, ou, redistribuição do colesterol do plasma para o fígado, enquanto o acetato é metabolizado pelos músculos cardíaco e esquelético e pelo cérebro (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991), além de promover diminuição da resistência dos vasos da rede vascular colônica, contribuindo para a manutenção do fluxo sanguíneo tanto para o fígado quanto para o cólon. Este ácido também potencializa os efeitos de propionato e butirato no estímulo da absorção de magnésio e outros íons no cólon (TOOPING, 1996).

Dos outros derivados da fermentação, os que recebem maior atenção são amônia, indoles e fenóis, devido ao seu caráter tóxico. A amônia induz uma aceleração na renovação celular e geralmente é mais tóxica para células saudáveis do que transformadas, o que pode selecionar linhagens cancerígenas. Sua concentração pode ser diminuída no lúmen intestinal por fermentação ativa de carboidratos, estimulando o requerimento bacteriano por nitrogênio devido ao aumento do crescimento. Compostos fenólicos e indólicos são resultantes da deaminação de aminoácidos aromáticos e são normalmente detoxificados por conjugação com glucuronídeos ou sulfatos no fígado e excretados na urina. Indoles e fenóis atuam como pró-carcinogênicos (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991).

Os AGCC atuam no controle do pH colônico e promovem o aumento de absorção de íons como cálcio, magnésio e ferro (TRINIDAD et al., 1996). Entre os efeitos sistêmicos podem ser citados a ação como reguladores de vias metabólicas-chaves como

gliconeogênese, lipogênese e metabolismo de ácidos nucléicos (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991).

6.2. Características de alguns prebióticos

Os FOS são polímeros de D-frutose, com ligações $\beta(2-1)$ e com uma ligação terminal $\alpha(1-2)$ D-glicose. Esse grau de polimerização (GP) pode variar de 2 a 60, sendo que polímeros com GP maior que 30 são normalmente chamados de inulina. O termo oligofrutose compreende, por sua vez, as frações com menor peso molecular (GP 2 a 20) (O'SULLIVAN, 1996).

O principal grupo bacteriano que fermenta os FOS é o das bifidobactérias (exceto *B. bifidum*). Algumas espécies de lactobacilos como *L. acidophilus* e *L. casei* também podem utilizá-los como substrato (KAPLAN e HUTKINS, 2000). Existem evidências de que *Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Klebsiella*, *S. Aureus*, *S. epidermidis*, *E. Faecalis*, *E. faecium* e *Clostridium* spp. (principalmente *C. Butyricum*) também poderiam fermentar esses prebióticos, embora em pequena escala (O'SULLIVAN, 1996; ROBERFROID et al., 1998, HAVENAAR et al., 1999). A inulina não é fermentada por *B. longum* e a fermentação por *B. infantis* e *B. adolescentis* é limitada, indicando que sua administração deve ser acompanhada de ingestão de Bifidobactérias que estejam adaptadas a esse substrato (HAVENAAR et al., 1999).

Como resultado da fermentação, ocorre a formação de biomassa bacteriana, lactato, dióxido de carbono, metano, hidrogênio além de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente acetato, propionato e butirato (OHTA et al., 1994; GIBSON e ROBERFROID, 1995). A fermentação *in vitro* de FOS leva à produção de 40 % de AGCC (acetato: propionato: butirato = 81:13:6), 15% de L-lactato, 5% de dióxido de carbono e 40% de biomassa bacteriana (GIBSON e ROBERFROID, 1995) e resulta em diminuição do pH do meio.

Estudos sobre a fermentação *in vitro* de inulina mostraram a produção principalmente de CO₂, algum H₂ e pouco CH₄. Em uma fermentação de 24 horas foram produzidos AGCC, uma quantidade moderada de ácido lático e alta quantidade de succinato (HAVENAAR et al., 1999). O espectro de AGCC não foi muito diferente do observado com FOS e outros carboidratos (razão molar acetato: propionato: butirato = 73:19:8).

Experimentos *in vitro* mostraram que tanto FOS quanto inulina são rápida e completamente metabolizados pela flora microbiana. A taxa relativa de fermentação mostrou-se similar para ambas substâncias, porém uma análise mais detalhada revelou que

a taxa de degradação de oligómeros com GP < 10 foi aproximadamente 2 vezes maior do que a de moléculas com maior DP. A razão desta diferença na metabolização ainda não foi determinada (ROBERFROID et al., 1998).

A fermentação de FOS e inulina necessita de enzimas específicas. Bifidobactérias possuem 2,1-B-D-fructono-fructanohidrolase intracelular e produzem B-fructosidase para a fermentação de FOS, enquanto é necessário a síntese de inulinasas para a degradação de inulina. A atividade dessas enzimas é influenciada pelo grau de polimerização do substrato. As enzimas que atuam sobre inulina são hidrolases (endo e exo inulinasas, B-fructofuranosidase) ou transferases (inulina fructotransferase, enzima depolimerizante). As inulinasas sintetizadas por bifidobactérias são associadas à parede celular (ROBERFROID et al., 1998; HAVENAAR et al., 1999).

Com relação a outros prebióticos, estudos *in vitro* mostraram que a lactulose, disacárideo (4-O-β-galctopiranosil-D-fructofuranose) que é formado em pequenas quantidades durante o aquecimento do leite, permite o crescimento de bifidobactérias, além de uma grande variedade de bactérias do ácido láctico, que incluem *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lb. Acidophilus*, *Lb. Salivarius* e *Lb. Casei*. Outros grupos, como *Clostridium spp.*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* e bacteroides também podem metabolizar este isômero da lactose (O'SULLIVAN, 1996).

Estudos *in vitro* da fermentação de transgalactooligossacarídeos (TOS) resultaram em diminuição do pH inicial, de 6,9 para 5,2 no 7º dia, mantendo-se estável neste patamar. A proporção inicial de acetato, propionato e butirato foi, respectivamente, de 50, 24 e 12%. A adição de TOS levou a um aumento na concentração de AGCC e alteração das proporções, com um aumento de acetato (51 para 65%) e diminuição de propionato (25 para 17%). A presença de lactato só foi detectada 2 dias após a incorporação de TOS (BOUHNİK et al., 1997).

Os galactooligossacarídeos também são formados a partir de lactose por uma reação de transgalactosilação. Sua utilização *in vitro* por bactérias intestinais incluem *Bifidobacterium* e algumas espécies de *Bacteroides*, *Lactobacillus* e *Clostridium perfringens* (TANAKA e MATSUMOTO, 1998).

6.3. Efeito de prebióticos sobre a microbiota intestinal e sobre o organismo.

O efeito mais aceito de inulina e oligofrutose sobre a microbiota colônica é o aumento do número e proporção de bifidobactérias fecais. Os experimentos são consistentes em mostrar um aumento na quantidade de bifidobactérias associado ou não com aumento de lactobacilos, quando há suplementação com prebióticos (MITSUOKA, 1992; ROBERFROID et al., 1998; HAVENAAR et al., 1999). A ingestão de inulina ou oligofrutose está associada a um aumento da massa fecal excretada, devido ao aumento da biomassa bacteriana, além de aumento de nitrogênio fecal, possivelmente devido à maior excreção de proteína bacteriana (JENKINS et al., 1999).

Experimentos *in vitro* mostraram que bifidobactérias presentes em um “pool” cecal de origem humana incubado por 48 horas em meios contendo FOS ou inulina foram estimuladas de forma seletiva, enquanto os níveis de *E. coli* e clostrídios foram mantidos relativamente estáveis (HAVENAAR et al., 1999).

Camundongos alimentados com FOS por 14 dias apresentaram um número significativamente maior de bifidobactérias em comparação com xilooligossacarídeos e grupo controle. A contagem total de bactérias anaeróbias não sofreu alteração, indicando que o FOS foi utilizado seletivamente pelas bifidobactérias (Howard et al., 1995, citados por HAVENAAR et al., 1999).

A ingestão de leite fermentado com bifidobactérias (LFB) levou a um aumento no total de bifidobactérias e uma diminuição na atividade de B-glucuronidase, em indivíduos saudáveis. Quando BFM acrescido de inulina foi administrado, não foi observada alteração na atividade dessa enzima. Os dados não mostraram diferença com relação ao uso ou não de prebiótico e sobrevivência e pico de concentração fecal de bifidobactérias endógenas. A fermentação de inulina produziu lactato e acetato, que podem ser o resultado de fermentação por bifidobactérias, mas também butirato, o que sugere que outras bactérias também participaram da fermentação de inulina. Aparentemente, os dados indicam que a administração de BFM aumenta a proporção de bifidobactérias na microbiota colônica e a administração concomitante de inulina não exerce maiores modificações, porém uma análise mais detalhada dos dados mostra que, 2 semanas após a parada do consumo do produto fermentado, os voluntários que receberam inulina tiveram um número maior de bifidobactérias comparadas com os voluntários que receberam apenas o probiótico (BOUHNİK et al., 1996).

A ingestão de FOS, em substituição à sacarose, por indivíduos saudáveis, sob dieta controlada, durante 45 dias mostrou um aumento acentuado de bifidobactérias, com diminuição de bacteroides, *Fusobacterium* e clostrídios. A contagem de outros grupos bacterianos, aeróbios totais, anaeróbios totais, lactobacilos, coliformes e cocos gram-positivos, permaneceram inalteradas. Resultados similares foram obtidos com o uso de inulina. O grupo dos *Bacteroides* predomina durante a ingestão de sacarose, enquanto bifidobactérias foram a flora dominante quando houve ingestão de FOS (GIBSON, 1999).

Ratos colonizados com microbiota entérica humana suplementados com galactooligossacarídeos (GOS) e *B. breve* durante 4 semanas apresentaram um aumento na concentração cecal de bactérias anaeróbias totais, lactobacilos e bifidobactérias, além de diminuição no número de enterobactérias e do pH cecal. Galactooligossacarídeos dietéticos também foram associados com diminuição da atividade de β -glucuronidase (TANAKA e MATSUMOTO, 1998).

Indivíduos suplementados com diferentes níveis de GOS mostraram um aumento significativo e dose-dependente no número de bifidobactérias endógenas. Doses diárias de 3g de GOS promoveu o aumento de bifidobactérias e diminuição de *Bacteroidaceae* e uma dosagem diária de 10g foi suficiente para que bifidobactérias fossem estabelecidas como flora predominante. A administração simultânea de GOS e *B. breve* resultou na supressão de *Bacteroidaceae* e *Enterobacteriaceae* além de redução na excreção fecal de amônia (TANAKA e MATSUMOTO, 1998).

O consumo isolado de oligossacarídeos de soja (10g/dia) ou em combinação com *Bifidobacterium longum* (6×10^9 UFC/dia) por parte de indivíduos saudáveis, resultou em um aumento na porcentagem de bifidobactérias sobre a população total bacteriana das fezes de 7,0% (controle) para 15,5% na suplementação apenas de oligossacarídeo e de 8,1% (controle) para 18,3%, no grupo suplementado com oligossacarídeo e bifidobactérias (MITSUOKA, 1992).

Iogurte enriquecido com *B. longum* e 5g de lactulose, consumido por 12 voluntários, resultou no aumento da excreção de bifidobactérias, mas não houve diferenças na excreção de bactérias totais, aeróbios, anaeróbios, clostrídios e *E. coli* (O'SULLIVAN, 1996), contrastando com os resultados obtidos por MITSUOKA (1992), que verificou diminuição do número de *C. perfringens* nas fezes, além de diminuição de amônia fecal, p-cresol e fenol durante o período de consumo de lactulose.

Adultos que receberam uma dose diária de 3 g de lactulose durante 2 semanas não apresentaram alteração na contagem total bacteriana, embora houvesse um aumento na

contagem de bifidobactérias e diminuição de *Bacteroidaceae* e clostrídios lecitinase-positivo, incluindo *C. perfringens*. A porcentagem de bifidobactérias aumentou de 8,3%, antes do tratamento, para 47,7%. Em outro estudo houve um aumento na quantidade de *Bifidobacterium* fecal e da frequência de defecação quando indivíduos saudáveis receberam doses diárias de iogurte ou leite fermentado contendo 0,65 ou 4,0 g lactulose associado a *Bifidobacterium* (10^8 UFC/mL). Os efeitos foram mais intensos no grupo que recebeu maior dose de lactulose (MIZOTA, 1996). A ingestão de lactulose também foi associada à diminuição na produção de indol e fenol, metabólitos das bactérias intestinais, amônia e da atividade de β -glucuronidase, nitroreductase e azoredutase, além de uma diminuição no pH fecal e aumento da umidade do bolo fecal (MIZOTA, 1996).

A rafinose é outro carboidrato que está tendo suas propriedades bifidogênicas estudadas. A utilização de rafinose em ratos mostrou efeito estimulador na quantidade de bifidobactérias, além de resultar em um aumento na concentração cecal de lactobacilos e na produção de ácidos graxos voláteis e diminuição significativa do pH cecal, da concentração cecal de estreptococos e de triacilglicerois totais. A associação com *Lactobacillus acidophilus* resultou em aumento na concentração cecal de estreptococos, na produção de butirato, da fração HDL de colesterol e do peso cecal (resultado da hipertrofia do tecido como resposta ao aumento do conteúdo fecal) e diminuição de estafilococos e clostrídios, além de diminuição na atividade de azoredutase. Não houve alteração na contagem de aeróbios totais ou anaeróbios totais. O aumento na concentração de lactobacilos indica que a rafinose pode estar sendo usada por certos lactobacilos de origem cecal (TORTUERO et al., 1997).

Em 1997 foi realizado um extenso estudo sobre os efeitos de FOS, GOS e glicooligossacarídeos no metabolismo intestinal bacteriano. Os resultados mostraram que FOS e TOS foram os substratos preferidos por bifidobactérias, que apresentaram um aumento de 2 log nas fezes dos animais quando comparados com GOS ou dieta controle. Enquanto GOS induziram um aumento da atividade de B-galactosidase, B-glucosidase e L-glucosidase, e diminuição da atividade de B-glucuronidase, TOS aumentou a atividade de B-galactosidase e FOS não exerceu efeito sobre nenhuma das enzimas. Animais suplementados com dietas contendo GOS, TOS ou FOS apresentaram aumento do peso cecal, diminuição do pH cecal mas não alteraram a contagem total bacteriana. A concentração de AGCC e a quantidade de acetato aumentou significativamente em todos os grupos, mas o perfil diferiu com o tratamento: aumento de propionato foi observado apenas com GOS, enquanto houve aumento da concentração de butirato com FOS e TOS.

Dietas contendo FOS e TOS levaram a um aumento significativo na excreção de H₂ e CH₄ enquanto GOS aumentaram apenas CH₄. O aumento na produção de butirato e de H₂ sugere que outras bactérias, como *Clostridium*, *Eubacterium* ou *Peptostreptococcus*, produtoras de butirato, estão envolvidas no metabolismo de FOS e TOS, seja pela hidrólise dos produtos ou pela utilização de metabólitos produzidos por bifidobactérias. O aumento na produção de propionato pode estar relacionado à habilidade de hidrólise de GOS por *Bacteroides* (DJOUZI & ANDRIEUX, 1997).

Animais suplementados com TOS (5%) durante 4 semanas mostraram um aumento significativo nas concentrações fecais de bifidobactérias e anaeróbios totais. Embora estudos *in vitro* tenham mostrado que transgalactooligossacarídeos (TOS) são bons substratos para o crescimento de enterobactérias, *in vivo*, TOS não alterou os níveis desse grupo bacteriano. A administração prolongada de TOS levou a mudanças no metabolismo fermentativo, com diminuição significativa no H₂ excretado via respiratória, sem alteração das concentrações de CH₄ (BOUHNİK et al., 1997), contrastando com os resultados encontrados por DJOUZI & ANDRIEUX (1997), que observaram um aumento tanto nas concentrações de H₂ quanto de CH₄.

O efeito bifidogênico de diferentes dosagens de FOS (1, 2, 3, 6 e 8 g/dia) foi pesquisado *in vitro* por Reading et al. (1998), citados por RAO (1999). Embora o número de bifidobactérias tenha aumentado mesmo com doses de 1g/dia, outras bactérias incluindo bacteroides, coliformes e cocos gram-positivos também cresceram bem com essa quantidade de FOS. Ao se trabalhar com 2 g/dia de FOS, o aumento do número de bifidobactérias foi mais seletivo. Os resultados indicaram que o efeito bifidogênico de oligofrutose foi otimizado no nível de 4g/dia.

A ingestão de diferentes doses (2,5; 5; 10 ou 20g) diárias de FOS (GP ≤ 4) por voluntários saudáveis, durante 7 dias foi pesquisada. Nenhuma das doses alterou a contagem de anaeróbios totais, porém a contagem de bifidobactérias no 8^o dia foi maior nos grupos com consumo de 10g e 20g diários, observando-se uma correlação significativa entre a dose de FOS ingerida e a contagem de bifidobactérias fecal. Devido ao fato do consumo de 20g levar a maiores desconfortos entre os indivíduos, os autores sugeriram que a dose ótima e melhor tolerada de FOS, que aumenta de forma significativa bifidobactérias fecais em voluntários saudáveis com dieta normal, é de 10g/dia (BOUHNİK et al., 1999).

Animais suplementados com FOS por um período prolongado (27 semanas) apresentaram modificações nas alterações inicialmente observados, indicando que os efeitos de FOS na composição da microbiota cecal variam com o tempo de administração

(LE BLAY et al., 1999). Inicialmente (2 semanas) foi observado que o grupo suplementado com FOS apresentou maior peso da parede cecal, maior concentração cecal de AGCC totais, com aumento acentuado na concentração de butirato, aumento da concentração de lactato (15x a inicial) e maior concentração de bactérias do ácido lático e *Lactobacillus* sp., enquanto a contagem de anaeróbios totais não foi alterada. Ao mesmo tempo o pH cecal diminuiu acentuadamente nas primeiras 2 semanas, mas esta redução foi minimizada durante o tratamento. No decorrer do experimento foi verificado uma diminuição no peso da parede cecal; o restabelecimento do nível inicial de lactato, que foi alcançado ao final do período experimental. O aumento na contagem de bactérias do ácido lático induzida pelo consumo de FOS não foi mantida e desapareceu após 8 semanas, enquanto as concentrações de AGCC totais e butirato aumentam com o tempo. Os autores sugerem que a ingestão contínua de FOS permite uma adaptação da microflora, promovendo o crescimento e, ou, atividade metabólica de bactérias que utilizam lactato. Este mecanismo seria responsável pela diminuição na concentração de lactato observada, concomitante ao aumento na concentração de AGCC e butirato (LE BLAY et al., 1999).

Avaliando os resultados de diversos trabalhos que comparavam o efeito de diferentes doses de fructanos sobre o aumento de bifidobactérias, ROBERFROID et al. (1998) concluíram que não existiria correlação entre as variáveis, mas que o número inicial de bifidobactérias fecais, independente da dose do prebiótico, seria mais importante para a obtenção dos aumentos verificados nas contagens desse grupo bacteriano.

Além de modificações na microbiota, com aumento da massa fecal, outras alterações fisiológicas, locais e sistêmicas, foram associados à ingestão de inulina e oligossacarídeos. Entre as modificações locais encontram-se o aumento da produção de AGCC, aumento da absorção de minerais e aumento da síntese de vitaminas do complexo B; enquanto diminuição dos níveis de colesterol sérico, triglicérides, apoproteína e níveis de glicose, diminuição de NH_3 e de uréia e modulação do sistema imune seriam consideradas alterações sistêmicas (MITSUOKA, 1992; JENKINS et al., 1999). A maioria dos oligossacarídeos aumenta o conteúdo de umidade fecal e diminui o pH fecal.

A adição de oligofrutose na dieta de cães resultou em intestinos mais longos, com maior superfície e maior massa de mucosa, quando comparado com o intestino de cães alimentados com dieta contendo celulose, que é pobremente fermentável (BUDDINGTON e WEIHER, 1999). A inclusão de oligofrutose e inulina na dieta de cães também causou um aumento na taxa de transporte ativo de glicose pela membrana apical, com respostas maiores no intestino delgado proximal.

A inclusão de 10% de inulina ou oligossacarídeos na dieta reduz a síntese hepática de triglicerídeos e triglicerídeos VLDL plasmáticos, além de baixos níveis plasmáticos de fosfolípidos e colesterol. A síntese de colesterol também pode ser modulada por AGCC, com acetato atuando como estimulador e propionato como inibidor (JENKINS et al., 1999).

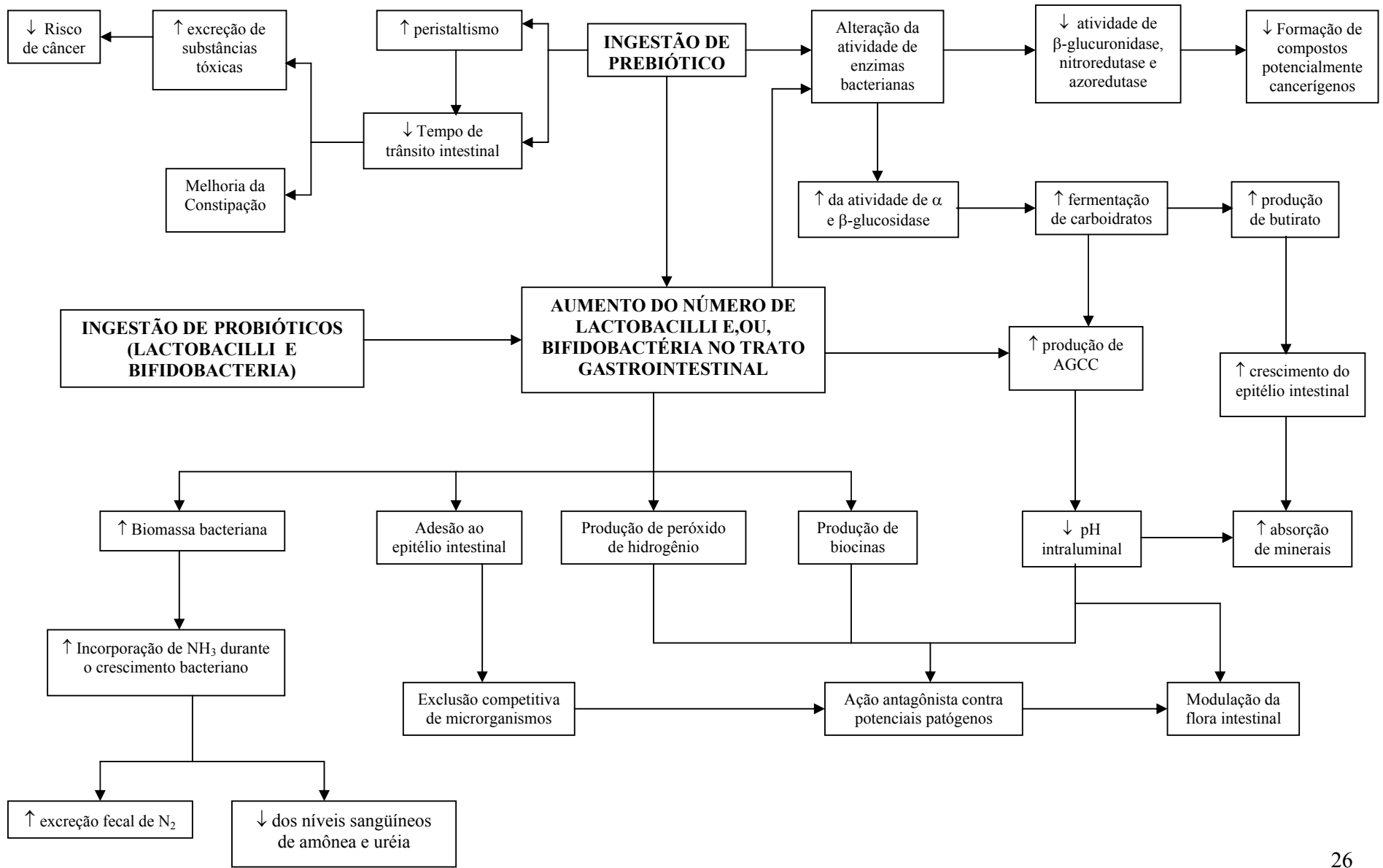
Os níveis sanguíneos de NH_3 e uréia podem ser reduzidos com a ingestão de lactulose. A diminuição está associada ao crescimento de biomassa bacteriana, a qual necessita de nitrogênio para seu desenvolvimento; e à acidificação do cólon que facilita a conversão de NH_3 em NH_4 , composto menos absorvido (JENKINS et al., 1999). A administração de lactulose diminuiu a excreção de hidrogênio respiratório, após 7 dias de administração de 0,6g/kg. A hipótese sugerida é que a diminuição do pH intestinal inibiu a produção de hidrogênio bacteriano e sua conseqüente excreção (MIZOTA, 1996). A Figura 3 resume os principais benefícios atribuídos aos prebióticos e probióticos e seus possíveis mecanismos.

7. Perspectivas de utilização de probióticos e prebióticos em medicina

Os microrganismos probióticos apresentam importantes propriedades que os tornam alternativas para a utilização no tratamento e prevenção de doenças do trato gastrointestinal, como a habilidade de aderir à mucosa intestinal humana, uma colonização temporária e potencialmente permanente do trato gastrointestinal, a produção de agentes antimicrobianos resultando na inibição do crescimento de patógenos, além da tolerância aos sais biliares e suco gástrico. Além disso, a possibilidade de que bactérias do ácido láctico e leites fermentados apresentem propriedades antimutagênica e anticancerígena vem sendo pesquisada (LAMBERT e HULL, 1996).

A utilização de estratégias alternativas ao uso de antibióticos para tratamento de doenças entéricas está recebendo muita atenção, devido à possibilidade de seleção de cepas resistentes que, embora não patogênicas, possam vir a transferir esta característica para microrganismos patogênicos, ao aumento de bactérias antibiótico-resistentes e à falência de drogas no tratamento de algumas infecções, como no caso de diarréias causadas por *Clostridium difficile*.

Figura 3 – Efeitos da ingestão de prebióticos e probióticos na microbiota intestinal



Legenda: AGCC: ácidos graxos de cadeia curta, ↓ diminuição, ↑ aumento

O administração de probióticos para o tratamento de diarreias, principalmente rotaviruses em crianças e diarreias associadas ao uso de antibióticos, mostraram resultados satisfatórios, como a diminuição do tempo da doença e a diminuição da recorrência. Entre os microrganismos estudados e que apresentaram resultados positivos encontram-se: *Lactobacillus* GG ATCC 53103, *L. casei*, *L. johnsonii* LJ-1 (LA-1), *L. reuteri* ATCC 55730, *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 (KAILA et al., 1992; SAAVEDRA et al., 1994; GORBACH, 1996; SPANHAAK et al., 1998, FULLER, 1999; MATTILA-SANDHOLM et al., 1999).

Um dos fatores associados com a recuperação das diarreia por rotavirus é um aumento da resposta humoral não específica. A administração de *Lactobacillus* GG para crianças resultou em um aumento de IgA, IgG e do número de células secretoras de IgM no intestino indicando que a melhoria do quadro de diarreia é devido ao aumento da defesa imune local (KAILA et al., 1992). A suplementação de crianças (5 a 24 meses) com fórmula infantil contendo *B. bifidum* e *S. thermophilus* também mostrou resultados positivos na redução da incidência de diarreia aguda e disseminação de rotavirus em crianças admitidas em um hospital (SAAVEDRA et al., 1994). O uso de *Lactobacillus* GG vem dando bons resultados no tratamento de diarreia causada por *C. difficile* (BENNETT et al., 1996; SAXELIN, 1997).

A ingestão de *B. lactis* Bb-12 por crianças saudáveis resultou em um aumento dos níveis fecais de IgA total (associada com a eliminação de patógenos invasivos do trato gastrointestinal) e anti-poliovirus IgA (prevenção da multiplicação de poliovirus por meio da inibição de adesão à superfície da mucosa) durante o tratamento, em crianças saudáveis. O aumento de IgA pode contribuir para melhoria da resistência da mucosa intestinal contra infecções gastrointestinais (FUKUSHIMA et al., 1998), porém, após o término de tratamento, o nível de IgA diminuiu e se aproximou do inicial.

O aumento na concentração de IgA total e de anti- β -lactoglobulina fecais também foi observado em camundongos fêmeas em fase de amamentação suplementados com *B. lactis* Bb-12, sugerindo que o consumo de bifidobactérias pode aumentar a produção local de IgA no leite e no intestino. Este aumento pode ajudar na proteção, tanto do filhote quanto da mãe, nas exposições a antígenos alimentares, prevenindo alergias alimentares (FUKUSHIMA et al., 1999).

Ensaio *in vitro* e *in vivo*, com modelo animal, associaram a utilização de *Lactobacillus acidophilus* com a inibição do crescimento de bactérias do gênero *Helicobacter*, inclusive *H. pylori* (LAMBERT e HULL, 1996; COCONNIER et al., 1998).

Experimentos recentes mostraram que algumas estirpes de *Bifidobacterium* apresentam potente efeito antagônico contra *E. coli* O157. O grau de inibição foi variável, mas os resultados mais satisfatórios foram obtidos com *B. infantis* e *B. longum* (GIBSON, 1999), enquanto a utilização de *L. acidophilus* combateu com eficiência septicemia provocada por linhagem patogênica de *E. coli* em animais de laboratório. Camundongos tratados diariamente com *L. acidophilus* mostraram-se mais resistentes a vários patógenos intestinais, como *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* e *Shigella flexneri* (NICOLI et al., 2000).

Além de efeito em doenças intestinais causadas por bactérias, probióticos e prebióticos têm sido associados a possíveis propriedades anticancerígenas, modulação na absorção de minerais e de colesterol e efeitos em doenças sistêmicas. A administração dietética de oligofrutose e inulina e culturas liofilizadas de *Bifidobacterium longum* inibiu a formação de lesões pré-neoplásicas no cólon e carcinogênese do cólon e, ou, mama em modelos animais (REDDY, 1998) e a administração de *Bifidobacterium animalis* exerce efeito benéfico na prevenção e normalização de alterações intestinais induzidas por deficiência de zinco, em ratos, indicando ação na defesa da mucosa intestinal (MENGHERI et al., 1999).

Ao regular a atividade intestinal, estimulando o crescimento de bifidobactérias e diminuindo a produção de amônia, a lactulose reduz os níveis de amônia no sangue e alivia os sintomas da hiperamonemia e da encefalopatia hepática (MIZOTA, 1996). Prebióticos como lactulose, FOS e inulina também estão sendo associados a aumentos na absorção ou retenção de cálcio, magnésio, zinco, cobre e ferro (OHTA et al., 1994; MIZOTA, 1996; SAKAI et al., 2000).

A associação de *L. acidophilus* e *B. bifidum* levou à diminuição do número e severidade de sintomas de tensão pré-mestrua (TPM) severa em 70% das mulheres tratadas, com desaparecimento de vômitos, dor de cabeça e coágulos menstruais, além de melhoria na dismenorréia, depressão, irritabilidade e entumescimento dos seios. Essa melhoria foi associada a alterações na microbiota, pois mulheres com TPM severa apresentaram menor quantidade de lactobacilos, bifidobactérias e anaeróbios totais e maior número de espécies de *Clostridium* e enteobacteriaceae do que indivíduos normais. Administração dos probióticos induziu aumento nos níveis de lactobacilos, restabelecendo parcialmente o balanço intestinal, com diminuição do número de clostrídios. No entanto, o efeito benéfico cessou 1 mês após o término da ingestão dos probióticos (BERTAZZONI-MINELLI et al., 1996).

8. Referências bibliográficas

- AKALIN, A.S.; GÖNÇ, S.; DÜZEL, S. Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice. **J. Dairy Sci.**, v.80, n.11, p.2721-2725, 1997.
- ALANDER, M.; DE SMET, I.; NOLLET, L.; VERSTRAECTE, W.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. The effect of probiotic strains on the microbiota of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME). **Intern. J. Food Microb.**, v.46, n.1, p.71-79, 1999.
- AYEBO, A.D.; ANGELO, I.A. Effect of ingesting lactobacillus acidophilus milk upon fecal flora and enzyme activity in humans. *Milchwissenschaft* v.35, n.12, p.730-33, 1980.
- BENNETT, R.G.; GORBACH, S.L.; GOLDIN, B.R.; CHANG, T.W.; LAUGHON, B.E.; GREENOUGH, W.B.; BARTLETT, J.G. Treatment of relapsing *Clostridium difficile* diarrhea with *Lactobacillus* GG. **Nutr. Today Suppl.**, v.31, n.6, p.35S-38S, 1996.
- BENNO, Y.; HE, F.; HOSODA, M.; HASHIMOTO, H.; KOJIMA, T.; YAMAZAKI, K.; IINO, H.; MYKKANEN, H.; SALMINEN, S. Effects of *Lactobacillus* GG yogurt on human intestinal microecology in Japanese subjects. **Nutr. Today Suppl.**, v.31, n.6, p.9S-11S, 1996
- BERTAZZONI-MINELLI, E.; BENINI, A.; VICENTINI, L.; ANDREOLI, E.; OSELLADORE, M.; CERUTTI, R. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* administration on colonic microbiota and its metabolic activity in premenstrual syndrome. **Microb. Ecol. Health Disease**, v.9, p.247-260, 1996.
- BOUHNİK, Y.; FLOURIE, B.; ANDRIEUX, C.; BISETTI, N.; BRIET, F.; RAMBAUD, J.C. Effects of *Bifidobacterium* sp fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. **Europ. J. Clin. Nutr.**, v.50, p.269-273, 1996.
- BOUHNİK, Y.; FLOURIÉ, B.; D'AGAY-ABENSOUR, L.; POCHART, P.; GRAMET, G.; DURAND, M.; RAMBAUD, J.C. Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. **J. Nutr.**, v.127, p.444-448, 1997.

- BOUHNİK, Y.; VAHEDI, K.; ACHOUR, L.; ATTAR, A.; SALFATI, J.; POCHART, P.; MARTEAU, P.; FLOURIÉ, B.; BORNET, F.; RAMBAUD, J.C. Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. **J. Nutr.**, v.129, n.1, p.113-116, 1999.
- BUDDINGTON, R.K.; WEIHER, E. The application of ecological principles and fermentable fibers to manage the gastrointestinal tract ecosystem. **J. Nutr.**, v.129, n.7, p.1446S-1450S, 1999.
- COCONNIER, M. H.; LIEVIN, V.; HEMERY, E.; SERVIN, A. L. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. **Applied Environ. Microb.**, v.64, n.11, p.4573-4580, 1998.
- CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. **J. Applied Bacter.**, v.70, n.6, p.443-459, 1991.
- DJOUZI, Z.; ANDRIEUX, C. Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with human faecal flora. **Brit. J. Nutr.**, v.78, p.313-324, 1997.
- DJOUZI, Z.; ANDRIEUX, C.; DEGIVRY, M. C.; BOULEY, C.; SZYLIT, O. The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* DN 114.001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal microflora in germ free rats and in human flora-associated rats. **J. Nutr.**, v.127, n.11, p.2260-2266, 1997.
- FUKUSHIMA, Y.; KAWATA, Y.; HARA, H.; TERADA, A.; MITSUOKA, T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. **Intern. J. Food Microb.**, v.42, n.1/2, p.39-44, 1998.
- FUKUSHIMA, Y.; KAWATA, Y.; MIZUMACHI, K.; KURISAKI, J.I.; MITSUOKA, T. Effect of bifidobacteria feeding on fecal flora and production of immunoglobulins in lactating mouse. **Intern. J. Food Microb.**, v.46, n.3, p.193-197, 1999.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Applied Bacter.**, v.66, n.5, p.365-378, 1989.
- FULLER, R. Modulation of the intestinal microflora by probiotics. p.33-45. In "HANSON, L.A.; YOLKEN, R. H. (Ed.) Probiotics, other nutritional factors, and intestinal microflora" Nestlé Nutrition Workshop Series, v.42. Nestec Ltd., Vevey/Lippincott-Raven Pub.: Philadelphia, 1999.
- GALLAHER, D.D.; STALLINGS, W.H.; BLESSING, L.L.; BUSTA, F.F.; BRADY, L.J. Probiotics, cecal microflora, and aberrant crypts in the rat colon. **J. Nutr.**, v.126, p.1362-1371, 1996.

- GIBSON, G.R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. **J. Nutr.**, v.129, n.7, p.1438S-1441S, 1999.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.
- GIBSON, G.R.; WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **J. Applied Bacter.**, v.77, n.4, p.412-420, 1994.
- GILLILAND, S.E. Acidophilus milk Products: a review of potential benefits to consumers. **J. Dairy Sci.**, v.72, n.10, p.2483-2494, 1989.
- GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L.; NAUYOK Jr., G.F.; GIESBRECHT, F.G. Influence of consuming nonfermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* on fecal flora of healthy males. **J. Dairy Sci.**, v.61, n.1, p.1-10, 1978.
- GOLDIN, B.R.; GORBACH, S.L. The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.39, n.5, p.756-761, 1984.
- GOLDIN, B.R., LICHTENSTEIN, A.H., GORBACH, S.L. Nutritional and metabolic roles of intestinal flora. In: SHILS, M.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. (Ed) **Modern Nutrition in health and disease**. 8 ed., Filadelfia: Lea e Febiger, 1994. v.1, p.569-582.
- GORBACH, S.L. Efficacy of *Lactobacillus* in treatment of acute diarrhea. **Nutr. Today Suppl.**, v.31, n.6, p.19S-23S, 1996.
- GUERIN-DANAN, C.; CHABANET, C.; PEDONE, C.; POPOT, F.; VAISSADE, P.; BOULEY, C.; SZYLIT, O.; ANDRIEUX, C. Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.67 n.1, p.111-117, 1998.
- HAVENAAR, R.; BONNIN-MAROL, S.; VAN DOKKUM, W.; PETITET, S.; SCHAAFASMA, G. Inulin: fermentation and microbial ecology in the intestinal tract. **Food Rev. Intern.**, v.15, n.1, p.109-120, 1999.
- HIRAYAMA, H.; RAFTER, J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. **Microbes Infect.**, v.2, n.6, p.681-686, 2000.
- HOLZAPFEL, W. H., HABERER, P., SNEL, J., SCHILLINGER, U., HUIS IN'T VELD, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. **Intern. J. Food Microb.**, v.41, n.2, p.85-101, 1998. (Proceedings of the International Yakult Symposium 14 May 1997, Bonn, Germany: Probiotics - gut flora and protection mechanisms).

- HULL, R.R.; CONWAY, P.L.; EVANS, A.J. Probiotic foods - a new opportunity. **Food Australia**, v.44 n.3, p.112-113, 1992.
- JENKINS, D.J.A.; KENDALL, C.W.C.; VUKSAN, V. Inulin, oligofructose and intestinal function. **J. Nutr.**, v.129, n.7, p.1431S-1433S, 1999.
- KAILA, M.; ISOLAURI, E. ; SOPPI, E. ; VIRTANEN, E. ; LAINE, S. ; ARVILOMMI, H. Enhancement of the circulating antibody secreting cells response in human diarrhoea by human *Lactobacillus* strain. **Pediatr. Res.**, v.32, n.2, p.141-144, 1992.
- KAPLAN, H.; HUTKINS, R.W. Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. **Appl. Environm. Microbiol.**, v.66, n.6, p.2682-2684, 2000.
- KATO, I.; ENDO, K.; YOKOKUBA, T. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. **Int. J. Immunopharmac.**, v.16, n.1, p.29-36, 1994.
- KIM, H.S. Characterization of Lactobacilli and Bifidobacteria as applied to dietary adjuncts. **Cultured Dairy Products J.**, v.23, n.3, p.6-9, 1988.
- LAMBERT, J.; HULL, R. Upper gastrointestinal tract disease and probiotics. **Asian Pacific J. Clin. Nutr.**, v.5, p.31-35, 1996.
- LANGHENDRIES, J.P.; DETRY, J.; VAN HEES, J.; LAMBORAY, J.M.; DARIMONT, J.; MOZIN, M.J.; SECRETIN, M.C.; SENTERRE, J. Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. **J. Pediatric Gastroent. Nutr.**, v.21, n.2, p.177-181, 1995.
- LE BLAY, G.; MAICHEL, C.; BLOTTIÈRE, H.M.; CHERBUT, C. Prolonged intake of fructooligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. **J. Nutr.**, v.129, n.12, p.2231-2235, 1999.
- MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **Brit. Med. J.**, v.318, p.999-1003, 1999.
- MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.69, n.5 (Supl.), p.1035S-1045S, 1999.

- MARTEAU, P.; POCHART, P.; FLOURIÉ, B., PELLIER, P., SANTOS, L., DESJEUX, J.F., RAMBAUD, J.C. Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.52, n.4, p.685-688, 1990.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MÄTTÖ, J.; SAARELA, M. Lactic acid bacteria with health claims - interactions and interference with gastrointestinal flora. **Intern. Dairy J.**, v.9, n.1, p.25-35, 1999.
- MENGERI, E.; NOBILI, F.; VIGNOLINI, F.; PESENTI, M.; BRANDI, G.; BIAVATI, B. *Bifidobacterium animalis* protects intestine from damage induced by zinc deficiency in rats. **J. Nutr.**, v.129, n.12, p.2251-2257, 1999.
- MERCENIER, A. Lactic acid bacteria as live vaccine. In: "TANNOCK, G.W. (Ed) Probiotics: A critical review." England: Horizont Scient. Press, 1999. Cap.8, p.113-127.
- MISRA, A.K.; KUILA, R.K. Effect of bifidus milk feed on excretory pattern of coliforms. **Indian J. Dairy Sci.**, v.47, n.7, p.603-606, 1994.
- MITSUOKA, T. Recent trends in research on intestinal flora. **Bifidobacteria Microflora**, v.1, n.1, p.3-24, 1982.
- MITSUOKA, T. **Microbes in the intestine: our lifelong partners.** Japan: Yakult Honsha Co., 1989. 104 p.
- MITSUOKA, T. Intestinal flora and aging. **Nutr. Rev.**, v.50, n.12, p.438-446, 1992.
- MIZOTA, T. Lactulose as a growth promoting factor for *Bifidobacterium* and its physiological aspects. In: Oligosaccharides and probiotic bacteria. **Bull. Intern. Dairy Fed.**, n.313, p.43-48, 1996.
- NICOLI, F.R.; VIEIRA, L.Q. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos: Moduladores do ecossistema digestivo. **Rev. Ciência Hoje**, v.28, n.163, p.34-38, 2000.
- O'SULLIVAN, M.G. Metabolism of bifidogenic factors by gut flora - an overview. In: Oligosaccharides and probiotic bacteria. **Bull. Intern. Dairy Fed.**, n.313, p.23-29, 1996.
- OHTA, A.; OHTUKI, M.; TAKIZAWA, T.; INABA, H.; ADACHI, T.; KIMURA, S. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of Magnesium and calcium by cecectomized rats. **Intern. J. Vit. Nutr. Res.**, v.64, p.316-323, 1994.

- OHTA, A.; OHTUKI, M.; BABA, S.; TAKIZAWA, T.; ADACHI, T.; KIMURA S. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v.41, p.281-291, 1995.
- PERDIGÓN, G.; MACÍAS, M.E.N.; ALVAREZ, S.; MEDICI, M.; OLIVER, G.; RUIZ HOLGADO, A.P. Effect of a mixture of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* administered orally on the immune system in mice. **J. Food Prot.**, v. 49, n. 12, p. 986-989, 1986.
- RAO, A.V. Dose-response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects. **J. Nutr.**, v.129, n.7, p.1442S-1445S, 1999.
- REDDY, B. S. Prevention of colon cancer by pre and probiotics: evidence from laboratory studies. **Br. J. Nutr.**, v.80, Supp.2, S219-S223, 1998.
- ROBERFROID, M.B.; VAN LOO, J.A.E.; GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **J. Nutr.**, v.128, n.1, p.11-19, 1998.
- SAAVEDRA, J.M.; BAUMAN, N.A.; OUNG, I.; PERMAN, J.A.; YOLKEN, R.H. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. **Lancet**, v.344, p.1046-1049, Oct.15, 1994.
- SAKAI, K.; OHTA, A.; SHIGA, K.; TAKASAKI, M.; TOKUNAGA, T.; HARA, H. The cecum and dietary short-chain fructooligosaccharides are involved in preventing postgastrectomy anemia in rats. **J. Nutr.**, v.130, n.6, p.1608-1612, 2000.
- SANDERS, M.E. Development of consumer probiotics for the US market. **Brit. J. Nutr.**, v.80, Supp.2, S213-S218, 1998.
- SAXELIN, M. *Lactobacillus* GG - a human probiotic strain with through clinical documentation. **Food Rev. Int.**, v.13, n.2, p.293-313, 1997.
- SHAHANI, K.M.; AYEBO, K.M. Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.33, p.2448-2457, 1980.
- SPANHAAK, S.; HAVENNAR, R.; SCHAAFSMA, G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. **Europ. J. Clin. Nutr.**, v.52, n.12, p.899-907, 1998.
- TAKAHARA, S.; MOROHASHI, T.; SANO, T.; OHTA, A.; YAMADA, S.; SASA, R. Fructooligosaccharides consumption enhance femoral bone volume and mineral concentrations in rats. **J. Nutr.**, v.130, n.7, p.1792-1795, 2000.
- TANAKA, R.; MATSUMOTO, K. Recent progress on prebiotics in Japan, including galactooligosaccharides. **Bull. Intern. Dairy Fed.**, n.336, p.21-27, 1998.

- TOOPING, D.L. Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria. **Asian Pacific J. Clin. Nutr.**, v.5, n.1, p.15-19, 1996.
- TORTUERO, F.; FERNÁNDEZ, E.; RUPÉREZ, P.; MORENO, M. Raffinose and lactic acid bacteria influence caecal fermentation and serum cholesterol in rats. **Nutr. Res.**, v.17, n.1, p.41-49, 1997.
- TRINIDAD, T.P.; WOLEVER, T.M.S.; THOMPSON, L.U. Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon in humans. **Am. J. Clin.Nutr.**, v.63, n.4, p.574-578, 1996.
- WELLS, J.M.; ROBINSON, K.; CHAMBERLAIN, L.M.; SCHOFIELD, K.M.; LE PAGE, R.W.F. Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.70, p.317-330, 1996.
- ZHANG, X.B.; OHTA, Y. *In vitro* binding of mutagenic pyrolyzates to lactic acid bacterial cells in human gastric juice. **J. Dairy Sci.**, v.74, n.3, p.752-757, 1991.

Influência de Probióticos e Prebióticos na Absorção de Minerais

1. Introdução

Há uma crescente preocupação da população pela busca de alternativas naturais para aumentar a qualidade de vida. Maiores cuidados com saúde incluem a prática de esportes e uma busca constante de maiores informações sobre nutrição e alimentos potencialmente benéficos. O crescimento do setor de alimentos conhecidos como funcionais os quais, além da função nutritiva, proporcionam benefícios adicionais à saúde do consumidor, tem sido traduzida por maior oferta de alimentos enriquecidos com vitaminas e minerais e de alimentos contendo probióticos e prebióticos.

A observação do aumento da biodisponibilidade de minerais pelo consumo de probióticos e prebióticos é recente, sendo o cálcio o foco principal, devido ao aumento da incidência de osteoporose (IGARASHI et al., 1994; FRANCK, 1998; OHTA et al., 1998a,b). Nos últimos anos houve um crescente interesse por outros minerais como ferro e magnésio (MOROHASHI et al., 1998; COSTA et al., 2000), bem como pela interação e equilíbrio entre esses minerais e os alimentos funcionais (GOLDIN, 1998).

2. Probióticos, prebióticos e biodisponibilidade de minerais.

Pouco se sabe sobre as interações entre as diversas espécies microbianas comercialmente utilizadas para a preparação de bebidas lácticas e absorção de minerais. Os estudos sobre as interações entre essas diversas espécies e a absorção de minerais são recentes e tomaram maior impulso no início da década de 90, com o aumento da expectativa de vida da população e conseqüente aumento de doenças degenerativas como a osteoporose. Os primeiros trabalhos enfocaram o cálcio (IGARASHI et al., 1994) e, posteriormente, o magnésio (OHTA et al., 1995a,b; YOUNES et al., 1996). Mais recentemente, surgiram trabalhos relacionando prebióticos e microbiota colônica à absorção de ferro (OHTA et al., 1998a,b; OHTA et al., 1999; SAKAI et al., 2000b).

O efeito de bactérias bifidas na absorção de cálcio foi documentado por IGARASHI et al. (1994) que, trabalhando com camundongos fêmeas ovariectomizadas e com

osteoporose, verificaram que a administração de *B. longum* e lactulose levou a um aumento da absorção de cálcio, com conseqüente melhoria da resistência óssea.

A utilização de probióticos pode alterar a composição da microbiota intestinal pré-estabelecida, porém esta modificação mostrou-se transitória, com a diminuição das bactérias exógenas alguns dias após a suspensão de sua ingestão (BOUHNİK et al., 1996). Essa situação pode ser contornada por meio da utilização de prebióticos ou fatores bifidogênicos.

2.1. Importância nutricional da absorção de cálcio, magnésio e ferro

O cálcio exerce papel fundamental na constituição de ossos e dentes, além ser o estímulo inicial de várias funções celulares como excitação/contração muscular, estímulo/secreção de histidina e acetilcolina, função microtubular, mitose celular e motilidade celular (ALLEN & WOOD, 1994) com o aumento da osteoporose, que é caracterizada por fragilidade óssea decorrente de desmineralização progressiva facilitando a ocorrência de fraturas, aumenta cada vez mais a importância de uma ingestão adequada de cálcio, assim como de magnésio, pois este também é necessário para a adequada constituição dos cristais de hidroxiapatita responsável pela estrutura óssea. Há fortes evidências de que, simultaneamente aos procedimentos que visam a diminuição da reabsorção óssea natural durante a velhice, maximizar a quantidade de massa óssea durante a adolescência pode ser a chave para retardar e inclusive prevenir a osteoporose. Uma forma de se obter esse resultado é o aumento da ingestão de cálcio, fator atualmente muito explorado pela indústria (FRANCK, 1998).

O magnésio tem papel essencial em várias reações celulares, como síntese de ácidos graxos, proteína, fosforilação de glicose, formação de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), além de constituinte da estrutura mineral óssea. Devido à sua extensa distribuição orgânica, a deficiência de magnésio pode levar a sintomatologia variada, que em humanos incluem náusea, vômito, diarreia, hipocalcemia, anorexia, apatia, alterações eletrocardiográficas, neurológicas e da personalidade, espasmos musculares e tremores, ataxia, confusão mental e convulsões (VIEIRA, 2000). Em animais de laboratório a hipomagnesemia está associada a crises epiléticas, hipocalcemia, tremores e convulsões que podem levar à morte (SHILS, 1994).

A deficiência de ferro é a patologia nutricional mais comum no mundo, atingindo cerca de 2 bilhões de pessoas, principalmente em países em desenvolvimento

(STOLTZFUS & DREYFUSS, 1999). No Brasil, a anemia ferropriva se manifesta de forma endêmica com uma prevalência média de 40% da população, afetando principalmente as mulheres em idade fértil, crianças e adolescentes (TORRES & SOUZA-QUEIROZ, 2000). Por outro lado, a suplementação de ferro pode ser danosa para as células entéricas, e está relacionada com a indução de colite e desenvolvimento de carcinoma coloretal em camundongos (SERIL et al., 2002) e agravamento do estado inflamatório em colites em ratos, com alterações histológicas, amplificação da resposta inflamatória e do dano na mucosa intestinal (REIFEN et al., 2000).

A absorção de minerais pode ocorrer por meio de transporte transcelular, dependente de energia e também denominado de via ativa, onde o mineral absorvido pelo enterócito, passa para o citoplasma celular e é liberado na corrente sanguínea; ou paracelular, denominado via passiva, onde o íon passa diretamente para a corrente sanguínea através das junções intercelulares. A absorção por via ativa pode ser influenciada por fatores dietéticos e orgânicos. Compostos que quelam os minerais, menor tempo de permanência do alimento ingerido no trato gastrointestinal, alterações no estado da mucosa intestinal podem diminuir a absorção, enquanto diminuição das reservas orgânicas e algumas vitaminas podem aumentá-la. A absorção passiva pode ser aumentada quando existe um aumento da concentração do mineral no conteúdo intestinal. Este aumento é determinado pela solubilidade intestinal do sal (dependente de pH e forma química) e maior tempo de permanência do alimento ingerido no lúmen intestinal.

Alguns procedimentos cirúrgicos também podem levar à deficiência de minerais. A retirada do estômago (gastrectomia), órgão importante na obtenção de pH ácido necessário para a solubilização de sais minerais, facilitando sua posterior absorção no intestino, induz à deficiência na absorção de cálcio e também à anemia, inicialmente devido ao sangramento durante a cirurgia (OHTA et al., 1998d) e também por à deficiência de absorção do ferro dietético (SAKAI et al., 2000a).

2.2. Estudos com prebióticos, probióticos e minerais em animais

Cada segmento intestinal apresenta diferente capacidade de absorção de minerais. Para verificar onde ocorreria a ação de FOS e o papel do ceco na absorção de cálcio e magnésio, OHTA et al. (1994) trabalharam com ratos cecectomizados ou não e suplementados ou não com FOS (5%), totalizando 4 tratamentos. Os animais suplementados com FOS apresentaram menor pH do conteúdo luminal e aumento

significativo na concentração fecal de acetato. Os animais cecectomizados apresentaram diminuição do pH deste segmento intestinal, indicativo de que FOS também são fermentados no cólon. A incorporação de FOS diminuiu significativamente a excreção de magnésio, aumentando sua taxa de absorção em todos os animais, enquanto os animais controle suplementados com FOS apresentaram diminuição na excreção e aumento na taxa de absorção de cálcio. Os resultados indicaram diferentes papéis de FOS na absorção de cálcio e magnésio no intestino grosso: enquanto a absorção de magnésio ocorre primariamente por processo passivo no segmento distal do trato gastrointestinal, inclusive humano (COUDRAY et al., 1997), a absorção de cálcio no ceco é quase inexistente em animais sem suplementação de FOS ou outro carboidrato fermentável. Frutooligosacarídeos ou substâncias que estimulem a fermentação intestinal no cólon aumentam a absorção de magnésio, enquanto para o cálcio o efeito estimulante de FOS ocorre principalmente no ceco.

Em 1989, DEMIGNÉ et al. estudaram o efeito de diversos carboidratos fermentáveis no trato gastrointestinal. A administração de pectina (10%), lactulose (10%), Goma Guar (10%) ou amido parcialmente digerido no intestino delgado (25 e 50%) e dieta isenta de fibras sobre a concentração mineral no ceco de ratos *germ-free* (trato gastrointestinal isento de microbiota) e convencionais mostrou que todos os carboidratos resultaram em um aumento do ceco e do peso da parede cecal. Nos animais *germ-free*, o peso do ceco foi particularmente alto devido ao acúmulo de várias substâncias não degradadas, mas a hipertrofia da parede cecal foi relativamente limitada, contrastando com os animais convencionais, os quais apresentaram hipertrofia mais acentuada, devido à atividade bacteriana nesta região. Essa atividade levou à produção de SCFAs, com conseqüente diminuição do pH do conteúdo cecal (que se apresentou próximo à neutralidade nos ratos com dieta isenta de fibras) e estímulo dos enterócitos apicais, que se traduz por hipertrofia. A produção de SCFAs, nos animais convencionais, aumentou a presença de cátions, derivados do intestino delgado e da solubilização de complexos minerais, no conteúdo luminal, provavelmente para promover sua neutralização. Esse aumento da concentração de minerais favorece a absorção passiva. A incorporação de fibras resultou em um aumento na concentração luminal de cálcio, magnésio e fosfato, sendo que a de potássio quase dobrou. Todos os carboidratos aumentaram a absorção de potássio e magnésio, porém lactulose teve maior efeito sobre o magnésio e o cálcio (DEMIGNÉ et al., 1989).

A incorporação de lactulose (0,5 ou 1%) na dieta de ratos recém-desmamados não mostrou efeito positivo sobre a absorção de cálcio, fósforo e ferro (NAGENDRA et al.,

1994). Embora os autores tivessem verificado previamente que a lactulose estimulava bactérias bífidas intestinais em ratos e promovia diminuição do pH, nessa experimentação não se observou alteração no pH fecal, provavelmente devido ao aumento na velocidade do trânsito intestinal, causado pelo alto teor de lactulose. A não diminuição do pH teria como consequência a não solubilização de sais minerais complexados presentes, fator importante para o aumento da absorção passiva.

Dietas contendo oligosacarídeo (inulina 15%) ou isentas de fibras, associadas a diferentes níveis de cálcio (3 ou 8 g/Kg dieta) resultaram em diferenças no tamanho do ceco, com os animais recebendo inulina apresentando aumento do ceco com hiperplasia de sua parede, provavelmente resultado do estímulo de ácidos graxos de cadeia curta, aumentando o crescimento epitelial e a renovação celular. A hiperplasia observada, que resulta em maior superfície de absorção, é postulado como um dos mecanismos associados ao aumento observado na absorção de minerais. As dietas com baixo teor de cálcio, por sua vez, acentuaram o aumento do ceco e promoveram um aumento na profundidade das criptas (RÉMÉSY et al., 1993). Confirmando os dados encontrados por DEMIGNÉ et al. (1989), ratos com dieta isenta de fibras apresentaram pH cecal próximo da neutralidade, independente da quantidade de cálcio, enquanto os animais que receberam inulina apresentaram pH cecal ácido e maiores concentrações de fósforo, cálcio e magnésio. O baixo nível de cálcio, juntamente a uma menor porcentagem de matéria seca, acentuou a queda do pH cecal. A absorção de magnésio e SCFAs foi mais eficiente em ratos suplementados com inulina, os quais também apresentaram maior concentração total de SCFAs, principalmente quando a concentração de cálcio foi alta (RÉMÉSY et al., 1993).

O nível de cálcio dietético também mostrou influência sobre o pH e a quantidade de ácidos orgânicos presentes no ceco, em ratos. Animais suplementados com baixo nível de cálcio (2,5g/Kg) apresentaram pH cecal baixo (5,0) e baixas concentrações de SCFAs, enquanto aqueles suplementados com dietas contendo 7,5g de cálcio/Kg apresentaram pH de 5,7, juntamente com maior concentração de SCFAs. A biodisponibilidade de alguns minerais, especialmente cálcio e fósforo, pode vir a exercer um papel importante na estabilidade das fermentações simbióticas, que produzem maior quantidade de SCFA, e no controle do pH do lúmen no intestino grosso (YOUNES et al., 1996). Uma maior concentração de cálcio neutralizaria os ácidos graxos em excesso, por meio de complexação, produzindo sais (lactato, propionato, butirato). Ao mesmo tempo, este sistema-tampão evita uma diminuição acentuada do pH, que teria efeito depressor sobre o metabolismo da microbiota intestinal.

Descreveu-se, em animais alimentados com inulina, a presença de um sistema tampão no ceco envolvendo o pool contendo Ca-P (RÉMÉSY et al., 1993). Esse pool de cálcio insolúvel atuaria contrabalançando a acidificação cecal no caso de fermentações acentuadas, evitando uma diminuição excessiva do pH. A concentração de ácidos butírico e propiônico no ceco diminuíram significativamente nos animais alimentados com dieta com baixo conteúdo de cálcio, embora isto possa ser resultado de uma acidificação excessiva e depressão no crescimento de microrganismos produtores de SCFA sensíveis a pH (YOUNES et al., 1996).

Animais suplementados com fibra parcialmente solúvel (amido não digerível) apresentaram, provavelmente como resultado da hipertrofia da parede cecal, um aumento de 3 a 4 vezes na absorção de magnésio, e de 5 a 6 vezes na de cálcio, quando comparados ao grupo controle. Além disso, apresentaram elevada concentração de cálcio solúvel no conteúdo luminal. Não houve, entretanto, interferência da quantidade de cálcio dietético (2,5 ou 7,5 g/Kg) sobre a absorção do cálcio e nenhuma das dietas testadas alterou a absorção de fósforo (YOUNES et al., 1996).

A suplementação com FOS (5%) levou a um aumento significativo na absorção de cálcio (28%) e magnésio (41%), em ratos, sendo que aproximadamente metade do aumento dessa absorção ocorreu no cólon e no reto. A absorção desses minerais nessas regiões não foi observada nos animais controles (OHTA et al., 1995a,b, 1998c). Trabalhando com FOS de diferentes graus de polimerização (GP - 2, 3 ou mistura de ambos) em quantidades de 5 e 10% na dieta, OHTA et al. (1998c) verificaram que o GP dos oligosacarídeos não teve influência sobre a absorção de minerais constatando-se, em todos os grupos suplementados com FOS, uma diminuição significativa na excreção fecal, um aumento da excreção urinária e uma maior absorção de cálcio e magnésio, sendo que o grau de alteração apresentou-se dose-dependente. O aumento na absorção de cálcio, ferro, zinco e principalmente magnésio, além de uma diminuição da excreção fecal de cálcio, magnésio, ferro, zinco e cobre, em ratos, por efeito de FOS (10%) também foi observado (OHTA et al., 1998c), assim como aumentos significativos na excreção urinária e na absorção de cálcio em ratos em crescimento suplementados com FOS (5%) (MOROHASHI et al., 1998).

No entanto, o grau de polimerização de FOS influenciou na absorção de ferro, que passou de 20%, nos animais controle, para 31% e 35% pela incorporação de FOS com GP < 5,0 e GP 10 respectivamente (OHTA et al., 1998c), corroborando os resultados encontrados por DELZENNE et al. (1995). Além de alterações na absorção de minerais verificou-se

também uma hiperplasia cecal nos animais suplementados com FOS, com conseqüente aumento da superfície de absorção. Esse pode, por sua vez, ser um dos mecanismos responsáveis pelo aumento da retenção dos cátions.

A absorção ativa (transcelular) de cálcio está associada à presença da proteína Calbindina D_{9K} (Ca_{9K}). Esta proteína tem sua síntese dependente de vitamina D, é encontrada nas células duodenais e se liga ao cálcio no interior do enterócito, mas está ausente nas células do íleo e de animais que apresentam deficiência de vitamina D (BRONNER, 1998). O papel desta proteína é facilitar a difusão do cálcio no interior da célula, aumentando a concentração de cálcio e amplificando o fluxo do íon de forma análoga à feita pela hemoglobina no transporte de oxigênio (FEHER et al., 1992; STEIN, 1992). A absorção de cálcio no intestino delgado é estreitamente regulada e a concentração de Ca_{9K} é determinada por fatores endógenos, sendo aumentada quando há necessidade de maior absorção de cálcio e diminuída para evitar excesso de sua absorção.

Ao pesquisarem alterações na concentração de Ca_{9K} nas células do intestino grosso em animais suplementados com FOS, OHTA et al. (1998a,b) observaram alterações nas concentrações dessa proteína nos diferentes segmentos intestinais e um aumento na absorção de cálcio. Os animais que receberam dietas contendo prebiótico apresentaram maior peso da mucosa do intestino delgado proximal e do ceco, bem como de proteína total das mucosas em ambos intestinos, indicando um estímulo à proliferação das células da mucosa. Esses animais também apresentaram concentrações maiores de Ca_{9K} no segmento distal do intestino delgado, ceco e segmento coloretal e uma diminuição da concentração normal no segmento proximal do intestino delgado, indicando que FOS estimulariam não apenas o aumento de absorção via paracelular (difusão passiva), mas também transcelular (absorção ativa).

Em animais gastrectomizados (OHTA et al., 1998b), a absorção de cálcio foi diminuída em 66%, com conseqüente diminuição das reservas orgânicas e aumento da concentração de Ca_{9K}. Ao serem suplementados com FOS, animais gastrectomizados apresentaram uma concentração de Ca_{9K} no intestino grosso seis vezes maior que nos controles (apenas gastrectomizados). Os resultados sugerem a existência de mecanismos independentes para a regulação da concentração de Ca_{9K} nos diversos segmentos intestinais. Uma maior absorção de cálcio no intestino grosso pode desencadear um mecanismo de *feedback* envolvendo a inibição da absorção duodenal, que seria traduzido por uma diminuição nos níveis de Ca_{9K} no intestino delgado, dado que foi observado no trabalho.

Outro mecanismo para verificar o efeito de FOS sobre o metabolismo de cálcio e magnésio refere-se ao acompanhamento da estrutura óssea, por meio de análise de densidade mineral óssea (BMD), microanálises histomorfológicas e raio X. Animais suplementados com FOS (7,5%) apresentaram maior BMD do fêmur (OHTA et al., 1998d), sugerindo que a utilização de FOS preveniu a diminuição de BMD, enquanto a utilização de microanálises histomorfológicas e raio X em ratos em crescimento mostrou que a absorção intestinal tanto de cálcio (ingestão de 95 mg/dia) quanto de magnésio (ingestão de 8 mg/dia) foram maiores nos animais que receberam FOS (5%), resultando em maiores concentrações dos minerais na metáfise distal, na diáfise e no colo do fêmur (TAKAHARA et al., 2000). Observou-se correlação positiva entre cálcio e magnésio absorvidos e a concentração óssea desses minerais. Tanto o volume trabecular do osso na metáfise distal quanto o volume do osso no colo foram maiores no grupo que recebeu prebiótico. Os resultados sugerem que, como consequência ao estímulo absorptivo, o consumo de FOS aumenta a retenção de cálcio e magnésio, influenciando a estrutura óssea.

A utilização de cálcio (5g/ Kg), associado ou não a diferentes níveis FOS (2,5, 5, ou 10%) em ratas adultas ovariectomizadas mostrou que, em níveis de 2,5%, FOS previne a perda de área trabecular do fêmur, com aumento da espessura das trabéculas, enquanto níveis de 5 e 10% aumentaram o perímetro trabecular. No entanto, apenas níveis de 10% de FOS aumentaram os níveis de cálcio no osso femoral. Dietas contendo 10g de cálcio/Kg e suplementadas com prebiótico (5%) resultaram em aumento da área trabecular (aumento do número de trabéculas, sem alterar a espessura), aumento da espessura cortical e do teor de cálcio na vertebra lombar. (SCHOLZ-AHRENS et al., 2002). Os resultados indicam que FOS pode prevenir perda estruturais na tíbia, decorrentes da deficiência hormonal provocada pela ovariectomia, mas ocorrem diferenças na arquitetura trabecular – aumento da área trabecular com diminuição do número de trabéculas e aumento da espessura, ou devido ao aumento do número trabecular sem alteração da espessura, dependendo do teor de cálcio e, ou, suplementação com FOS, sendo que os efeitos mais pronunciados foram obtidos em dietas contendo alto teor de cálcio.

Os primeiros trabalhos sobre o efeito de FOS (5%) na absorção de ferro, cálcio e magnésio e sobre os parâmetros bioquímicos em ratos com anemia foram realizados por OHTA et al. (1995b). A anemia foi induzida por dieta de depleção e para a sua recuperação foram utilizadas dietas com dois níveis de ferro (15 e 30 mg/kg dieta). Os resultados indicaram que FOS melhorou a recuperação de anemia, aumentando a absorção de ferro, cálcio e magnésio. Animais suplementados com FOS apresentaram menor pH intestinal, o

que aumentou a solubilidade de ferro, cálcio e magnésio no conteúdo cecal, sugerindo que o aumento da absorção de minerais está relacionado à fermentação de FOS no intestino grosso, principalmente no ceco e cólon.

Para excluir anemia devido à insolubilização do ferro, trabalhou-se com ratos gastrectomizados alimentados com dietas contendo complexo de citrato férrico que não sofre a influência de secreções gástricas (OHTA et al., 1998d). O FOS dietético aumentou a absorção de ferro, observando-se novamente uma diminuição do pH do conteúdo cecal e conseqüente aumento da concentração de ferro em sua fração solúvel. Os animais que receberam FOS (7,5%) não apresentaram diferenças de hematócrito ou concentração de hemoglobina quando comparados aos animais controle (com ou sem FOS), indicando que a suplementação com prebiótico participou na prevenção do desenvolvimento de anemia pós-gastrectomia.

Resultados similares foram obtidos por SAKAI et al. (2000a), em ratos gastrectomizados e, ou, cecectomizados com dietas contendo ou não FOS (7,5%), com $GP \leq 4$. A adição do prebiótico preveniu a anemia pós gastrectomia nos animais que mantiveram o ceco. A cecetomia não impediu, mas retardou a recuperação da anemia, indicando que os prebióticos não apenas estimulam a absorção de ferro no intestino grosso (pelo menos em animais submetidos à gastrectomia), mas também estimulariam a absorção de ferro ao nível cólon-retal, embora esta seja mínima.

O efeito de FOS de cadeia curta (ScFOS) com $GP \leq 4$, na prevenção de anemia com diferentes fontes de ferro dietético (citrato de ferro ou ferro heme) em ratos gastrectomizados foi estudado por OHTA et al. (1999). O consumo de ScFOS aumentou a absorção de ferro e preveniu a anemia em ratos controle (citrato de ferro), ao contrário dos animais com dieta contendo ferro heme onde, embora tivesse ocorrido um aumento dos níveis de ferro sérico, não se alcançou a normalidade. Os resultados indicaram que ferro-heme dietético não é capaz, por si só, de prevenir anemia pós-gastrectomia, embora a ingestão concomitante de FOS aumente a biodisponibilidade de ambas as formas, ferro citrato e ferro-heme.

As reservas orgânicas de ferro foram monitoradas por meio das medidas de ferro sérico (FS), capacidade de ligação insaturada de ferro (UIBC), capacidade de ligação total de ferro (TIBC), ferro hepático e esplênico (OHTA et al., 1999). As concentrações de FS e UIBC foram maiores nos animais controle e gastrectomizados com suplemento de FOS. Observou-se menor TIBC nos ratos controle do que nos outros grupos, exceto naqueles gastrectomizados do grupo controle que receberam prebiótico, enquanto os níveis de ferro

hepático e esplênico foram maiores nos animais controle (que mantiveram o estômago), indicando maiores reservas do mineral. A taxa de regeneração de hemoglobina (HRE) foi maior nos animais controle e gastrectomizados suplementados com prebiótico e ferro citrato. O grupo que recebeu ferro heme e não foi suplementado com prebiótico apresentou menor HRE. Os resultados indicaram maior HRE nos animais que receberam ferro não heme, independente da presença ou ausência de prebiótico. Neste estudo não foi observado efeito de ScFOS na absorção de ferro em animais normais, concluindo-se que, embora a presença de ScFOS na dieta tenha aumentado a biodisponibilidade de ferro heme em ratos, o ferro heme dietético não foi efetivo para prevenir anemia pós-gastrectomia nesses animais (OHTA et al., 1999).

Embora alguns trabalhos (DELZENNE et al., 1995; OHTA et al., 1998c) tenham mostrado que FOS com diferentes GP exercem o mesmo efeito sobre a absorção de minerais, estes enfocaram apenas GP inferior a 11. A comparação do efeito de ScFOS (7,5%), com GP ≤ 4 , e inulina na recuperação de anemia pós-gastrectomia em ratos indicaram níveis mais elevados de hemoglobina e hematócrito nos animais suplementados com ScFOS (SAKAI et al., 2000b). Entre animais gastrectomizados, o grupo suplementado com ScFOS apresentou níveis de ferro sérico, hemoglobina e hematócrito maiores do que nos outros grupos. Após um período de 4 semanas de experimentação os níveis de hemoglobina e hematócrito foram os mesmos nos animais controles e gastrectomizados suplementados com ScFOS, com total recuperação da anemia nos animais. Na terceira semana, os níveis de hematócrito e hemoglobina foram maiores nos animais gastrectomizados suplementados com FOS. Esses animais também apresentaram HRE maior do que os gastrectomizados suplementados com inulina, indicando que a biodisponibilidade de ferro é alterada por diferenças no tamanho da cadeia de carboidratos não digeríveis consumidos, e que ScFOS têm maior efeito do que a inulina na recuperação de anemia induzida por gastrectomia.

Os trabalhos dos últimos anos enfocam a interação de prebióticos e fatores conhecidamente inibidores da absorção de minerais. Assim, LOPEZ et al. (2000) pesquisaram o efeito de FOS (10%) na absorção de cálcio, magnésio, ferro e cobre em ratos suplementados com dietas contendo ácido fítico. Observou-se aumento cecal e acidificação de seu conteúdo, com conseqüente aumento da absorção de cálcio e magnésio. A absorção de minerais foi maior nos animais que receberam dieta contendo prebiótico, com um aumento de 20%, 50%, 23%, 45%, respectivamente para cálcio, magnésio, ferro e cobre. No grupo que recebeu a mesma dieta adicionada de ácido fítico, que exerce inibição

sobre a absorção de minerais, repercutindo no sangue, fígado e ossos, a presença de prebiótico contrabalançou este efeito deletério estimulando sua hidrólise pelas bactérias e permitindo a absorção cecal desses minerais.

2.3. Estudos com prebióticos, probióticos e minerais em humanos

Há poucas experimentações com seres humanos. Em 1997, COUDRAY et al. verificaram, em 9 indivíduos jovens ($21,5 \pm 2,5$ anos) e saudáveis, que dietas contendo inulina aumentavam a absorção aparente e o balanço de cálcio, sem efeitos adversos sobre a absorção e o balanço de magnésio, ferro e zinco. Posteriormente avaliou-se o efeito de inulina (15g), FOS (15g) e galactooligosacarídeos (GOS) (15g) na absorção intestinal de cálcio e ferro em 12 adultos jovens com idade entre 20 e 30 anos (VAN DEN HEUVEL et al., 1998). Nenhum dos prebióticos exerceu efeito negativo sobre o cálcio ou ferro não heme. O único parâmetro que alterou significativamente foi TIBC, que foi menor na dieta que continha FOS do que naquela sem o prebiótico (controle). Não foram encontradas diferenças significativas entre a absorção de cálcio ou ferro, pH fecal ou SCFAs nos diferentes tratamentos. A concentração de ácido acético, entretanto, foi maior nos indivíduos que receberam inulina ou GOS. O fato de não ter sido observado maior absorção de ferro deveu-se ao estado de saúde dos indivíduos, pois em seres humanos com estoques de ferro saturado, a absorção é muito limitada. A incapacidade de se observar maior absorção de cálcio pode ser resultado da ativação de mecanismos de feedback que compensariam maior absorção no intestino grosso com uma diminuição na absorção no intestino delgado e, ou, período de coleta de urina curto para detectar efeito, além de possível efeito de diluição no cólon do isótopo empregado.

No intuito de corroborar os resultados obtidos, VAN DEN HEUVEL et al. (1999) realizaram um estudo duplo-cego aleatório, com delineamento crossover para verificar o efeito de oligofrutose (15g) em 12 adolescentes (14 a 16 anos, média de 15,3 anos). Os resultados, que compreenderam um maior tempo de coleta do material, visando avaliar o efeito de cálcio colônico, mostraram que 15 g de oligofrutose/ dia estimularam a absorção fracional de cálcio, sem reflexos na excreção urinária de cálcio. Outro estudo duplo-cego aleatório, realizado com 12 mulheres em período pós-menopausa (55 a 65 anos) suplementadas com 200 mL de iogurte contendo 10g de transgalactooligosacarídeos (TOS)/ 2 vezes ao dia contendo, quando comparado com o grupo controle (10g de sacarose) encontrou resultados similares (VAN DEN HEUVEL et al., 2000). Os períodos

experimentais foram de 9 dias, com intervalo de 19 dias entre as dietas-teste. Não foram observados sintomas de intolerância, pois antes do experimento os indivíduos foram submetidos a uma adaptação progressiva (10 para 20g TOS/dia). A incorporação de TOS resultou em um aumento de 20 para 24% na absorção ($p < 0,04$) sem aumento da excreção urinária de cálcio.

Os resultados das experimentações com humanos apresentados são contradizentes, o que pode ser devido à metodologia empregada, além dos pequenos grupos estudados e mostram-se inconclusivas. No intuito de obter maiores informações sobre o efeito de inulina e oligofrutose na absorção de cálcio, GRIFFIN et al. (2002) realizaram um estudo com 59 adolescentes do sexo feminino (11 a 13,9 anos), com ingestão diária de 1500 mg de cálcio dietético e suplementação com 8g/dia de placebo (sacarose) ou 8g de carboidrato teste (inulina ou mistura inulina + oligofrutose), em um delineamento duplo-cego aleatório. Os períodos experimentais foram de 3 semanas, com um intervalo de 2 semanas entre as dietas teste. Os resultados mostraram que 8g da mistura inulina + oligofrutose foram suficientes para aumentar ($p < 0,05$) a absorção de cálcio.

Praticamente todos os estudos realizados, tanto em modelos animais quanto em humanos, indicaram que FOS e outros oligosacarídeos, com possível efeito prebiótico, têm a capacidade de diminuir o pH, favorecendo a solubilização dos complexos minerais, aumentando assim sua absorção. Porém apenas este mecanismo não explicaria a variação observada quando se avalia diferentes cátions. Os possíveis mecanismos que podem estar envolvidos no aumento observado da absorção de minerais serão discutidos a seguir.

3. Possíveis mecanismos envolvidos no aumento da biodisponibilidade de minerais

Uma das principais observações feitas pelos pesquisadores se refere à diminuição do pH do conteúdo luminal que resulta da formação de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), principalmente propionato, butirato e acetato (CAMPBELL et al., 1997). IGARASHI et al. (1994) sugerem que a acidificação dos produtos fermentados associada à atividade proteolítica aumentariam a quantidade de cálcio absorvida pelo organismo.

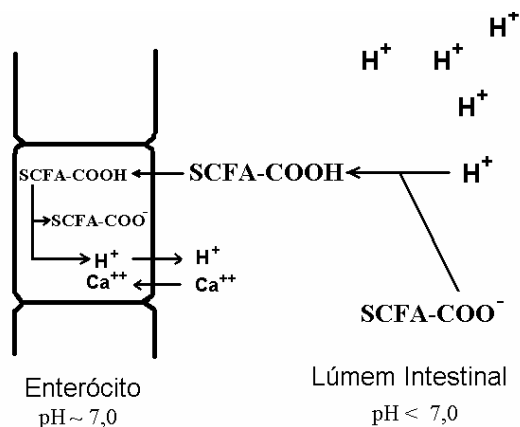
A presença de propionato e,ou, butirato no ceco aumenta a absorção de minerais como cálcio e magnésio, por meio da diminuição do pH local (TRINIDAD et al., 1996), levando à solubilização de parte dos minerais presentes ou de complexos previamente formados, ocasionando, assim, um aumento da concentração nas frações solúveis (OHTA

et al., 1995b, OHTA et al., 1999) e, conseqüentemente, maior absorção pela via paracelular (OHTA et al., 1994).

Outro mecanismo possível, e com o qual os resultados encontrados são compatíveis, seria que SCFAs protonados são absorvidos por difusão direta através da membrana apical. Quando o pH cecal encontra-se mais ácido do que o citosol celular ($\sim 7,0$), ácidos fracos se acumulam no compartimento mais alcalino promovendo sua absorção (DEMIGNÉ et al., 1989). Uma vez no interior celular, esses ácidos se dissociam, pois os valores de pKa ($\sim 4,8$) são menores do que o pH da célula (entre 6 e 7), levando a uma diminuição do pH intracelular. O íon H^+ resultante é secretado para o exterior da célula e trocado por outro cátion que, no cólon distal, corresponde ao cálcio (TRINIDAD et al., 1996). Uma vez fora da célula, o H^+ fica disponível para protonar um novo SCFA (Figura 1). Esse processo é mais ativo com propionato uma vez que este, sendo mais lipossolúvel, é absorvido mais rapidamente do que o acetato pela célula por difusão direta, indicando que a natureza dos SCFAs produzidos no trato gastrointestinal tem influência na absorção de cálcio.

OHTA et al. (1998a,b) também verificaram que o aumento na concentração de Calbindina D_{9K} (Ca_{9K}), proteína cuja presença está associada à absorção ativa do cálcio, nos enterócitos do ceco e cólon, indicando a existência de algum mecanismo de regulação, mesmo ao nível do intestino grosso, levaria a uma maior absorção de cálcio pela via ativa. Uma das hipóteses aventadas sugere que um aumento de butirato de sódio, produzido a partir da fermentação luminal de FOS, poderia aumentar o número de receptores de Ca_{9K} . O aumento na concentração de cálcio solúvel no conteúdo luminal, como resultado da diminuição de pH pelo incremento de ácidos orgânicos derivados da fermentação de FOS, teria como conseqüência um aumento de Ca_{9K} , uma resposta fisiológica para aumentar a absorção de cálcio, com diminuição da concentração luminal e manutenção da homeostase local (OHTA et al., 1998b). A estimulação da proliferação celular da mucosa intestinal pela presença de ácidos graxos de cadeia curta pode aumentar a concentração de Ca_{9K} , enquanto a hipertrofia da parede cecal (OHTA et al., 1994), que resulta em maior peso do ceco e da parede cecal (CAMPBELL et al., 1997) estaria relacionada a um aumento da atividade no processo de absorção dos minerais e de SCFAs (DEMIGNÉ et al., 1989, YOUNES et al., 1996), provavelmente por um aumento na superfície de absorção intestinal.

Figura 1 – Possível mecanismo para o aumento de absorção de cálcio no intestino grosso.



Legenda: SCFA= ácidos graxos de cadeia curta

A formação no trato gastrointestinal de complexos de baixo peso molecular, derivados de ácidos graxos produzidos pelo metabolismo de bactérias lácticas e bífidas, como acetato de cálcio, lactato de cálcio (OHTA et al., 1994) e lactato de ferro (OHTA et al., 1995b), que são mais facilmente absorvíveis pelas membranas celulares do que cálcio ionizado (TRINIDAD et al., 1993), também promoveriam aumento na absorção.

A diferença de efeito observada entre inulina e FOS (SAKAI et al., 2000b) provavelmente é resultado da diferença dos SCFAs produzidos durante a fermentação desses prebióticos pelas diferentes espécies microbianas. Experimentos anteriores (Tashiro et al., 1997, citados por SAKAI et al., 2000b) mostraram que ScFOS, com menor peso molecular, são fermentados mais rapidamente do que inulina, indicando que, moléculas maiores tendem a desaparecer de forma mais lenta do que moléculas menores, à medida que os ácidos orgânicos são produzidos. Estes, por sua vez, levam à diminuição do pH intestinal, facilitando a dissolução de complexos minerais e aumentando a absorção de ferro solubilizado, além de permitir a formação de complexos entre o ferro e ácidos graxos, que aparentemente são melhor absorvidos pela borda em escova do enterócito pois passariam com maior facilidade através da membrana celular (SAKAI et al., 2000b).

Os resultados encontrados por VAN DEN HEUVEL et al (1998), mostrando que fermentação de FOS não aumenta a absorção de ferro em indivíduos saudáveis, indicam que absorção de ferro promovida pela fermentação também ocorreria por um mecanismo ativo, provavelmente transcelular, sujeito a controles orgânicos.

Outros mecanismos que também podem vir a alterar a biodisponibilidade dos minerais seriam: i) mudanças na composição de mucina, com maior absorção de ferro no intestino delgado; ii) aumento do tempo de transito intestinal; iii) aumento da absorção de cálcio, diminuindo a possibilidade de formação de complexos insolúveis cálcio/ferro e interações minerais negativas (OHTA et al., 1998d, SAKAI et al., 2000a); iv) estímulo da produção de heme por propionato, levando a um mecanismo de regulação que aumenta a absorção ativa de ferro (OHTA et al., 1998d); v) aceleração do fluxo sanguíneo, devido à ação de SCFA (YOUNES et al., 1996).

4. Considerações finais

Os mecanismos e as diferentes variáveis que regulam e afetam a absorção de vários minerais, como cálcio, ferro e magnésio, ainda não são totalmente conhecidas. A possibilidade de que um grupo microbiano seja capaz de favorecer a absorção de minerais ingeridos em quantidades normais, pelo aumento da sua biodisponibilidade, tem importância fisiológica. Além de influir positivamente na absorção de minerais, o consumo de probióticos está associado à diminuição da intolerância à lactose, estímulo do sistema imune e modulação da microbiota intestinal. No entanto, embora a sua utilização sugira a possibilidade de modificação da microbiota intestinal pré-estabelecida, esta alteração apresenta-se transitória em indivíduos saudáveis (BOUHNİK et al., 1996), com a eliminação das bactérias exógenas alguns dias após a suspensão de sua ingestão.

Modificações mais duradouras seriam obtidas com o estímulo do aumento das bactérias intestinais endógenas benéficas, pelo fornecimento de uma fonte alimentar que propicie, de forma seletiva, seu crescimento (por ex., oligosacarídeos) (GIBSON & ROBERFROID, 1995). No entanto, os efeitos de FOS na composição da microbiota cecal variam com o tempo de administração (LE BLAY et al., 1999), e o consumo prolongado de FOS levaria a uma adaptação progressiva às condições ácidas derivadas da maior produção de ácidos orgânicos e diminuição do pH intestinal. Nessas condições, as bactérias que utilizam lactato, normalmente em menor concentração, começam a metabolizá-lo originando SCFAs. A diminuição na concentração de lactato aumentaria, por sua vez, o pH, permitindo que grupos bacterianos cujo crescimento é inibido em pH ácido, como as bifidobactérias, voltassem a se desenvolver, até se alcançar um equilíbrio entre produção e consumo de lactato.

Os simbióticos também podem ser empregados para modulação de várias atividades fisiológicas, com a vantagem de veicularem uma fonte de energia para o microrganismos desejáveis endógenos.

A observação da relação benéfica entre probióticos, prebióticos e minerais, principalmente cálcio, magnésio e ferro é recente. Tem-se comprovado o efeito positivo da utilização de FOS, inulina e bactérias bífidas na absorção desses minerais principalmente em estudos empregando-se modelos animais, porém os mecanismos envolvidos nesse efeito ainda não estão totalmente elucidados. Alterações na composição da microbiota e, conseqüentemente, aumento na produção de SCFA com estímulo de crescimento das células epiteliais intestinais e aumento da superfície de absorção, além da diminuição do pH e solubilização de complexos minerais seriam fatores preponderantes no aumento observado na biodisponibilidade dos minerais.

Os estudos que mostram efeito de prebiótico na absorção de cálcio tem em comum o fato do prebiótico ser ingerido juntamente com a fonte de cálcio (BROMMAGE et al., 1993, COUDRAY et al., 1997, GRIFFIN et al., 2002), o que indica a possibilidade do efeito não ser prolongado e depender da contínua ingestão do substrato.

Os efeitos sobre a mucosa intestinal, notadamente a hiperplasia da parede intestinal devem ser avaliados cuidadosamente. Embora os trabalhos a considerem benéfica pois indicaria uma maior absorção de minerais, deve ser analisado dentro da fisiologia geral do animal/ humano, inclusive com implicações a longo prazo, para verificar se este aumento pode vir a propiciar inflamações e,ou, mesmo crescimento desordenado do epitélio, com conseqüente formação de lesões pré-neoplásicas.

Outro fator a ser investigado diz respeito à dose utilizada de prebiótico e,ou, probiótico necessária para promover efeitos benéficos. Os trabalhos com animais indicam doses de 5 a 10% de oligosacarídeos (FOS, TOS, GOS) em ratos. Levando-se em consideração um peso médio de 200 g (animais em crescimento) ou 400 g (animais adultos) e consumo diário de 15 a 20 g de dieta, temos uma ingestão de mais de 1g de prebiótico/Kg peso corporal. Este valor é muito superior ao apontado (10g/dia/indivíduo) para consumo humano de modo a evitar a ocorrência de efeitos colaterais como flatulência, dor abdominal e diarreia (BOUHNİK et al., 1999). Até que ponto experimentos com altas doses de prebióticos em animais podem vir a refletir uma realidade posterior na aplicação para a alimentação humana é uma incognita a ser considerada.

Os mecanismos que levam à alteração da microbiota e ambiente intestinal, o grau e permanência das alterações, bem como a influência na absorção de minerais, devem ser

objetos de estudos mais aprofundados (inclusive em humanos) uma vez que verificar o efeito sem saber sua causa é um conhecimento incompleto. Desse modo, a possibilidade do emprego de pro-, pré- e simbiótico na absorção de minerais constitui uma importante alternativa para melhorar a qualidade de vida do ser humano.

5. Referências Bibliográficas

- ALLEN, L.H.; WOOD, R.J. Calcium and phosphorus. In: SHILS, M.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. (Ed) **Modern Nutrition in health and disease**. 8 ed., Filadelfia: Lea & Febiger, 1994. v.1, cap.7, p.144-149.
- BOUHNİK, Y.; FLOURIE, B.; ANDRIEUX, C.; BISETTI, N.; BRIET, F.; RAMBAUD, J.C. Effects of *Bifidobacterium* sp fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. **Europ. J. Clin. Nutr.**, v.50, p.269-273, 1996.
- BOUHNİK, Y.; VAHEDI, K.; ACHOUR, L.; ATTAR, A.; SALFATI, J.; POCHART, P.; MARTEAU, P.; FLOURIÉ, B.; BORNET, F.; RAMBAUD, J.C. Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. **J. Nutr.**, v.129, n.1, p.113-116, 1999.
- BRONNER, F. Calcium absorption - a paradigm for mineral absorption. **J. Nutr.**, v.128, n.5, p.917-920, 1998.
- BROMMAGE, R.; BINACUA, CL, ANTILLE, S.; CARRIÉ, A.L. Intestinal calcium absorption in rats is stimulated by dietary lactulose and other resistant sugars. **J. Nutr.**, v.123, n.12, p.2186-2194, 1993.
- CAMPBELL, J.M.; FAHEY, G.C.; WOLF, B.W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. **J. Nutr.**, v.127, n.1, p.140-136, 1997.
- COSTA, N.M.B.; YBARRA, L.M.; SANTOS, F.L.; RAMIREZ-CÁRDENAS, L.; SANT'ANA, L.F.R.; NOBRE, L.N.; PIRES, I.S.C.; ROSADO, E.L.; FERREIRA, A.C. Modulação dos níveis de hemoglobina em ratos pelo consumo de probiótico (*Lactobacillus acidophilus*). **Anais do XII Congresso Latinoamericano de Nutrición** (NC105). Buenos Aires (Argentina), 12-16 Nov. 2000.

- COUDRAY, C.; BELLANGER, J.; CASTIGLIA-DELAUVAUD, C.; RÉMÉSY, C.; VERMOREL, M.; RAYSSIGNUIER, Y. Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. **Europ. J. Clin. Nutr.**, v.51, n.6, p.375-380, 1997.
- DELZENNE, N.; AERTSENS, J.; VERPLAETSE, H.; ROCCARO, M.; ROBERFROID, M. Effect of fermentable fructo-oligosaccharides on mineral, nitrogen and energy digestive balance in the rat. **Life Sci.**, v.57, n.17, p.1579-1587, 1995.
- DEMIGNÉ, C.; LEVRAT, M.A.; RÉMÉSY, C. Effects of feeding fermentable carbohydrates on the cecal concentration of minerals and their fluxes between the cecum and blood plasma in the rat. **J. Nutr.**, v.119, n.11, p.1625-1630, 1989.
- FEHER, J.J.; FULLMER, C.S.; WASSERMAN, R.H. Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption. **Am. J. Physiol.**, v.262, n.2, Parte 1, p.C517-526, 1992.
- FRANCK, A. Prebiotics stimulates calcium absorption: a review. **Milchwissenschaft**, v.53, n.8, p.427-429, 1998.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.
- GRIFFIN, I.J.; DAVILA, P.M.; ABRAMS, S.A. Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes. **Brit. J. Nutr.**, v.87, Supl.2, p.S187-S191, 2002.
- GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. **Brit. J. Nutr.**, v.80, sup.2., p.203-207, 1998.
- IGARASHI, M.; IYAMA, Y.; KATO, TOMITA, M.; OMI, N.; EZAWA, I. Effect of *Bifidobacterium longum* and lactulose on the straight of bone in ovariectomized osteoporosis model rats. **Bifidus**, v.7, p.139-147, 1994.
- LE BLAY, G.; MAICHEL, C.; BLOTTIÈRE, H.M.; CHERBUT, C. Prolonged intake of fructooligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. **J. Nutr.**, v.129, n.12, p.2231-2235, 1999.
- LOPEZ, H.W.; COUDRAY, C.; LEVRAT-VERNY, M.A.; FEILLET-COUDRAY, C.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effect of phytic acid on mineral homeostasis in rats. **J. Nutr. Bioch.**, v.11, p.500-508, 2000.

- MOROHASHI, T.; SANO, T.; OHTA, A.; YAMADA, S. True calcium absorption in the intestine is enhanced by fructooligosaccharide feeding in rats. **J. Nutr.**, v.128, p.1815-1818, 1998.
- NAGENDRA, R.; VISWANATHA, S.; MURTHY, K.N.; RAO, S. V. Effect of incorporation of lactulose in infant formula on absorption and retention of nitrogen, calcium, phosphorus and iron in rats. **Intern. Dairy J.**, v.4, n.8, p.779-788, 1994.
- OHTA, A.; OHTUKI, M.; TAKIZAWA, T.; INABA, H.; ADACHI, T.; KIMURA, S. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of Magnesium and calcium by cecectomized rats. **Intern. J. Vitamin Nutr. Res.**, v.64, p.316-323, 1994.
- OHTA, A.; OHTUKI, M.; BABA, S.; ADACHI, T.; SAKATA, T.; SAKAGUCHI, E. Calcium and Magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. **J. Nutr.**, v.125, p.2417-2424, 1995a.
- OHTA, A.; OHTUKI, M.; BABA, S.; TAKIZAWA, T.; ADACHI, T.; KIMURA S. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v.41, p.281-291, 1995b.
- OHTA, A.; MOTOHASHI, Y.; OHTSUKI, M.; HIRAYAMA, M.; ADACHI, T.; SAKUMA, K. Dietary fructooligosaccharides change the concentration of calbindin D9K differently in the mucosa of the small and large intestine of rats. **J. Nutr.**, v.128, p.934-939, 1998a.
- OHTA, A.; MOTOHASHI, Y.; SAKAI, K.; HIRAYAMA, M.; ADACHI, T.; SAKUMA, K. Dietary fructooligosaccharides increase calcium absorption and levels of mucosal calbindin D9K in the large intestine of gastrectomized rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.33, p.1062-1068, 1998b.
- OHTA, A.; OHTSUKI, M.; BABA, S.; HIRAYAMA, M.; ADACHI, T. Comparison of the nutritional effects of fructooligosaccharides of different sugar chain length in rats. **Nutr. Res.**, v.18, n.1, p.109-120, 1998c.
- OHTA, A.; OHTSUKI, M.; UEHARA, M.; HOSONO, A.; HIRAYAMA, M.; ADACHI, T.; HARA, H. Dietary fructooligosaccharides prevent postgastrectomy anemia and osteopenia in rats. **J. Nutr.**, v.128, n.3, p.485-490, 1998d.
- OHTA, A.; SAKAI, K.; TAKASAKI, M.; UEHARA, M.; TOKUNAGA, T.; ADACHI, T. Dietary heme iron does not prevent postgastrectomy anemia but fructooligosaccharides improve bioavailability of heme iron in rats. **Intern. J. Vitamin Nutr. Res.**, v.69, n.5, p.348-355, 1999.

- REIFEN, R.; MATAS, Z.; ZEIDEL, L.; BERKOVITCH, Z.; BUJANOVER, Y. Iron Supplementation may aggravate inflammatory status of colitis in a rat model. **Dig. Dis. Sci.**, v.45, n.2, p.394-397, 2000.
- RÉMÉSY, C.; LEVRAT, M.A.; GAMET, L.; DEMIGNÉ, C. Cecal fermentations in rats fed oligosaccharides (inulin) are modulated by dietary calcium level. **Am. J. Physiol.**, v.264, n.5, Part.1, p.G855-862, 1993.
- SAKAI, K.; OHTA, A.; SHIGA, K.; TAKASAKI, M.; TOKUNAGA, T.; HARA, H. The cecum and dietary short-chain fructooligosaccharides are involved in preventing postgastrectomy anemia in rats. **J. Nutr.**, v.130, n.6, p.1608-1612, 2000a.
- SAKAI, K.; OHTA, A.; TAKASAKI, M.; TOKUNAGA, T. The effect of short chain fructooligosaccharides in promoting recovery from post-gastrectomy anemia is stronger than that of inulin. **Nutr. Res.**, v.20, n.3, p.403-412, 2000b.
- SCHOLZ-AHRENS, K.E.; AÇIL, Y.; SCHREZENMEIR, J. Effect of oligofructose or dietary calcium on repeated calcium and phosphorus balances, bone mineralization and trabecular structure in ovariectomized rats. **Brit. J. Nutr.**, v.88, n.4, p.365-377, 2002.
- SERIL, D.N.; LIAO, J.; HO, K.L.K.; WARSI, A.; YANG, C.S.; YANG, G.Y. Dietary iron supplementation enhances DSS-Induced colitis and associated colorectal carcinoma development in mice. **Dig. Dis. Sci.**, v.47, n.6, p.1266-1278, 2002.
- SHILS, M.E. Magnesium. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. (Ed.) **Modern Nutrition in health and disease**. 8th, Philadelphia: Lea e Febiger, 1994. v.1, cap.8, p.164-165, 172-174.
- STEIN, W.D. Facilitated diffusion of calcium across the rat intestinal epithelial cell. **J. Nutr.**, v.122, n.3S, p.651-656, 1992.
- STOLTZFUS, R. J.; DREYFUSS, M. L. **Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anemia**. International Nutritional Anemia Consultative Group (INAOCG). USA: ILSI Press, 1999.
- TAKAHARA, S.; MOROHASHI, T.; SANO, T.; OHTA, A.; YAMADA, S.; SASA, R. fructooligosaccharides consumption enhance femoral bone volume and mineral concentrations in rats. **J. Nutr.**, v.130, n.7, p.1792-1795, 2000.
- TORRES, M.A.A.; SOUZA QUEIROZ, S. Prevenção da anemia ferropriva em nível populacional: uma revisão da literatura dos últimos quinze anos. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, v.19/20, p.145-164, 2000.

- TRINIDAD, T.P.; WOLEVER, T.M.S.; THOMPSON, L.U. Interactive effect of Ca and SFCA on absorption in the distal colon of man. **Nutr. Rev.**, v.13, p.417-425, 1993.
- TRINIDAD, T.P.; WOLEVER, T.M.S.; THOMPSON, L.U. Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon of humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.63, n.4, p.574-578, 1996.
- VIEIRA, C.E. Doenças nutricionais. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 6 ed., 2000. Cap.12, p.291.
- VAN DEN HEUVEL, E.G.H.M.; SCHAAFSMA, G.; MUYS, T.; VAN DOKKUM, W. Non digestible oligosaccharides do not interfere with calcium and nonheme-iron absorption in young, healthy men. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.67, p.445-451, 1998.
- VAN DEN HEUVEL, E.G.H.M.; MUYS, T.; VAN DOKKUM, W.; SCHAAFSMA, G. Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.69, n.3, p.544-548, 1999.
- VAN DEN HEUVEL, E.G.H.M.; SCHOTERMAN, M.H.C.; MUIJS, T. Transgalactooligosaccharides stimulate calcium absorption in postmenopausal women. **J. Nutr.**, v.130, n.12, p.2938-2942, 2000.
- YOUNES, H.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. **Brit. J. Nutr.**, v.75, n.2, p.301-314, 1996.

Interação entre Cálcio e Ferro

1. Introdução

A deficiência de ferro e cálcio está associada com problemas de saúde pública, sendo prevalente nos países em vias de desenvolvimento e atingindo principalmente crianças, gestantes, nutrízes e idosos. Países desenvolvidos diminuíram a incidência dessas deficiências por meio da fortificação de alimentos básicos, prática que está se tornando cada vez mais comum em países em desenvolvimento (FREIRE, 1997, SCHULTINK e DILLON, 1998), como o Brasil, onde a incorporação de ferro às farinhas de trigo e milho (BRASIL, 2000), encontram-se em fase de regulamentação (ANVISA, 2001).

O aumento na oferta de alimentos fortificados deve-se não apenas à ação governamental, mas também à iniciativa de indústrias que, a cada dia, lançam novos produtos no mercado, utilizando como estratégia de marketing o fato destes serem adicionados de vitaminas e,ou, minerais. Um exemplo claro são leite e derivados: excelentes como fonte de cálcio, mas com baixos teores de ferro. Esses produtos vêm sendo utilizados como veículos para fortificação com ferro devido principalmente aos potenciais consumidores (crianças e idosos). No entanto, as implicações nutricionais, decorrentes principalmente do delicado equilíbrio existente entre os diversos minerais não foram totalmente definidas e o aumento de um mineral em uma formulação pode tanto inibir quanto estimular a absorção de outros nutrientes (COOK et al., 1991b, REEDY & COOK, 1997, WHITING & WOOD, 1997, WOOD & ZHENG, 1997). A interação de cálcio e ferro é controversa e esta revisão tem como objetivo discuti-la, verificando os possíveis mecanismos e seus efeitos fisiológicos.

2. Ferro

O ferro é constituinte de muitas enzimas essenciais como citocromo C, catalase, enzimas do ciclo de Krebs, além de estar envolvido no transporte de gases por fazer parte da hemoglobina e mioglobina, é um mineral essencial para o metabolismo oxidativo, crescimento celular, síntese protéica e de neurotransmissores (FAIRBANKS, 1994; BEARD et. al., 1996). A deficiência de ferro, que leva à anemia ferropriva, é mais comum

em crianças, adolescentes e mulheres grávidas, particularmente nos países em vias de desenvolvimento. Essa deficiência pode afetar de maneira adversa o desenvolvimento psicomotor e mental de crianças. Em gestantes pode levar ao nascimento de bebês com baixo peso, bebês prematuros, além de poder provocar perdas fetais. Em adultos pode diminuir a capacidade de trabalho e a resistência a infecções (LOZOFF et al., 1991; PREZIOSI et al., 1997).

O excesso de ferro que está mais relacionado com suplementação medicamentosa ou doenças genéticas como hemossiderose/ siderose africana (Bantu) ou hemocromatose (defeito no gene HFE), pode levar à cirrose hepática, cardiopatias e diabetes (HALLIDAY, 1998). Estudos recentes demonstraram que o produto de HFE pode se ligar aos receptores de transferrina, afetando o controle homeostático da absorção intestinal de ferro (WOOD e HAN, 1998). Outro risco associado ao excesso de ferro é o aparecimento de câncer de cólon (carcinoma distal). O ferro intraluminal está sendo avaliado como fator cancerígeno, já que pode estimular a proliferação celular devido à participação na reação de Fenton (formação de radicais hidroxila) e produção de peróxido de hidrogênio o que levaria a um estresse oxidativo. A resposta a essas situações seria a aceleração do processo de divisão celular para reparar o aumento das perdas das células da superfície luminal. O aumento de radicais hidroxila também pode promover a transformação de pró-carcinogênicos, como ácidos biliares secundários em carcinogênicos no lúmen intestinal (LUND et al., 1998), além de alterações em proteínas e lipídios.

Como o organismo não possui um mecanismo adequado de excreção, o metabolismo do ferro é controlado em nível de absorção, que ocorre primariamente no duodeno (FAIRBANKS, 1994). O ceco, no entanto, tem sido indicado como sítio importante de absorção de ferro inorgânico (VONK et al., 1988; EBIHARA et al., 1994; EBIHARA e OKANO, 1995) e essa absorção poderia ser aumentada pela fermentação de lactose e consequente diminuição do pH. A eficiência na absorção é aumentada nos casos de deficiência de ferro, hemólise aguda, aumento de eritropoiese – seja devido a hemorragia ou hemólise - e hipóxia e reduzida quando a eritropoiese for deprimida. Perdas podem ser observadas em descamação celular e quando há perdas sangüíneas como na menstruação ou hemorragia (BEARD et al., 1996).

O ferro pode ser ingerido nas formas heme (carnes) e não-heme. A forma heme é menos influenciada por fatores dietéticos, embora a sua absorção seja aparentemente aumentada por proteínas musculares e diminuída em presença de cálcio, enquanto a forma não-heme é influenciada pelos componentes da dieta, sendo mais facilmente absorvida na

presença de ácido ascórbico, ácidos orgânicos ou proteínas musculares e inibida por compostos fenólicos, ácido fítico, cálcio e alguns tipos de proteínas (DALLMAN et al., 1980, FAIRWEATHER-TAIT e HURRELL, 1996; BEARD et al., 1996; LYNCH, 1997). O balanço entre estes fatores determina a biodisponibilidade do ferro. Outros fatores intraluminais como a quantidade de ferro, secreções gástricas e entéricas, estado das células entéricas (SANTOS et al., 1997) e trânsito intestinal (VONK et al., 1988) também influenciam a absorção das duas formas de ferro.

A absorção do ferro ocorre por transporte transcelular (mais importante) ou paracelular. O ferro-heme é absorvido pelo enterócito como ferro-porfirina. O ferro não-heme está presente primariamente na forma de complexos férricos, dissociados durante o processo de digestão, o que permite a sua redução parcial por ação de ferri-redutase no intestino (Riedel et al., 1995, citados por WOOD e HAN, 1998). Como já indicado anteriormente, esta redução é facilitada por fatores endógenos como ácido clorídrico, secreções gástricas e constituintes da dieta como ácido ascórbico. O ferro liga-se a glicoproteínas (gastroferrina no estômago ou mucina no intestino), permanecendo solúvel e disponível para a absorção no pH alcalino do duodeno (CONRAD e UMBREIT, 1993; POWELL et al., 1999). A absorção do ferro ocorre em três etapas: passagem pela membrana apical do enterócito, transporte pelo citosol e liberação na circulação através da membrana basolateral.

A transposição da membrana apical é um processo dependente de energia e de carreadores. CONRAD e UMBREIT (1993) observaram em ratos a presença de uma proteína, a integrina, que seria um importante mediador na absorção, em microvilosidades do duodeno. A identificação de uma proteína semelhante à transferrina (melanotransferrina) ligada à superfície celular foi descrita em células de fetos de suínos embora sua ação em mamíferos adultos ainda não tenha sido demonstrada (POWELL et al., 1999). Também foi demonstrada a existência de uma enzima com atividade ferroredutase na superfície da mucosa entérica, cuja única função seria a redução de Fe^{+3} em Fe^{+2} , permitindo a entrada deste íon na célula (POWELL et al., 1999). A passagem do íon através do citosol ocorreria com a atuação de chaperonas e da enzima mobilferrina que, embora tenha maior afinidade pelo ferro, também pode ligar-se a outros íons divalentes como cálcio, cobre, zinco e chumbo. A membrana basolateral possui oxidases cobre-dependentes como glicosilfosfatidilinositol ancorada em ceruloplasmina (WOOD e HANN, 1998), necessárias para a oxidação do ferro e receptores de transferrina (BEARD et al., 1996). O ferro é transportado no sangue sob a forma oxidada, ligada à transferrina.

Nos últimos anos novas descobertas foram feitas com relação à regulação da absorção de ferro. Determinou-se a existência de FET4 (*low affinity Ferrous Iron Transporter*), uma proteína transportadora de membrana com baixa afinidade pelo ferro e que também transporta outros minerais (cobalto, cádmio e níquel), além da ação dos genes HFE (gene de hemocromatose) e DCT1 (*Divalent Cation Transporter*), que codifica a proteína Nramp-2 (“*Natural resistance associated macrophage protein 2*”), um transportador de cátions bivalentes (ferro, zinco, manganês, cobalto, cádmio, cobre, níquel e chumbo) (WOOD e HAN, 1998). A proteína Nramp-2 apresenta várias características estruturais de canais iônicos e transportadoras, o que a habilitaria como uma possível mediadora na absorção de ferro entérico. A exposição de animais a dietas deficientes de ferro aumentou o nível (50 a 100 vezes) desta proteína no duodeno proximal de ratos (CANONNE-HERGAUX et al., 1999). Nestes animais o aumento de Nramp-2 foi detectado principalmente na metade luminal das vilosidades e restritos aos enterócitos, e com maior intensidade na superfície luminal dos mesmos, associado à borda em escova. A Nramp-2 não foi encontrada em outras células ou estruturas da porção central interna da vilosidade (lâmina própria). Os autores concluíram que sob condições que levam à deficiência de ferro, ocorre uma expressão abundante de Nramp-2 na borda em escova dos enterócitos do duodeno.

O metabolismo de ferro também é regulado por proteínas citoplasmáticas específicas (*Iron Regulator Protein* - IRP-1 e IRP-2), que atuam sobre a síntese de ferritina e transferrina e tem sua síntese regulada por um mecanismo “feedback” negativo dependente das concentrações de ferro orgânico (KÜHN, 1998; EISENSTEIN e BLEMINGS, 1998). Estes pesquisadores estudaram a resposta destas proteínas à deficiência dietética de ferro e subsequente reversão do estado nutricional de ferro. Os resultados indicaram que enquanto as criptas duodenais respondiam fortemente ao ferro sérico, as células da vilosidade apresentaram pouca ou nenhuma resposta. As IRP presentes nas células da lâmina própria são afetadas rapidamente pelo ferro dietético, indicando que este ferro penetra nas células e inativa as IRP.

Apesar do grande número de trabalhos realizados no intuito de aprofundar o conhecimento do metabolismo de ferro, tanto em humanos quanto em animais, a maior parte dos mecanismos envolvidos continuam desconhecidos.

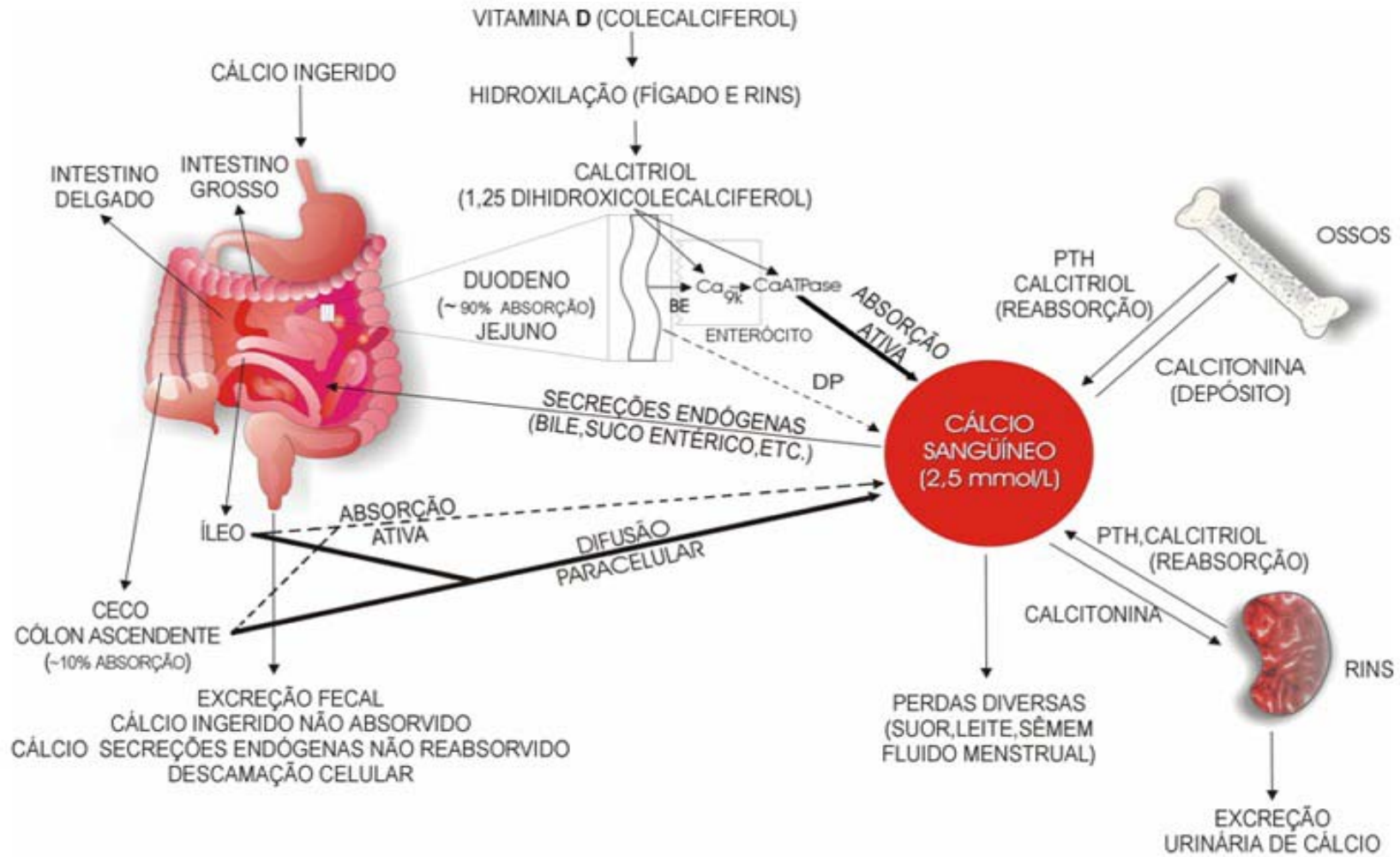
3. Cálcio

Além de ser um dos minerais mais importantes na manutenção da vida, o cálcio também é o mais abundante no corpo humano. É constituinte estrutural de ossos e dentes e exerce o papel de regulação de funções críticas como impulsos nervosos, contração muscular, função microtubular, mitose celular e motilidade celular (ALLEN e WOOD, 1994).

A regulação dos níveis plasmáticos é alcançado por meio de um complexo sistema fisiológico (Figura 1) que inclui a interação de hormônios calcicotrópicos como paratormônio (PTH) e dihidrocolecalciferol (vitamina D₃) e calcitonina, que atuam em receptores específicos nos rins, ossos e intestino e mantêm o equilíbrio entre as três formas de cálcio: ligado à proteínas; complexado com citrato, fosfato ou bicarbonato e na forma de íons livres). A secreção destes hormônios é governada parcial ou totalmente pelas concentrações plasmáticas de cálcio ionizado, em um sistema de “feedback” negativo. Quando existe uma diminuição da concentração plasmática, ocorre a secreção de paratormônio, que mobiliza o cálcio dos ossos e aumenta sua reabsorção renal, além de promover a ativação de vitamina D em calcitriol que por sua vez atua não apenas na reabsorção renal e retirada de cálcio dos ossos, mas também aumenta a absorção intestinal, pela via ativa. Um aumento da concentração plasmática de íons de cálcio estimula a secreção de calcitonina, que favorece o depósito de cálcio nos ossos e aumenta a excreção renal (CASHMAN e FLYNN, 1999).

Do total de cálcio ingerido na dieta, somente uma fração é absorvida (25 a 35%). A eficiência da absorção diminui com o aumento da quantidade ingerida e é melhorada quando o cálcio está na forma iônica solúvel. O suco gástrico tem um papel solubilizante muito importante. Enquanto alguns componentes dos alimentos, como lactose e fosfopeptídeos da caseína, podem exercer efeito sinérgico, outros, como o ácido oxálico e o ácido fítico, podem formar complexos insolúveis com o cálcio. Menor tempo de permanência do alimento ingerido no trato gastrointestinal, danos na mucosa intestinal, deficiência de vitamina D ou de cobre, diminuem a absorção. A acidez estomacal promove um aumento da solubilidade do cálcio proveniente da dieta. Cerca de 80% da absorção de cálcio no intestino delgado ocorre na forma passiva (transporte paracelular) e 20% por facilitadores ou mecanismos ativos (transporte transcelular) (WHITING e WOOD, 1997). Uma pequena fração (aproximadamente 7%) de cálcio pode ser absorvida no cólon e ceco (BRONNER e PANSU, 1999).

Figura 1 – Metabolismo de cálcio



No transporte transcelular, o cálcio entra no enterócito através de canais de cálcio ou de absorção por vesículas da membrana ciliada, sendo que este último não depende de Adenosina Trifosfato (ATP), passando para o citoplasma e sendo posteriormente liberado pela membrana basolateral. O principal fator limitante dessa via é a velocidade de difusão do cálcio no citoplasma, facilitada pela Calbindina D_{9k} , que tem o papel de aumentar a concentração de cálcio, amplificando o fluxo do íon de forma análoga à feita pela hemoglobina no transporte de oxigênio (FEHER et al., 1992; STEIN, 1992). A Calbindina D_{9k} é uma proteína cuja síntese depende de vitamina D, encontrada nas células duodenais e que se liga ao cálcio no interior do enterócito, mas está ausente nas células do íleo e de animais que apresentam deficiência de vitamina D (BRONNER, 1998).

Após a absorção pelo enterócito, o cálcio é liberado na corrente sangüínea por meio de um sistema ATP-dependente, no qual ocorre uma fosforilação que induz modificações conformacionais na enzima cálcio ATPase. Este mecanismo também é dependente de vitamina D e supõe-se que esta aumente o número de enzimas, ou seja, o número de bombas no enterócito, embora a ausência desta vitamina não seja fator limitante para a liberação do cálcio na corrente sangüínea. Vários minerais, tais como bário, estrôncio, manganês, e lantanídeos (chumbo) competem com o cálcio pela Calbindina. No entanto, alguns destes minerais apresentam ligação mais forte que o próprio cálcio. Essas ligações podem explicar o fenômeno de aumento da absorção de chumbo observada quando se administra vitamina D (BRONNER, 1998). O mecanismo de transporte transcelular é muito importante, sobretudo quando a ingestão dietética de cálcio é baixa (GHISHAN, 1989).

O transporte paracelular (passivo) ocorre através das junções celulares intermediárias. PANSU et al. (1993) indicaram que, em ratos, do total de cálcio em solução no intestino, de 50 a 60% foram absorvidos pela via paracelular. Para um período de trânsito de ingestão de 3 horas, o quimo permanece 2 a 3 minutos no duodeno, 45 minutos no íleo e mais de 2 horas no ceco, e não existindo diferenças na permeabilidade nas três porções do intestino (DUFLOS et al., 1995). Devido ao fato de quase 90% do tempo de permanência do quimo no intestino delgado ocorrer na porção final do jejuno e íleo, a absorção paracelular é de grande importância. Aproximadamente 11% do total de cálcio paracelular é absorvido no ceco e cólon ascendente (BRONNER e PANSU, 1999). Os dados apresentandos permitem inferir que, do total de cálcio absorvido pela via paracelular, menos de 2% ocorre no duodeno, 25% no jejuno e o restante no íleo (BRONNER, 1998).

A absorção paracelular é um processo dependente da concentração de cálcio ingerido da dieta, do tempo de permanência do quimo e da permeabilidade da membrana apical ao cálcio (DUFLOS et al., 1995), e só é preferida quando a ingestão de cálcio é adequada ou alta, ou seja, quanto maior a ingestão de cálcio, maior será a sua absorção via paracelular, embora essa relação não seja diretamente proporcional (GHISHAN, 1989).

Para a manutenção de níveis adequados de cálcio, a ingestão diária recomendada (*Dietary Reference Intakes* - DRI) varia de 600 a 1200 mg, dependendo da idade e das condições fisiológicas do indivíduo (INSTITUTE OF MEDICINE, 1997), sendo o leite e seus derivados as maiores fontes de obtenção desse mineral, que também encontra-se presente em vegetais como couve.

O excesso de cálcio também pode ocorrer e está associado a ingestão acima de 2g/dia do mineral, hiperabsorção no intestino, tratamento de úlceras pépticas com leite e antiácidos álcalis (Síndrome do leite álcali). Animais submetidos a excesso de cálcio apresentaram osteocondrose, falência renal e morte, enquanto que em humanos os sintomas variam de hipercalcemia (concentração sanguínea de cálcio anormalmente elevada) com ou sem hipercalciúria (aumento do nível de cálcio excretado na urina), falência renal, calcificação dos tecidos moles, irritabilidade, cefaléias, além de interferência negativas com a absorção de minerais, como magnésio, fósforo, ferro e zinco (WHITING e WOOD, 1997).

O cálcio pode ser perdido nas fezes, por meio de descamação endotelial, secreções pancreáticas e biliares, pela urina e, em pequena escala, pela pele e pelo suor. Os rins reabsorvem de 98 a 99% do cálcio filtrado. Variações nas quantidades excretadas devem-se à idade (diminui em pessoas idosas) e sexo (maior excreção em homens e em mulheres após menopausa). A excreção também aumenta com altos consumos de sódio e proteína (MARGEN et al., 1974) e tende a diminuir com alta ingestão de fósforo.

4. Interação cálcio e ferro

A possível interação existente entre estes minerais adquire um novo aspecto diante do crescente número de alimentos fortificados ou enriquecidos. Vários estudos indicam a possibilidade de interação entre cálcio e outros minerais essenciais, podendo conduzir a uma diminuição na absorção destes outros minerais, consideração feita especialmente para

ferro e zinco (KLETZIEN, 1940; GREIG, 1952; PRATHER e MILLER, 1992; SHACKELFORD et al., 1994; WOOD e ZHENG, 1997).

Estudos sobre a interação cálcio-ferro começaram no início do século passado, com a observação de que cálcio aumentaria a absorção de ferro (Von Wendt, 1905 e Sherman, 1907 citados por KLETZIEN, 1940). Após observar o aparecimento de anemia em ratos alimentados com dietas contendo altos teores de cálcio, KLETZIEN (1940) realizou uma experimentação onde níveis de cálcio variando de 1 a 3%, administrados sob a forma de carbonato, lactato, cloreto, fosfato, oxalato e, ou, sulfato. Os resultados indicaram efeito adverso dos sais sobre a retenção de ferro e cobre nos animais. Desde então diversos estudos têm sido realizados, em modelos animais e humanos, na tentativa de verificar a magnitude desta interferência, seus mecanismos e suas implicações na saúde humana.

4.1. Estudos com animais

Os estudos com modelos animais predominaram até 1990, quando, após verificada a possível influência do cálcio sobre o ferro, passou-se a buscar evidências de que o fenômeno também ocorreria nos seres humanos. Embora a literatura seja rica em trabalhos demonstrando uma correlação negativa entre os minerais (GREIG, 1952; BARTON et al., 1983; PRATHER e MILLER, 1992; SHACKELFORD et al., 1994), este aspecto tornou-se muito controverso, com a divulgação de resultados (DALTON et al., 1997) mostrando que esta diminuição pode não ter influência clínica, em se tratando de pessoas saudáveis e com alimentação adequada. A Tabela 1 mostra o resumo dos trabalhos comentados no texto.

Os trabalhos clássicos incluem o estudo realizado por GREIG (1952), com camundongos em fase de amamentação, onde foi verificado que dietas ricas em cálcio (2%), sob a forma de carbonato de cálcio, induziram anemia ferropriva nos animais e também nas crias. Esta anemia foi prevenida com a adição de citrato férrico na dieta. Outros experimentos foram realizados na tentativa de corroborar estes resultados e elucidar o(s) mecanismo(s) envolvido(s).

Pesquisa realizada por RANHOTRA et al. (1981) mostrou que leite fortificado com complexo citrato fosfato de ferro, recuperou os níveis de hemoglobina de ratos previamente submetidos a dietas de depleção. Esta recuperação apresentou os mesmos níveis quando o complexo foi testado sozinho, demonstrando não haver interferência de componentes do leite, inclusive do cálcio, na absorção de ferro, nas condições experimentais.

Tabela 1 – Resumo dos experimentos enfocando interação cálcio e ferro, realizados com animais, citados no texto.

<i>Autores</i>	Animais	Resultados
KLETZIEN (1940)	Ratos	Ca (1 a 3%) levou à depressão da absorção de Fe e Cu mesmo nos níveis mais baixos.
GREIG (1952)	Camundongos	Fêmeas e crias amamentadas apresentaram anemia quando alimentadas com dietas contendo alto teor de cálcio.
RANHOTRA et al. (1981)	Ratos	Leite fortificado conseguiu recuperar animais anêmicos.
BARTON et al. (1983)	Ratos	Ca diminuiu/ retardou absorção Fe nas alças intestinais <i>in vivo</i> . O nível de redução dependeu da quantidade de Ca presente e não da relação Ca/Fe. Animais recebendo dietas com alto teor de Ca apresentaram sinais de deficiência de Fe. Observou-se redução no número de vesículas de absorção de ferro na membrana apical de enterócitos na presença de cálcio.
PRATHER & MILLER (1992)	Ratos	Foram administrados CaCO ₃ , NaCO ₃ , CaSO ₄ e NaSO ₄ e verificou-se que tanto ânions quanto cátions exercem efeito sobre a absorção de ferro. A maior depressão foi observada com CaCO ₃ .
SHACKELFORD et al. (1994)	Ratos	Excesso de cálcio (CaCO ₃) na dieta diminuiu a biodisponibilidade de Fe, Mg, P e Cu, tanto nos animais adultos quanto nos fetos
WAUBEN & ATKINSON (1999)	Leitões	Os animais adaptados à dietas com alto teor de cálcio e os do grupo controle não apresentaram diferenças nas reservas e concentração de ferro em diversos órgãos. A absorção de ferro <i>in vitro</i> mostrou redução em ambos grupos, porém não houve diferenças significativas na resposta <i>in vivo</i> . O período de adaptação (2 semanas) às dietas ricas em cálcio pode ter induzido mecanismos adaptativos que contrabalançam o efeito inibitório na absorção de ferro.

Trabalhando com ratos BARTON et al. (1983), avaliaram vários aspectos relacionados com inibição de ferro por cálcio. O estudo foi realizado com animais submetidos a dietas com teores de cálcio baixo (2,66g de cálcio/kg de dieta), normal (5,66g de cálcio/kg de dieta) e alto (16,86g de cálcio/kg de dieta) e teores baixos (2mg ferro/kg de dieta e 20mg de ferro/kg de dieta) e normais (85mg ferro/kg dieta) de ferro. Os resultados mostraram menor absorção de FeCl₃ em comparação com FeCl₂ e que a absorção de ferro foi mais lenta nos animais que receberam dietas com cálcio. Trabalhando com segmentos intestinais

de ratos, os mesmos autores verificaram que concentrações de 1 a 100 mMol (CaCl_2) resultaram em diminuição da absorção de ferro do intestino delgado em uma relação dose-dependente. A inibição dependeu mais do quantidade de cálcio presente no lúmen que da relação molar cálcio /ferro e ocorreu apenas no duodeno e jejuno. Animais recebendo dietas com alto teor de cálcio apresentaram sinais de deficiência de ferro. A microscopia eletrônica mostrou retardamento progressivo na absorção de ferro pela membrana apical dos enterócitos com o aumento da concentração de cálcio (animais recebendo apenas ferro apresentaram mais pontos de coloração de depósitos de ferro nas vilosidades do que animais sob dieta cálcio/ferro ou solução salina), sugerindo que o processo de absorção do ferro seria interrompido pelo cálcio neste estágio, pela competição por receptores ou bloqueando o transporte do ferro através da membrana.

PRATHER e MILLER (1992) desenvolveram estudos em ratos anêmicos (modelo da AOAC, 1984 de depleção/repleção de hemoglobina) utilizando CaCO_3 , CaSO_4 , Na_2CO_3 e Na_2SO_4 que objetivaram verificar se o efeito sobre a absorção de ferro era devido ao cálcio e,ou, ao ânion (CO_3^{-2} ou SO_4^{-2}). O sal que apresentou maior efeito inibitório foi CaCO_3 sendo o único que apresentou interferência sobre a recuperação de hemoglobina mesmo quando adicionado em baixos níveis (62,5mmol/kg de dieta). CaSO_4 , Na_2CO_3 também diminuíram a taxa de repleção de hemoglobina, mas apenas quando em níveis elevados (187,5 mmol/kg de dieta). Os resultados indicaram interação significativa entre cátion (cálcio) x ânion e ânion x concentração do sal sobre a absorção de ferro. Os autores concluíram que tanto o cálcio quanto o carbonato contribuíram para o efeito verificado. Os mecanismos sugeridos para o efeito dos sais seriam 1) interações luminais complexas onde estariam incluídas alterações no pH, conteúdo de cálcio, solubilidade do ferro e ligações com complexos de baixo peso molecular presentes nos alimentos; 2) competição por receptores na membrana apical do enterócito e 3) alterações na taxa de transferência do ferro da célula para a circulação.

Experimentos realizados por SHACKELFORD et al. (1994) com ratas não-prenhes, prenhes e fetos e reafirmaram que excesso de cálcio diminui a biodisponibilidade de diversos minerais, entre eles ferro e magnésio, tanto nos animais adultos quanto nos fetos. No entanto WAUBEN e ATKINSON (1999) trabalhando com leitões adaptados à dietas contendo teores normais (2,0 g/L) ou alto (4,67 g/L) de cálcio (na forma de glicerolfosfato de cálcio) concluíram que as reservas e concentração de ferro em diversos órgãos não apresentaram diferenças entre os grupos. Embora a absorção de ferro, medida *in vitro* por meio de método que quantifica vesículas da borda em escova da membrana apical, fosse

reduzida em ambos grupos, não houve diferenças significativas na resposta *in vivo*. Os autores sugeriram ainda que o período de adaptação (2 semanas) às dietas ricas em cálcio poderia ter induzido mecanismos adaptativos que contrabalançassem o efeito inibitório do cálcio na absorção de ferro, indicando que o efeito interativo entre esses minerais poderia não comprometer as reservas de ferro, mesmo em dietas suplementadas com cálcio.

4.2. Estudos com humanos

Nos últimos tempos vem sendo observado que o efeito de um componente dietético específico na absorção de ferro pode ser exagerado em estudos de biodisponibilidade de curta duração ou refeição única, enquanto em períodos de tempo maiores respostas de mecanismos adaptativos podem evitar esse efeito verificado (COOK et al., 1991a). A Tabela 2 mostra o resumo dos trabalhos sobre experimentações sobre o efeito de cálcio na biodisponibilidade de ferro.

Testes com ferro radioativo foram realizados por MONSEN e COOK (1976) em 34 voluntários, que consumiram dieta semi-sintética marcada com ferro radioativo (^{55}Fe e ^{59}Fe). Refeições que continham cálcio e, ou, fosfato (CaCl_2 , CaHPO_4 ou K_2HPO_4) em quantidades normais não alteraram a absorção do radioisótopo quando comparados com refeições controle. A combinação de CaHPO_4 e K_2HPO_4 diminuiu significativamente a absorção de ferro, sugerindo que um complexo cálcio-fosfato-ferro, pouco absorvível poderia ter sido formado.

Tabela 2 – Resumo dos estudos enfocando interação cálcio e ferro realizados com seres humanos, citados no texto.

Autores	Caracter. estudo (Nº de indivíduos/ refeição única ou tempo/ detalhes)	Resultados
MONSEN & COOK (1976)	34, refeições únicas	Incorporação de 178 mg de Ca (CaHPO ₄ , CaCl ₂ e, ou, KHPO ₄) → 50 a 70% ↓ absorção Fe. Combinação CaHPO ₄ /K ₂ HPO ₄ → ↓ significativa da absorção Fe.
COOK et al. (1991b)	61, refeições únicas	CaCO ₃ não ↓ absorção de FeSO ₄ quando ingeridos sem alimentos. Citrato de cálcio e CaPO ₄ (600 mg Ca) ↓ (49 e 62%) absorção Fe (18 mg). O efeito do Ca limitou-se ao Fe não-heme. Foi mais acentuada em dietas com baixa biodisponibilidade de ferro do que em dietas com alta biodisponibilidade (55 e 28% de inibição).
HALLBERG et al. (1991)	126, refeições únicas	↓ absorção Fe heme (52 a 76%), com inibição aparentemente dose-dependente. O limite máximo de inibição foi alcançado com dose de 300 mg Ca. A adição de mais cálcio não implica em um grau maior de inibição. O grau de inibição foi afetado pelo processamento e momento de adição do cálcio, pela maior ou menor degradação de fitatos presentes.
HALLBERG et al. (1992a)	28, refeições únicas	Níveis de cálcio de 165 mg levaram à redução na absorção tanto de ferro heme (até 41%) quanto não-heme (até 48%), sendo esta inibição dose-dependente.
HALLBERG et al. (1992b)	18, refeições únicas, leite de vaca x leite humano	> absorção de Fe no leite humano (< teor de cálcio). Leites com teores de cálcio semelhantes apresentaram mesmo nível de inibição (50%) da absorção.
HALLBERG et al. (1992c)	6 estudos com 57 indivíduos, refeições únicas	Indicação de que a interação Ca/Fe ocorreria fora do trato gastrointestinal; A inibição não está relacionada à concentração molar Ca/Fe. É necessária uma concentração mínima de cálcio para que este efeito seja verificado. Patamar de inibição entre 150 e 200 mg; valores acima não levariam a aumentos significativos da inibição da absorção de ferro.
SOKOLL & DAWSON-HUGHES (1992)	109 mulheres, 12 semanas, CaCO ₃ sobre reservas de Fe.	A suplementação não levou a diferenças nas reservas de ferro entre os grupos teste (1000 mg Ca/dia sob a forma de CaCO ₃) e controle.

Tabela 2 – Continuação

Autores	Caracter. estudo (Nº de indivíduos/ refeição única ou tempo/ detalhes)	Resultados
GLEERUP et al. (1995)	21 mulheres, 2 períodos de 10 dias	Produtos lácteos ↓ consideravelmente absorção Fe (30 a 50%); a ingestão separada de alimentos ricos em Ca e Fe ↑ a absorção deste último.
TIDEHAG et al. (1995)	9 indivíduos ileostomizados; 8 semanas	Sem diminuição aparente na absorção de Fe em dieta rica em Ca.
REDDY e COOK (1997)	14 indivíduos, 5 dias	Ca dietético não apresentou influência significativa na absorção de Fe não-heme, mesmo em dietas com alto conteúdo (1281 mg Ca/dia).
DALTON et al. (1997)	103 crianças; dietas testes oferecidas durante 9 meses	Incidência de deficiência de Fe igual para os grupos teste (1800mg de Ca/ L bebida) e controle (465 mg de cálcio/ L bebida). A inibição da absorção de Fe por Ca e P não é clinicamente importante em crianças alimentadas com fórmulas infantis fortificadas.
FLEMING et al. (1998)	634 idosos (idade 75,3 ± 5 anos) Questionário de frequência de ingestão de alimentos	Correlação positiva entre 5 fatores dietéticos (Fe heme, suplementação com Fe, vit.C, álcool) e ferritina sérica. Apenas a ingestão de café mostrou associação negativa, indicando que o cálcio dietético não teria maior significado sobre os níveis de ferritina, no caso de idosos.
ILICH-ERNEST et al. (1998)	354 meninas, 4 anos.	Não foi observada influência da suplementação (1500 mg/dia) de Ca sobre as reservas de Fe.
KALKWARF & HARRAST (1998)	95 mulheres lactantes e 92 não lactantes em período pós-parto, 6 meses	A suplementação com Ca (1 g) por longos períodos não afetou as reservas de Fe de ambos os grupos, controle (placebo) e teste (ingestão de Ca).
MINIHANE & FAIRWEATHER- TAIT (1998)	31 indivíduos não anêmicos, 6 meses	Ingestão de Ca (1200 mg/ 6 meses) ↓ em cerca de 70% a absorção de Fe não-heme mas a suplementação prolongada não exerceu efeito sobre as reservas orgânicas de Fe.
AMES et al. (1999)	11 pré-escolares, 5 semanas (adaptação), refeição única, estudo multitraço, crossover.	Crianças submetidas a um período de adaptação de 5 semanas a dietas de baixo (502 mg) e alto (1180) teor de Ca. Não foram observadas diferenças entre incorporação de Fe dos dois grupos, mas a absorção de Ca foi maior no grupo que recebeu dieta rica nesse mineral.
VAN DE VIJVER et al. (1999)	1080 adolescentes e 524 mulheres, 6 países europeus; questionário de frequência; estudo tipo CALEUR, Cross- secional	Modelo de RL ajustado para ingestão de Fe, proteína, chá, Vit.C, idade, menarca e país. Observado associação consistente e inversa, mas fraca, entre ingestão de Ca e níveis de ferritina sérica, independente da ingestão de Fe. Associações negativas entre ferritina sérica e idade e transferrina sérica e ingestão de Vit.C. Idade, peso, ingestão de energia e proteína estavam positivamente associados com transferrina sérica.

LEGENDA: ↓ Redução; ↑ Aumento; Vit.C: Vitamina C; RL Regressão Linear.

Na década de 90 foram realizados vários estudos no intuito de verificar se a adição de cálcio, realmente, levaria à inibição da absorção de ferro e se existiria alguma relação entre dose e porcentagem de inibição. O estudo mais sugestivo da existência de uma relação dose-dependência entre cálcio e inibição de ferro foi realizado por (HALLBERG et al., 1991). Neste trabalho, a adição de 40 a 600 mg de cálcio, na forma de CaCl_2 a uma refeição teste com baixo nível de fitato inibiu a absorção de ferro de forma dose-dependente até alcançar níveis de 300 mg de cálcio, onde foi observada a redução máxima (75%). Doses superiores não implicam em maior porcentagem de inibição da absorção de ferro. Também foi observada uma redução de 52 a 76% na absorção de ferro heme. A mesma quantidade de cálcio também reduziu significativamente a absorção de ferro-heme sugerindo que o efeito do cálcio estaria relacionado com a transferência de ferro na mucosa. COOK et al. (1991b) verificaram uma redução significativa na absorção de ferro (49% e 62% em presença de citrato de cálcio e fosfato de cálcio, respectivamente), quando níveis de 600 mg de cálcio e 18 mg de ferro foram ingeridos sem alimentos. Esta inibição limitou-se ao ferro não-heme, sendo mais acentuada em dietas com baixa biodisponibilidade de ferro do que em dietas com alta biodisponibilidade (respectivamente 55 e 28% de inibição). A adição de 300 a 600 mg cálcio como CaCO_3 , cálcio citrato malato, cálcio citrato, hidroxiapatita e CaPO_4 reduziram a absorção de ferro em refeições testes entre 28 e 80%.

Buscando obter maiores informações sobre a inibição do cálcio em relação ao tipo de ferro, HALLBERG et al. (1992a) corroboraram uma forte inibição da absorção de ferro, seja este heme ou não, por íons de cálcio. A adição de 165 mg de cálcio a refeições fortificadas com hemoglobina levou a uma redução de 48% na absorção do ferro, sugerindo que o cálcio interferiria no transporte de ferro através da célula da mucosa e em um estágio posterior, na liberação do ferro para a corrente sanguínea, comum ao transporte dos dois tipos de ferro. Em outra experimentação HALLBERG et al. (1992c) verificaram, a partir dos resultados de 6 estudos realizados com 57 indivíduos, que a interação cálcio/ferro ocorreria fora do lúmen gastrointestinal, apoiando a hipótese de que o efeito inibitório do cálcio sobre o ferro estaria situado em nível de células da mucosa intestinal, especialmente em algumas das vias intracelulares comuns à absorção tanto de ferro heme quanto não-heme. Os pesquisadores também verificaram que a inibição não está relacionada apenas à concentração molar cálcio/ferro mas que é necessária a presença de uma concentração mínima de cálcio para que este efeito seja verificado. Os resultados indicaram que o patamar de inibição estaria localizado entre 150 e 200 mg de cálcio e que

valores superiores a estes não levariam a aumentos significativos da inibição da absorção de ferro.

HALLBERG et al., (1992b) compararam a absorção de ferro do leite humano e do leite de vaca, utilizando isótopos radioativos (^{55}Fe e ^{59}Fe). O ensaio foi realizado com 18 indivíduos e os resultados mostraram que a absorção é maior no leite humano, fato relacionado com um menor teor de cálcio presente neste substrato. Quando pela adição de CaCl_2 os teores de cálcio tornaram-se equivalentes, observou-se o mesmo nível de inibição com redução de cerca de 50% da absorção.

Em 1995, GLEERUP et al. realizaram um estudo com 21 mulheres, durante 2 períodos de 10 dias. Este trabalho utilizou ferro não-heme marcado com ^{59}Fe e administrado no café da manhã e lanche, refeições relativamente pobres neste mineral. Os resultados sugeriram que a associação de produtos lácteos com fontes de ferro diminui consideravelmente a absorção de ferro (30 a 50%) e que a ingestão separada de alimentos ricos em cálcio e ferro aumenta significativamente a absorção do ferro.

Apesar dos resultados obtidos durante os primeiros anos de experimentações, vários estudos realizados nos últimos anos não comprovam a interação negativa entre cálcio e ferro. TIDEHAG et al. (1995) trabalharam com 9 indivíduos ileostomizados recebendo dietas relativamente ricas em cálcio (leite semi-desnatado e bebida láctea fermentada com baixo teor de gordura) e pobres em fitatos durante um período experimental de 8 semanas. Os resultados obtidos indicaram não haver diminuição na absorção aparente de ferro. Em uma experimentação conduzida por um período de 5 dias, REDDY e COOK (1997) não observaram diferença na absorção de ferro não-heme de dieta variada com alto (1281 mg/d) ou baixo (280 mg/dia) teor de cálcio. Tampouco foram observadas relações significativas entre a absorção de ferro não-heme e fatores dietéticos que influenciam sua absorção, em uma dieta variada, concluindo que, no contexto do experimento, o consumo de cálcio não apresentou influência significativa na absorção deste tipo de ferro.

Os efeitos da suplementação diária com 1200 mg de cálcio (CaCO_3), ingerido junto com as refeições, sobre a absorção diária de ferro não-heme e sobre as reservas de ferro orgânico após um período de suplementação de 6 meses foram estudados por MINIHANE e FAIRWEATHER-TAIT (1998). Os ensaios foram realizados em 31 indivíduos não anêmicos e o consumo de cálcio diário foi registrado utilizando-se questionário de frequência alimentar. A absorção diária de ferro foi medida por meio do uso de marcação com isótopos estáveis e monitoramento de fezes. O efeito da suplementação diária na reserva orgânica foi avaliado pelos níveis de hemoglobina, hematócrito, zinco-

protoporfirina, ferritina sérica e receptores de transferrina plasmática. A adição de cálcio reduziu em cerca de 70% a absorção de ferro não-heme, enquanto a suplementação durante um período de tempo prolongado não exerceu efeito sobre as reservas orgânicas de ferro.

Um estudo multitraço, *cross-over* foi realizado por AMES et al. (1999) para avaliar a relação entre ingestão de cálcio, sua absorção e incorporação de ferro em eritrócitos em 11 crianças em idade pré-escolar (3 a 5 anos). As crianças foram submetidas a um período de adaptação de 5 semanas a dietas de baixo (502 mg) e alto (1180 mg) teores de cálcio. Os níveis de cálcio foram alcançados com a incorporação de alimentos ricos no mineral e não com suplementação na forma de sais minerais. Foram analisadas as concentrações de hemoglobina e ferritina sérica, excreção fecal de cálcio endógeno, excreção urinária de cálcio e cálcio sérico, para determinar a retenção líquida deste mineral. Os resultados não mostraram diferenças entre incorporação de ferro dos dois grupos. No entanto, a absorção de cálcio foi maior no grupo que recebeu dieta rica em cálcio, indicando que a ingestão de maiores quantidades de cálcio por crianças em idade pré-escolar poderia ser benéfico, avaliando a hipótese sugerida por WAUBER e ATKINSON (1999) de que a adaptação gradativa a dietas contendo maior teor de cálcio levaria a um aumento na absorção diária de cálcio sem causar efeitos adversos na absorção de ferro e sua incorporação aos eritrócitos.

Esta experimentação corrobora os resultados de SOKOLL e DAWSON-HUGHES (1992). Os pesquisadores verificaram o efeito de suplementação de cálcio (500 mg de cálcio/ dia na forma de CaCO_3) nas reservas de ferro, em um estudo aleatório, com 109 mulheres saudáveis, na fase pré-menopausa. A suplementação foi feita durante 12 semanas e foram avaliados concentração de ferritina plasmática, ferro sérico, capacidade total de ligação de ferro, saturação de transferrina, concentração de hemoglobina e hematócrito. Os autores não observaram diferenças entre os grupos teste e controle, concluindo que a absorção de 1000 mg de cálcio durante 12 semanas não foi suficiente para alterar as reservas de ferro de mulheres saudáveis.

A maioria dos estudos teve como foco a influência de ingestão de suplementos de cálcio sobre a absorção de ferro. Nos últimos anos, a tendência está sendo avaliar grupos populacionais ou seguir grupos experimentais por um período de tempo mais prolongado, no intuito de verificar a influência de cálcio nas reservas orgânicas de ferro, dentro de um contexto ambiental e alimentar mais realístico.

DALTON et al. (1997) avaliaram 103 crianças saudáveis, divididas em grupos teste (dieta rica em cálcio e fósforo) e controle (placebo), em um estudo duplo-cego, aleatório. Foram

realizados controles do nível de ferritina sérica, capacidade total de ligação, protoporfirina eritrocitária e hematócrito para verificar alterações nas reservas orgânicas de ferro no início do experimento, aos 4 e aos 9 meses. Os resultados encontrados indicaram que a suplementação de fórmulas infantis com cálcio e fósforo não apresentou efeitos clínicos nas reservas de ferro ou na incidência de deficiência em crianças saudáveis entre 6 e 15 meses de idade.

ILICH-ERNEST et al. (1998) seguiram durante 4 anos o desenvolvimento de 354 meninas, com idade variando entre 8 e 13 anos, que receberam suplementação de cálcio (sob a forma de malato citrato) em níveis de 1500 mg de cálcio/ dia. Foram observados os efeitos da suplementação nos níveis de ferro sanguíneo, crescimento e estado menstrual na puberdade. Os resultados levaram à conclusão de que, embora o crescimento e estado fisiológico (menstruação) influenciassem os níveis de ferro em garotas com baixa ingestão de ferro, a suplementação com cálcio não interferiu com a absorção deste. Do mesmo modo, KALKWARF e HARRAST (1998) verificaram que a suplementação com cálcio (1 g de cálcio por dia na forma de CaCO_3) por longos períodos (6 meses) não afetou as reservas de ferro em mulheres lactantes e não lactantes em período pós-parto. Embora não tenha sido observada diferença entre o grupo controle (placebo) e grupo teste (ingestão de cálcio), as lactantes apresentaram nível basal de ferritina maior do que as não lactantes, diferença atribuída ao fato de não haver perdas menstruais de ferro.

Um estudo bastante abrangente foi realizado por FLEMING et al. (1998), com 634 idosos (idade variando entre 67 e 93 anos), utilizando dieta livre e questionário de frequência alimentar. O parâmetro avaliado foi o nível de ferritina sérica, porém para evitar que fatores extrínsecos aos dietéticos influíssem nos resultados, foram realizados exames de atividade de enzimas hepáticas (para excluir doenças hepáticas); leucograma e nível de proteína C reativa (para identificação de possíveis doenças inflamatórias que poderiam afetar os níveis de ferro orgânico) e fixado limite máximo de ferritina sérica para evitar que indivíduos com hemocromatose genética levassem a alterações dos resultados. As análises foram feitas por meio de regressão múltipla para identificar possíveis fatores dietéticos que poderiam influenciar nas reservas orgânicas de ferro. As variáveis utilizadas foram independentes – covariantes (fatores determinantes de ferritina sérica não nutricionais, como sexo, idade e álcool) e fatores dietéticos (ingestão de ferro, vitamina C, cálcio, fibra e cafeína). O modelo foi então ajustado para sexo, idade, índice de massa corporal, ingestão energia total, fumo e uso de aspirina e outras drogas. Os resultados indicaram que, dos fatores dietéticos pesquisados, ferro heme, suplementação com ferro, vitamina C e

álcool apresentaram uma correlação positiva com ferritina sérica, enquanto a ingestão de café mostrou associação negativa com o marcador biológico, indicando que o cálcio dietético não teria maior significado sobre os níveis de ferritina, no caso de indivíduos idosos.

Mais recentemente, VAN DE VIJVER et al. (1999) realizaram um estudo *cross-sectional* com 1080 adolescentes do sexo feminino ($13,5 \pm 1,5$ anos) e 524 adultas jovens ($22,0 \pm 1,1$ anos) em seis países europeus, objetivando verificar a influência da ingestão de cálcio não suplementar no ferro em um grupo considerado como de risco para a deficiência de ferro. As fontes e quantidades de ingestão de cálcio, ferro e energia foram obtidas com o uso de inquérito dietético por método recordatório de 3 dias e o nível de reserva de ferro orgânico foi avaliado por meio dos níveis de ferritina, ferro e transferrina no soro, além de ser calculada a porcentagem de saturação da transferrina. Após ajuste do modelo de regressão linear para ingestão de ferro, proteína, chá, vitamina C, idade, menarca e país de residência, foi observada associação consistente e inversa entre ingestão de cálcio e níveis de ferritina sérica, independente se o ferro era ingerido concomitantemente com o cálcio. Também foram observadas associações negativas entre ferritina sérica e idade e transferrina sérica e ingestão de vitamina C. Idade, peso, ingestão de energia e proteína estavam positivamente associados com transferrina sérica. Os resultados indicaram uma associação negativa fraca entre a ingestão de cálcio e o estado de ferro sanguíneo.

4.3. Mecanismos envolvidos na interação cálcio-ferro

Embora ainda não se saiba com precisão os mecanismos envolvidos nesta interação, vários estudos (COOK et al., 1991b; GLEERUP et al., 1995; HALLBERG et al., 1992a,c) indicaram que cálcio inibe a absorção de ferro quando ambos são ingeridos concomitantemente, sendo este efeito observado para ferro em ambas as formas heme e não-heme.

A interação poderia ocorrer em nível luminal, com a formação de compostos pouco absorvíveis (MONSEN e COOK, 1976; PRATHER e MILLER, 1992), embora a maioria dos pesquisadores sugira que o efeito seria em nível celular (BARTON et al., 1983; HALLBERG et al., 1991), como alteração no nível de borda em escova da membrana na absorção de ferro não-heme.

O fato de ter sido observada redução na absorção de ferro heme em vários estudos levou à sugestão de que a interação também ocorreria em algum estágio posterior, comum

ao transporte de ferro-heme e não-heme (HALLBERG, 1992a), como a inibição na saída do ferro do enterócito (HALLBERG et al., 1992c) e,ou, competição pela mobilferrina (VAN DE VIJVER et al., 1999).

Apesar da observação de efeito antagônico entre cálcio e ferro em experimentos pontuais e de curto prazo, esses resultados não foram corroborados em estudos de longa duração. Uma das hipóteses levantadas para explicar as diferenças observadas entre os efeitos agudo e crônico do cálcio no metabolismo de ferro seria uma resposta adaptativa nas células intestinais. Estudos com refeições únicas mostram que a absorção de ferro é reduzida na presença de cálcio, mas a diminuição do suprimento de ferro no plasma pode modificar o desenvolvimento dos enterócitos nas criptas das vilosidades intestinais, estimulando a produção de proteínas específicas, como por exemplo Nramp-2, que levaria a uma utilização mais eficiente do ferro dietético nas células maduras (MINIHANE e FAIRWEATHER-TAIT, 1998).

A recente clonagem de uma proteína transportadora de íons metálicos (GUNSHIN et al., 1997), denominada DCT1 (*Divalent Cation Transporter*), da mucosa duodenal de ratos daria maior suporte à hipótese de interação intracelular, pois esta proteína aparentemente tem um amplo espectro de ação (ferro, zinco, manganês, cádmio, cobre, níquel, chumbo) e níveis altos de cálcio poderiam interferir com a absorção normal de minerais traço.

5. Considerações finais

Pesquisas sobre a interação cálcio e ferro não são conclusivas. Sabe-se que existe uma interação potencialmente negativa, especialmente quando os minerais são ingeridos ao mesmo tempo. Resultados de várias pesquisas sugeriram a existência da correlação negativa quando avaliadas refeições únicas e incorporação de cálcio, porém os efeitos a longo prazo desta interação não foram comprovados.

Em recente revisão, LYNCH (2000) verificou que a maioria dos estudos com múltiplas refeições indicaram que o cálcio apresenta muito menos influência sobre o ferro do que mostram os resultados com refeições únicas. Esta diferença poderia ser devido ao fato de que os experimentos com refeição única são realizados de forma a maximizar o efeito de qualquer fator sobre a biodisponibilidade de ferro (COOK et al., 1991a).

Embora alguns estudos mostrem uma relação inversa entre ingestão prolongada de cálcio e as reservas orgânicas de ferro, esta interação não seria significativa e tampouco

apresentaria conseqüências do ponto de vista clínico. Alguns trabalhos (COOK, 1990; HUNT e ROUGHEAD, 2000) indicam que o organismo humano possui uma certa capacidade de adaptar o metabolismo de ferro ao tipo de dieta, maximizando a absorção de ferro não-heme quando necessário. Esta adaptação seria parcial, pois dietas com baixa biodisponibilidade levariam, ao longo dos anos, a quadros de deficiência de ferro. Assim, a não observância de efeitos negativos com a suplementação de cálcio seria resultado de uma resposta adaptativa do organismo à diminuição do ferro disponível.

Outro fator a ser considerado diz respeito ao patamar máximo de inibição relatado. O máximo efeito negativo de cálcio sobre absorção de ferro seria atingido com concentrações de 300 mg de cálcio. Níveis maiores de cálcio não resultariam em maior taxa de inibição na absorção de ferro (HALLBERG et al., 1991). A maioria dos experimentos a longo prazo (com humanos) utilizou doses de cálcio normalmente consumidas na alimentação diária, acima de 300 mg, o que pode não implicar em maiores inibições.

Como as interações entre nutrientes podem ser variadas e múltiplas, especialmente quando ingestão de apenas um é aumentada, este risco deve ser contemplado quando se trabalha com fortificação de alimentos. No caso específico de cálcio e ferro, recomendar-se-ia que fontes de ferro alimentares fossem ingeridas separadamente de alimentos ricos em cálcio, de modo a minimizar qualquer interferência negativa.

O leite e seus derivados estão sendo fortificados com ferro por serem produtos de fácil administração, além de bem aceitos pelas populações mais acometidas pela deficiência de ferro. Apesar das fortes evidências com relação à interação negativa entre ferro e cálcio, alguns experimentos utilizando leite e, ou, bebida láctea fermentada fortificados com ferro apresentaram resultados positivos na recuperação de níveis depletados de ferro orgânico (RANHOTRA et al., 1981; TORRES et al., 1994; TORRES et al., 1996; SILVA, 2000), indicando que o estado orgânico das reservas de ferro é mais um fator a ser considerado na avaliação da biodisponibilidade de ferro.

Esses resultados enfatizam a necessidade de novas pesquisas para verificar a extensão da interação cálcio e ferro e de mecanismos ou fatores que permitam o aumento da biodisponibilidade dos minerais existentes nos alimentos, evitando uma ingestão excessiva que poderia levar a desequilíbrios na absorção e utilização destes minerais.

6. Referências Bibliográficas

- ALLEN, L.H.; WOOD, R.J. Calcium and phosphorus. In: SHILS, M.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. (Ed) **Modern Nutrition in health and disease**. 8 ed., Filadelfia: Lea e Febiger, 1994. v.1, cap.7, p.144-149.
- AMES, S.K.; GORHAM, B.M.; ABRAMS, S.A. Effects of high compared with low calcium intake on calcium absorption and incorporation of iron by red blood cells in small children. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.70, n.1, p.44-48, 1999.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Brasília, 03 agosto 2001. <http://www.anvisa.gov.br/divulgaçao/noticias/030801.html>
- AOAC - ASSOCIATION OF ANALITICAL CHEMISTRY **Official Methods of Analysis**. Bioavailability of Iron. Rat Hemoglobin repletion bioassay, 1984. p.880-881.
- BARTON J.C.; CONRAD, M.E.; PARMLEY, R.T. Calcium inhibition of inorganic iron absorption in rats. **Gastroenterol.**, v.84, p.90-101, 1983.
- BEARD, J.L.; DAWSON, H.; PIÑEIRO, D.J. Iron Metabolism: a comprehensive review. **Nutr. Rev.**, v.54, n.10, p.295-317, 1996.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº15, de 21 de fevereiro de 2000. **Diário Oficial da União**, 25 fev.2000. Seção I.
- BRONNER, F. Calcium absorption - a paradigm for mineral absorption. **J. Nutr.**, v.128, n.5, p.917-920, 1998.
- BRONNER, F.; PANSU, D. Nutritional aspects of calcium absorption. **J. Nutr.**, v.129, n.1, p.9-12, 1999.
- CANONNE-HERGAUX, F.; GRUENHEID, S.; PONKA, P.; GROS, P. Cellular and subcellular localization of the Nramp-2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. **Blood**, v.93, n.12, p.4406-4417, 1999.
- CASHMAN, K.D.; FLYNN, A. Optimal nutrition: calcium, magnesium and phosphorus. **Proceedings Nutr. Soc.**, v.58, n.2, p.477-487, 1999.
- CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N. A concise review: iron absorption - the mucin-mobilferrin-integrin pathway. A competitive pathway for metal absorption. **Am. J. Hematology**, v.42, p.67-73, 1993.
- COOK, J.D. Adaptation in iron metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.51, n.2, p.301-308, 1990.

- COOK, J.D.; DASSENKO, S.A.; LYNCH, S.R. Assessment of the role of nonheme-iron availability in iron balance. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.54, n.4, p.717-722, 1991a.
- COOK, J.D.; DASSENKO, S.A.; WHITTAKER, P. Calcium supplementation: effect on iron absorption. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.53, n.1, p.106-111, 1991b.
- DALLMAN, P.R.; SIIMES, M.A.; STEKEL, A. Iron deficiency in infancy and childhood. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.33, n.1, p.86-118, 1980.
- DALTON, M.A.; SARGENT, J.D.; O'CONNOR, G.T.; OLMSTEAD, E.M.; KLEIN, R.Z. Calcium and phosphorus supplementation of iron-fortified infant formula: no effect on iron status of healthy full-term infants. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.65, n.4, p.921-926, 1997.
- DUFLOS, C.; BELLATON, C.; PANSU, D.; BRONNER, F. Calcium solubility, intestinal sojourn time and paracellular permeability codetermine passive calcium absorption in rats. **J. Nutr.**, v.125, n.9, p.2348-2355, 1995.
- EBIHARA, K.; OKANO, J. Comparison of bioavailability and hemoglobin repletion of ferric and ferrous iron infused into the cecum in anemic rats. **Nutr. Res.**, v.15, n.6, p.889-897, 1995.
- EBIHARA, K.; OKANO, J.; MIYATA, T. Comparison of ferrous and ferric iron bioavailability following rat cecal infusion. **Nutr. Res.**, v.14, n.2, p.221-228, 1994.
- EISENSTEIN, R.S.; BLEMININGS, K.P. Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. **J. Nutr.**, v.128, n.12, p. 2295-2298, 1998.
- FAIRBANKS, V.F. Iron in medicine and nutrition. In: SHILS, M.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. (Ed) **Modern Nutrition in health and disease**. 8 ed., Filadelfia: Lea e Febiger, 1994. v.1, cap.9, p. 185-191.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.; HURRELL, R.F. Bioavailability of minerals and trace elements. **Nutr. Res. Rev.**, v.9, p.295-300, 306-309, 1996.
- FEHER, J.J.; FULLMER, C.S.; WASSERMAN, R.H. Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption. **Am. J. Physiol.**, v.262, n.2, Parte 1, p.C517-526, 1992.
- FLEMING, D.J.; JACQUES, P.F.; DALLAL, G.E.; TUCKER, K.L.; WILSON, P.W.; WOOD R.J. Dietary determinants of iron stores in a free-living elderly population: the Framingham Heart Study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.67, n.4, p.722-733, 1998.
- FREIRE, W.B. Strategies of the Pan American Health Organization/ World Health Organization for the control of iron deficiency in Latin America. **Nutr. Rev.**, v.55, n.6, p.183-188, 1997.

- GHISHAN, A. Characterization of calcium uptake by brush border membrane vesicles of human small intestine. **Gastroenterol.**, v.96, p.122-129, 1989.
- GLEERUP, A.; ROSSANDER-HULTÉN, L.; GRAMATKOVSKI, E.; HALLBERG, L. Iron absorption from the whole diet: comparison of the effect of two different distributions of daily calcium intake. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.61, n.1, p.97-104, 1995.
- GREIG, W.A. The effects of additions of calcium carbonate to the diet of breeding mice. 2. Haematology and Histopathology. **Brit. J. Nutr.**, v.6, p.280-294, 1952.
- GUNSHIN, H.; MACKENZIE, B.; BERGER, U.V.; GUNSHIN, Y.; ROMERO, M.F.; BORON, W.F.; NUSSBERGER, S.; GOLLAN, J.L.; HEDIGER, M.A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. **Nature**, v.388, p.482-488, 1997.
- HALLBERG, L.; BRUNE, M.; ERLANDSSON, M.; SANDBERG, A.S.; ROSSANDER-HULTÉN, L. Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.53, n.1, p.112-119, 1991.
- HALLBERG, L., ROSSANDER-HULTÉN, L., BRUNE, M., GLEERUP, A. Inhibition of heme-iron absorption in man by calcium. **Br. J. Nutr.**, v.69, n.2, p.533-540, 1992a.
- HALLBERG, L., ROSSANDER-HULTÉN, L., BRUNE, M., GLEERUP, A. Bioavailability in man of iron in human milk and cow's milk in relation to their calcium contents. **Pediatr. Res.**, v.31, n.5, p.524-527, 1992b.
- HALLBERG, L., ROSSANDER-HULTÉN, L., BRUNE, M., GLEERUP, A. Calcium and iron absorption: mechanisms of action and nutritional importance. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.46, n.5, p.317-327, 1992c.
- HALLIDAY, J.W. Hemochromatosis and iron needs. **Nutr. Rev.**, v.56, n.2, p.S30-S37, 1998.
- HUNT, J.R., ROUGHEAD, Z.K. Adaptation of iron absorption in men consuming diets with high or low iron bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.71, n.1, p.94-102, 2000.
- ILICH-ERNST, J. Z., MCKENNA, A. A., BADENHOP, N. E., CLAIRMONT, A. C., ANDON, M. B., NAHHAS, R.W., GOEL, P., MATKOVIC, V. Iron status, menarche, and calcium supplementation in adolescent girls. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.68, n.4, p.880-887, 1998.
- INSTITUTE OF MEDICINE **Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride**. Washington, D.C.: National Academy Press, 1997. Cap.2, p.43-46.

- KALKWARF, H.J., HARRAST, S.D. Effects of calcium supplementation and lactation on iron status. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.67, n.6, p.1244-1249, 1998.
- KLETZIEN, S.W. Iron metabolism: 1.The role of calcium in iron assimilation. **J. Nutr.**, v.19, p.187-197, 1940.
- KÜHN, L.C. Iron and gene expression: molecular mechanisms regulating cellular iron homeostasis. **Nutr. Rev.**, v.56, n.2, p.S11-S19, 1998.
- LOZOFF, B.; JIMENEZ, E.; WOLF, A.W. Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. **N. Eng. J. Med.**, v.325, n.10, 1991.
- LYNCH, S.R. Interaction of iron with other nutrients. **Nutr. Rev.**, v.55, n.4, p.102-110, 1997.
- LYNCH, S.R. The effect of calcium on iron absorption. **Nutr. Res. Rev.**, v.13, n.2, p.141-158, 2000.
- LUND, E.K.; WHARF, S.G.; FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; JOHNSON, I.T. Increases in the concentrations of available iron in response to dietary iron supplementation are associated with changes in crypt cell proliferation in rat large intestine. **J. Nutr.**, v.128, n.2, p.175-179, 1998.
- MARGEN, S.; CHUN, J.Y.; KAUFMANN, N.A.; CALLOWAY, D.H. Studies in calcium metabolism. I. The calciuretic effect of dietary protein. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.27, n.6, p.584-589, 1974.
- MINIHANE, A.M.; FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Effect of calcium supplementation on daily nonheme-iron absorption and long term iron status. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.68, n.1, p.96-102, 1998.
- MONSEN, E.R.; COOK, J.D. Food iron absorption in human subjects. IV. The effects of calcium and phosphate salts on the absorption of nonheme iron. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.29, n.10, p.1142-1148, 1976.
- PANSU, D.; DUFLOS, C.; BELLATON, C.; BRONNER, F. Solubility and intestinal transit time limit calcium absorption in rats. **J. Nutr.**, v.123, n.8, p.1396-1404, 1993.
- POWELL, J.J.; JUGDAOHSINGH, R.; THOMPSON, R.P.H. The regulation of mineral absorption in the gastrointestinal tract. **Proceedings Nutr. Soc.**, v.58, n.1, p.147-153, 1999.
- PRATHER, T.A.; MILLER, D.D. Calcium carbonate depresses iron bioavailability in rats more than calcium sulfate or sodium carbonate. **J. Nutr.**, v.122, n.2, p.327-332, 1992.

- PREZIOSI, P.; PRUAL, A.; GALAN, P.; DAOUDA, H.; BOUREIMA, H.; HERCBERG, S. Effect of iron supplementation on the iron status of pregnant women: consequences for newborns. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.66, n.5, p.1178-1182, 1997.
- RANHOTRA, G.S.; GELROTH, J.A.; TORRENCE, F.A.; BOCK, M.A.; WINTERRINGER, G.L. Bioavailability of iron in iron fortified fluid milk. **J. Food Sci.**, v.46, p.1342-1344, 1981.
- REDDY, M.B.; COOK, J.D. Effect of calcium intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.65, n. , p.1820-1825, 1997.
- SANTOS, M.; WIENK, K.J.H.; SCHILHAM, M.W.; CLEVERS, H.; DE SOUZA, M.; MARX, J.J.M. In vivo mucosal uptake, mucosal transfer and retention of iron in mice. **Lab. animals**, v.31, n.3, p.264-270, 1997.
- SCHULTINK, W.; DILLON, D. Supplementation strategies to alleviate iron deficiency experiences from Indonesia. **Nutr. Res.**, v.18, n.12, p.1943-1952, 1998.
- SHACKELFORD, M.E.; COLLINS, T.F.X.; BLACK, T.N.; AMES, M.J.; DOLAN, S.; SHEIKH, N.S.; CHI, R.K.; O'DONNELL, M.W. Mineral interactions in rats fed AIN-76A diets with excess calcium. **Food Chem. Tox.**, v.32, n.3, p.255-263, 1994.
- SILVA, M.R. **Efeito de uma bebida láctea fermentada e fortificada com ferro no estado nutricional de ferro em pré-escolares**. 2000. 75p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.
- SOKOLL, L.J.; DAWSON-HUGHES, B. Calcium supplementation and plasma ferritin concentrations in premenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.56, p.1045-1048, 1992.
- STEIN, W.D. Facilitated diffusion of calcium across the rat intestinal epithelial cell. **J. Nutr.**, v.122, n.3S, p.651-656, 1992.
- TIDEHAG, P.; SANDBERG, A.S.; HALLMANS, G.; WING, D.; TÜRK, M.; HOLM, S.; GRAHN, E. Effect of milk and fermented milk on iron absorption in ileostomy subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.62, n.6, p.1234-1238, 1995.
- TORRES, M.A.A.; LOBO, N.F.; SATO, K; SOUZA QUEIROZ, S. Fortificação do leite fluído na prevenção e tratamento da anemia carencial ferropriva em crianças menores de 4 anos. **Rev. Saúde Pública**, v.30, n.4, p.350-357, 1996.
- TORRES, M.A.A.; SATO, K; LOBO, N.F.; SOUZA QUEIROZ, S. O leite fortificado no controle da anemia carencial ferropriva, em crianças matriculadas nas creches municipais da Grande São Paulo. **Boletim**, v.16, n.166, p.221-227, 1994.

- VAN DE VIJVER, L.P.L.; KARDINAAL, A.F.M.; CHARZEWESKA, J.; ROTILY, M.; CHARLES, P.; MAGGIOLINI, M.; ANDO, S.; VÄÄMÄMEM, K.; WAJSZCZYK, B.; JEIKKINEN, J.; DELORAINE, A.; SCHAAFSMA, G. Calcium intake is weakly but consistently negatively associated with iron status in girls and women in six European countries. **J. Nutr.**, v.129, n.5, p.963-968, 1999.
- VONK, A.D.; SCHAAFSMA, G.; DEKKER, P.R.; WAARD, H. Relationship between intestinal transit time and iron absorption from milk and yogurt in rats. **Neth. Milk Dairy J.**, n.42, p.147-154, 1988.
- WAUBEN, I.P.M.; ATKINSON, S. A. Calcium does not inhibit iron absorption or alter iron status in infant piglets adapted to a high calcium diet. **J. Nutr.**, v.129, n.3, p.707-711, 1999.
- WHITING, S.J.; WOOD, R.J. Adverse Effects of high-calcium diets in humans. **Nutr. Rev.**, v.55, p.1-9, 1997.
- WOOD, R.J.; HAN, O. Recently identified molecular aspects of intestinal iron absorption. **J. Nutr.**, v.128, n.11, p.1841-1844, 1998.
- WOOD, R. J., ZHENG J. J. High dietary calcium intakes reduce zinc absorption and balance in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.65, n. , p.1803-1809, 1997.

Efeito de Prebiótico (FOS), Probiótico (*Bifidobacterium longum*) e Simbiótico (FOS + *B. longum*) na Biodisponibilidade de Ferro, Histologia Intestinal e Modulação de Alguns Grupos Microbianos em Ratos.

1. Introdução

A deficiência de ferro, uma das patologias mundiais mais comuns, atinge cerca de 2 bilhões de pessoas, principalmente em países em desenvolvimento (STOLTZFUS & DREYFUSS, 1999). No Brasil, a anemia ferropriva se manifesta de forma endêmica com uma prevalência média de 40% da população, afetando principalmente as mulheres em idade fértil, crianças e adolescentes (TORRES & SOUZA-QUEIROZ, 2000). O maior fator causal tem sido considerado a baixa biodisponibilidade do ferro ingerido, predominantemente não hemínico, devido ao tipo de alimentação da população, constituída por arroz, feijão, fubá de milho, derivados do trigo e farinha de mandioca (ANUÁRIO ESTATÍSTICO..., 1992).

A deficiência de ferro pode ter sérias conseqüências à saúde humana, podendo afetar o desenvolvimento mental e motor de crianças (LOZOFF et al., 1991, ANDRACA et al., 1997), pois poderia vir a alterar os padrões de mielinização durante o crescimento e surgimento de conexões cerebrais em bebês (ANDRACA et al., 1997), *performance* física de adultos (ZHU & HASS, 1997) além de alguns estudos *in vitro* relacionarem deficiência de ferro com diminuição da função fagocitária e de células T humanas (WALTER et al., 1997), o que poderia vir a afetar a resposta imunológica.

Em diversos países, inclusive o Brasil, medidas governamentais estão sendo tomadas no sentido de prevenir o surgimento da anemia e,ou, melhorar as reservas de ferro da sua população (BRASIL, 2000). O método mais comum é a fortificação de alimentos básicos como açúcar e farinhas com fontes de ferro (PELLEGRINO et al., 1996; FREIRE, 1997). Embora este método possa trazer benefícios rapidamente, a longo prazo isto poderia implicar em efeitos adversos, uma vez que o organismo não apresenta mecanismos para excretar excesso de ferro (BEARD et al., 1996). A ingestão de excesso de ferro também está sendo relacionada com aumento da incidência de infecções, intoxicação, diminuição na absorção de outros minerais e câncer (HURRELL & COOK, 1990; LUND et al., 1998, REIFEN et al., 2000, SERIL et al., 2002), o que leva à discussão de formas alternativas para aumentar a absorção de ferro, sem necessariamente aumentar sua ingestão, como o uso de prebióticos e,ou, probióticos.

Quando animais ou humanos são suplementados com bactérias produtoras de ácido láctico normalmente ocorre um aumento detectável na contagem do organismo que foi administrado (BERTAZZONI-MINELLI et al., 1996; SPANHAAK et al., 1998; FULLER, 1999), porém os efeitos são transitórios e desaparecem alguns dias após o tratamento ter sido concluído (GILLILAND et al., 1978; BERTAZZONI-MINELLI et al., 1996; BOUHNİK et al., 1996; SPANHAAK et al., 1998), indicando que, embora sobrevivam ao trato gastrointestinal, as estirpes utilizadas não conseguem colonizar o intestino.

As respostas dos diferentes grupos bacterianos à suplementação com probióticos é variável, com um aumento marcante, embora temporário, no número de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias e diminuição de *Enterobacteriaceae* (ALANDER et al., 1999) e *Enterococci* (BENNO et al., 1996), aumento do número de anaeróbios totais, lactobacilos e de bifidobactérias fecais (BERTAZZONI-MINELLI et al., 1996, BENNO et al., 1996). A suplementação com prebiótico, especialmente inulina e oligofrutose, resulta em um aumento na quantidade de bifidobactérias associado ou não com aumento de lactobacilos (MITSUOKA, 1992; ROBERFROID et al., 1998; HAVENAAR et al., 1999), diminuição de bacteróides, *Fusobacterium* e clostrídios (GIBSON, 1999), aumento na concentração cecal de bactérias anaeróbias totais, lactobacilos e bifidobactérias, diminuição no número de enterobactérias, do pH cecal (TANAKA e MATSUMOTO, 1998) e do número de *C. perfringens* (MITSUOKA, 1992, MIZOTA, 1996).

Além de prebióticos e probióticos outras substâncias ingeridas podem vir a ter efeito sobre a microbiota. Pouco se sabe sobre as interações entre as diversas espécies microbianas e os minerais. O ferro, por exemplo, é essencial para o crescimento bacteriano (KOCHAN et al., 1977), mas pode vir a ser tóxico para as células se em grandes quantidades (VONK et al., 1988).

O objetivo desta experimentação foi avaliar o efeito de dietas contendo prebiótico (Raftilose® P95 - FOS), probiótico (*Bifidobacterium longum*) e simbiótico na biodisponibilidade de ferro, na mucosa intestinal murina e na modulação da microbiota cecal e colônica de animais anêmicos.

2. Material e métodos

2.1. Origem e manutenção da cultura probiótica

A cultura de *Bifidobacterium longum*, isolada de *B. longum* ATCC 15707, foi obtida no Banco de Culturas do Laboratório de Culturas Láticas (UFVCC) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, mantida congelada a -70°C em meio TPY (*Trypticase Phytone Yeast extract*) + glicerol 20% (2:1).

2.2. Obtenção do concentrado de células de *Bifidobacterium longum* para administração aos animais.

Para completa ativação, a cultura foi descongelada e repicada três vezes consecutivas em caldo TPY (SCARDOVI, 1986). As ativações foram feitas empregando-se 5% de *inoculum*, segundo-se incubação a 37°C / 24 horas. Após a ativação, foi cultivada em 100 mL de caldo TPY (*Trypticase Phytone Yeast extract*), incubada a 37°C por 24 h, sob condições de anaerobiose, obtida com a utilização de anaerobac (Probac, Brasil) em jarras de anaerobiose. Seguiu-se centrifugação a 2750xg por 15 minutos, a 4°C , em centrífuga Beckman GS-6R. O sobrenadante foi descartado e o concentrado celular ressuspenso em 10 mL de LDR (leite desnatado reconstituído) a 10% estéril. Retirou-se uma alíquota de 1 mL para contagem de células viáveis de bifidobacteria em ágar TPY, seguindo-se plaqueamento “pour-plate” nas diluições 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} , com incubação a 37°C por 48 horas, em anaerobiose. O concentrado celular foi produzido em quantidades suficientes para 5 dias de experimentação, divididos em volumes diários e acondicionados sob refrigeração.

2.3. Biodisponibilidade de ferro

Foram utilizados 104 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*) da linhagem Wistar, recém-desmamados, com peso médio inicial de $91,46\text{g} \pm 13,24\text{g}$. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inox em ambiente com temperatura controlada ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e com ciclo claro-escuro de 12 horas.

A indução da anemia nos ratos seguiu o protocolo da AOAC (1984) modificado, com uma fase de depleção de 21 dias, onde os animais receberam dieta AIN93-G (REEVES et al., 1993) sem ferro *ad libitum* e uma fase de repleção, de 14 dias, onde os animais receberam suas respectivas dietas-teste administradas de forma controlada (15 a 18 g/ dia). O ganho de peso dos animais foi monitorado semanalmente e o consumo alimentar, durante a fase de repleção, diariamente.

O nível de hemoglobina foi quantificado no início do experimento em 8 animais, para obtenção da média basal (tempo 0). Ao final da fase de depleção (tempo 21) e após 14 dias da fase de repleção (tempos 35) foram realizadas novas dosagens. O sangue dos animais foi colhido por incisão na cauda para obtenção de 20 µL de amostra. A divisão dos grupos experimentais (n= 8) foi feito ao final da fase de depleção (tempo 21), de acordo com os níveis de hemoglobina, de forma que a média entre os grupos estivesse o mais próximo possível. A cultura de *B. longum* foi administrada diariamente, via oral, na forma de concentrado celular de 10¹⁰ UFC/mL de leite desnatado reconstituído (LDR) na fase de repleção, em quantidade de 0,1 mL/ rato/ dia, para os grupos probiótico e simbiótico.

Os animais foram sacrificados no 36^o dia por meio de asfixia com CO₂ seguida da incisão da cavidade abdominal para coleta do íleo (6 cm finais do intestino delgado), ceco e cólon ascendente (6 cm a partir do ceco). Foi feita contagem de microbiota de ceco e cólon ascendente de 6 animais de cada grupo experimental e análise histológica do íleo dos animais dos grupos com nível de ferro de 24 mg/kg de dieta e do grupo isento de ferro.

2.3.1. Preparo das dietas experimentais

As dietas experimentais foram preparadas de acordo com a dieta padrão para roedores AIN-93G, segundo REEVES et al. (1993). Esta dieta é indicada para experimentações utilizando-se animais roedores em crescimento.

As dietas testes consistiram de: 1) controle (AIN-93G); 2) Prebiótico (FOS 5%); 3) Probiótico (0,1 mL de concentrado celular – *B. longum* - 10¹⁰ UFC/mL); 4) Simbiótico (FOS 5% + 0,1 mL de concentrado celular – *B. longum* - 10¹⁰ UFC/mL) (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais (g/100g de mistura)

Ingredientes	Dietas*			
	Controle	Prebiótico	Probiótico	Simbiótico
Caseína	20	20	20	20
Amido dextrinizado	13,2	13,2	13,2	13,2
Sacarose*	10,0	5,0	10,0	5,0
Óleo soja	7,0	7,0	7,0	7,0
Fibra (celulose microfina)	5,0	5,0	5,0	5,0
Mistura de Minerais**	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura de Vitaminas	1,0	1,0	1,0	1,0
L-cistina	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido milho	39,75	39,75	39,75	39,75
FOS	0,0	5,0	0,0	5,0
Leite Desnatado Reconstituído***	0,1	0,1	-	-
Concentrado celular ***	-	-	0,1	0,1

Fonte : Adaptado de REEVES et al. (1993)

Controle = Dieta AIN-93G (REEVES et al., 1993)

* o teor de sacarose nas dietas de prebiótico e simbiótico foi reduzido para compensar o acréscimo de FOS a essas dietas.

** Quantidade de ferro variável, segundo a dieta (6, 12 ou 24 mg/Kg)

*** mL/dia/animal

O FOS utilizado na experimentação, da marca Orafti (Raftilose® P95), foi cedido pela sucursal brasileira. O produto contém em sua composição 96,3% de matéria seca, sendo 96,7% oligofrutose (GP2 a GP7) e 3,3% de açúcares (glicose, frutose e sacarose) e valor calórico de 158 Kcal por 100 g.

Todas as dietas foram oferecidas contendo 3 teores de ferro (6; 12 ou 24 mg/kg).

2.3.2. Dosagem do teor de ferro das dietas experimentais.

A determinação de ferro foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica (GBC, mod. 908-AA, Alemanha), utilizando chama de ar/acetileno e $\lambda = 248,33$ nm.

2.3.3. Dosagens sanguíneas

O nível de hemoglobina foi quantificado pelo método colorimétrico da cianometahemoglobina (HiCN), proposto pela AOAC (1984), utilizando o kit para diagnóstico colorimétrico *in vitro* da ANALISA Indústria e Comércio LTDA (Belo

Horizonte – MG). Os 20µL de sangue são misturados a 5 mL de uma solução de cianeto e ferrocianeto de potássio (solução de Drabkin). Nesse método, o íon ferroso (Fe^{+2}) do heme da hemoglobina é oxidado para o estado férrico (Fe^{+3}) pelo cianeto ionizado, formando cianeto de metahemoglobina, cuja concentração é medida a 540 nm em espectrofotômetro (Pharmacia LKB, Novaspec II, USA).

2.4. Análise Histológica.

Fragmentos de aproximadamente 1 cm do íleo distal, do cólon ascendente e o ceco de cada animal foram retirados, lavados com solução salina (0,9% NaCl) estéril e colocados em formol 10%. A retirada do íleo foi padronizada em relação à região final do íleo. O material foi levado para processamento no Laboratório de Anatomia Patológica (PREVENT, Viçosa), onde foram confeccionadas lâminas para avaliação histológica, após a inclusão em parafina, cortes semi-seriados em micrótomo e coloração por hematoxilina-eosina. Cada lâmina continha dois cortes do segmento.

As lâminas foram analisadas para superfície de absorção e comprimento de vilosidade em microscópio óptico Olympus AX 70 com sistema U-PHOTO (Olympus Optical Co., Japão) acoplado a um microcomputador com software Image Pro® Plus para Windows versão 4.1.0.0 (Média Cybernetics, USA), utilizando-se aumento de 10x e zoom 1.

A superfície de absorção foi medida em dois campos (um por corte) de cada segmento e depois foi calculada a média dos valores para cada segmento. O comprimento da vilosidade foi medido em seis campos (3 por corte) de cada segmento, desde a extremidade da vilosidade até a parede mais externa do intestino (muscular da mucosa). A média das 6 leituras, para cada segmento intestinal, foi calculada.

2.5. Avaliação da microbiota intestinal murina, por meio de contagem de anaeróbios totais, aeróbios totais, bifidobactérias e *Escherichia* sp.

Os animais foram sacrificados após 15 dias de administração das dietas testes, devido a problemas de operacionalidade e tempo. O ceco de cada animal foi pesado, antes da retirada do conteúdo.

A análise microbiológica do conteúdo intestinal do ceco e cólon ascendente foi realizada apenas de amostras de 6 animais de cada grupo, devido a restrições de material, ambiente físico e tempo. O conteúdo intestinal (1 ou 0,1 g) de cada segmento foi adicionado em 9 ou 9,9 mL de água peptonada reduzida estéril (Peptona 1 g, NaCl 8g, Tween 80 1g, L-cisteína HCl.H₂O 0,5 g; glicerol 10 g; água destilada 1000 mL). As amostras diluídas foram imediatamente congeladas (-70°C) para posterior análise microbiológica.

Foram realizadas contagens dos seguintes grupos bacterianos, de cada amostra:

- Bactérias anaeróbicas totais: Ágar BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO 37-17-8) com adição de 5% de sangue de carneiro desfibrinado no momento de preparo das placas com meio sólido;
- Bactérias aeróbicas ou aeróbicas facultativas totais: Ágar BHI (DIFCO 37-17-8) sem adição de sangue;
- *Escherichia* sp.: Ágar Mac Conkey Sorbitol (DIFCO 79-17-7)
- *Bifidobacterium* spp.: Ágar RB (Rafinose-*Bifidobacterium*), de acordo com HARTEMINK et al. (1996).

As amostras foram submetidas a diluições decimais em água de diluição reduzida (KH₂PO₄ 4,5g; Na₂HPO₄ 6g; L-cisteína HCl.H₂O 0,5g; Tween 80 0,5; água destilada 1000 mL) e uma alíquota de 0,1 mL da diluição apropriada foi plaqueada à superfície dos meios de cultura. As placas invertidas foram incubadas a 37° C em aerobiose (*Escherichia* sp. e aeróbios totais) ou anaerobiose (anaeróbios totais e bifidobactérias), em câmara de anaerobiose (Anaerobic workstation, mod.Bug Box-SG, marca Jouan, fabr. Rouskinn Technology Ltda., UK) por um período de 24 a 48 h e 72 a 96 h, respectivamente.

2.6. Análises estatísticas

O experimento de biodisponibilidade de ferro foi montado segundo um esquema fatorial 4x3, sendo 4 tratamentos (controle, prebiótico, probióticos e simbiótico) e 3 níveis de ferro (6, 12 e 24 mg de ferro/Kg de dieta) no delineamento inteiramente casualizado, com 8 repetições, totalizando 96 animais. Procedeu-se à análise de variância e regressão dos dados. Para o fator qualitativo (tipo de dieta) as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey, adotando-se um nível de 5% de probabilidade. Para o fator quantitativo (nível de ferro) os modelos foram escolhidos baseados na significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o teste F (VIEIRA & HOFFMANN, 1989) e

adotando um nível de até 10% de probabilidade, no coeficiente de determinação e nos fenômenos biológicos em estudo (hemoglobina, ganho de hemoglobina e ganho de peso). Optou-se pelo desdobramento da interação, independente de ser ou não significativa.

Os cortes histológicos de íleo foram avaliados para superfície de absorção e comprimento de vilosidade, em um delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos (4 dietas com nível de ferro de 24 mg/kg e uma dieta isenta de ferro). As médias dos tratamentos foram comparadas entre si pelo teste de Tukey e o grupo isento de ferro foi comparado versus os tratamentos pelo teste de Dunnett.

A análise do peso do ceco e o ensaio microbiológico foram montados em um esquema fatorial 4x3 (4 dietas, 3 níveis de ferro) no delineamento inteiramente casualizado, com 8 repetições (para peso de ceco) e 6 repetições (microbiologia). Procedeu-se à análise de variância e regressão dos dados. Para o fator qualitativo (tipo de dieta) as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey adotando-se um nível de 5% de probabilidade. Para o fator quantitativo (nível de ferro) os modelos foram escolhidos baseados na significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o teste F e adotando um nível de até 10% de probabilidade, no coeficiente de determinação e na alteração dos grupos bacterianos do ceco e cólon ascendente. Em ambos experimentos optou-se pelo desdobramento da interação, independente de ser ou não significativa.

As avaliações foram efetuadas utilizando-se o software SAEG (Sistema de Análise Estatística, Universidade Federal de Viçosa).

3. Resultados

3.1. Ganho de peso dos animais

Os dados relativos ao ganho de peso dos animais estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Ganho de peso (g) de ratos alimentados com FOS, *B. longum* ou simbiótico e 3 níveis de ferro (6, 12 e 24 mg/kg) ao final do período de 14 dias de repleção.

Dieta/ teor de ferro	6 mg FeSO ₄ /kg	12 mg FeSO ₄ /kg	24 mg FeSO ₄ /kg
(1) Controle	149,12	158,25	145,88
(2) <i>B. longum</i>	148,62	145,50	154,00
(3) FOS (Raftilose® P95)	141,75	163,00	144,50
(4) Simbiótico*	146,00	138,00	154,88

* FOS + *B. longum*

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as dietas para o ganho de peso dos diferentes grupos experimentais.

3.2. Nível de hemoglobina e Ganho de hemoglobina

Os níveis de hemoglobina no início e fim do período de repleção, bem como o ganho de hemoglobina são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Ganho de hemoglobina em ratos após os 14 dias da fase de repleção, consumindo dietas com 6, 12 e 24 mg de ferro/ kg de dieta contendo prebiótico, probiótico ou simbiótico.

Grupos Experimentais	hemoglobina (g/dL)	Hemoglobina (g/dL)*	Ganho de hemoglobina* g/dL
	Tempo 0 (dia 21)	Tempo 14 (dia 35)	
Controle – 6 ppm FeSO ₄	9,20	9,81	0,61
<i>B. longum</i> – 6 ppm FeSO ₄	8,79	10,56	1,77
FOS – 6 ppm FeSO ₄	8,92	11,16	2,24
Simbiótico – 6 ppm FeSO ₄	8,65	10,34	1,69
Controle – 12 ppm FeSO ₄	9,03	11,59	2,56
<i>B. longum</i> – 12 ppm FeSO ₄	8,63	11,43	2,80
FOS – 12 ppm FeSO ₄	8,89	11,74	2,85
Simbiótico – 12 ppm FeSO ₄	8,73	11,82	3,09
Controle – 24 ppm FeSO ₄	8,98	12,88	3,90
<i>B. longum</i> – 24 ppm FeSO ₄	8,70	13,54	4,84
FOS – 24 ppm FeSO ₄	8,83	12,33	3,50
Simbiótico – 24 ppm FeSO ₄	8,68	13,32	4,64

* Não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, para um mesmo período de tempo e nível de ferro, segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

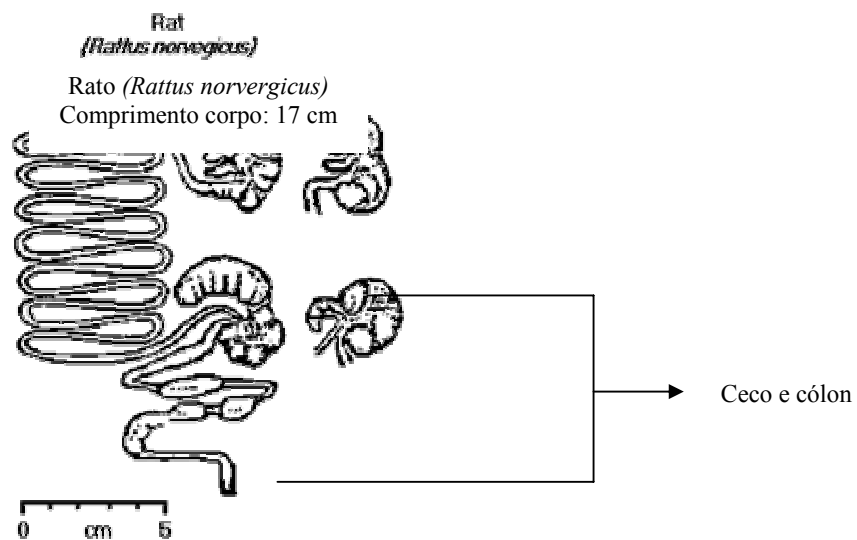
Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$) e verificou-se que nenhum dos tratamentos utilizados conseguiu recuperar a anemia dos animais (níveis de hemoglobina basais iniciais de 14,80 g/dL).

Os resultados encontrados nesta fase experimental não estão de acordo com SAKAI et al. (2000a,b), os quais, trabalhando com ratos gastrectomizados, verificaram que a incorporação de FOS, em níveis de 7,5%, evitou o aparecimento de anemia nos animais. No entanto, além dos níveis de FOS utilizados terem sido maiores, a gastrectomia é um procedimento cirúrgico que afeta posteriormente a absorção de ferro e os resultados positivos no aumento de biodisponibilidade de ferro encontrada resultou da comparação entre os animais submetidos ou não à gastrectomia (SAKAI et al., 2000a,b). A anemia derivada da gastrectomia baseia-se na diminuição da absorção duodenal de ferro por meio de alteração no pH do quimo, que não chega acidificado ao intestino delgado. A absorção de ferro fica restrita ao ceco e cólon dos animais, onde ocorre a ação do FOS. No entanto,

em um indivíduo normal, a absorção pela via transcelular no intestino delgado é a forma predominante de absorção de ferro.

As bifidobactérias são habitantes normais do ceco e cólon (Figura 1), locais onde a via predominante de absorção de ferro e outros minerais é passiva. Os possíveis mecanismos envolvidos no aumento da absorção de minerais quando há suplementação com bifidobactérias e, ou, prebióticos relacionam-se com aumento de ferro solúvel ou complexação de ferro facilitando a sua absorção, como produção de ácidos orgânicos, diminuição do pH intestinal e aumento na fração de ferro solúvel, devido à solubilização de ferro previamente complexado (VONK et al., 1988), formação de complexos como acetato e lactato de ferro mais facilmente absorvidos (OHTA et al., 1994, OHTA et al., 1995b) e aumento da superfície de absorção. DERMAN et al. (1980) mostraram que embora a acidificação do lúmen intestinal seja importante, a formação de lactato de ferro também pode vir a influenciar a absorção de ferro.

Figura 1 – modelo de intestino de rato e locais principais de colonização por bifidobactérias.



Fonte: Comparative Anatomy of the Digestive Tract

(http://ourworld.compuserve.com/homepages/gr_frank/dig_anat.htm)

Por outro lado em animais anêmicos, há um aumento na absorção, principalmente no intestino delgado, do ferro ingerido em um mecanismo de resposta objetivando recuperar as reservas orgânicas (BEARD et al., 1996). A fonte de ferro utilizada nesta experimentação foi sulfato ferroso, sal orgânico que apresenta boa biodisponibilidade, permitindo rápida recuperação da anemia, quando incorporado em níveis de 24 mg/kg,

correspondente a 100% da recomendação nutricional para ratos, segundo REEVES et al. (1993). Sugere-se a utilização de outras fontes alimentares de ferro, de baixa biodisponibilidade, para verificar se a incorporação de prebiótico e,ou, probiótico poderiam aumentar sua absorção.

O efeito dos diferentes níveis de ferro nas dietas sobre o valor final de hemoglobina e ganho de hemoglobina está indicado na Tabela 4.

Tabela 4 – Equações ajustadas do nível de hemoglobina (HB - g/dL) e ganho de hemoglobina (GHB - g/dL), em função dos níveis de ferro (mg/kg dieta) de ratos suplementados com FOS, *B. longum* ou simbiótico.

Dieta	Variável	Equações Ajustadas	r ²
1	HB	D ₁ = $\hat{y} = 9,16312 + 0,161492^{**} \text{Fe}$	0,9233
2		D ₂ = $\hat{y} = 9,500 + 0,167321^{**} \text{Fe}$	0,9981
3		D ₃ = $\hat{y} = 10,8675 + 0,0627083^{***} \text{Fe}$	0,9672
4		D ₄ = $\hat{y} = 9,59438 + 0,159449^{**} \text{Fe}$	0,9660
Comum	HB	D = $\hat{y} = 9,78125 + 0,137768^{**} \text{Fe}$	0,9790
1	GHB	D ₁ = $\hat{y} = - 0,0578811 + 0,172443^{**} \text{Fe}$	0,9137
2		D ₂ = $\hat{y} = 0,740380 + 0,171039^{**} \text{Fe}$	0,9999
3		D ₃ = $\hat{y} = 1,9135 + 0,0677306^{***} \text{Fe}$	0,9716
4		D ₄ = $\hat{y} = 0,917806 + 0,158874^{**} \text{Fe}$	0,9744
Comum	GHB	D = $\hat{y} = 0,878452 + 0,142522^{**} \text{Fe}$	0,9753

D₁ = Dieta controle (AIN-93G); D₂= dieta com probiótico (controle + *Bifidobacterium longum*); D₃ = dieta com prebiótico (controle + Raftilose® P95); D₄ = dieta com simbiótico (controle + *B. longum* + Raftilose® P95)

** 1% de significância pelo teste de F

*** 10% de significância pelo teste de F

As equações comuns para os dois parâmetros indicam que a inclinação (β) das retas obtidas com as diferentes dietas, relativas ao efeito do nível de ferro nos níveis finais de hemoglobina e ganho de hemoglobina, são semelhantes, pela identidade dos modelos. Estas equações indicam que ambos parâmetros (HB e GHB) dependem do nível de ferro encontrado na dieta, independente da presença ou não de pré e,ou, probiótico.

3.3. Superfície de absorção e comprimento das vilosidades do íleo

As medidas de superfície de absorção (μm) e comprimento das vilosidades (μm) dos animais alimentados com pré-, pró ou simbiótico e dietas contendo 24 mg de ferro/kg de dieta, analisadas pelo teste de Tukey e Dunnett estão indicadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Superfície de absorção (μm) e comprimento de vilosidades (μm) da porção terminal do íleo de ratos alimentados com alimentados com FOS, *B. longum* ou simbiótico e 24 mg de ferro/kg de dieta.

Dietas	Superfície absorção (μm) [*]	Comprimento das Vilosidades (μm) [*]
(1) Controle	651,8474 ^{a ns}	52,51490 ^{a ns}
(2) Probiótico	619,7843 ^{a ns}	49,01394 ^{a ns}
(3) Prebiótico	552,0013 ^{a ns}	43,89422 ^{a ns}
(4) Simbiótico	585,2956 ^{a ns}	49,10988 ^{a ns}
Dieta isenta de ferro	635,69101 ^a	55,22131 ^a

* Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

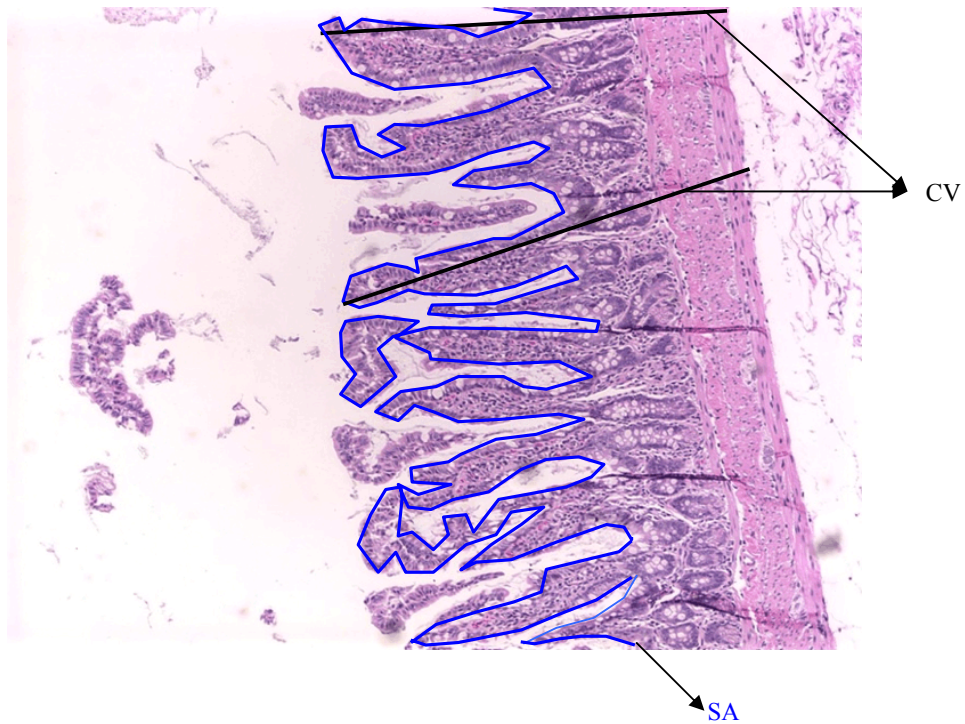
ns= não significativo, pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade, entre os tratamentos e o grupo testemunha (dieta isenta de ferro).

Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre superfície de absorção (μm) dos diferentes grupos experimentais, com dieta de 24 mg de ferro/kg de dieta nem no comprimento das vilosidades (μm). Tampouco foi verificada diferença entre as medidas de superfície absorção (μm) e comprimento das vilosidade (μm) entre o grupo testemunha e os outros grupos experimentais. Os resultados encontrados estavam de acordo com o esperado, visto que os prebióticos são fermentados no ceco e cólon, locais onde as bifidobactérias são normalmente encontradas, e não apresentem influência no íleo. O fato do tempo de permanência do alimento no íleo ser curto - 45 min (DUFLOS et al., 1995) sem grandes retenções, também diminui a probabilidade de alterações na porção terminal do íleo.

Conforme citado anteriormente, o sítio principal para atuação de bifidobactérias e também fermentação de FOS é o cólon, onde trabalhos anteriores indicam a alteração na superfície de absorção, com diminuição do número de criptas aberrantes (GALLAHER et al., 1996), aumento do peso das mucosas cecal e coloretal de animais suplementados com FOS (CAMPBELL et al., 1997, OHTA et al., 1998a,b) ou hipertrofia da parede celular em ratos suplementados com amido resistente (YOUNES et al., 1996). No entanto nesta experimentação não foi possível a avaliação desses segmentos intestinais (ceco e cólon) pois a coleta de material para contagem microbiana resultou em manipulação que alterou a parede intestinal.

A Foto 1 indica como foram realizadas as medidas de superfície de absorção e comprimento de vilosidade dos cortes histológicos.

Foto 1 – Fragmento de íleo de rato. Indicação de medidas de superfície de absorção (SA) e comprimento de vilosidade (CV)



A análise da superfície de absorção e da comprimento das vilosidades das mesmas regiões dos animais que receberam dietas contendo 6 e 12 mg de ferro/kg de dieta não foi realizada devido à ausência dos resultados significativos ($p > 0,05$) entre as dietas com nível máximo de ferro e a dieta isenta de ferro (Tabela 5).

3.4. Peso do ceco

A Tabela 6 indica os valores do peso do ceco dos animais alimentados com dietas contendo FOS, *B. longum* ou simbiótico e 6, 12 e 24 mg de ferro/kg de dieta.

Tabela 6 – Peso do ceco (g) de ratos alimentados com dieta contendo FOS, *B. longum* ou simbiótico com 6, 12 e 24 mg de ferro/kg de dieta.

Dieta/Ferro	6 mg/Kg	12 mg/Kg	24 mg/Kg
(1) Controle	2,776 ^b	2,508 ^b	2,592 ^b
(2) Probiótico	2,945 ^b	2,536 ^b	2,350 ^b
(3) Prebiótico	4,929 ^a	4,522 ^a	4,985 ^a
(4) Simbiótico	5,541 ^a	4,590 ^a	4,992 ^a

Dieta controle = AIN-93G; Probiótico = *B. longum*; Prebiótico = FOS; simbiótico = *B. longum* + FOS

* Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O peso do ceco dos animais submetidos a dietas contendo prebiótico foi maior ($p < 0,05$), quando comparado com os dos animais alimentados com dieta controle e probiótico (Tabela 6). Este resultado era esperado, pois ao alcançar o ceco, onde é metabolizado pelos microrganismos, FOS aumenta o peso do órgão. Este aumento seria devido ao aumento do peso das mucosas cecal e coloretal (OHTA et al., 1998a,b), resultando em maior peso da parede cecal (CAMPBELL et al. 1997, LE BLAY et al., 1999) devido a uma hipertrofia da parede celular (YOUNES et al., 1996). O efeito de carboidratos complexos na hipertrofia cecal tende a ser proporcional à sua fermentação (YOUNES et al., 1996), com produção de metabólitos que estimulem a proliferação celular e não ao simples acúmulo de substratos no ceco.

A Tabela 7 indica as equações ajustadas para efeito do nível de ferro sobre o peso do ceco nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 7 – Equações ajustadas do peso do ceco (g) em função do nível de ferro (mg/kg dieta) de ratos suplementados FOS, *B. longum* ou simbiótico.

Dieta	Equações Ajustadas	R ²
1. Controle	$D_1 = \hat{y} = 2,26254$	
2. Probiótico	$D_2 = \hat{y} = 3.03813 - 0,0305506^{***}Fe$	0,8464
3. Prebiótico	$D_3 = \hat{y} = 4,8121$	
4. Simbiótico	$D_4 = \hat{y} = 5,0413$	

D_1 = Dieta controle (AIN-93G); D_2 = dieta com probiótico (*Bifidobacterium longum*); D_3 = dieta com prebiótico (Raftilose® P95); D_4 = dieta com simbiótico (*B. longum* + Raftilose® P95)

*** 10% de significância pelo teste de F

A dieta 2, suplementada com probiótico foi a única onde se verificou correlação entre o nível de ferro e o peso do ceco ($p < 0,10$). A equação ajustada indica uma diminuição no peso do ceco com o aumento do teor de ferro da dieta (Tabela 7). Esse decréscimo poderia ser explicada por uma estimulação do probiótico por maiores teores de ferro, refletindo em uma maior ação de antibiose com relação a grupos bacterianos específico, diminuição da produção de ácidos graxos responsáveis por um aumento do peso da mucosa cecal (grupos produtores de butirato, por exemplo) ou utilização de componentes do meio com diminuição da concentração de nutrientes osmóticos; ou maiores teores de ferro, juntamente com a presença de probiótico pode exercer um efeito tóxico sobre alguns grupos microbianos e alteração do peso do ceco, por maior ou menor produção de ácidos orgânicos (como butirato), que estimulam a proliferação celular (TOOPING, 1996) ou incremento/ diminuição na quantidade de material indigerível presente no conteúdo fecal.

A presença de FOS, fibra não digerível pelo organismo animal, representa aumento do volume de material que consegue chegar ao ceco. Com a fermentação bacteriana há um aumento também da água no lúmen intestinal, para diluição do conteúdo e manutenção da pressão osmótica. Alguns experimentos mostram que a fermentação de frutooligosacarídeos resulta em maior peso da parede cecal e do seu conteúdo (LE BLAY et al., 1999) e, conseqüentemente, do ceco provavelmente devido à proliferação celular como resultado da ação de ácidos orgânicos, especialmente butirato (TOOPING, 1996).

3.5. Efeito sobre a microbiota intestinal murina

As contagens de bactérias bífidas, anaeróbios totais, coliformes e aeróbios totais do ceco e cólon dos animais experimentais estão indicados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 – Concentração bacteriana cecal - bifidobactérias e anaeróbios totais - (Log UFC/g de fezes) de ratos alimentados com dieta controle, suplementada com probiótico, prebiótico ou simbiótico, contendo 6, 12 e 24 mg de ferro/kg de dieta.

Dieta/ferro (mg/Kg)	Bifidobactérias (Log UFC/g conteúdo)*			Anaeróbios Totais (Log UFC/g conteúdo)*		
	6	12	24	6	12	24
(1) Controle	7,72 ^a	7,48 ^a	7,64 ^{ab}	8,74 ^a	8,59 ^a	8,64 ^a
(2) Probiótico	7,35 ^{ab}	7,64 ^a	7,99 ^a	8,03 ^{ab}	8,26 ^{ab}	8,57 ^a
(3) Prebiótico	7,21 ^{ab}	6,42 ^b	7,14 ^{ab}	8,19 ^{ab}	7,68 ^b	8,39 ^a
(4) Simbiótico	6,57 ^b	7,20 ^{ab}	6,95 ^b	7,61 ^b	8,03 ^{ab}	8,45 ^a

D₁ = Dieta controle (AIN-93G); D₂= dieta com probiótico (*Bifidobacterium longum*); D₃ = dieta com prebiótico (Raftilose® P95); D₄ = dieta com simbiótico (*B. longum* + Raftilose® P95)

* Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 9 – Concentração bacteriana cecal – aeróbios totais e coliformes - (Log UFC/g de fezes) de ratos alimentados com dieta controle, suplementada com probiótico, prebiótico ou simbiótico, contendo 6, 12 e 24 mg de ferro/kg de dieta.

Dieta/ferro (mg/Kg)	Coliformes (Log UFC/g conteúdo)*			Aeróbios Totais (Log UFC/g conteúdo)*		
	6	12	24	6	12	24
(1) Controle	4,35 ^a	3,82 ^a	2,73 ^a	8,21 ^a	7,89 ^a	8,19 ^a
(2) Probiótico	3,82 ^a	3,05 ^a	3,54 ^a	7,74 ^{ab}	7,78 ^a	8,30 ^a
(3) Prebiótico	3,16 ^{ab}	2,71 ^a	2,48 ^a	7,54 ^{ab}	6,55 ^b	7,12 ^a
(4) Simbiótico	2,69 ^b	3,06 ^a	2,70 ^a	6,99 ^b	7,72 ^a	7,40 ^a

D₁ = Dieta controle (AIN-93G); D₂= dieta com probiótico (*Bifidobacterium longum*); D₃ = dieta com prebiótico (Raftilose® P95); D₄ = dieta com simbiótico (*B. longum* + Raftilose® P95)

* Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados observados indicam similaridade ($p > 0,05$) nas concentrações dos grupos bacterianos avaliados em todos os níveis de ferro, para as dietas controle e com probiótico. A incorporação de prebiótico resultou em efeito diferenciado, dependendo do nível de ferro da dieta, com decréscimo da contagem de bifidobactérias, aeróbios totais e anaeróbios totais ($p < 0,05$) nas dietas com 12 mg ferro/Kg, enquanto a suplementação com simbiótico resultou em decréscimo das concentrações de todos os grupos avaliados apenas

na dieta contendo 6 mg Fe/Kg. Os dados referentes à suplementação com FOS e simbiótico não concordam com o esperado e o encontrado na literatura (GIBSON et al., 1995, BOUHNİK et al., 1996, DJOUZI & ANDRIEUX, 1997, ALANDER et al., 1999, GIBSON, 1999) – aumento de bifidobactérias com a utilização de prebiótico.

Os animais que foram alimentados com Raftilose[®] P95 (FOS) apresentaram diarreia. A escolha da proporção de FOS na dieta (5%) baseou-se em dados de literatura (OHTA et al., 1995a,b, OHTA et al., 1998a,b, MOROHASHI et al., 1998, TESHIMA, 2001). A alteração do nível de FOS de 5% para 3% (uma semana após o início da fase de repleção) diminuiu mas não foi suficiente para eliminar a diarreia, que pode ser resultante da adição de FOS em um efeito sinérgico ou não ao aumento do teor de ferro na dieta. Esta diarreia pode ter influenciado nos resultados observados das concentrações bacterianas.

Efeitos intestinais adversos, que incluem flatulência, dor abdominal, cólica e burburismo também foram notados em humanos. A ingestão diária de 10g de FOS, por seres humanos, apresenta efeitos bifidogênicos, sem levar aos problemas colaterais verificados com doses superiores (15g/dias) (BOUHNİK et al., 1999). Embora os pesquisadores não tenham fornecido o peso médio dos indivíduos analisados, tomando-se como base 65kg, ter-se-ia uma dose de 15,3 mg FOS/100g peso corporal.

Se esta também for a dose adequada ao animal, os ratos, que começaram a receber FOS com peso médio de 200g, deveriam ingerir diariamente 30,6 mg de FOS. O consumo diário mínimo foi de 15g de dieta a uma proporção de 5%, o que significa uma ingestão diária de 750 mg de FOS, muito acima do valor calculado. Mesmo com uma diminuição da proporção de FOS para 3%, o consumo diário ainda permaneceu elevado (450 mg FOS).

As contagens de bactérias bífidas, anaeróbios totais, coliformes e aeróbios totais do cólon dos animais experimentais estão indicados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 – Concentração bacteriana colônica - bifidobactérias e anaeróbios totais - (Log UFC/g de fezes) de ratos alimentados dieta controle, suplementada com probiótico, prebiótico ou simbiótico, contendo 6, 12 e 24 mg de ferro/kg de dieta.

Dieta/ferro (mg/Kg)	Bifidobactérias (Log UFC/g conteúdo) *			Anaeróbios Totais (Log UFC/g conteúdo) *		
	6	12	24	6	12	24
(1) Controle	8,24 ^a	7,70 ^a	8,04 ^a	8,75 ^a	8,60 ^{ab}	8,96 ^{ab}
(2) Probiótico	7,64 ^a	7,89 ^a	8,24 ^a	8,42 ^a	8,68 ^{ab}	9,05 ^a
(3) Prebiótico	7,91 ^a	6,81 ^b	7,61 ^a	8,81 ^a	8,23 ^b	8,71 ^{ab}
(4) Simbiótico	7,82 ^a	8,09 ^a	7,73 ^a	8,85 ^a	8,97 ^a	8,42 ^b

D₁ = Dieta controle (AIN-93G); D₂= dieta com probiótico (*Bifidobacterium longum*); D₃ = dieta com prebiótico (Raftilose® P95); D₄ = dieta com simbiótico (*B. longum* + Raftilose® P95)

* Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 11 – Concentração bacteriana colônica – aeróbios totais e coliformes - (Log UFC/g de fezes) de ratos alimentados com dieta controle, suplementada com probiótico, prebiótico ou simbiótico, contendo 6, 12 e 24 mg de ferro/kg de dieta.

Dieta/ferro (mg/Kg)	Coliformes (Log UFC/g conteúdo) *			Aeróbios Totais (Log UFC/g conteúdo) *		
	6	12	24	6	12	24
(1) Controle	4,81 ^{ab}	4,93 ^a	4,11 ^a	8,39 ^a	8,10 ^a	8,47 ^{ab}
(2) Probiótico	4,24 ^b	4,70 ^a	4,90 ^a	8,32 ^a	8,36 ^a	8,77 ^a
(3) Prebiótico	5,94 ^a	4,41 ^a	4,32 ^a	8,49 ^a	6,73 ^b	7,85 ^b
(4) Simbiótico	5,23 ^{ab}	4,90 ^a	4,08 ^a	7,85 ^a	8,43 ^a	7,89 ^b

D₁ = Dieta controle (AIN-93G); D₂= dieta com probiótico (*Bifidobacterium longum*); D₃ = dieta com prebiótico (Raftilose® P95); D₄ = dieta com simbiótico (*B. longum* + Raftilose® P95)

* Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados indicam que a incorporação de FOS à dieta não influenciou na população de bifidobactérias colônicas, exceto nas dieta com 12 mg de ferro/kg de dieta, onde também se verifica uma diminuição de todos os grupos avaliados, exceto coliformes. A suplementação com prebiótico também resultou em diminuição da concentração de aeróbios totais (p<0,05) na dieta contendo 24 mg Fe/kg.

O dado mais significativo se refere ao aumento ($p < 0,05$) da contagem de coliformes colônicos em dietas contendo FOS e baixo teor de ferro, indicando que este grupo pode estar sendo estimulado, seja pelo FOS ou por metabólitos resultantes da fermentação cecal do substrato.

Os resultados encontrados, com relação ao efeito de prébióticos sobre microbiota intestinal, são inconclusivos. Os dados obtidos com a contagem microbiana, associados ao aparecimento de diarreia, provavelmente osmótica, indicam a necessidade de se trabalhar com a contagem microbiana por grama de peso seco, implicando na utilização de um número maior de animais por grupo experimentais (parte para contagem e parte para a determinação da quantidade de água presente nas fezes).

Os trabalhos científicos consultados (OHTA et al., 1995a,b, OHTA et al., 1998b, TESHIMA, 2001), que utilizam 5% de prebiótico para ratos e serviram como base para a decisão de se utilizar esta proporção no experimento, foram realizados com frutooligosacarídeos de outras marcas, indicando a possibilidade de diferentes efeitos dependendo da forma de obtenção e processamento do FOS e a necessidade de ajuste no nível de utilização de cada substrato de modo a evitar efeitos fisiológicos adversos, como a diarreia observada.

Observa-se que nas dietas suplementadas com probiótico (*Bifidobacterium longum*) as contagens microbianas são semelhantes às encontradas nos animais com dieta controle ($p > 0,05$), (Tabelas 9 e 11) condizendo com os resultados encontrados por outros autores (GALLAHER et al, 1996, AMANN et al., 1998), os quais indicam que a suplementação de bifidobactéria não altera significativamente a população bacteriana em indivíduos com a microbiota entérica estável. Nestes indivíduos, o equilíbrio populacional foi alcançado, e para que haja alterações significativas é necessária alteração dos níveis populacionais o que normalmente ocorre por fatores externos como antibióticos, toxiinfecção ou ingestão de bactérias patogênicas.

Verifica-se que, em dietas com baixo teor de ferro (6 mg/kg), a suplementação com prebiótico resulta em aumento ($p < 0,05$) da concentração de coliformes colônicos quando comparada com a dieta suplementada com probiótico (Tabela 11) indicando um possível efeito antagônico da cultura e, ou, que a incorporação de FOS estimularia o grupo dos coliformes, compensando um possível efeito negativo exercido por *B. longum*.

O nível de ferro influencia de forma diferenciada ($p < 0,01$ ou $p < 0,05$) os grupos bacterianos, de acordo com as dietas utilizadas (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12 –Equações ajustadas da concentração dos diferentes grupos bacterianos cecais (Log UFC/g de conteúdo) em função do nível de ferro (mg/kg dieta) de ratos suplementados com dietas controle, suplementada com probiótico, prebiótico ou simbiótico.

Dieta	Variável	Equações Ajustadas	r ²
1	Bifidobactérias Cecais	D ₁ = \hat{y} = 7,612	
2		D ₂ = \hat{y} = 7,6596	
3		D ₃ = \hat{y} = 36,9244	
4		D ₄ = \hat{y} = 6,9067	
1	Anaeróbios Totais Cecais	D ₁ = \hat{y} = 8,6589	0,9663
2		D ₂ = \hat{y} = 8,2841	
3		D ₃ = \hat{y} = 8,0856	
4		D ₄ = \hat{y} = 7,40368 + 0,0446543*Fe	
1	Aeróbios Totais Cecais	D ₁ = \hat{y} = 8,0968	
2		D ₂ = \hat{y} = 8,006	
3		D ₃ = \hat{y} = 7,0708	
4		D ₄ = \hat{y} = 7,3720	
1	Coliformes Cecais	D ₁ = \hat{y} = 4,91876 – 0,0913103**Fe	0,9999
2		D ₂ = \hat{y} = 3,4694	
3		D ₃ = \hat{y} = 2,7795	
4		D ₄ = \hat{y} = 2,8125	

D₁ = Dieta controle (AIN-93G); D₂= dieta com probiótico (*Bifidobacterium longum*); D₃ = dieta com prebiótico (Raftilose® P95); D₄ = dieta com simbiótico (*B. longum* + Raftilose® P95)

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de F.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F.

Tabela 13 – Equações ajustadas para nível de ferro (mg/kg dieta) e efeito na concentração dos diferentes grupos bacterianos colônicos (Log UFC/g de conteúdo) de ratos suplementados com dietas controle, suplementada com probiótico, prebiótico ou simbiótico.

Dieta	Variável	Equações Ajustadas	r ²
1	Bifidobactérias	D ₁ = \hat{y} = 7,9902	
2	Cólon	D ₂ = \hat{y} = 7,9205	
3		D ₃ = \hat{y} = 10,0118 – 0,433714**Fe + 0,0138937**Fe ²	1,0000
4		D ₄ = \hat{y} = 7,8827	
1	Anaeróbios	D ₁ = \hat{y} = 8,766	
2	Totais	D ₂ = \hat{y} = 8,7158	
3	Cólon	D ₃ = \hat{y} = 8,5841	
4		D ₄ = \hat{y} = 9,1304 – 0,0272012*Fe	0,7335
1	Aeróbios	D ₁ = \hat{y} = 8,3209	
2	Totais	D ₂ = \hat{y} = 8,4796	
3	Cólon	D ₃ = \hat{y} = 11,7804 – 0,677442**Fe + 0,0214008**Fe ²	1,0000
4		D ₄ = \hat{y} = 8,0560	
1	Coliformes	D ₁ = \hat{y} = 4,6184	
2	Cólon	D ₂ = \hat{y} = 4,6116	
3		D ₃ = \hat{y} = 8,46846 – 0,504209*Fe + 0,0138053*Fe ²	1,0000
4		D ₄ = \hat{y} = 4,7345	

D₁ = Dieta controle (AIN-93G); D₂= dieta com probiótico (*Bifidobacterium longum*); D₃ = dieta com prebiótico (Raftilose® P95); D₄ = dieta com simbiótico (*B. longum* + Raftilose® P95)

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de F.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F.

Na dieta controle (Tabela 12) há uma diminuição da concentração de coliformes cecais (p<0,01) com o aumento do nível de ferro, enquanto os outros grupos não seriam influenciados por esta variável. Na dieta contendo simbiótico, ocorre um aumento significativo da quantidade de anaeróbios totais cecais (p<0,05) com o aumento do nível de ferro (Tabela 12), enquanto as equações quadráticas indicam que o aumento do nível de ferro na presença de prebiótico exerce inicialmente um efeito inibidor sobre bifidobactérias (p<0,01), anaeróbios totais (p<0,01) e coliformes (p<0,05) do cólon (Tabela 13). Os valores de 15,61, 15,83 e 18,26 mg de ferro/kg de dieta representam, respectivamente, os pontos mínimos das curvas. A partir destes valores, verificar-se-ia um aumento das populações, retornando a níveis semelhantes aos encontrados nos animais controle. O aumento do nível de ferro representaria mais ferro solubilizado no meio. Os dados indicam a possibilidade da existência de dois grupos bacterianos (espécies) diferentes: um

estimulado por baixas concentrações de ferro e para os quais altas concentrações poderiam vir a ser tóxicas e outro que necessita de um nível mínimo para o seu crescimento. Os pontos mínimos representariam o intervalo entre o decréscimo do primeiro grupo e o início de estímulo do segundo. Outra hipótese é que níveis intermediários de ferro são insuficientes para estimular mecanismos de utilização de ferro do meio, como secreção de sideróforos (substâncias que se ligam ao ferro do ambiente, indisponibilizando-o para outros grupos de microorganismos que não os secretores), que ocorre em meios com baixo conteúdo de ferro (KOT & BEZKOROVAINY, 1993, KOT et al., 1995).

Na dieta contendo simbiótico observa-se uma diminuição da concentração de anaeróbios totais ($p < 0,05$) com o aumento do nível de ferro (Tabela 12), indicando um possível efeito tóxico deste mineral sobre esses microrganismos.

Os dados obtidos sugerem que a concentração de coliformes está sendo afetada pela concentração de ferro, especialmente no ambiente cecal, diminuindo com o aumento deste mineral. A ação do ferro não é observada quando ocorre incorporação de probióticos e, ou, FOS, indicando uma alteração no meio de crescimento ou nas interações populacionais que favoreçam a manutenção da população de coliformes.

A importância da presença de ferro para o crescimento de bactérias e potencial colonização de nichos ecológicos, principalmente nos gram-negativos, é evidenciada pela utilização de sideróforos, como no caso de *E. coli* (KOCHAN et al., 1977).

O crescimento de cepas de *E. coli* em meios deficientes de ferro resultou em aparecimento de fenilalanil-t-RNA anormal, sugerindo o desenvolvimento de lesões permanentes na célula bacteriana. Estas lesões podem parar a multiplicação e eventualmente causar a morte celular (KOCHAN et al., 1977).

Ao mesmo tempo que o ferro mostra-se essencial ao crescimento dos microrganismos, este é um elemento altamente reativo, que em altas quantidades pode vir a ser tóxico pois, através da reação de Fenton, produz radicais livres e peróxido de hidrogênio, substâncias danosas não apenas para as células bacterianas, mas também para as células intestinais do hospedeiro (VONK et al., 1988).

Assim, em ambientes com maior quantidade de ferro solubilizado, factível de ser utilizado pelas células ou em reações extracelulares, os microrganismos que apresentem mecanismos mais eficientes tanto de incorporação de ferro quanto de neutralização dos efeitos danosos, apresentarão maiores probabilidades de sobrevivência. A incorporação de FOS propiciaria o crescimento de grupos que podem utilizá-lo com maiores vantagens e,

ao mesmo tempo, indisponibilizá-lo para outros grupos bacterianos, em um processo de seleção nutritiva.

4. Conclusões

A incorporação de prebiótico resultou no aumento do peso do ceco e conteúdo cecal, provavelmente devido a um estímulo na proliferação da parede cecal pelos metabólitos produzidos na fermentação da Raftilose® P95. Os dados relativos à contagem microbiana mostraram-se inconclusivos, devido ao aparecimento de diarreia nos animais que receberam FOS.

A incorporação de diferentes níveis de ferro indicou que não apenas os microrganismos interferem na absorção de minerais, mas a própria concentração de alguns minerais pode vir a influir no crescimento e, ou, metabolismo de alguns microrganismos em diferentes graus.

Os experimentos com animais evidenciaram uma tendência no aumento da biodisponibilidade de ferro com o uso de probióticos e prebióticos, e estes podem não ter sido significativos devido aos efeitos adversos como diarreia e diminuição na concentração dos grupos bacterianos desejados, indicando a necessidade de se avaliar a quantidade de prebiótico a ser administrada, da fonte alimentar de ferro utilizada, dependendo do tipo de frutooligosacarídeo e, inclusive, peso do animal, com novos estudos na área.

5. Referências Bibliográficas

- ALANDER, M.; DE SMET, I.; NOLLET, L.; VERSTRAECTE, W.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. The effect of probiotic strains on the microbiota of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME). **Intern. J. Food Microb.**, v.46, n.1, p.71-79, 1999.
- AMANN, M.M.; KULLEN, M.J.; MARTINI, M.C.; BUSTA, F.F.; BRADY, L.J. Consumption of exogenous *Bifidobacterium* does not alter fecal bifidobacteria and breath hydrogen excretion in humans. **J. Nutr.**, v.128, n.6, p.996-1002, 1998.
- ANDRACA, I.; CASTILLO, M.; WALTER, T. Psychomotor development and behavior in iron-deficient anemic infants. **Nutr. Rev.**, v.55, n.4, p.125-132, 1997.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1992, Rio de Janeiro, v.52, 1992.

- AOAC - ASSOCIATION OF THE OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. p.880-881, 1984.
- BEARD, J.L.; DAWSON, H.; PIÑEIRO, D.J. Iron Metabolism: a comprehensive review. **Nutr. Rev.**, v.54, n.10, p.295-317, 1996.
- BENNO, Y.; HE, F.; HOSODA, M.; HASHIMOTO, H.; KOJIMA, T.; YAMAZAKI, K.; IINO, H.; MYKKANEN, H.; SALMINEN, S. Effects of *Lactobacillus* GG yogurt on human intestinal microecology in Japanese subjects. **Nutr. Today Suppl.**, v.31, n.6, p.9S-11S, 1996
- BERTAZZONI-MINELLI, E.; BENINI, A.; VICENTINI, L.; ANDREOLI, E.; OSELLADORE, M.; CERUTTI, R. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* administration on colonic microbiota and its metabolic activity in premenstrual syndrome. **Microb. Ecol. Health Disease**, v.9, p.247-260, 1996.
- BOUHNİK, Y.; FLOURIE, B.; ANDRIEUX, C.; BISETTI, N.; BRIET, F.; RAMBAUD, J.C. Effects of *Bifidobacterium* sp fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. **Europ. J. Clin. Nutr.**, v.50, p.269-273, 1996.
- BOUHNİK, Y.; VAHEDI, K.; ACHOUR, L.; ATTAR, A.; SALFATI, J.; POCHART, P.; MARTEAU, P.; FLOURIE, B.; BORNET, F.; RAMBAUD, J.C. Short-chain fructooligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. **J. Nutr.**, v.129, n.1, p.113-116, 1999.
- BRASIL (2000) Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 15, de 21 de fevereiro de 2000. **Diário Oficial da União**, 25 fevereiro 2000, Seção 1.
- CAMPBELL, J.M.; FAHEY, G.C.; WOLF, B.W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. **J. Nutr.**, v.127, n.1, p.140-136, 1997.
- COMPARATIVE Anatomy of the Digestive Tract. Documento da internet: http://ourworld.compuserve.com/homepages/gr_frank/dig_anat.htm. Acesso em 27/06/2002.
- DERMAN, D.P.; BOTHWHEEL, T.H.; TORRANCE, J.D.; BEZWODA, W.R.; MACPHAIL, A.P.; KEW, M.C.; SAYERS, M.H.; DISLER, P.B.; CHARLTON, R.W. Iron absorption from maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum vulgare*) beer. **Brit. J. Nutr.**, v.43, p.271-279, 1980.

- DJOUZI, Z.; ANDRIEUX, C. Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with human faecal flora. **Brit. J. Nutr.**, v.78, p.313-324, 1997.
- DUFLOS, C.; BELLATON, C.; PANSU, D.; BRONNER, F. Calcium solubility, intestinal sojourn time and paracellular permeability codetermine passive calcium absorption in rats. **J. Nutr.**, v.125, n.9, p.2348-2355, 1995.
- FREIRE, W.B. Strategies of the Pan American Health Organization/ World Health Organization for the control of iron deficiency in Latin America. **Nutr. Rev.**, v.55, n.6, p.183-188, 1997.
- FULLER, R. Modulation of the intestinal microflora by probiotics. p.33-45. In "HANSON, L.A.; YOLKEN, R.H. (Ed.) Probiotics, other nutritional factors, and intestinal microflora" Nestlè Nutrition Workshop Series, v.42. Nestec Ltd., Vevey/ Lippincott-Raven Pub.: Philadelphia, 1999.
- GALLAHER, D.D.; STALLINGS, W.H.; BLESSING, L.L.; BUSTA, F.F.; BRADY, L.J. Probiotics, cecal microflora, and aberrant crypts in the rat colon. **J. Nutr.**, v.126, p.1362-1371, 1996.
- GIBSON, G.R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. **J. Nutr.**, v.129, n.7, p.1438S-1441S, 1999.
- GIBSON, G.R.; BEATTY, E.R.; WANG, X.; CUMMINGS, J.H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**, v.108, p.975-982, 1995.
- GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L.; NAUYOK Jr.; G.F.; GIESBRECHT, F.G. Influence of consuming nonfermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* on fecal flora of healthy males. **J. Dairy Sci.**, v.61, n.1, p.1-10, 1978.
- HARTEMINK, R.; KOK, B.J.; WEENK, G.H.; ROMBOOTS, F.M. Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for Bifidobacteria. **J. Microbiol. Meth.**, v.27, n.1, p.33-43, 1996.
- HAVENAAR, R.; BONNIN-MAROL, S.; VAN DOKKUM, W.; PETITET, S.; SCHAAFASMA, G. Inulin: fermentation and microbial ecology in the intestinal tract. **Food Rev. Intern.**, v.15, n.1, p.109-120, 1999.
- HURRELL, R.F.; COOK, J.D. Strategies for fortifications of foods. **Trends Food Sci. Technol.**, v.1, n.3, p.56-61, 1990.
- KOCHAN, I.; KVACH, J.T.; WILES, T.I. Virulence-associated acquisition of iron in mammalian serum by *Escherichia coli*. **J. Infectious Dis.**, v.135, n.4, p.623-632, 1977.

- KOT, E.; BEZKOROVAINY, A. Distribution of Accumulated iron in *Bifidobacterium thermophilum*. **J. Agric. Food Chem.**, v.41, n.2, p.177-181, 1993.
- KOT, E.; FURMANOV, S.; BEZKOROVAINY, A. Accumulation of iron in lactic acid bacteria and bifidobacteria. **J. Dairy Sci.**, v.60, n.3, p.547-550, 1995.
- LE BLAY, G.; MAICHEL, C.; BLOTTIERE, H.M.; CHERBUT, C. Prolonged intake of fructooligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. **J. Nutr.**, v.129, n.12, p.2231-2235, 1999.
- LOZOFF, B.; JIMENEZ, E.; WOLF, A. W. Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. **N. Eng. J. Med.**, v.325, n.10, 1991.
- LUND, E.K.; WHARF, S.G.; FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; JOHNSON, I.T. Increases in the concentrations of available iron in response to dietary iron supplementation are associated with changes in crypt cell proliferation in rat large intestine. **J. Nutr.**, v.128, n.2, p.175-179, 1998.
- MITSUOKA, T. Intestinal flora and aging. **Nutr. Rev.**, v.50, n.12, p.438-446, 1992.
- MIZOTA, T. Lactulose as a growth promoting factor for *Bifidobacterium* and its physiological aspects. In: Oligosaccharides and probiotic bacteria. **Bull. Intern. Dairy Fed.**, n.313, p.43-48, 1996.
- MOROHASHI, T.; SANO, T.; OHTA, A.; YAMADA, S. True calcium absorption in the intestine is enhanced by fructooligosaccharide feeding in rats. **J. Nutr.**, v.128, p.1815-1818, 1998
- OHTA, A.; OHTUKI, M.; TAKIZAWA, T.; INABA, H.; ADACHI, T.; KIMURA, S. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of magnesium and calcium by cectomized rats. **Intern. J. Vit. Nutr. Res.**, v.64, n.5, p.316-323, 1994.
- OHTA, A.; OHTSUKI, M.; BABA, S.; ADACHI, T.; SAKATA, T.; SAKAGUCHI, E. Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. **J. Nutr.**, v.125, n.12, p.2417-2424, 1995a.
- OHTA, A.; OHTSUKI, M.; BABA, S.; TAKIZAWA, T.; ADACHI, T.; KIMURA, S. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v.41, n.3, p.281-291, 1995b.
- OHTA, A.; MOTOHASHI, Y.; SAKAI, K.; HIRAYAMA, M.; ADACHI, T.; SAKUMA, K. Dietary fructooligosaccharides increase calcium absorption and levels of mucosal calbindin-D9K in the large intestine of gastrectomized rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.33, p.1062-1068, 1998a.

- OHTA, A.; MOTOHASHI, Y.; OHTSUKI, M.; HIRAYAMA, M.; ADACHI, T.; SAKUMA, K. Dietary fructooligosaccharides change the concentration of calbindin-D9K differently in the mucosa of the small and large intestine of rats. **J. Nutr.**, v.128, n.6, p.934-939, 1998b.
- PELLEGRINO, N.; WOLFGOR, R.; RODRÍGUES, V.; VALENCIA, M. Biodisponibilidad del hierro agregado como fortificante em leche y derivados. **Alimentación Latinoam.** 215:77-80, 1996.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.
- REIFEN, R.; MATAS, Z.; ZEIDEL, L.; BERKOVITCH, Z.; BUJANOVER, Y. Iron Supplementation may aggravate inflammatory status of colitis in a rat model. **Dig. Dis. Sci.**, v.45, n.2, p.394-397, 2000.
- ROBERFROID, M.B.; VAN LOO, J.A.E.; GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **J. Nutr.**, v.128, n.1, p.11-19, 1998.
- SAKAI, K.; OHTA, A.; TAKASAKI, M.; TOKUNAGA, T. The effect of short chain fructooligosaccharides in promoting recovery from post-gastrectomy anemia is stronger than that of inulin. **Nutr. Res.**, v.20, n.3, p.403-412, 2000a.
- SAKAI, K.; OHTA, A.; SHIGA, K.; TAKASAKI, M.; TOKONAGA, T.; HARA, H. The cecum and dietary short-chain fructooligosaccharides are involved in preventing postgastrectomy anemia in rats. **J. Nutr.**, v.130, n.6, p.1608-1612, 2000b.
- SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacterium*. In: SNEATH, P.H.A. et al. (Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams & Wilkins: Baltimore. v.1, p.1418-1434, 1986.
- SERIL, D.N.; LIAO, J.; HO, K.L.K.; WARSI, A.; YANG, C.S.; YANG, G.Y. Dietary iron supplementation enhances DSS-Induced colitis and associated colorectal carcinoma development in mice. **Dig. Dis. Sci.**, v.47, n.6, p.1266-1278, 2002.
- SPANHAAK, S.; HAVENNAR, R.; SCHAAFSMA, G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. **Europ. J. Clin. Nutr.**, v.52, n.12, p.899-907, 1998.
- STOLTZFUS, R.J.; DREYFUSS, M.L. Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anemia. International Nutritional Anemia Consultative Group (INAOCG). USA: ILSI Press, 1999.

- TANAKA, R.; MATSUMOTO, K. Recent progress on prebiotics in Japan, including galactooligosaccharides. **Bull. Intern. Dairy Fed.**, n.336, p.21-27, 1998.
- TESHIMA, E. Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota por meio do uso de probiótico, prebiótico e simbiótico. 2001. Tese de doutorado. Imprensa Universitária: UFV, Viçosa. 2001. 113p.
- TOOPING, D.L. Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria. **Asian Pacific J. Clin. Nutr.**, v.5, n.1, p.15-19, 1996.
- TORRES, M.A.A.; SOUZA QUEIROZ, S. Prevenção da anemia ferropriva em nível populacional: uma revisão da literatura dos últimos quinze anos. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, v.19/20, p.145-164, 2000.
- VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística experimental.** São Paulo: Atlas, 1989. 179p.
- VONK, A.D.; SCHAAFSMA, G.; DEKKER, P.R.; WAARD, H. Relationship between intestinal transit time and iron absorption from milk and yogurt in rats. **Neth. Milk Dairy J.**, n.42, p.147-154, 1988.
- WALTER, T.; OLIVARES, M.; PIZARRO, F.; MUÑOZ, C. Iron, anemia and infection. **Nutr. Rev.**, v.55, n.4, p.111-124, 1997.
- YOUNES, H.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. **Brit. J. Nutr.**, v.75, n.2, p.301-314, 1996.
- ZHU, Y. I.; HAAS, J. D. Iron depletion without anemia and physical performance in young women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.66, n.2, p.334-341, 1997.

Efeito de Prebiótico na Biodisponibilidade de Ferro, Cálcio e Magnésio em Ratos

1. Introdução

O aumento na oferta de alimentos fortificados deve-se não apenas à ação governamental, mas também à iniciativa de indústrias que, a cada dia, lançam novos produtos no mercado, utilizando como estratégia de *marketing* o fato destes serem adicionados de vitaminas e, ou, minerais. A substituição de alimentos normais por aqueles fortificados com cálcio pode levar a um aumento superior a 200% (WHITTING & WOOD, 1997) da ingestão diária recomendada (*Dietary Reference Intakes* - DRI), a qual varia de 600 a 1200 mg, dependendo da idade e das condições fisiológicas do indivíduo (INSTITUTE OF MEDICINE, 1997).

No entanto, as implicações nutricionais, decorrentes principalmente do delicado equilíbrio existente entre os diversos minerais não estão ainda totalmente definidas e o aumento da ingestão de um mineral pode tanto inibir quanto estimular a absorção de outros nutrientes (COOK et al., 1991, REEDY & COOK, 1997, WHITTING & WOOD, 1997, WOOD & ZHENG, 1997).

Vários estudos indicam a possibilidade de interação entre cálcio e outros minerais essenciais, podendo conduzir a uma diminuição especialmente na absorção de ferro e zinco (KLETZIEN, 1940; GREIG, 1952; PRATHER & MILLER, 1992; SHACKELFORD et al., 1994; WOOD & ZHENG, 1997).

A observação da relação benéfica entre probióticos, prebióticos e minerais, principalmente cálcio, magnésio e ferro é recente (IGARASHI et al., 1994, OHTA et al., 1995a,b; YOUNES et al., 1996, OHTA et al., 1998a,b,c; OHTA et al., 1999; SAKAI et al., 2000a,b). Tem-se comprovado o efeito positivo da utilização de frutooligosacarídeos (FOS), inulina e bactérias *bífidas* na absorção desses minerais principalmente em estudos empregando-se modelos animais, porém os mecanismos envolvidos nesse efeito ainda não estão totalmente elucidados.

A presente experimentação objetivou verificar o efeito de FOS na biodisponibilidade de ferro, cálcio e magnésio assim como a interação de cálcio e ferro ou magnésio.

2. Material e Métodos

2.1. Delineamento Experimental

Foram utilizados 70 ratos recém desmamados (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*) da linhagem Wistar, com peso médio inicial de 55,43g ($\pm 6,01$). Os animais foram pesados e mantidos em gaiolas individuais de aço inox em ambiente com temperatura controlada ($25\pm 2^\circ\text{C}$) e com ciclo claro-escuro de 12 horas.

Os animais foram divididos em 7 grupos experimentais (n=10), sendo 2 tratamentos (controle, prebiótico), com 3 níveis de cálcio (50%, 100% e 200% do requerimento nutricional para ratos, correspondendo respectivamente a 2,5; 5,0 e 10g de cálcio/kg de dieta) e 1 grupo controle, em um delineamento inteiramente ao acaso.

Os animais do grupo controle receberam dieta AIN-93G (REEVES et al., 1993), enquanto os demais receberam as dietas testes, deficientes em ferro (14 mg de ferro/kg de dieta, correspondendo a 58% das recomendações nutricionais do rato) por 28 dias. O ganho de peso dos animais foi monitorado semanalmente e o consumo alimentar diariamente. Após este período, foi realizada coleta do sangue da cauda dos animais para determinação do hematócrito e dos níveis de hemoglobina.

Os animais foram sacrificados no 30º dia do experimento por meio de asfíxia com CO_2 , após o qual retirou-se o fêmur direito para análise dos teores de cálcio e magnésio.

2.2. Dosagens sangüínea

A dosagem de hematócrito foi obtida por leitura direta após centrifugação dos capilares, em ultracentrífuga Sigma, a 4000xg por 5 minutos. O nível de hemoglobina foi quantificado pelo método colorimétrico da cianometahemoglobina (HiCN), proposto pela AOAC (1984), utilizando o kit para diagnóstico colorimétrico *in vitro* da ANALISA Indústria e Comércio LTDA (Belo Horizonte – MG). Os 20 μL de sangue foram misturados a 5 mL de uma solução de cianeto e ferrocianeto de potássio (solução de Drabkin). Nesse método, o íon ferroso (Fe^{+2}) do heme da hemoglobina é oxidado para o estado férrico (Fe^{+3}) pelo cianeto ionizado, formando cianeto de metahemoglobina, cuja concentração foi medida a 540 nm, em espectrofotômetro UV-1601 (Shimadzu, Japão).

2.3. Determinação do teor de cálcio e magnésio no fêmur

Os teores de cálcio e magnésio nos ossos foram determinados após digestão do fêmur com 3 mL de ácido nítrico por 15 horas à temperatura ambiente, e leitura em espectrofotômetro de absorção atômica (GBC, mod. 908-AA, Alemanha), a 422 nm (cálcio) e a 285,2 nm (magnésio), em chama de ar/acetileno. Para a determinação de cálcio e magnésio foi necessária a incorporação de cloreto de estrôncio (49g SrCl₂/L), em valores iguais a 10% do volume final (diluição na qual foi realizada a leitura).

2.4. Análise estatística

O experimento foi montado em um esquema fatorial 2x3+1 (2 dietas, 3 níveis de cálcio e 1 grupo testemunha), no delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições, totalizando 70 animais. Procedeu-se à análise de variância e regressão dos dados. Para o fator qualitativo (tipo de dieta) as médias foram comparadas utilizando-se o teste de t de Student, adotando-se um nível de até 5% de probabilidade. Para o fator quantitativo (níveis de cálcio) os modelos foram escolhidos baseados na significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o teste F e adotando um nível de até 10% de probabilidade, no coeficiente de determinação e nos fenômenos biológicos em estudo (ganho de peso, nível de hemoglobina, hematócrito, teor de cálcio e de magnésio no osso). Foi também utilizado o teste de Dunnett para comparação dos grupos experimentais com a testemunha. As avaliações foram efetuadas utilizando-se o software SAEG (Sistema de Análise Estatística, Universidade Federal de Viçosa).

3. Resultados

3.1. Ganho de peso e consumo alimentar dos animais

A incorporação de FOS, assim como os diferentes níveis de cálcio não influenciaram no ganho de peso ou consumo alimentar dos grupos experimentais ($p > 0,05$), confirmando resultados obtidos por YOUNES et al. (1996), os quais trabalharam com ratos alimentados com dietas contendo diferentes níveis de cálcio.

3.2. Efeito de FOS e cálcio no nível de hemoglobina, hematócrito, magnésio e cálcio

Os dados referentes aos níveis de hemoglobina e hematócrito testados estão na Tabela 1 e as dos teores de magnésio (mg/g osso) e cálcio (mg/g osso) na Tabela 2.

Tabela 1 – Efeito da incorporação de FOS sobre os níveis de hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) em ratos alimentados com dietas contendo 2,5, 5,0 e 10,0 g de cálcio/kg dieta.

Dieta/ Nível de cálcio (g/kg)	Hemoglobina (g/dL)			Hematócrito (%)		
	2,5	5,0	10,0	2,5	5,0	10,0
Controle	8,86 ^{ns}	8,22 ^{ns}	6,15 ^{ns}	37,40 ^{ns}	37,00 ^{ns}	31,30 ^{ns}
FOS	8,41	8,43	5,77	36,20	34,70	27,10

Controle = Dieta AIN-93G com 14 mg de ferro/kg; FOS = Controle + 1%Raftilose® P95

^{ns} não significativo, ao nível de 5%, para valores na coluna, pelo teste de t.

Tabela 2 – Efeito da incorporação de FOS sobre os teores de magnésio e cálcio (mg/g de osso) em ratos alimentados com dietas contendo 2,5, 5,0 e 10,0 g de cálcio/kg dieta.

Dieta/ Nível de cálcio (g/kg)	mg magnésio/ g osso			mg cálcio/ g osso		
	2,5	5,0	10,0	2,5	5,0	10,0
Controle	1,65 ^{ns}	1,51 ^{ns}	0,93*	83,62 ^{ns}	90,85 ^{ns}	83,79**
FOS	1,62	1,48	1,07	84,63	88,93	92,79

Controle = Dieta AIN-93G com 14 mg de ferro/kg; FOS = Controle + 1%Raftilose® P95

^{ns} não significativo, ao nível de 5%, para valores na coluna, pelo teste de t

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de t.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de t.

A inclusão de FOS exerceu efeito diferencial apenas na dieta contendo alto teor (10g/kg) de cálcio e resultou em aumento da absorção de cálcio ($p < 0,01$) e magnésio ($p < 0,02$), porém não exerceu efeito nos níveis de hemoglobina e hematócrito ($p > 0,05$). Diferenças no teor de hematócrito indicam menores quantidades celulares, ou células de menor tamanho, sendo uma indicação indireta de alterações nos níveis de hemoglobina.

As deficiências de ferro e cálcio estão associadas com problemas de saúde pública. A deficiência de ferro, que leva à anemia ferropriva, é mais comum em crianças, adolescentes e mulheres grávidas, particularmente nos países em vias de desenvolvimento (STOLTZFUS & DREYFUSS, 1999). No Brasil, a anemia ferropriva se manifesta de

forma endêmica com uma prevalência média de 40% da população (TORRES & SOUZA-QUEIROZ, 2000). A deficiência de ferro pode ter sérias conseqüências à saúde humana, podendo afetar o desenvolvimento mental e motor de crianças (LOZOFF et al., 1991, ANDRACA et al., 1997), pois poderia vir a alterar os padrões de mielinização durante o crescimento e surgimento de conexões cerebrais em bebês (ANDRACA et al., 1997), performance física de adultos (ZHU & HASS, 1997), diminuição da capacidade de trabalho e da resistência a infecções (PREZIOSI et al., 1997). Alguns estudos *in vitro* relacionam deficiência de ferro com diminuição da função fagocitária e de células T humanas (WALTER et al., 1997), o que poderia vir a afetar a resposta imunológica.

O cálcio é constituinte estrutural de ossos e dentes e exerce o papel de regulação de funções críticas como impulsos nervosos, contração muscular, função microtubular, mitose celular e motilidade celular (ALLEN & WOOD, 1994). Sua deficiência usualmente se manifesta em doenças crônico-degenerativas, como osteoporose, que é caracterizada por fragilidade óssea decorrente de desmineralização progressiva, facilitando a ocorrência de fraturas.

Já o magnésio tem papel essencial em várias reações celulares, como síntese de ácidos graxos, proteína, fosforilação de glicose, formação de adenosina monofosfato cíclica (AMPc). A sua adequada ingestão e absorção é fundamental para a formação de cristais imperfeitos de hidroxapatita, que resultam em uma estrutura óssea mais flexível e menos sujeita a fraturas. Devido à sua extensa distribuição orgânica, a deficiência de magnésio pode levar a sintomatologia variada, que em humanos incluem náusea, vômito, diarreia, hipocalcemia, anorexia, apatia, alterações eletrocardiográficas, neurológicas e da personalidade, espasmos musculares e tremores, ataxia, confusão mental e convulsões (VIEIRA, 2000). Em animais de laboratório a hipomagnesemia está associada a crises epilépticas, hipocalcemia, tremores e convulsões, que podem levar à morte (SHILS, 1994).

O efeito positivo de FOS sobre a absorção de cálcio e magnésio foi comprovado por BROMMAGE et al. (1993), OHTA et al. (1994), OHTA et al. (1995b), YOUNES et al. (1996), MOROHASHI et al. (1998), OHTA et al. (1998a,b,d), TAKAHARA et al. (2000) e SCHOLZ-AHRENS et al. (2002).

Os dados encontrados, relativos ao teor de cálcio no fêmur, estão de acordo com os resultados obtidos por SCHOLZ-AHRENS et al. (2002), embora estes autores tenham utilizado ratas adultas ovariectomizadas e doses de FOS superiores ao desta experimentação. Os autores utilizaram cálcio (5g/kg), associado ou não a diferentes níveis FOS (2,5, 5, e 10%) mostrou que, em níveis de 2,5%, FOS previne a perda de área

trabecular do fêmur, com aumento da espessura das trabéculas, enquanto níveis de 5 e 10% aumentaram o perímetro trabecular. No entanto, apenas níveis de 10% de FOS aumentaram os níveis de cálcio no fêmur. Dietas contendo 10g de cálcio/ kg e suplementadas com prebiótico (5%) resultaram em aumento da área trabecular (aumento do número de trabéculas, sem alterar a espessura), aumento da espessura cortical e do teor de cálcio na vertebra lombar (SCHOLZ-AHRENS et al., 2002). Os resultados indicam que FOS pode prevenir perdas estruturais na tíbia, decorrentes da deficiência hormonal provocada pela ovariectomia, mas ocorrem diferenças na arquitetura trabecular – aumento da área trabecular com diminuição do número de trabéculas e aumento da espessura, ou devido ao aumento do número trabecular sem alteração da espessura, dependendo do teor de cálcio e,ou, suplementação com FOS, sendo que os efeitos mais pronunciados foram obtidos em dietas contendo alto teor de cálcio.

A fermentação microbiana teria uma influência pronunciada na eficiência da absorção de cálcio no intestino grosso. A suplementação de FOS contrabalançou o efeito negativo do cálcio dietético na biodisponibilidade de magnésio no intestino grosso (YOUNES et al., 1996). Carboidratos não digeríveis podem aumentar o pool de magnésio solúvel no intestino grosso pela acidificação do conteúdo luminal.

Em estudo realizado por YOUNES et al. (1996), observou-se que o nível de cálcio apresenta influência sobre a acidificação do conteúdo cecal e a quantidade de AGCC presente no ceco em animais suplementados com amido resistente. Os animais que receberam menor concentração de cálcio (2,5g/kg) apresentaram uma diminuição mais acentuada do pH. Os animais adaptados a uma maior concentração de cálcio (7,5g/kg) apresentaram uma maior concentração de AGCC (cerca de . 160mmol/L), com concentrações de ácidos propiônico e butírico, na ordem de 40mmol/L, enquanto os animais que receberam dietas pobres em cálcio a fermentação, que resultou em pH mais baixo, apresentou menores concentrações de AGCC (100mmol/L), caracterizados por uma alta proporção de ácido acético e baixa proporção de ácido propiônico. Os autores ainda verificaram que os animais submetidos a dietas controle apresentaram a mesma quantidade de cálcio solúvel no conteúdo cecal, independente do teor de cálcio da dieta. A adição de amido resistente na dieta dos animais alimentados com 2,5g ca/kg não resultou em alterações na concentração cecal de cálcio solúvel, que só aumentou de forma significativa nos animais adaptados a dietas com 7,5g Ca/kg.

O fato de não ter sido observado efeito de FOS na biodisponibilidade de ferro, no presente estudo, pode ser devido às baixas concentrações de FOS utilizadas. Os trabalhos

relacionando o efeito positivo de FOS na recuperação de anemia em animais (OHTA et al., 1995b, OHTA et al., 1999, SAKAI et al., 2000a) utilizaram doses que variaram de 5 a 10% de FOS. A concentração de FOS (1%) utilizada nesta experimentação foi definida baseando-se em resultados anteriores (capítulo anterior), onde foi observado que a suplementação de animais com 3% de FOS resultou em diarreia.

A absorção de cálcio, ferro e magnésio no intestino grosso ocorre em diferentes segmentos. A incorporação de FOS (7,5%) estimulou a absorção de ferro em animais gastroectomizados, aumentando sua absorção no ceco (SAKAI et al., 2000a). OHTA et al (1994) verificaram que o magnésio é absorvido no cólon e o cálcio no ceco.

Os mecanismos sugeridos para aumento da absorção dos minerais estão relacionados com a fermentação do prebiótico e seus produtos de metabolismo, que promovem a diminuição do pH luminal, com conseqüente solubilização de sais minerais complexados, aumentando a concentração de cátions e favorecendo a absorção passiva (OHTA et al., 1995b, OHTA et al., 1998d, SAKAI et al., 2000a); aumento da superfície de absorção devido a maiores concentrações de ácidos graxos de cadeia curta, especialmente butirato (YOUNES et al., 1996, TOOPING, 1996, VAN LOO et al., 1999); aumento da profundidade e do número de células nas criptas intestinais (RÉMÉSY et al., 1993); efeito de propionato e acetato, que se ligam ao cálcio favorecendo a sua absorção transcelular (TRINIDAD et al., 1996); aceleração do fluxo sanguíneo, devido à ação de AGCC (YOUNES et al., 1996); alteração da concentração de proteínas específicas para a absorção ativa de minerais, como Calbindina D9k (cálcio), que aumenta no intestino grosso de animais alimentados com FOS (OHTA et al., 1998a,b).

A formação no trato gastrointestinal de complexos de baixo peso molecular, derivados de ácidos graxos produzidos pelo metabolismo de bactérias lácticas e bífidas, como acetato de cálcio, lactato de cálcio (OHTA et al., 1994) e lactato de ferro (OHTA et al., 1995b), que são mais facilmente absorvíveis pelas membranas celulares do que cálcio ionizado (TRINIDAD et al., 1993), também promoveriam aumento na absorção

Outro mecanismo seria o aumento na concentração de carboidratos não fermentáveis no ceco, que promoveriam um maior afluxo de água para a manutenção da isotonicidade do meio. O aumento do volume do conteúdo cecal poderia aumentar a distensão e permeabilidade das junções intercelulares dos enterócitos, aumentando a absorção passiva de cálcio e outros elementos (BRONNER, 1987), além de diluir os minerais que vêm do intestino delgado (RÉMÉSY et al., 1993), evitando que uma concentração excessiva dos mesmos indisponibilize uma fração dos minerais por meio de formação de complexos não

absorvíveis. No entanto, os mecanismos relacionados com a absorção passiva influenciariam de forma semelhante a absorção de todos os minerais.

Os mecanismos relacionados evidenciam uma falta de especificidade dos FOS, indicando que o efeito sobre absorção de minerais pode ser obtido por “alimentos colônicos”, substâncias que servem como substrato para a microbiota intestinal de forma não específica, mas que podem estimular a taxa de fermentação, a produção de ácidos graxos de cadeia curta e a acidificação luminal (SCHOLZ-AHRENS et al., 2001).

Nos últimos anos, experimentações em humanos apontam para efeitos benéficos da utilização de FOS sobre a absorção de minerais. A ingestão de 40g/dia de inulina (9 indivíduos, 21,5 + 2,5 anos) aumentou a biodisponibilidade de cálcio sem levar a efeito negativo na retenção de Fe, Mg, Zn (COUDRAY et al., 1997), enquanto o consumo de 15g FOS/dia estimulou a absorção ($p < 0,05$) de cálcio em 12 adolescentes do sexo masculino (14 a 16 anos), sem reflexos na excreção urinária de cálcio (VAN DEN HEUVEL et al., 1999). A ingestão de 20g/dia de transgalactooligosacarídeo aumentou a absorção de cálcio ($p < 0,04$) em mulheres pós-menopausa (12 indivíduos, idade entre 55 e 65 anos), sem aumentar a excreção urinária de cálcio, indicando um possível aumento na deposição do mineral (VAN DEN HEUVEL et al., 2000). GRIFFIN et al. (2002) verificaram que doses menores (8g/dia) de mistura inulina + oligofrutose aumentou a absorção ($p < 0,01$) de cálcio em adolescentes do sexo feminino (11 a 13,9 anos) com ingestão diária de 1500 mg de cálcio dietético.

Na Tabela 3 encontra-se a comparação, pelo teste de Dunnett, entre os níveis de hemoglobina, hematócrito e teores de cálcio e magnésio no osso das dietas deficientes em ferro e com diferentes níveis de cálcio e o grupo recebendo dieta com os níveis recomendados de ferro e cálcio.

Tabela 3 – Avaliação do nível de hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), teores de cálcio e de magnésio (mg/g osso) dos diferentes grupos experimentais versus o grupo testemunha (AIN-93G).

Tratamento	Cálcio (mg/g osso)	Magnésio (mg/g osso)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)
1. Controle + 0,25% Ca	83,62 ^{ns}	1,65 ^{ns}	8,86*	37,4*
2. FOS + 0,25% Ca	84,63 ^{ns}	1,62 ^{ns}	8,41*	36,2*
3. Controle + 0,5% Ca	90,85 ^{ns}	1,51 ^{ns}	8,22*	37,0*
4. FOS + 0,5% Ca	88,93 ^{ns}	1,48 ^{ns}	8,43*	34,7*
5. Controle + 1,0% Ca	83,79 ^{ns}	0,93*	6,15*	31,3*
6. FOS + 1,0% Ca	92,79 ^{ns}	1,07*	5,77*	27,1*
7. AIN-93G	92,58	1,58	13,52	48,1

^{ns} não significativo, pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

* significativo pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

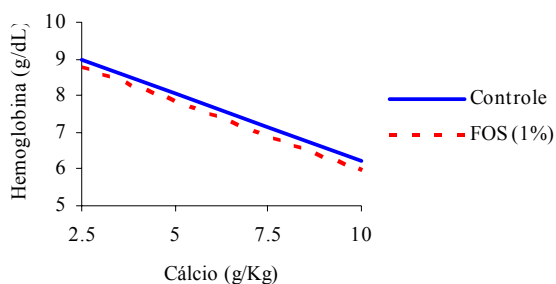
A diferença ($p < 0,05$) entre os níveis de hemoglobina e hematócrito era esperado, pois as dietas-teste foram formuladas com 14 mg Fe/kg a fim de promover deficiência. A suplementação com FOS não impediu o desenvolvimento de anemia. O teor de magnésio no osso dos animais que receberam dietas contendo 1% de cálcio foi menor ($p < 0,05$) do que o dos animais que receberam dieta AIN-93G, indicando que o teor de cálcio da dieta influi negativamente na absorção e, ou, incorporação de magnésio. A suplementação com FOS, embora tenha resultado em valores médios superiores ($p < 0,05$, Tabela 2), não foi suficiente para contrabalançar o efeito negativo.

A diminuição ou aumento do teor de cálcio da dieta não resultou em diferença ($p > 0,05$) no teor de cálcio do osso entre as dietas teste e a dieta com adequado teor de cálcio.

O efeito do nível de cálcio (g/kg) sobre os parâmetros avaliados é demonstrado nas Figuras 1 a 4, com as respectivas equações de regressão ajustadas para cada tipo de dieta.

Verificou-se que um aumento no nível de cálcio da dieta exerce efeitos negativos sobre os níveis de hemoglobina, hematócrito e magnésio ($p < 0,01$) (Figuras 1, 2 e 3), porém não resultou em aumento do teor de cálcio nos ossos, em dietas controle. A incorporação de FOS (1%) potencializou o efeito negativo sobre hematócrito (Figura 2) e, ao mesmo tempo, contrabalançou sem no entanto anular este efeito negativo sobre a absorção de magnésio (Figura 3). Por outro lado, a incorporação de FOS aumentou ($p < 0,10$) a absorção de cálcio (Figura 4).

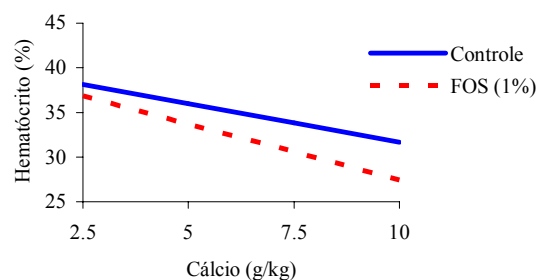
Figura 1 - Efeito de Cálcio sobre Hemoglobina em dietas controle e com FOS (1%)



$$D_{\text{controle}} = \hat{y} = 9,8925 - 0,368714^{**}Ca \quad r^2 = 0,5973$$

$$D_{\text{FOS}} = \hat{y} = 9,744 - 0,3784^{**}Ca \quad r^2 = 0,4686$$

Figura 2 - Efeito de Cálcio sobre Hematócrito em dietas controle e com FOS (1%)



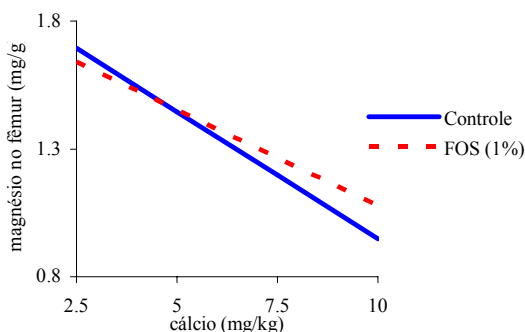
$$D_{\text{controle}} = \hat{y} = 40,25 - 0,86^{**}Ca \quad r^2 = 0,2399$$

$$D_{\text{FOS}} = \hat{y} = 40,00 - 1,25714^{**}Ca \quad r^2 = 0,3204$$

D_{Controle} = Dieta AIN-93G com 14 mg de ferro/kg; D_{FOS} = Controle + 1%Raftilose® P95

** 1% de significância pelo teste de F

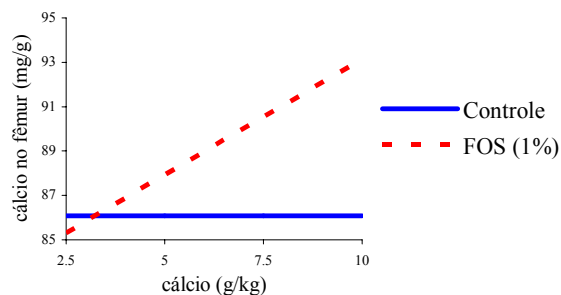
Figura 3 - Efeito de cálcio sobre o teor de magnésio (mg/g) no fêmurem dietas controle e com FOS (1%)



$$D_{\text{controle}} = \hat{y} = 1,94108 - 0,099245^{**}Ca \quad r^2 = 0,7191$$

$$D_{\text{FOS}} = \hat{y} = 1,82715 - 0,0750032^{**}Ca \quad r^2 = 0,5719$$

Figura 4 - Efeito de cálcio sobre teor de cálcio (mg/g) no fêmurem dietas controle e com FOS (1%)



$$D_{\text{controle}} = \hat{y} = 86,09$$

$$D_{\text{FOS}} = \hat{y} = 82,7048 + 1,04238^{***}Ca \quad r^2 = 0,7049$$

D_{Controle} = Dieta AIN-93G com 14 mg de ferro/kg; D_{FOS} = Controle + 1%Raftilose® P95

** 1% de significância pelo teste de F

*** 10% de significância pelo teste de F

O nível de cálcio da dieta não influenciou o teor de cálcio no fêmur, em dietas controle (Figura 4). Isto pode ser devido ao pouco tempo de experimentação ou a um mecanismo de adaptação fisiológica. OHTA et al., (1998a) observaram um aumento de calbindina D_{9K} , proteína associada à absorção ativa de cálcio, no intestino grosso resultou em diminuição da concentração no intestino delgado, em um mecanismo de regulação que evitaria excessiva absorção do mineral. Assim, a contínua ingestão de altos níveis de cálcio

pode levar a uma adaptação no mecanismo de sua absorção, com diminuição da absorção ativa para contrabalançar o aumento que ocorreria na absorção passiva, por um aumento na concentração de cálcio que atinge o ceco e é solubilizado.

Em experimentação com ratos alimentados com dietas contendo baixo (2,5g/kg) ou alto (7,5g/kg) teores de cálcio, YOUNES et al. (1996) verificaram que a solubilidade do magnésio, assim como sua absorção, foi menor nos animais submetidos a altas concentrações de cálcio, provavelmente devido a uma menor solubilização do magnésio no lúmen intestinal.

A interferência de cálcio sobre a biodisponibilidade de ferro é controversa em humanos. Enquanto SOKOLL & DAWSON-HUGHES (1992) e AMES et al. (1999) verificaram que aumentos no teor de cálcio não alteraram a utilização de ferro, mas aumentaram a absorção de cálcio em mulheres em pré-menopausa e crianças, respectivamente, e ILICH-ERNEST et al. (1998) observaram que a suplementação com cálcio não afeta as reservas de ferro em adolescentes na menarca, COOK et al. (1991) e VAN DE VIJVER et al. (1999) observaram uma interação negativa entre os minerais.

A interação poderia ocorrer em nível luminal, com a formação de compostos pouco absorvíveis (MONSEN & COOK, 1976; PRATHER & MILLER, 1992), embora a maioria dos pesquisadores sugira que o efeito seria em nível celular (BARTON et al., 1983; HALLBERG et al., 1991), como alteração no nível de borda em escova da membrana na absorção de ferro não-heme.

O fato de ter sido observada redução na absorção de ferro heme em vários estudos levou à sugestão de que a interação também ocorreria em algum estágio posterior, comum ao transporte de ferro-heme e não-heme (HALLBERG, 1992a), como a inibição na saída do ferro do enterócito (HALLBERG et al., 1992b) e, ou, competição pela mobilferrina (VAN DE VIJVER et al., 1999).

A observação de que o aumento dos níveis de cálcio diminui a absorção de ferro, enquanto a incorporação de FOS não afeta esta absorção, sugere que o efeito negativo de cálcio ocorreria em nível de intestino delgado. No ceco e colon, locais onde o FOS é fermentado e poderia promover maior absorção de ferro, níveis maiores de cálcio resultam em maior concentração de cálcio no lúmen intestinal, favorecendo a formação de complexos com o ferro, indisponibilizando-o para a absorção passiva, além de competição por ácidos orgânicos ou sítios de absorção ativa. Como os níveis de cálcio fornecidos são muito superiores ao requerido pelo organismo, a fração de cálcio complexada não alteraria a absorção deste mineral.

4. Conclusões

A suplementação de cálcio, prática muito comum na atualidade, pode acarretar uma diminuição na absorção de outros minerais. Nesta experimentação comprovou-se a interação negativa entre cálcio e ferro e entre cálcio e magnésio. Doses elevadas de cálcio promoveram anemia severa em animais submetidos a dietas deficientes em ferro, com a diminuição da absorção de ferro e de magnésio. No entanto o aumento de cálcio na dieta não exerceu influência sobre o teor de cálcio no fêmur, em ratos submetidos às dietas testes por 28 dias.

A suplementação com FOS (1%) não minimizou o desenvolvimento de anemia em animais submetidos a dietas deficientes em ferro, porém aumentou a absorção de magnésio e cálcio. Os efeitos mais pronunciados foram evidenciados nas dietas contendo níveis de cálcio equivalentes a 200% das recomendações nutricionais.

5. Referências bibliográficas

- ALLEN, L.H., WOOD, R.J. Calcium and phosphorus. In: SHILS, M.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. (Ed) **Modern Nutrition in health and disease**. 8 ed., Filadelfia: Lea & Febiger, 1994. v.1, cap.7, p.144-149.
- AMES, S.K., GORHAM, B.M., ABRAMS, S.A. Effects of high compared with low calcium intake on calcium absorption and incorporation of iron by red blood cells in small children. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.70, n.1, p.44-48, 1999.
- ANDRACA, I., CASTILLO, M., WALTER, T. Psychomotor development and behavior in iron-deficient anemic infants. **Nutr. Rev.**, v.55, n.4, p.125-132, 1997.
- BARTON J.C., CONRAD, M.E., PARMLEY, R.T. Calcium inhibition of inorganic iron absorption in rats. **Gastroenterol.**, v.84, p.90-101, 1983.
- BROMMAGE, R., BINACUA, CL, ANTILLE, S., CARRIÉ, A.L. Intestinal calcium absorption in rats is stimulated by dietary lactulose and other resistant sugars. **J. Nutr.**, v.123, n.12, p.2186-2194, 1993.
- BRONNER, F. Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. **J. Nutr.**, v.117, p.1347-1352, 1987.

- COOK, J.D., DASSENKO, S.A., WHITTAKER, P. Calcium supplementation: effect on iron absorption. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.53, n.1, p.106-111, 1991.
- COUDRAY, C., BELLANGER, J., CASTIGLIA-DELAVALD, C., RÉMÉSY, C., VERMOREL, M., RAYSSIGNUIER, Y. Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. **Europ. J. Clin. Nutr.**, v.51, n.6, p.375-380, 1997.
- GREIG, W.A. The effects of additions of calcium carbonate to the diet of breeding mice. 2. Haematology and Histopathology. **Brit. J. Nutr.**, v.6, p.280-294, 1952.
- GRIFFIN, I.J., DAVILA, P.M., ABRAMS, S.A. Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes. **Brit. J. Nutr.**, v.87, Supl.2, p.S187-S191, 2002.
- HALLBERG, L., BRUNE, M., ERLANDSSON, M., SANDBERG, A.S., ROSSANDER-HULTÉN, L. Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.53, n.1, p.112-119, 1991.
- HALLBERG, L., ROSSANDER-HULTÉN, L., BRUNE, M., GLEERUP, A. Inhibition of heme-iron absorption in man by calcium. **Br. J. Nutr.**, v.69, n.2, p.533-540, 1992a.
- HALLBERG, L., ROSSANDER-HULTÉN, L., BRUNE, M., GLEERUP, A. Calcium and iron absorption: mechanisms of action and nutritional importance. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.46, n.5, p.317-327, 1992b
- IGARASHI, M., IYAMA, Y., KATO, TOMITA, M., OMI, N., EZAWA, I. Effect of *Bifidobacterium longum* and lactulose on the straight of bone in ovariectomized osteoporosis model rats. **Bifidus**, v.7, p.139-147, 1994.
- ILICH-ERNST, J. Z., MCKENNA, A. A., BADENHOP, N. E., CLAIRMONT, A. C., ANDON, M. B., NAHHAS, R.W., GOEL, P., MATKOVIC, V. Iron status, menarche, and calcium supplementation in adolescent girls. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.68, n.4, p.880-887, Oct.1998.
- INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride.** Washington, D.C.: National Academy Press, 1997. Cap.2, p.43-46.
- KLETZIEN, S.W. Iron metabolism: 1.The role of calcium in iron assimilation. **J. Nutr.**, v.19, p.187-197, 1940.
- LOZOFF, B., JIMENEZ, E., WOLF, A.W. Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. **N. Eng. J. Med.**, v.325, n.10, 1991.

- MONSEN, E.R., COOK, J.D. Food iron absorption in human subjects. IV. The effects of calcium and phosphate salts on the absorption of nonheme iron. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.29, n.10, p.1142-1148, 1976.
- MOROHASHI, T., SANO, T., OHTA, A., YAMADA, S. True calcium absorption in the intestine is enhanced by fructooligosaccharide feeding in rats. **J. Nutr.**, v.128, n.10, p.1815-1818, 1998
- OHTA, A., OHTUKI, M., TAKIZAWA, T., INABA, H., ADACHI, T., KIMURA, S. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of Magnesium and calcium by cecectomized rats. **Intern. J. Vitamin Nutr. Res.**, v.64, p.316-323, 1994.
- OHTA, A., OHTUKI, M., BABA, S., ADACHI, T., SAKATA, T., SAKAGUCHI, E. Calcium and Magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. **J. Nutr.**, v.125, p.2417-2424, 1995a.
- OHTA, A., OHTUKI, M., BABA, S., TAKIZAWA, T., ADACHI, T., KIMURA S. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v.41, p.281-291, 1995b.
- OHTA, A., MOTOHASHI, Y., OHTSUKI, M., HIRAYAMA, M., ADACHI, T., SAKUMA, K. Dietary fructooligosaccharides change the concentration of calbindin D9K differently in the mucosa of the small and large intestine of rats. **J. Nutr.**, v.128, n.6, p.934-939, 1998a.
- OHTA, A., MOTOHASHI, Y., SAKAI, K., HIRAYAMA, M., ADACHI, T., SAKUMA, K. Dietary fructooligosaccharides increase calcium absorption and levels of mucosal calbindin D9K in the large intestine of gastrectomized rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.33, p.1062-1068, 1998b.
- OHTA, A., OHTSUKI, M., BABA, S., HIRAYAMA, M., ADACHI, T. Comparison of the nutritional effects of fructooligosaccharides of different sugar chain length in rats. **Nutr. Res.**, v.18, n.1, p.109-120, 1998c.
- OHTA, A., OHTSUKI, M., UEHARA, M., HOSONO, A., HIRAYAMA, M., ADACHI, T., HARA, H. Dietary fructooligosaccharides prevent postgastrectomy anemia and osteopenia in rats. **J. Nutr.**, v.128, n.3, p.485-490, 1998d.
- OHTA, A., SAKAI, K., TAKASAKI, M., UEHARA, M., TOKUNAGA, T., ADACHI, T. Dietary heme iron does not prevent postgastrectomy anemia but fructooligosaccharides improve bioavailability of heme iron in rats. **Intern. J. Vitamin Nutr. Res.**, v.69, n.5, p.348-355, 1999

- PRATHER, T.A., MILLER, D.D. Calcium carbonate depresses iron bioavailability in rats more than calcium sulfate or sodium carbonate. **J. Nutr.**, v.122, n.2, p.327-332, 1992.
- PREZIOSI, P., PRUAL, A., GALAN, P., DAOUDA, H., BOUREIMA, H., HERCBERG, S. Effect of iron supplementation on the iron status of pregnant women: consequences for newborns. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.66, n.5, p.1178-1182, 1997.
- REDDY, M.B., COOK, J.D. Effect of calcium intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.65, n. , p.1820-1825, 1997.
- REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.
- RÉMÉSY, C., LEVRAT, M.A., GAMET, L., DEMIGNÉ, C. Cecal fermentations in rats fed oligosaccharides (inulin) are modulated by dietary calcium level. **Am. J. Physiol.**, v.264, n.5, Part.1, p.G855-862, 1993.
- SAKAI, K., OHTA, A., SHIGA, K., TAKASAKI, M., TOKUNAGA, T., HARA, H. The cecum and dietary short-chain fructooligosaccharides are involved in preventing postgastrectomy anemia in rats. **J. Nutr.**, v.130, n.6, p.1608-1612, 2000a.
- SAKAI, K., OHTA, A., TAKASAKI, M., TOKUNAGA, T. The effect of short chain fructooligosaccharides in promoting recovery from post-gastrectomy anemia is stronger than that of inulin. **Nutr. Res.**, v.20, n.3, p.403-412, 2000b.
- SCHOLZ-AHRENS, K.E., SCHAAFSMA, G., VAN DEN HEUVEL, E. G.H.M., SCHREZENMEIR, J. Effects of prebiotics on mineral metabolism. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.73, Supl.2, p.459S-464S, 2001.
- SCHOLZ-AHRENS, K.E., AÇIL, Y., SCHREZENMEIR, J. Effect of oligofructose or dietary calcium on repeated calcium and phosphorus balances, bone mineralization and trabecular structure in ovariectomized rats. **Brit. J. Nutr.**, v.88, n.4, p.365-377, 2002.
- SHACKELFORD, M.E., COLLINS, T.F.X., BLACK, T.N., AMES, M.J., DOLAN, S., SHEIKH, N.S., CHI, R.K., O'DONNELL, M.W. Mineral interactions in rats fed AIN-76A diets with excess calcium. **Food Chem. Tox.**, v.32, n.3, p.255-263, 1994.
- SHILS, M.E. Magnesium. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. (Ed.) **Modern Nutrition in health and disease**. 8th, Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. v.1, cap.8, p.164-165, 172-174.

- SOKOLL, L.J., DAWSON-HUGHES, B. Calcium supplementation and plasma ferritin concentrations in premenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.56, p.1045-1048, 1992.
- STOLTZFUS, R. J., DREYFUSS, M. L. **Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anemia.** International Nutritional Anemia Consultative Group (INAOCG). USA: ILSI Press, 1999.
- TAKAHARA, S., MOROHASHI, T., SANO, T., OHTA, A., YAMADA, S., SASA, R. fructooligosaccharides consumption enhance femoral bone volume and mineral concentrations in rats. **J. Nutr.**, v.130, n.7, p.1792-1795, 2000
- TOOPING, D.L. Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria. **Asian Pacific J. Clin. Nutr.**, v.5, n.1, p.15-19, 1996.
- TORRES, M.A.A., SOUZA QUEIROZ, S. Prevenção da anemia ferropriva em nível populacional: uma revisão da literatura dos últimos quinze anos. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, v.19/20, p.145-164, 2000.
- TRINIDAD, T.P., WOLEVER, T.M.S., THOMPSON, L.U. Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon of humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.63, n.4, p.574-578, 1996.
- TRINIDAD, T.P., WOLEVER, T.M.S., THOMPSON, L.U. Interactive effect of Ca and SFCA on absorption in the distal colon of man. **Nutr. Rev.**, v.13, p.417-425, 1993.
- VAN DEN HEUVEL, E.G.H.M., MUYS, T., VAN DOKKUM, W., SCHAAFSMA, G. Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.69, n.3, p.544-548, Mar.1999.
- VAN DEN HEUVEL, E.G.H.M., SCHOTERMAN, M.H.C., MUIJS, T. Transgalactooligosaccharides stimulate calcium absorption in postmenopausal women. **J. Nutr.**, v.130, n.12, p.2938-2942, 2000.
- VAN LOO, J., CUMMINGS, J., DELZENNE, N., ENGLYST, H., FRANCK, A., HOPKINS, M., KOK, N., MACFARLANE, G., NEWTON, D., QUIGLEY, M., ROBERFROID, M., VAN VLIET, T., VAN DEN HEUVEL, E. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095) **Brit. J. Nutr.**, n.2, v.81, p.121-132, 1999.

- VAN DE VIJVER, L.P.L., KARDINAAL, A.F.M., CHARZEWESKA, J., ROTILY, M., CHARLES, P., MAGGIOLINI, M., ANDO, S., VÄÄMÄMEM, K., WAJSZCZYK, B., JEIKKINEN, J., DELORAINE, A., SCHAAFSMA, G. Calcium intake is weakly but consistently negatively associated with iron status in girls and women in six European countries. **J. Nutr.**, v.129, n.5, p.963-968, 1999.
- VIEIRA, C.E. Doenças nutricionais. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 6 ed., 2000. Cap.12, p.291.
- WALTER, T., OLIVARES, M., PIZARRO, F., MUÑOZ, C. Iron, anemia and infection. **Nutr. Rev.**, v.55, n.4, p.111-124, 1997.
- WHITING, S.J., WOOD, R.J. Adverse Effects of high-calcium diets in humans. **Nutr. Rev.**, v.55, p.1-9, 1997.
- WOOD, R. J., ZHENG J. J. High dietary calcium intakes reduce zinc absorption and balance in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.65, p.1803-1809, 1997.
- YOUNES, H., DEMIGNÉ, C., RÉMÉSY, C. Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. **Brit. J. Nutr.**, v.75, n.2, p.301-314, 1996.
- ZHU, Y. I., HAAS, J. D. Iron depletion without anemia and physical performance in young women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.66, n.2, p.334-341, 1997.

Efeito de Prebiótico (FOS), Probiótico (*Bifidobacterium longum*) e simbiótico (FOS + *B. longum*) associados a diferentes níveis de ferro na modulação da microbiota humana e na produção de ácidos orgânicos: estudo *in vitro*

1. Introdução

O aumento da oferta de alimentos fortificados com minerais é um fator muito explorado pela indústria. Também existe um crescente interesse na utilização de prebióticos e probióticos para aumentar a biodisponibilidade de minerais, notadamente cálcio, ferro e magnésio (OHTA et al., 1994, 1995, 1998, SAKAI et al., 2000a,b, SCHOLZ-AHRENS et al., 2002), no intuito de prevenir ou retardar o aparecimento de doenças como anemia e osteoporose.

Se por um lado a suplementação com ferro vem sendo utilizada na prevenção de anemia (SCHULTINK & DILLON, 1998; STOLTZFUS & DREYFUSS, 1999; BRASIL, 2000), por outro, experimentos com animais associam a suplementação com o agravamento de colite e desenvolvimento de carcinoma coloretal (LUND et al., 1998, REIFEN et al., 2000, SERIL et al., 2002).

Microbiologicamente, o ferro é um elemento essencial ao crescimento bacteriano, mas também está relacionado, por outro lado, com a viabilidade e patogenicidade de cepas bacterianas (KOCHAN et al., 1977). Os resultados encontrados previamente (capítulo anterior) indicam que não apenas os microrganismos interferem na absorção de minerais, mas a própria concentração de ferro pode vir a influir no crescimento e, ou, metabolismo de alguns microrganismos em diferentes graus.

No intuito de avaliar o efeito de ferro, associado ou não a prebiótico e probiótico, sobre a microbiota intestinal, foram realizados experimentos *in vitro* utilizando microbiota humana. Nestes modelos os resultados obtidos não levam em consideração a interferência de fatores do hospedeiro como absorção de nutrientes, estresse físico e, ou, emocional, limitando-se ao efeito dos constituintes sobre a microbiota.

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a influência de prebiótico (Raftilose® P95 - FOS), probiótico (*Bifidobacterium longum*) e simbiótico (FOS + *B. longum*), associados a diferentes concentrações de ferro sobre a microbiota colônica humana e a produção de ácidos orgânicos.

2. Material e Métodos

2.1. Origem da cultura utilizada como probiótico

A cultura de *Bifidobacterium longum* DMS 20219 foi obtida do Banco de Culturas do Laboratório de Microbiologia Intestinal, Food Microbiology Science Unit, University of Reading, UK. Esta cultura corresponde ao *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 utilizada previamente no Brasil. A cultura estava congelada a -70°C em tubos de Microbank™ cryogenic beads (Pro-Lab Diagnostics, Neston, Wirral, UK), estocados em Cryoboxes (Fisher Scientific, Loughborough, UK).

2.2. Obtenção do concentrado de células de *Bifidobacterium longum*

Para completa ativação, a cultura foi inicialmente estriada em uma placa de ágar BHI (Oxoid) suplementado com L-cisteína HCl 0,5% (Sigma) (BHIS). Após coloração de gram, para verificar a pureza da cultura, colônias típicas (pequenas, arredondadas, lisas, brilhantes e ligeiramente amarelada) foram selecionadas para serem repicadas por três vezes consecutivas em caldo BHIS, sendo o meio incubado a 37°C em condições de anaerobiose. Após a ativação, procedeu-se a repicagem em 500 mL de caldo BHIS mantendo as condições de incubação previamente descritas.

A cultura foi centrifugada a 7000 rpm por 15 minutos, a 4°C , em centrífuga refrigerada Heraeus Sepatech 12500 Varifuge 20 RS (Heraeus Instruments GmbH, KENDRO, Hanau, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o concentrado celular ressuspendido em 50 mL de leite desnatado reconstituído (LDR) a 7,5% previamente esterilizado a 115°C por 10 min. (10lb/10 min.), em tubos de centrifuga estéreis. O concentrado celular foi levado ao freezer a -70°C por 3 horas para o congelamento. Após congelamento, os tubos de centrifuga foram levados ao liofilizador por 72 horas. Retirou-se uma alíquota de 1 g para contagem de células viáveis de bifidobacteria em ágar sangue. O plaqueamento *pour-plate* foi feito utilizando-se diluições 10^{-5} até 10^{-9} , com incubação a 37°C por 72 horas, em câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific Limited, UK).

2.3. Delineamento experimental

O experimento foi montado em um esquema fatorial 4x3, utilizando-se 4 dietas (controle, probiótico, prebiótico e simbiótico) e 3 níveis de ferro (11,0274 mg FeSO₄/L meio; 22,0548 mg FeSO₄/L meio e 33,0822 mg FeSO₄/L meio), totalizando 12 tratamentos, com 2 repetições. Os níveis de ferro estudados correspondem a 50, 100 e 150% dos níveis recomendados na composição de meio de cultura e foram adicionados na forma de sulfato de ferro heptahidrato (Fe₂SO₄.7H₂O). A Tabela 1 mostra a composição do meio básico.

Tabela 1 – composição do meio basal para fermentação em modelo de culturas em série

Ingredientes	g/L
Água peptonada	2
Extrato de levedura	2
NaHCO ₃	2
Sais biliares	0,5
L- Cisteína HCL	0,5
NaCl	0,1
K ₂ HPO ₄	0,04
KH ₂ PO ₄	0,04
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,01
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,01
Tween 80	2 mL
Vit K1	10 µL
Solução de Resazurina	4 mL
FeSO ₄ .7H ₂ O	*

* Variável segundo o meio: 11,0274 mg (baixo ferro); 22,0548 mg (teor normal) ou 33,0822 mg (alto ferro).
Fonte: Protocolos internos do Food Microbiology Science Unit, School of Food Biosciences, Universidade de Reading.

2.4. Montagem do experimento

Os meios (135 mL), devidamente autoclavados, foram colocados nos vasos de fermentação de vidro (Soham Scientific, UK, com capacidade para 280 mL), com tampas de vidro com 4 portas (entrada de N₂, saída de ar, pHmetro, feeder – alimentador de NaOH 0,5M ou HCl 0,5M para manutenção de pH) fechadas por pressão (clamps) e mantidos em atmosfera de N₂ por 12 horas. Após este período, incorporou-se 1,5 g (1% do volume total) dos carboidratos-teste (amido, no caso de dieta controle e probiótico; ou Raftilose® P95,

Orafti, Bélgica, para dieta com prebiótico ou simbiótico) e 0,2 g da cultura celular (leite desnatado ou *B. longum*), seguindo-se a imediata incorporação de 15 mL de fezes previamente diluídas a 10% em tampão fosfato pH 7,2, totalizando 150 mL de meio inoculado. Os doadores foram adultos saudáveis, sem histórico de utilização de antibiótico ou mudança alimentar (viagens incluídas) no último mês. Cada repetição foi realizada com fezes de um doador diferente.

As amostras foram colhidas nos tempos 0, 5, 10 e 24 h de inoculação. Essas amostras foram divididas em alíquotas para serem analisadas por meio da técnica de Hibridização Fluorescente *In Situ* (*Fluorescence In Situ Hybridization* - FISH) e para determinação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), utilizando-se cromatografia gasosa.

2.5. Hibridização Fluorescente *In Situ* – FISH

A hibridização fluorescente *in situ* – FISH foi utilizada para determinação de bifidobactérias, bacteróides, clostrídios e contagem celular total. Empregou-se o protocolo interno do laboratório de microbiologia (*Food Microbial Science Unit*, Universidade de Reading), que consta de preparo da amostra, hibridização, enxague e contagem.

2.5.1. Preparo da amostra

- a) Colocaram-se 1125µl de solução de paraformaldeído a 4%, previamente esterilizado a frio (membrana Millipore 0,2µm) e 375µl da amostra em tubos Eppendorfs de 1,5 mL, em duplicata.
- b) O tubo foi misturado (Vortex) e mantido a 4°C por pelo menos 4 horas.
- c) Após este período, os Eppendorfs foram centrifugados a 6000xg por 5min (centrífuga Microcentaur, Sanyo Instruments, Sanyo Gallenkamp PLC, Holanda).
- d) O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspenso em 1mL de Tampão fosfato pH 7,2 (PBS) filtrado
- e) Os procedimento c) e d) foram repetidos
- f) O tubo foi centrifugado novamente
- g) Após a terceira centrifugação, tentou-se remover a maior quantidade de sobrenadante possível e cuidadosamente ressuspendeu-se o sedimento em 150µL de PBS filtrado
- h) Adicionaram-se 150µL de etanol 96% filtrado.

- i) Misturou-se, com auxílio de Vortex e a amostra foi estocada a -20°C . As amostras preparadas foram analisadas no período de 3 meses.

2.5.2. Hibridização

- a) Adicionaram-se $16\mu\text{L}$ da amostra (PBS/Etanol, -20°C) a $200\mu\text{L}$ de tampão de hibridização com dodecil sulfato de sódio (SDS) (Anexo 2) e $64\mu\text{L}$ de água para HPLC filtrada. Tanto o tampão quanto a água encontravam-se à temperatura de hibridização.
- b) A mistura foi mantida em estufa com a temperatura adequada de hibridização (50°C para bifidobactérias e clostrídios; 45°C para bacteróides), por pelo menos 5 minutos.
- c) Em um Eppendorf de $0,5\text{mL}$ adicionou-se a sonda ($50\text{ng}/\mu\text{L}$) e posteriormente a mistura da amostra, respeitando uma proporção de $5\mu\text{L}$ sonda + $45\mu\text{L}$ da amostra. Misturou-se com auxílio de Vortex.
- d) A mistura de hibridização permaneceu em estufas (calor seco) por uma noite, nas temperaturas adequadas para cada sonda (50°C para bifidobactérias e clostrídios; 45°C para bacteróides).

Sondas utilizadas (marcadas com Cy3 ou Cy5) (MWG Oligo, MGW-Biotech UK Ltd):

- Bif164 5'-CAT CCG GCA TTA CCA CCC-3' (bifidobactérias) (LANGENDIJK et al., 1995)
- Bac303 5'-CCA ATG TGG GGG ACC TT-3' (bacteróides) (MANZ et al., 1996)
- His150 5'-TTA TGC GGT ATT AAT CT(CT) CCT TT-3' (clostrídios e grupo histolítico) (FRANKS et al., 1998)

2.5.3. Enxagüe

- a) Adicionaram-se aproximadamente 5 mL tampão de hibridização para enxagüe, pré-aquecido e $20\mu\text{L}$ de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) ($500\text{ng}/\mu\text{L}$) em um tubo de 5mL (Sterilin).
- b) A seguir, foi adicionada a quantidade de mistura de hibridização (entre 5 e $100\mu\text{L}$, para as sondas e 2 ou 3 para DAPI). O tubo foi mantido em estufa de hibridização por pelo menos 30 min . A mistura de hibridização restante (com a sonda), foi recolocada na estufa para o caso de ser necessário repetir o procedimento.
- c) O conteúdo do tubo foi filtrado em membranas Millipore GTBP $0,2\mu\text{L}$, utilizando-se um sistema a vácuo. O tubo foi lavado com tampão de enxagüe, para retirar células que possam ter ficado sedimentadas.

- d) A membrana foi colocada sobre uma lâmina, posteriormente foi adicionada uma gota de reagente AntiFade (Qbiogene Molecular Cytogenetics, UK) e a lamínula.
- e) As lâminas assim preparadas foram mantidas protegidas de luminosidade a 4°C até o momento da contagem.

2.5.4. Contagem

- a) As lâminas foram retiradas da refrigeração pelo menos 10 min. antes da contagem.
- b) Foram colocadas no microscópio, com óleo de imersão e seleção da lente adequada.
- c) Para contar os microrganismos marcados foram utilizados filtro azul para DAPI (DM400) para DAPI e verde (DM510) para outras sondas.
- d) Foram contados todos os microrganismos marcados que se encontravam dentro do campo marcado em uma das objetivas do microscópio.
- e) Geralmente foram contados 15 campos por lâmina. Quando a contagem era muito alta e homogênea optou-se por contar apenas 10 campos. Como regra geral deve-se contar pelo menos 300 células no total.
- f) As lâminas foram refrigeradas ou descartadas, dependendo se esta seria posteriormente fotografada ou não.

2.5.5. Cálculo das concentrações

Para o cálculo utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Log UFC/mL} = \text{Log} (155,56 * \text{CC} * 4873,74 * (1000/\text{QU}))$$

onde CC= média das contagens dos campos (por amostra) e QU = quantidade da amostra utilizada para preparação da lâmina.

2.6. Determinação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta.

A determinação de concentração de ácidos graxos de cadeia curta foi feita empregando-se cromatografia gasosa (PEREIRA et al., **no prelo**).

Utilizou-se sistema Hewlett Packard 5890 Series II, com software HP 3365 series IX Chemostation APG-TPC, versão A.06.03, com coluna capilar de sílica fundida Permabond FFAP 0,25µm 25m x 0,32 mm (Macherey-Nagel, Alemanha). Como gás carreador

empregou-se hélio, a com um fluxo 2,42 ml/min. As temperaturas do injetor e detector, foram, respectivamente, 240°C (isoterma) e 250°C (isoterma), enquanto a temperatura inicial da coluna foi de 140°C. A pressão inicial foi estabelecida em 40Kpa. Os parâmetros de corrida foram um patamar inicial de 5 minutos a 140°C, com um aumento posterior de 20°C/ min até ser alcançada uma temperatura de 240°C, mantida por ulteriores 5 minutos. As amostras foram analisadas utilizando um padrão interno (ácido 2-etilbutírico 99% de pureza, densidade 0,924, peso molecular 116,16, na concentração de 3,7 mMol, correspondente a 470µL/L)

2.6.1. Preparo das amostras

- a) As amostras foram centrifugadas a 6000xg por 5 min (centrífuga Microcentaur, Sanyo Instruments, Sanyo Gallenkamp PLC, Holanda) para sedimentação de bactérias e sólidos.
- b) Filtrou-se o sobrenadante usando-se filtro polysulfone 0,2µm.
- c) Adicionaram-se 200µL da amostra centrifugada e filtrada a 800µL de acetonitrilo contendo 3,7mM de ácido 2-etilbutírico (padrão interno), previamente colocado em tubos de 2mL. A mistura foi mantida refrigerada até o momento da análise (-20°C). Em alguns casos houve precipitação, que se manteve no fundo do vidro. No momento da injeção foram tomados cuidados para evitar a aspiração e injeção desse precipitado.

2.6.2. Preparo dos padrões externos de ácidos orgânicos

Os ácidos utilizados para preparar os padrões, com suas características estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Características dos ácidos utilizados para a preparação dos padrões para cromatografia gasosa.

Padrões	Pureza (%)	PM (g/mol)	d (g/mL)	Laboratório
Acético	99,5	60,05	1,05	Sigma
Propiônico	99,0	74,08	0,99	Sigma
N-butírico	99,0	88,11	0,964	Sigma
DL-lático	98,0	90,08	1,165	Sigma
N-valérico	99,0	102,14	0,938	Sigma
Isovalérico	98,0	102,14	0,925	Fluka
Isobutírico	99,5	88,11	0,948	Fluka
N-capríco	99,5	116,2	0,93	Sigma

- a) Inicialmente foi preparado um padrão-mãe (mantido a -20°C), com que consistiu em incorporar 200mM de cada ácido a 1 L de acetonitrilo. Prepararam-se 20 mL deste padrão com os ácidos acético (230 μL), propiônico (302 μL), n-butírico (370 μL), DL-lático (316 μL), n-valérico (440 μL), isovalérico (450 μL), isobutírico (374 μL) e n-capróico (502 μL).
- b) A partir do padrão-mãe prepararam-se os padrões secundários: 100, 50, 25, 5 e 2,5mM.
- c) Os padrões injetados foram preparados a partir dos padrões secundários, tratando-os como se fossem amostras: 200 μL de padrão em 800 μL de acetonitrilo contendo padrão interno.
- d) Foram obtidos os seguintes padrões: P1 (0,5mM), P2 (1mM), P3 (5mM), P4 (10 mM) e P5 (20mM).
- e) Estes padrões foram utilizados para preparar a curva de calibração. O tempo de retenção esperado para cada ácido está citado na Tabela 3.

Tabela 3 - Tempo de retenção estimado para as condições previamente estipuladas, em análise de ácidos graxos de cadeia curta.

Ácido	Tempo de retenção (min)
Acético	1,815
Propiônico	2,179
Isobutírico	2,327
N-butírico	2,731
Isovalérico	3,061
N-valérico	3,770
2-etilbutírico (padrão interno)	4,039
N-capróico	5,355
L-lático	7,478
D-Lático	8,383

2.6.3. Cálculo das concentrações de ácidos orgânicos

Injetou-se 1 μL das amostras e padrões. A integração dos picos foi feita pelo sistema. Nos casos onde o próprio programa não fez os cálculos, utilizou-se a seguinte fórmula,

$$\frac{\text{Área do ácido}}{\text{Área PI}} = m \cdot \frac{\text{massa ácido}}{3.7} + b$$

onde área PI = área do padrão interno no cromatograma e (m) e (b) dependem de cada ácido (Tabela 4) sendo seus valores fornecidos pela Tabela de calibração. Uma vez obtido o resultado da concentração dos ácidos nas amostras (mMol), o valor foi multiplicado por 5 (diluição da amostra inicial), para a obtenção das concentrações por 1µL da amostra original.

Tabela 4 – Valores dos coeficientes (m) e (b) necessários para o cálculo de concentração dos ácidos, obtidos a partir da curva de calibração.

Ácido	m	b	Correlação
Acético	0,243714	0,052894	0,99834
Propiônico	0,362268	0,060735	0,99798
Isobutírico	0,478714	0,072752	0,99877
N-butírico	0,587180	0,118292	0,99916
Isovalérico	0,694132	0,083665	0,99892
N-valérico	0,720948	0,061354	0,99859
N-capróico	0,930519	0,071125	0,99808
L-lático	0,082158	0,021253	0,99253
D-Lático	0,192845	0,026038	0,99121

2.7. Análise estatística

O experimento foi montado segundo um esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas um esquema fatorial 4x3 (4 dietas, 3 níveis de ferro) e nas subparcelas o tempo de avaliação (5, 10 e 24 horas) em um delineamento inteiramente casualizado, com 2 repetições. Procedeu-se à análise de variância e regressão dos dados. Para o fator qualitativo (tipo de dieta) as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey, adotando-se um nível de 5% de probabilidade. Para os fatores quantitativos utilizou-se a técnica de superfície de resposta. Os modelos foram escolhidos baseados na significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o teste F e adotando-se um nível de até 10% de probabilidade, no coeficiente de determinação e nos fenômenos biológicos em estudo (alteração da quantidade de células totais - DAPI, bacteróides, bifidobacteria, clostrídios, ácidos graxos de cadeia curta). Independente da interação ser ou não significativa optou-se pelo desdobramento. As avaliações foram efetuadas utilizando-se o software SAEG (Sistema de Análise Estatística, Universidade Federal de Viçosa).

3. Resultados

3.1. Contagem total de células (DAPI), bifidobactérias, bacteróides e clostrídios determinados pelo método de FISH.

Os resultados da contagem total de células (DAPI) e de bifidobactérias (Log UFC/mL), nas duas repetições das dietas controle, adicionadas de prebiótico, probiótico ou simbiótico, em meios com diferentes níveis de ferro e a diferença entre os valores encontrados nos tempos 5, 10 e 24 e os valores iniciais de cada repetição estão indicados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

As alterações encontradas na contagem total, para as diferentes dietas fixando o tempo, não foram significativas (Tabela 7), resultado esperado pois a incorporação de FOS não objetiva influir na contagem total, mas no aumento da contagem em alguns grupos, como os de bactérias bífidas e diminuição de outros, como coliformes e clostrídios. A alteração de altos níveis populacionais como os já presentes nas amostras (10^{10} UFC/mL – Tabela 5) é mais difícil, pois esses números são indicativos de um ecossistema onde alcançou-se uma população estável. A possibilidade de aumento de 1 ciclo log em ambientes com alta concentração bacteriana é mais difícil do que em ambientes cujas populações se encontrem em níveis de 10^4 a 10^5 UFC/g ou mL. A avaliação estatística da modulação das bifidobactérias em presença das diferentes dietas encontra-se na Tabela 8.

Tabela 5 – Contagem celular total (DAPI) (Log UFC/g) dos recipientes contendo dietas controle ou adicionadas de probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg de sulfato ferroso/ L meio. Médias obtidas da contagem de 15 campos pelo método de FISH.

	11 mg FeSO ₄ /L			22 mg FeSO ₄ /L			33 mg FeSO ₄ /L		
	Tempo (h)	Log UFC/mL	Δ	Tempo (h)	Log UFC/mL	Δ	Tempo (h)	Log UFC/mL	Δ
Controle	0	10,14	-	0	10,30	-	0	10,32	-
	0	10,24	-	0	10,22	-	0	10,20	-
	5	10,33	0,19	5	10,37	0,07	5	10,48	0,16
	5	10,14	-0,10	5	10,23	0,01	5	10,33	0,13
	10	10,28	0,14	10	10,39	0,09	10	10,53	0,21
	10	10,25	0,01	10	10,27	0,05	10	10,29	0,09
	24	10,26	0,12	24	10,35	0,05	24	10,64	0,32
	24	10,37	0,13	24	10,46	0,24	24	10,48	0,28
<i>B. longum</i>	0	10,28	-	0	10,29	-	0	10,37	-
	0	10,34	-	0	10,40	-	0	9,99	-
	5	10,36	0,08	5	10,39	0,10	5	10,43	0,06
	5	10,30	-0,04	5	10,89	0,49	5	10,40	0,41
	10	10,54	0,26	10	10,56	0,27	10	10,45	0,08
	10	10,32	-0,02	10	10,77	0,37	10	10,37	0,38
	24	10,39	0,09	24	10,67	0,38	24	10,59	0,22
	24	10,57	0,23	24	10,92	0,52	24	10,58	0,59
FOS	0	10,36	-	0	10,31	-	0	10,33	-
	0	10,30	-	0	10,28	-	0	10,20	-
	5	10,43	0,08	5	10,42	0,11	5	10,45	0,12
	5	10,42	0,12	5	10,18	-0,10	5	10,60	0,40
	10	10,50	0,14	10	10,46	0,15	10	10,60	0,27
	10	10,48	0,18	10	10,48	0,20	10	10,59	0,39
	24	10,48	0,12	24	10,52	0,21	24	10,61	0,28
	24	10,69	0,39	24	10,70	0,42	24	10,75	0,55
Simbiótico	0	10,25	-	0	10,38	-	0	10,36	-
	0	10,50	-	0	10,26	-	0	10,32	-
	5	10,43	0,18	5	10,29	-0,09	5	10,57	0,21
	5	10,82	0,32	5	10,26	0,00	5	10,31	-0,01
	10	10,60	0,35	10	10,56	0,18	10	10,56	0,20
	10	10,65	0,15	10	10,48	0,22	10	10,69	0,37
	24	10,53	0,28	24	10,55	0,17	24	10,56	0,20
	24	10,65	0,15	24	10,60	0,34	24	10,65	0,33

Legenda: FOS= Raftilose® P95; simbiótico (*B. longum* + FOS), Δ = Diferença com relação ao tempo 0, da respectiva repetição.

Tabela 6 – Contagem de bifidobactérias (Log UFC/g) dos recipientes contendo dietas controle ou adicionadas de probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg de sulfato ferroso/ L meio. Médias obtidas da contagem de 15 campos pelo método de FISH.

		11 mg FeSO ₄ /L			22 mg FeSO ₄ /L			33 mg FeSO ₄ /L		
		Tempo (h)	Log UFC/mL	Δ	Tempo (h)	Log UFC/mL	Δ	Tempo (h)	Log UFC/mL	Δ
Controle	0	0	9,26	-	0	9,43	-	0	9,40	-
	0	0	9,20	-	0	9,11	-	0	9,05	-
	5	5	9,81	0,55	5	9,75	0,32	5	9,96	0,56
	5	5	9,08	-0,12	5	9,46	0,35	5	9,71	0,66
	10	10	9,72	0,46	10	9,92	0,49	10	9,74	0,34
	10	10	9,08	-0,12	10	9,46	0,35	10	9,76	0,71
	24	24	9,79	0,53	24	10,22	0,79	24	10,17	0,77
	24	24	8,51	-0,69	24	9,93	0,82	24	10,08	1,03
<i>B. longum</i>	0	0	9,39	-	0	9,48	-	0	9,40	-
	0	0	9,24	-	0	9,26	-	0	9,15	-
	5	5	9,81	0,42	5	9,89	0,41	5	9,81	0,41
	5	5	9,46	0,22	5	9,68	0,42	5	9,63	0,48
	10	10	9,74	0,35	10	9,69	0,21	10	9,98	0,58
	10	10	9,75	0,51	10	10,17	0,91	10	9,96	0,81
	24	24	10,07	0,68	24	10,10	0,62	24	10,16	0,76
	24	24	10,04	0,80	24	10,39	1,13	24	10,22	1,07
FOS	0	0	9,42	-	0	9,45	-	0	9,46	-
	0	0	9,07	-	0	9,04	-	0	9,13	-
	5	5	10,05	0,63	5	10,22	0,77	5	10,12	0,66
	5	5	9,42	0,35	5	9,53	0,49	5	9,67	0,54
	10	10	10,01	0,59	10	9,92	0,47	10	10,13	0,67
	10	10	9,92	0,85	10	10,17	1,13	10	10,14	1,01
	24	24	10,10	0,68	24	10,18	0,73	24	10,02	0,56
	24	24	10,07	1,00	24	10,13	1,09	24	10,14	1,01
Simbiótico	0	0	9,40	-	0	9,46	-	0	9,47	-
	0	0	9,35	-	0	9,03	-	0	9,17	-
	5	5	10,07	0,67	5	9,97	0,51	5	10,06	0,59
	5	5	10,18	0,83	5	9,37	0,34	5	9,75	0,58
	10	10	10,10	0,70	10	9,74	0,28	10	10,09	0,62
	10	10	10,28	0,93	10	10,17	1,14	10	10,11	0,94
	24	24	10,19	0,79	24	9,99	0,53	24	10,04	0,57
	24	24	10,31	0,96	24	10,03	1,00	24	10,43	1,26

Legenda: FOS= Raftilose® P95; simbiótico (*B. longum* + FOS), Δ = Diferença com relação ao tempo 0, da respectiva repetição.

Tabela 7 – Diferença entre a contagem total – DAPI (Log UFC/mL) nos diferentes tempos (h) e a contagem inicial (tempo 0) em dietas controle ou adicionadas de probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg de sulfato ferroso/L.

Dieta/	T=5 h			T=10 h			T=24 h		
	11	22	33	11	22	33	11	22	33
Nível Fe (mg/L)									
Controle	0,05 ^a	0,04 ^a	0,15 ^a	0,07 ^a	0,07 ^a	0,15 ^a	0,12 ^a	0,15 ^a	0,31 ^a
Probiótico	0,02 ^a	0,29 ^a	0,24 ^a	0,12 ^a	0,32 ^a	0,23 ^a	0,17 ^a	0,45 ^a	0,40 ^a
Prebiótico	0,10 ^a	0,00 ^a	0,26 ^a	0,16 ^a	0,18 ^a	0,33 ^a	0,25 ^a	0,32 ^a	0,41 ^a
Simbiótico	0,25 ^a	-0,04 ^a	0,10 ^a	0,25 ^a	0,20 ^a	0,29 ^a	0,22 ^a	0,26 ^a	0,27 ^a

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 8 – Diferença entre a contagem de bifidobactérias (Log UFC/mL) nos diferentes tempos (h) e a contagem inicial (tempo 0) em dietas controle ou adicionadas de probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg de sulfato ferroso/L.

Dieta/	T=5 h			T=10 h			T=24 h		
	11	22	33	11	22	33	11	22	33
Nível Fe (mg/L)									
Controle	0,22 ^a	0,33 ^a	0,61 ^a	0,17 ^a	0,42 ^a	0,52 ^a	-0,08 ^b	0,80 ^a	0,90 ^a
Probiótico	0,32 ^a	0,42 ^a	0,44 ^a	0,43 ^a	0,56 ^a	0,69 ^a	0,74 ^{ab}	0,88 ^a	0,91 ^a
Prebiótico	0,49 ^a	0,63 ^a	0,60 ^a	0,72 ^a	0,80 ^a	0,84 ^a	0,84 ^a	0,91 ^a	0,78 ^a
Simbiótico	0,75 ^a	0,42 ^a	0,58 ^a	0,81 ^a	0,70 ^a	0,77 ^a	0,87 ^a	0,76 ^a	0,91 ^a

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados significativos ($p < 0,05$) foram observados nas amostras obtidas no tempo 24 h. Não houve diferença ($p > 0,05$) na contagem total de células (DAPI). No entanto, verifica-se um aumento na concentração ($p < 0,05$) de bifidobactérias nas dietas contendo prebiótico e simbiótico com menor teor de ferro (11mg FeSO₄/L meio), no tempo 24 h (Tabela 8).

A incorporação de FOS aumentou a população de bifidobactérias, o que corrobora resultados anteriores indicados por GIBSON et al. (1995), BOUHNİK et al. (1996), DJOUZI & ANDRIEUX (1997), ALANDER et al. (1999) e GIBSON (1999). No entanto, incorporação da própria bactéria bífida (*B. longum*) não alterou ($p > 0,05$) os níveis desse grupo. Esse resultado foi semelhante ao observado por GALLAHER et al. (1996), que trabalharam com ratos suplementados com FOS (2%), bifidobactérias (10⁸ UFC/dia) ou FOS + bifidobactéria, e por AMANN et al. (1998), que trabalharam com seres humanos. O resultado também é semelhante ao observado durante a experimentação *in vivo* (com ratos) (Capítulo 4). A quantidade adicionada de bactérias bífidas (10⁷ UFC) nesta experimentação foi muito menor do que a flora residente normal, observada nos controles (10⁸ e 10⁹ – Tabela 6). Portanto a sua influência sobre o total somente seria esperado se fosse uma cepa altamente competitiva e com uma taxa de crescimento superior à das espécies endógenas, indicando que a ingestão de probióticos (nos níveis de 10⁷ UFC) não é suficiente para alterar um ambiente microbiano estável (hospedeiro saudável). O benefício da ingestão de probióticos deve ser considerado em situações de prevenção de crescimento de microrganismos indesejáveis da flora subdominante. O efeito benéfico seria alcançado por competição pelos sítios de adesão, por nutrientes, por meio da ação de bacteriocinas, diminuição do pH ou outros fatores (ANAND et al., 1984, PIARD & DESMAZEAUD, 1991, SILVA et al., 1999). Deve-se considerar ainda que fatores externos (patógenos, intoxicação ou infecção, entre outros) ou internos (estresse, alergia alimentar) podem possibilitar desequilíbrios na microbiota endógena, favorecendo grupos potencialmente patógenos.

As contagens de bacteróides e clostrídios (Log UFC/mL), nas duas repetições das dietas controle, adicionadas de prebiótico, probiótico ou simbiótico, em meios com diferentes níveis de ferro e a diferença entre os valores encontrados nos tempos 5, 10 e 24 e os valores iniciais de cada repetição estão indicados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. As variações nas concentrações de bacteróides foram pequenas, porém constantes, observando-se uma diminuição inicial da população (tempo 5 h) com posterior aumento, maior nos recipientes que receberam probiótico, independente do nível de ferro da dieta. Isto indicaria um possível efeito sinérgico entre *B. longum* e bacteróides, provavelmente devido aos metabólitos formados, uma vez que o aumento é verificado a partir das amostras do tempo 10 h, quando se verificaria uma concentração de metabólitos suficiente para a estimulação do aumento da população de bacteróides.

Tabela 9 – Contagem de bacteróides (Log UFC/g) dos recipientes contendo dietas controle ou adicionadas de probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg de sulfato ferroso/ L meio. Médias obtidas da contagem de 15 campos pelo método de FISH.

	11 mg FeSO4/L			22 mg FeSO4/L			33 mg FeSO4/L		
	Tempo (h)	Log UFC/mL	Δ	Tempo (h)	Log UFC/mL	Δ	Tempo (h)	Log UFC/mL	Δ
Controle	0	7,97	-	0	9,13	-	0	9,27	-
	0	9,03	-	0	9,15	-	0	8,99	-
	5	8,11	0,14	5	8,60	- 0,53	5	9,09	- 0,18
	5	8,03	- 1,00	5	8,59	- 0,56	5	8,78	- 0,21
	10	8,00	0,03	10	9,28	0,15	10	9,92	0,65
	10	8,36	-0,67	10	9,01	-0,14	10	9,44	0,45
	24	9,38	1,41	24	9,73	0,60	24	10,13	0,86
	24	8,43	- 0,60	24	9,54	0,39	24	9,86	0,87
<i>B. longum</i>	0	9,30	-	0	9,11	-	0	9,28	-
	0	8,97	-	0	9,24	-	0	9,14	-
	5	9,02	- 0,28	5	8,61	- 0,50	5	9,14	- 0,14
	5	9,02	0,05	5	9,50	0,26	5	9,02	- 0,12
	10	9,34	0,04	10	9,77	0,66	10	9,79	0,51
	10	9,66	0,69	10	10,05	0,81	10	9,74	0,60
	24	9,81	0,51	24	9,62	0,51	24	10,27	0,99
	24	9,79	0,82	24	10,21	0,97	24	9,88	0,74
FOS	0	9,33	-	0	9,37	-	0	9,25	-
	0	9,09	-	0	9,10	-	0	9,07	-
	5	9,21	- 0,12	5	9,10	- 0,27	5	9,06	- 0,19
	5	8,82	- 0,27	5	8,64	- 0,46	5	8,57	- 0,50
	10	9,61	0,28	10	9,52	0,15	10	9,68	0,43
	10	9,11	0,02	10	9,25	0,15	10	9,14	0,07
	24	9,58	0,25	24	9,67	0,30	24	9,68	0,43
	24	9,38	0,29	24	9,36	0,26	24	9,37	0,30
Simbiótico	0	9,34	-	0	9,33	-	0	9,25	-
	0	9,37	-	0	9,09	-	0	9,14	-
	5	9,10	- 0,24	5	9,01	- 0,32	5	9,09	- 0,16
	5	9,53	0,16	5	8,62	- 0,47	5	8,91	- 0,23
	10	9,51	0,17	10	9,34	0,01	10	9,64	0,39
	10	9,51	0,14	10	9,11	0,02	10	9,29	0,15
	24	9,87	0,53	24	9,82	0,49	24	9,75	0,50
	24	9,88	0,51	24	9,32	0,23	24	9,47	0,33

Legenda: FOS= Raftilose® P95; simbiótico (*B. longum* + FOS), Δ = Diferença com relação ao tempo 0, da respectiva repetição.

Tabela 10 – Contagem de clostrídios (Log UFC/g) dos recipientes contendo dietas controle ou adicionadas de probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg de sulfato ferroso/ L meio. Médias obtidas da contagem de 15 campos pelo método de FISH.

	11 mg FeSO ₄ /L			22 mg FeSO ₄ /L			33 mg FeSO ₄ /L		
	Tempo (h)	Log UFC/mL	Δ	Tempo (h)	Log UFC/mL	Δ	Tempo (h)	Log UFC/mL	Δ
Controle	0	7,84	-	0	6,79	-	0	7,47	-
	0	7,57	-	0	7,64	-	0	7,47	-
	5	9,47	1,63	5	8,96	2,17	5	8,69	1,22
	5	7,42	-0,15	5	8,82	1,18	5	7,83	0,36
	10	9,55	1,71	10	9,19	2,40	10	8,94	1,47
	10	8,13	0,56	10	7,47	-0,17	10	7,49	0,02
	24	9,17	1,33	24	8,85	2,06	24	8,21	0,74
	24	9,23	1,66	24	7,60	-0,04	24	8,44	0,97
<i>B. longum</i>	0	7,53	-	0	7,03	-	0	7,49	-
	0	7,68	-	0	8,52	-	0	7,59	-
	5	8,82	1,29	5	9,34	2,31	5	8,39	0,90
	5	8,89	1,21	5	8,91	0,39	5	8,13	0,54
	10	8,91	1,38	10	9,25	2,22	10	8,90	1,41
	10	7,30	-0,38	10	7,27	-1,25	10	7,42	-0,17
	24	8,99	1,46	24	8,70	1,67	24	8,82	1,33
	24	7,49	-0,19	24	7,53	-0,99	24	7,64	0,05
FOS	0	7,71	-	0	7,44	-	0	7,59	-
	0	7,49	-	0	7,44	-	0	7,51	-
	5	8,92	1,21	5	8,78	1,34	5	8,64	1,05
	5	8,98	1,49	5	9,13	1,69	5	9,13	1,62
	10	9,41	1,70	10	9,40	1,96	10	9,14	1,55
	10	8,26	0,77	10	8,77	1,33	10	8,54	1,03
	24	9,58	1,87	24	8,64	1,20	24	9,88	2,29
	24	7,79	0,30	24	7,49	0,05	24	7,65	0,14
Simbiótico	0	7,73	-	0	7,68	-	0	7,39	-
	0	8,55	-	0	7,53	-	0	7,49	-
	5	8,91	1,18	5	8,75	1,07	5	8,76	1,37
	5	8,39	-0,16	5	9,10	1,57	5	9,25	1,76
	10	9,32	1,59	10	8,95	1,27	10	9,40	2,01
	10	7,97	-0,58	10	8,80	1,27	10	8,53	1,04
	24	9,18	1,45	24	8,75	1,07	24	9,76	2,37
	24	7,42	-1,13	24	7,53	0,00	24	7,81	0,32

Legenda: FOS= Raftilose® P95; simbiótico (*B. longum* + FOS), Δ = Diferença com relação ao tempo 0, da respectiva repetição.

Nas Tabelas 11 e 12 encontram-se as médias referentes a bacteróides e clostrídios, respectivamente.

As concentrações de bacteróides e clostrídios não foram diferentes ($p > 0,05$) nas dietas avaliadas, para todos os tempos e níveis de ferro, indicando que o FOS e, ou, *B. longum* não alteraram estes grupos nas primeiras 24 h de fermentação. A presença de amido no controle também deve ser considerada para a avaliação desses resultados. A comparação nesta experimentação foi realizada entre recipientes contendo FOS ou amido, mas este último não representa uma condição fisiológica. Em um organismo normal o amido é fracionado e absorvido na sua quase totalidade no intestino delgado, sendo muito pequena a quantidade que alcança o cólon. Além disso, a fermentação de amido é realizada com maior facilidade por alguns grupos bacterianos como *Bacteróides* (*B. bivius*, *B. disiens*, *B. distasonis*, *B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. intermedius*, *B. melaninogenicus*, *B. oralis*, *B. ovatus*, *B. vulgatus*), *Clostridium botulinum* tipos A, B e F, *C. butyricum*, *C. perfringens*, *C. disporicum*, *Pediococcus dextranicus* (LEVETT, 1991; HIPPE et al., 1992; WEISS, 1992), o que indica uma seletividade desse substrato. O grupo de bifidobactérias, por exemplo, apresenta espécies que fermentam amido, como *B. adolescentis*, *B. pseudolongum* e *B. dentium*, porém as mais comuns (*B. longum*, *B. infantis*, *B. bifidum* e *B. breve*) não fermentam este carboidrato (SCARDOVI, 1986). Desta forma, a utilização de fermentações em série seria um sistema válido apenas para a comparação de diferentes oligosacarídeos, que fisiologicamente alcançariam o cólon para fermentação seletiva. No caso de um controle, sugere-se a utilização de placebo (silicone ou mesmo celulose, substrato que não é normalmente digerido pela microbiota intestinal), que supriria o volume incorporado como oligosacarídeo, mas inerte para fermentação bacteriana. Portanto, a ação prebiótica de raftilose pode ter sido mascarada pela comparação de resultados obtidos com a utilização de amido.

Tabela 11 – Diferença entre a contagem de bacteróides (Log UFC/mL) nos diferentes tempos (h) e a contagem inicial (tempo 0) em dietas controle ou adicionadas de probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg de sulfato ferroso/L.

Dieta/	T=5 h			T=10 h			T=24 h		
	11	22	33	11	22	33	11	22	33
Nível Fe (mg/L)									
Controle	-0,43 ^a	-0,55 ^a	-0,19 ^a	-0,32 ^a	0,01 ^a	0,55 ^a	0,41 ^a	0,50 ^a	0,87 ^a
Probiótico	-0,11 ^a	-0,13 ^a	-0,14 ^a	0,37 ^a	0,73 ^a	0,55 ^a	0,67 ^a	0,74 ^a	0,86 ^a
Prebiótico	-0,19 ^a	-0,37 ^a	-0,35 ^a	0,15 ^a	0,15 ^a	0,25 ^a	0,27 ^a	0,28 ^a	0,36 ^a
Simbiótico	-0,04 ^a	-0,40 ^a	-0,19 ^a	0,16 ^a	0,01 ^a	0,27 ^a	0,52 ^a	0,35 ^a	0,42 ^a

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 12 – Diferença entre a contagem de clostrídios (Log UFC/mL) nos diferentes tempos (h) e a contagem inicial (tempo 0) em dietas controle ou adicionadas de probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg de sulfato ferroso/L.

Dieta/	T=5 h			T=10 h			T=24 h		
	11	22	33	11	22	33	11	22	33
Nível Fe (mg/L)									
Controle	0,74 ^a	1,68 ^a	0,79 ^a	1,13 ^a	1,12 ^a	0,75 ^a	1,50 ^a	1,02 ^a	0,86 ^a
Probiótico	1,25 ^a	1,35 ^a	0,72 ^a	0,50 ^a	0,48 ^a	0,62 ^a	0,63 ^a	0,34 ^a	0,69 ^a
Prebiótico	1,35 ^a	1,52 ^a	1,34 ^a	1,24 ^a	1,64 ^a	1,29 ^a	1,09 ^a	0,62 ^a	1,22 ^a
Simbiótico	0,51 ^a	1,32 ^a	1,56 ^a	0,50 ^a	1,27 ^a	1,53 ^a	0,16 ^a	0,54 ^a	1,34 ^a

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

A Tabela 13 indica as equações de regressão para as diferentes dietas, em função do nível de ferro e do tempo.

Tabela 13 – Equações ajustadas para contagem celular total (DAPI), bacteróides, bifidobactérias e clostrídios (Log UFC/mL), em função de nível de ferro (mg/L) e tempo (h) em experimentos com fermentação em culturas em série utilizando dietas controle, probiótico, prebiótico ou simbiótico.

Dieta	Variável	Equações Ajustadas	r ²
1	DAPI	D ₁ = $\hat{y} = - 0,0752197 + 0,00538124^* \text{Fe} + 0,00616109^* \text{T}$	0,8234
2		D ₂ = $\hat{y} = 0,0455154 + 0,00843515^* \text{Fe} + 0,00836116^{***} \text{T}$	0,6235
3		D ₃ = $\hat{y} = - 0,0730882 + 0,00745794^* \text{Fe} + 0,0102129^{**} \text{T}$	0,7931
4		D ₄ = $\hat{y} = 0,452517 - 0,0344287^{***} \text{Fe} + 0,000755424^{***} \text{Fe}^2 + 0,00596999^{***} \text{T}$	0,4264
1	Bacteróides	D ₁ = $\hat{y} = - 1,05746 + 0,0237151^* \text{Fe} + 0,0483283^{**} \text{T}$	0,8798
2		D ₂ = $\hat{y} = 0,442574 - 0,0754892^* \text{Fe} + 0,0016604^* \text{Fe}^2 + 0,0309748^{**} \text{T}$	0,8698
3		D ₃ = $\hat{y} = - 0,288223 + 0,0269691^{**} \text{T}$	0,6780
4		D ₄ = $\hat{y} = 0,280077 + 0,0309748^{**} \text{T}$	0,8940
1	Bifidobactérias	D ₁ = $\hat{y} = - 0,40507 + 0,0260062^{**} \text{Fe}$	0,9414
2		D ₂ = $\hat{y} = 0,114825 + 0,00839954^{***} \text{Fe} + 0,0229506^{**} \text{T}$	0,9670
3		D ₃ = $\hat{y} = 0,578305 + 0,0119775^* \text{T}$	0,6953
4		D ₄ = $\hat{y} = 0,572747 + 0,0123203^{***} \text{T}$	0,7968
1	Clostrídios	D ₁ = $\hat{y} = 1,0646$	
2		D ₂ = $\hat{y} = 0,7324$	
3		D ₃ = $\hat{y} = 1,2566$	
4		D ₄ = $\hat{y} = - 0,117404 + 0,0493053^* \text{Fe}$	0,9869

D₁ = Dieta controle; D₂ = dieta com probiótico (*Bifidobacterium longum*); D₃ = dieta com prebiótico (Raftilose® P95); D₄ = dieta com simbiótico (*B. longum* + Raftilose® P95)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de F.

*** significativo ao nível de 10% de probabilidade pelo teste de F.

O nível de ferro influencia de forma diferenciada a concentração dos diferentes parâmetros avaliados, dependendo da dieta experimental. A contagem total (DAPI) aumenta com o nível de ferro e o tempo de fermentação, enquanto bacteróides e bifidobactérias são positivamente influenciados pelo nível de ferro nas dietas controle (D₁ = $\hat{y} = - 1,05746 + 0,0237151^* \text{Fe} + 0,0483283^{**} \text{T}$ e D₁ = $\hat{y} = - 0,40507 + 0,0260062^{**} \text{Fe}$, respectivamente) e com probiótico. As equações ajustadas mostram que o nível de ferro alterou positivamente a contagem de clostrídios nas dietas com simbiótico (D₄ = $\hat{y} = - 0,117404 + 0,0493053^* \text{Fe}$). O fator tempo exerce influência na contagem total (DAPI), bacteróides e bifidobactérias, independente da dieta, exceto no caso de contagem

de bifidobactérias da dieta controle, onde apenas o nível de ferro exerce influência positiva ($p < 0,01$).

Os resultados dessa experimentação indicam que o tempo, como esperado, influencia positivamente o crescimento bacteriano. A utilização de uma fonte de energia (amido ou FOS) promove a multiplicação celular (aumento da contagem celular total – DAPI).

O ferro é essencial para o metabolismo bacteriano e seu aumento no meio pode vir a estimular o crescimento ou patogenicidade de alguns grupos, como *Escherichia coli* e bacilo da tuberculose (KOCHAN et al., 1977). Ao mesmo tempo um excesso de ferro pode tornar-se tóxico tanto para as células entéricas quanto para as células bacterianas, por sua participação na formação de radicais livres (REIFEN et al., 2000, SERIL et al., 2002).

A equação encontrada para bifidobactérias para dieta controle ($D_1 = \hat{y} = -0,40507 + 0,0260062^{**}Fe$) indica que é necessário um nível mínimo (15,576 mg/L) para a manutenção do nível desse grupo, enquanto a equação para clostrídios para dieta adicionada com simbiótico ($D_4 = \hat{y} = -0,117404 + 0,0493053^*Fe$) sugere que este grupo também necessitaria de um nível mínimo de ferro (2,381 mg/L). Teores de ferro inferiores resultariam em decréscimo da população, indicando que o ferro, nos meios citados, é essencial para a manutenção e crescimento de bifidobactérias e clostrídios.

O grupo dos clostrídios apresenta a característica de esporular quando em condições adversas, que podem ser traduzidas por estresse osmótico, nutricional ou populacional. Durante a leitura das lâminas observou-se um acentuado aumento na contagem de clostrídios nas amostras colhidas no tempo 5 h, porém nas amostras colhidas nos tempos 10 e 24 h observou-se um grande número de esporos formados (Foto 1), o que pode estar relacionado com a ausência do efeito de tempo sobre o seu crescimento. A esporulação pode ter resultado de um excesso de microrganismos em um ambiente onde os nutrientes começaram diminuir (o sistema utilizado era fechado, sem renovação dos constituintes).

3.2. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta.

A concentração de ácidos acético, propiônico e n-butírico (mMol/ μ L), nas duas repetições das dietas controle, adicionadas de prebiótico, probiótico ou simbiótico, em meios com diferentes níveis de ferro e a diferença entre os valores encontrados nos tempos 5, 10 e 24 e os valores iniciais de cada repetição estão indicados nas Tabelas 14, 15 e 16, respectivamente.

A partir desses resultados, utilizaram-se os valores referentes à diferença das concentrações observadas nos diversos tempos com as observadas no tempo 0 h, para as respectivas análises estatísticas (Tabelas 17, 18 e 19).

Os outros ácidos graxos analisados (isobutírico, isovalérico, n-valérico e capróico) foram detectados em pequena concentração, nas amostras de 10 e, ou, 24h (Tabelas 20, 21 e 22).

Foto 1 – Amostra do tempo 10h, de dieta controle com baixo teor de sulfato ferroso, preparada com sonda HIS150

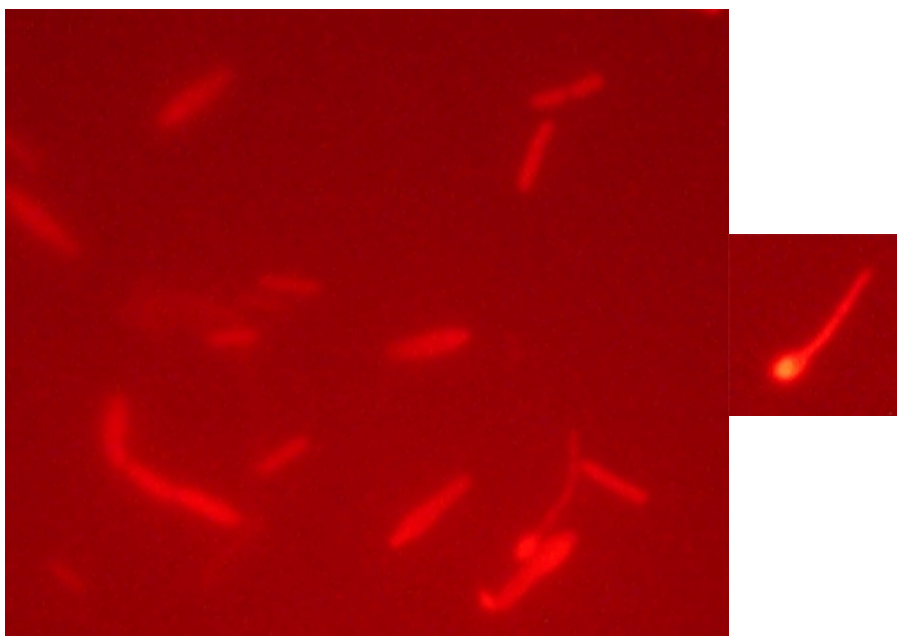


Tabela 14 – Concentração de ácido acético (mMol/μL) dos recipientes contendo dietas controle ou adicionadas de probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg de sulfato ferroso/ L meio.

	11 mg FeSO4/L			22 mg FeSO4/L			33 mg FeSO4/L		
	Tempo (h)	mMol/μL	Δ	Tempo (h)	mMol/μL	Δ	Tempo (h)	mMol/μL	Δ
Controle	0	0,00	-	0	1,41	-	0	1,57	-
	0	0,59	-	0	0,00	-	0	0,00	-
	5	4,81	4,81	5	4,06	2,65	5	1,31	-0,26
	5	2,66	2,07	5	9,45	9,45	5	8,28	8,28
	10	10,24	10,24	10	6,28	4,87	10	4,72	3,15
	10	4,33	3,74	10	12,81	12,81	10	15,64	15,64
	24	4,77	4,77	24	5,32	3,91	24	9,20	7,63
	24	2,90	2,31	24	23,61	23,61	24	18,82	18,82
<i>B. longum</i>	0	0,00	-	0	2,20	-	0	0,00	-
	0	3,50	-	0	0,00	-	0	0,00	-
	5	5,74	5,74	5	5,46	3,26	5	0,00	0,00
	5	5,55	2,05	5	4,96	4,96	5	9,68	9,68
	10	9,69	9,69	10	8,48	6,28	10	2,17	2,17
	10	15,33	11,83	10	11,80	11,8	10	13,87	13,87
	24	4,74	4,74	24	9,00	6,8	24	6,81	6,81
	24	4,54	1,04	24	9,51	9,51	24	17,85	17,85
FOS	0	3,74	-	0	2,83	-	0	0,00	-
	0	0,00	-	0	0,25	-	0	0,00	-
	5	9,30	5,56	5	3,10	0,27	5	4,11	4,11
	5	7,98	7,98	5	7,13	6,88	5	7,31	7,31
	10	9,56	5,82	10	15,40	12,57	10	3,82	3,82
	10	11,49	11,49	10	14,13	13,88	10	11,44	11,44
	24	12,54	8,80	24	9,39	6,56	24	9,71	9,71
	24	21,20	21,2	24	16,67	16,42	24	15,62	15,62
Simbiótico	0	0,00	-	0	5,52	-	0	1,25	-
	0	2,26	-	0	0,64	-	0	0,00	-
	5	5,67	5,67	5	7,21	1,69	5	3,64	2,39
	5	7,66	5,40	5	6,02	5,38	5	7,91	7,91
	10	10,31	10,31	10	9,66	4,14	10	7,76	6,51
	10	10,44	8,18	10	14,24	13,6	10	12,84	12,84
	24	6,09	6,09	24	12,45	6,93	24	10,97	9,72
	24	11,44	9,18	24	17,48	16,84	24	17,91	17,91

Legenda: FOS= Raftilose® P95; simbiótico (*B. longum* + FOS), Δ = Diferença com relação ao tempo 0, da respectiva repetição.

Tabela 15 – Concentração de ácido propiônico (mMol/μL) dos recipientes contendo dietas controle ou adicionadas de probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg de sulfato ferroso/ L meio.

		11 mg FeSO ₄ /L			22 mg FeSO ₄ /L			33 mg FeSO ₄ /L		
		Tempo (h)	mMol/μL	Δ	Tempo (h)	mMol/μL	Δ	Tempo (h)	mMol/μL	Δ
Controle	0	0,00	-		0	0,00	-	0	0,00	-
	0	0,00	-		0	0,00	-	0	0,00	-
	5	0,00	0		5	0,00	0	5	0,00	0
	5	0,00	0		5	0,12	0,12	5	0,00	0
	10	0,51	0,51		10	0,00	0	10	0,00	0
	10	2,28	2,28		10	1,44	1,44	10	1,65	1,65
	24	0,00	0		24	0,00	0	24	0,00	0
	24	1,22	1,22		24	5,14	5,14	24	3,52	3,52
<i>B. longum</i>	0	0,00	-		0	0,00	-	0	0,00	-
	0	1,16	-		0	0,00	-	0	0,00	-
	5	0,00	0		5	0,00	0	5	0,00	0
	5	2,54	1,38		5	0,00	0	5	0,00	0
	10	0,56	0,56		10	0,00	0	10	0,00	0
	10	3,55	2,39		10	1,56	1,56	10	2,09	2,09
	24	0,00	0		24	0,75	0,75	24	1,51	1,51
	24	0,70	-0,46		24	2,15	2,15	24	4,90	4,9
FOS	0	0,00	-		0	0,00	-	0	0,00	-
	0	0,00	-		0	0,32	-	0	0,00	-
	5	0,18	0,18		5	0,00	0	5	0,00	0
	5	0,00	0		5	0,00	-0,32	5	0,00	0
	10	0,78	0,78		10	2,09	2,09	10	0,00	0
	10	0,79	0,79		10	1,98	1,66	10	1,48	1,48
	24	3,40	3,4		24	0,94	0,94	24	2,19	2,19
	24	10,38	10,38		24	4,69	4,37	24	5,81	5,81
Simbiótico	0	0,00	-		0	0,00	-	0	0,00	-
	0	0,00	-		0	0,19	-	0	0,00	-
	5	0,00	0,00		5	0,00	0,00	5	0,00	0,00
	5	0,00	0,00		5	0,00	-0,19	5	0,00	0,00
	10	0,44	0,44		10	0,41	0,41	10	1,04	1,04
	10	1,83	1,83		10	1,75	1,56	10	2,35	2,35
	24	0,00	0,00		24	1,99	1,99	24	2,20	2,2
	24	2,63	2,63		24	6,16	5,97	24	5,27	5,27

Legenda: FOS= Raftilose® P95; simbiótico (*B. longum* + FOS), Δ = Diferença com relação ao tempo 0, da respectiva repetição.

Tabela 16 – Concentração de ácido n-butírico (mMol/μL) dos recipientes contendo dietas controle ou adicionadas de probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg de sulfato ferroso/ L meio.

	11 mg FeSO ₄ /L			22 mg FeSO ₄ /L			33 mg FeSO ₄ /L		
	Tempo (h)	mMol/μL	Δ	Tempo (h)	mMol/μL	Δ	Tempo (h)	mMol/μL	Δ
Controle	0	0,00	-	0	0,00	-	0	0,00	-
	0	2,18	-	0	0,00	-	0	0,33	-
	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00
	5	0,00	- 2,18	5	0,00	0,00	5	0,00	- 0,33
	10	1,49	1,49	10	0,00	0,00	10	0,81	0,81
	10	1,65	1,65	10	0,00	0,00	10	0,17	0,17
	24	2,05	2,05	24	0,94	0,94	24	3,06	3,06
	24	2,71	2,71	24	8,97	8,97	24	4,49	4,49
<i>B. longum</i>	0	0,00	-	0	0,00	-	0	0,00	-
	0	3,96	-	0	0,00	-	0	0,68	-
	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00
	5	0,00	- 3,96	5	0,00	0,00	5	0,00	- 0,68
	10	2,08	2,08	10	1,51	1,51	10	0,00	0,00
	10	2,36	2,36	10	1,32	1,32	10	0,54	0,54
	24	1,67	1,67	24	3,84	3,84	24	2,32	2,32
	24	2,65	2,65	24	1,98	1,98	24	5,43	5,43
FOS	0	0,00	-	0	0,00	-	0	0,00	-
	0	0,00	-	0	1,20	-	0	0,00	-
	5	0,58	0,58	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00
	5	0,00	0,00	5	0,00	- 1,20	5	6,71	6,71
	10	2,58	2,58	10	0,15	0,15	10	1,07	1,07
	10	0,00	0,00	10	0,00	0,00	10	0,00	0,00
	24	4,92	4,92	24	2,97	2,97	24	0,56	0,56
	24	17,00	17,00	24	2,25	2,25	24	0,00	0,00
Simbiótico	0	0,00	-	0	0,09	-	0	0,00	-
	0	0,00	-	0	2,10	-	0	0,00	-
	5	0,00	0,00	5	0,00	- 0,09	5	0,00	0,00
	5	0,00	0,00	5	0,00	- 2,10	5	0,00	0,00
	10	2,50	2,50	10	1,35	1,35	10	2,28	2,28
	10	2,41	2,41	10	0,00	0,00	10	0,04	0,04
	24	4,25	4,25	24	4,62	4,62	24	4,41	4,41
	24	4,52	4,52	24	10,94	10,94	24	8,48	8,48

Legenda: FOS= Raftilose® P95; simbiótico (*B. longum* + FOS), Δ = Diferença com relação ao tempo 0, da respectiva repetição.

Tabela 17 – Diferença entre a concentração de ácido acético (mMol/ μ L) nos diferentes tempos (h) e a concentração inicial (tempo 0) em dietas controle ou adicionadas com probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg FeSO₄/L.

Dieta/	T=5			T=10			T=24		
	11	22	33	11	22	33	11	22	33
Nível Fe (mg/L)									
Controle	3,44 ^a	6,05 ^a	4,14 ^a	6,99 ^a	8,84 ^a	9,39 ^a	3,53 ^a	13,76 ^a	13,35 ^a
Probiótico	3,89 ^a	4,11 ^a	4,84 ^a	10,76 ^a	9,04 ^a	8,02 ^a	2,89 ^a	8,15 ^a	12,33 ^a
Prebiótico	6,78 ^a	3,58 ^a	5,66 ^a	8,66 ^a	13,23 ^a	7,58 ^a	15,00 ^a	11,50 ^a	12,61 ^a
Simbiótico	5,54 ^a	3,64 ^a	5,15 ^a	9,24 ^a	8,97 ^a	9,67 ^a	7,63 ^a	11,98 ^a	13,82 ^a

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 18 – Diferença entre a concentração de ácido propiônico (mMol/ μ L) nos diferentes tempos (h) e a concentração inicial (tempo 0) em dietas controle ou adicionadas com probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg FeSO₄/L.

Dieta/	T=5			T=10			T=24		
	11	22	33	11	22	33	11	22	33
Nível Fe (mg/L)									
Controle	0,00 ^a	0,06 ^a	0,00	1,39 ^a	0,72 ^a	0,83 ^a	-0,53 ^b	2,57 ^a	1,76 ^a
Probiótico	0,69 ^a	0,00 ^a	0,00	1,47 ^a	0,78 ^a	1,04 ^a	-0,23 ^b	1,45 ^a	3,20 ^a
Prebiótico	0,09 ^a	0,00 ^a	0,00	0,78 ^a	2,03 ^a	0,74 ^a	6,89 ^a	2,81 ^a	4,00 ^a
Simbiótico	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00	1,13 ^a	1,08 ^a	1,70 ^a	1,32 ^b	4,08 ^a	3,73 ^a

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 19 – Diferença entre a concentração de ácido n-butírico (mMol/ μ L) nos diferentes tempos (h) e a concentração inicial (tempo 0) em dietas controle ou adicionadas com probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg FeSO₄/L.

Dieta/	T=5			T=10			T=24		
	11	22	33	11	22	33	11	22	33
Nível Fe (mg/L)									
Controle	0,00 ^a	0,00	0,00	1,57 ^a	0,00 ^a	0,49 ^a	2,38 ^b	4,96 ^a	3,77 ^a
Probiótico	0,00 ^a	0,00	0,00	2,22 ^a	1,42 ^a	0,27 ^a	2,16 ^b	2,91 ^a	3,88 ^a
Prebiótico	0,29 ^a	0,00	0,00	1,29 ^a	0,08 ^a	0,5371 ^a	10,96 ^a	2,61 ^a	3,64 ^a
Simbiótico	0,00 ^a	0,00	0,00	2,46 ^a	0,68 ^a	1,16 ^a	4,38 ^b	7,78 ^a	6,44 ^a

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 20 – Diferença entre a concentração de ácido n-valérico (mMol/ μ L) nos diferentes tempos (h) e a concentração inicial (tempo 0) em dietas controle ou adicionadas com probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg FeSO₄/L.

Dieta/	T=5			T=10			T=24		
	11	22	33	11	22	33	11	22	33
Nível Fe (ppm)									
Controle	0,0000	0,0000	0,0000	0,8365 ^a	0,0159 ^a	0,0000	0,0000 ^b	0,7418 ^a	0,2657 ^a
Probiótico	0,0000	0,0000	0,0000	0,3930 ^a	0,0000 ^a	0,0000	0,2023 ^b	0,0000 ^a	0,0451 ^a
Prebiótico	0,0000	0,0000	0,0000	0,0604 ^a	0,0000 ^a	0,0000	3,7113 ^a	0,4031 ^a	0,0000 ^a
Simbiótico	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000 ^a	0,0000 ^a	0,0000	0,0000 ^b	0,5884 ^a	0,0089 ^a

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 21 – Diferença entre a concentração de ácido capróico (mMol/ μ L) nos diferentes tempos (h) e a concentração inicial (tempo 0) em dietas controle ou adicionadas com probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg FeSO₄/L.

Dieta/	T=5			T=10			T=24		
	11	22	33	11	22	33	11	22	33
Controle	0,00	0,00 ^a	0,00	1,04 ^a	0,00	0,00 ^a	0,00 ^b	0,24 ^a	0,00
Probiótico	0,00	0,04 ^a	0,00	0,35 ^a	0,00	0,00 ^a	0,00 ^b	0,00 ^a	0,00
Prebiótico	0,00	0,00 ^a	0,00	0,00 ^a	0,00	0,00 ^a	3,38 ^a	0,04 ^a	0,00
Simbiótico	0,00	0,00 ^a	0,00	0,00 ^a	0,00	0,27 ^a	0,00 ^b	0,00 ^a	0,00

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Com 10 h de fermentação, há pequena produção de ácido n-valérico nas dietas controle, adicionada de probiótico ou prebiótico, com baixo nível de sulfato ferroso. Verificou-se maior produção ($p<0,05$) na dieta com baixo nível de ferro e prebiótico nas amostras de 24 h (Tabela 20).

Ácido caprótico foi detectado nas amostras de 10h das dietas controle e probiótico com baixo teor de ferro e com alto teor de ferro adicionado de simbiótico. Com 24 h de fermentação verificou-se aumento ($p<0,05$) na concentração deste ácido na dieta adicionada de prebiótico com baixo nível de ferro (Tabela 21).

Tabela 22 – Diferença entre a concentração (mMol/ μ L) no tempo 24 h e a concentração inicial dos ácidos isobutírico e isovalérico em dietas controle ou adicionadas com probiótico, prebiótico ou simbiótico com níveis de 11, 22 e 33 mg FeSO₄/L.

Dieta/ Nível Fe (mg/Kg)	Isobutírico			Isovalérico		
	11	22	33	11	22	33
Controle	0,00 ^b	0,00	0,00	0,5105 ^b	0,2415 ^a	0,0000
Probiótico	0,00 ^b	0,00	0,00	0,00 ^b	0,0000 ^a	0,0000
Prebiótico	2,83 ^a	0,00	0,00	2,66 ^a	0,0000 ^a	0,0000
Simbiótico	0,00 ^b	0,00	0,00	0,00 ^b	0,0000 ^a	0,0000

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os ácido isobutírico e isovalérico só foram detectados nas amostras 24h. A ocorrência do primeiro só foi verificada na dieta com prebiótico e baixo teor de sulfato ferroso (11mg/L) ($p<0,05$), enquanto houve produção diferenciada ($p<0,05$) de ácido isovalérico na dieta com prebiótico e baixo teor de sulfato ferroso.

Observou-se maior produção ($p<0,05$) de ácido propiônico e n-butírico nas amostras com 24 h de fermentação, na dieta contendo apenas prebiótico e baixo nível de ferro (Tabelas 17 e 19). Nesta mesma dieta houve aumento ($p<0,05$) de ácidos isobutírico, n-butírico, isovalérico, n-valérico e caprótico.

Espera-se que a incorporação de bifidobacterias e,ou, prebiótico altere o perfil de produção de ácidos graxos de cadeia curta, principalmente com relação à produção de ácidos acético e láctico, principais ácidos orgânicos produzidos pelo grupo das bifidobactérias. Embora tenha sido observada uma maior produção de ácido acético na

dieta suplementada com prebiótico, as diferenças de concentrações entre as amostras, que pode ser devido a diferenças nas espécies microbianas existentes no inóculo inicial, determinaram que este resultado não fosse significativo.

A incorporação de probióticos não resultou em alteração no número de bifidobactérias (Tabela 6). O decréscimo observado na contagem de bifidobactérias em uma dieta controle com menor nível de ferro poderia levar a uma menor produção de ácidos orgânicos. Como estes se acumulam no ambiente, a diminuição na produção, caso existente, seria notada em um tempo maior de experimentação.

O aumento significativo da produção dos outros ácidos orgânicos, inclusive isovalérico, n-valérico e caprótico, em dietas contendo prebiótico e 11 mg de sulfato ferroso/L meio indica que FOS estimula grupos bacterianos mais adaptados para a utilização de ferro, os quais sofreriam ação inibitória por *Bifidobacterium longum*, uma vez que este aumento não é observado quando o *B. longum* é incorporado simultaneamente (simbiótico). No entanto, a produção aparenta ser lenta pois uma diferença significativa somente é notada com um tempo maior de fermentação.

As dietas contendo amido (controle e probiótico) resultaram em menor produção de ácido propiônico, n-butírico e n-valérico ($p < 0,05$) em meios com menor teor de ferro (11 mg de sulfato ferroso/L meio) (Tabelas 17, 18 e 19), indicando que grupos bacterianos fermentadores de amido e produtores destes ácidos também podem ser afetados pelo conteúdo de ferro (e,ou, sulfato) do meio. Entre os microrganismos destacam-se os do gênero *Clostridium*: *C. botulinum* tipos A, B e F, que fermentam amido tendo como produto final ácido acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e isocaprótico; *C. butyricum* e *C. perfringens* tipos B e C, que fermentam amido com produção de ácidos acético e butírico, *C. kluyveri*, fermentador de etanol e acetato, formando butirato e caproato (LEVETT, 1991, HIPPE et al., 1992, SMITH, 1992); *Eubacterium limosum*, que produz ácido isobutírico a partir de valina, e caproato e valerato a partir de propionato e butirato, respectivamente, *E. tenue*, produtor de ácidos isobutírico e isovalérico, *E. bifforme*, produtor de ácido caprótico (ANDREESSEN, 1992); *Peptococcus niger*, que produtor de ácido caprótico e butirato, *Peptostreptococcus indolicus*, *Ps. Asoccharolyticus*, *Ps. Prevotiik*, *Ps. Tetradius*, produtores de ácido butírico (EZAKI et al., 1992) e *Veillonella*, que usa lactato como fonte de energia, produzindo propionato (KOLENBRANDER et al., 1992).

A presença de maiores concentrações de propionato, butirato e lactato tem importantes efeitos sobre o organismo. Aumento na produção de ácidos propiônico e butírico está

associada a incremento na absorção de minerais, especialmente cálcio (TRINIDAD et al., 1996).

Trabalhos recentes (HARA et al., 1998, HARA et al., 1999) demonstraram que AGCC reduzem o colesterol sanguíneo. Dentre os AGCC, o propionato é o mais relacionado com esta diminuição. Após absorção pela mucosa intestinal, esse ácido orgânico é conduzido ao fígado pelo sistema porta, onde inibe a ação de enzimas, como a HMG CoA redutase (*Hidroxiacetilglutaril Coenzima A* redutase), envolvidas na síntese de colesterol (CHENG & LAI, 2000). A atividade de todas as enzimas lipogênicas hepáticas foi diminuída em animais alimentados com FOS, provavelmente devido a um efeito regulador sobre a expressão gênica. Esta modificação da regulação genética seria devido a mudanças hormonais (insulina, proteína semelhante ao glucagon do tipo I e polipeptídeos insulínotropos glicose-dependentes), estimuladas por metabólitos da fermentação bacteriana (especialmente propionato) (VAN LOO et al., 1999).

Os resultados obtidos são inconclusivos no sentido de determinar se os ácidos são originados das fermentações de FOS ou amido, ou derivados da utilização de metabólitos formados pela utilização desses substratos, embora o alto incremento na concentração com 24 h de fermentação suporta a segunda hipótese. Microrganismos produtores de ácidos, como *Propionibacterium*, produtores de acetato, propionato, isovalerato e lactato (SCHAAL, 1992) ou *Veillonella*, produtores de propionato, podem ser estimulados por metabólitos de fermentações anteriores, como por exemplo aminoácidos produzidos por bifidobactérias (SCARDOVI, 1986), utilizados por algumas espécies de *Propionibacterium*. Além disso, lactato pode ser metabolizado por *Propionibacterium* sp., *Veillonella* sp., *Clostridium* (produção de acetato e butirato) ou sulfato-redutores (Durant et al., 1994; Macfarlane et al., 1994 citados por LE BLAY et al., 1999).

A Tabela 23 indica as equações ajustadas para tempo e nível de ferro dos ácidos orgânicos pesquisados, nas diversas dietas.

Tabela 23 – Equações ajustadas a concentração de diferentes ácidos orgânicos (mMol/μL) em função do nível de ferro (mg/L) e tempo (h) em experimentos com fermentação em culturas em série utilizando diversas dietas-teste.

Dieta	Variável	Equações Ajustadas	r ²
1	Ácido	D ₁ = $\hat{y} = 4,31618 + 0,261923^{***} T$	0,7923
2	Acético	D ₂ = $\hat{y} = - 3,62392 + 1,87169^{*} T - 0,0581678^{*} T^2$	1,0000
3		D ₃ = $\hat{y} = 4,62378 + 0,367270^{**} T$	0,8747
4		D ₄ = $\hat{y} = 4,61985 + 0,291208^{*} T$	0,7663
1	Ácido	D ₁ = $\hat{y} = 0,7563$	
2	propiónico	D ₂ = $\hat{y} = 0,192383 + 0,0570264^{***} T$	0,7753
3		D ₃ = $\hat{y} = -1,18618 + 0,239485^{**} T$	0,9999
4		D ₄ = $\hat{y} = -0,532156 + 0,152353^{**} T$	0,9664
1	Ácido	D ₁ = $\hat{y} = 0,0161$	
2	isobutírico	D ₂ = $\hat{y} = 0$	
3		D ₃ = $\hat{y} = -0,381485 + 0,0535702^{***} T$	0,9356
4		D ₄ = $\hat{y} = 0$	
1	Ácido	D ₁ = $\hat{y} = -1,12906 + 0,199374^{**} T$	0,9933
2	N-butírico	D ₂ = $\hat{y} = -0,508741 + 0,149003^{**} T$	0,9629
3		D ₃ = $\hat{y} = 0,893887 - 0,126371^{***} Fe + 0,311377^{**} T$	0,6784
4		D ₄ = $\hat{y} = -1,74044 + 0,329605^{**} T$	0,9988
1	Ácido	D ₁ = $\hat{y} = 0,162169 - 0,0104704^{***} Fe + 0,0132736^{*} T$	0,7153
2	isovalérico	D ₂ = $\hat{y} = 0$	
3		D ₃ = $\hat{y} = -0,357742 + 0,0502362^{***} T$	0,9356
4		D ₄ = $\hat{y} = 0$	
1	Ácido	D ₁ = $\hat{y} = 0,2067$	
2	N-valérico	D ₂ = $\hat{y} = 0,254549 - 0,00831513^{***} Fe$	0,6888
3		D ₃ = $\hat{y} = -0,543013 + 0,0774526^{***} T$	0,9417
4		D ₄ = $\hat{y} = -0,732221 + 0,0707417^{***} Fe - 0,00160071^{***} Fe^2 + 0,0112905^{***} T$	0,4891
1	Ácido	D ₁ = $\hat{y} = 0,1421$	
2	Capróico	D ₂ = $\hat{y} = 0,0429$	
3		D ₃ = $\hat{y} = -0,4601 + 0,0646098^{***} Fe$	0,9720
4		D ₄ = $\hat{y} = 0,0296$	

D₁ = Dieta controle; D₂= dieta com probiótico (*Bifidobacterium longum*); D₃ = dieta com probiótico (Raftilose® P95); D₄ = dieta com simbiótico (*B. longum* + Raftilose® P95)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de F.

*** significativo ao nível de 10% de probabilidade pelo teste de F.

A produção de ácidos orgânicos foi influenciada basicamente pelo tempo (Tabela 23), enquanto o nível de ferro influencia de forma seletiva e positiva a produção de ácido n-valérico na dietas com simbiótico (p<0,10) e ácido capróico (p<0,10) na dieta com probiótico e de forma negativa no caso de produção de ácido isovalérico, em uma dieta

controle ($p < 0,10$), ácido n-butírico em dieta com prebiótico, e ácido valérico na dieta com probiótico ($p < 0,10$).

As equações com valores de (a) negativo indicam que a produção de ácidos orgânicos só é detectada algumas horas após o início da fermentação (Tabela 23), para um determinado nível de ferro.

A produção de maiores quantidades de ácidos orgânicos em meio pobre de ferro e suplementado apenas com FOS foi um resultado inesperado, o qual indica que, embora não tenham sido observadas grandes alterações nas populações microbianas, pode ter ocorrido um aumento do metabolismo celular, traduzido por maior produção de ácidos graxos.

Resultados obtidos no meio com menor teor de sulfato ferroso (11 mg/L) indicam que Raftilose® P95 estimularia grupos bacterianos que possuem algum mecanismo para melhor utilização deste mineral essencial ao crescimento celular. Dados encontrados por KOT & BEZKOROVAINY (1993) e posteriormente comprovado por KOT et al. (1995) indicam a presença de um mecanismo de absorção de ferro em bifidobactérias, dependente de energia e ativado apenas em meios pobres em ferro. Este mesmo processo pode explicar a diminuição da população de bifidobactérias ($p < 0,05$) observada no meio controle com baixo teor de ferro: a fermentação de amido por outros grupos bacterianos reduzem a quantidade de substrato disponível para as bifidobactérias, e com isto diminui a incorporação de ferro, mineral essencial para o seu crescimento (BEZKOROVAINY et al., 1996).

4. Conclusões

As interações microbianas mostram-se extremamente complexas. A inclusão de uma fonte de energia ou alteração dos micronutrientes presentes no meio podem exercer efeitos diretos ou indiretos no balaço populacional.

As fermentações em série indicaram que o meio contendo menor teor de sulfato ferroso e suplementado com FOS induz maiores alterações microbiológicas e de produção de ácidos orgânicos, com resultados significativos nas amostras colhidas no tempo 24 h de experimentação. Um maior tempo experimental se faz necessário para verificar se as alterações são permanentes.

5. Referências Bibliográficas

- ALANDER, M.; DE SMET, I.; NOLLET, L.; VERSTRAECTE, W.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. The effect of probiotic strains on the microbiota of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME). **Intern. J. Food Microb.**, v.46, n.1, p.71-79, 1999.
- AMANN, M.M.; KULLEN, M.J.; MARTINI, M.C.; BUSTA, F.F.; BRADY, L.J. Consumption of exogenous *Bifidobacterium* does not alter fecal bifidobacteria and breath hydrogen excretion in humans. **J. Nutr.**, v.128, n.6, p.996-1002, 1998.
- ANAND, S.K.; SRINIVASAN, R.A.; RAO, L.K. Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*. **Cultured Dairy Products J.**, v.19, n.4, p.6-8, 1984.
- ANDREESEN, J.R. The genus *Eubacterium*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (Eds) The Prokaryotes. 1992, 2^a ed, New York: Springer-Verlag, v.2, Cap.86. p.1914.
- BEZKOROVAINY, A.; KOT, E.; MILLER-CATCHPOLE, R.; HALOFTIS, G.; FURMANOV, S. Iron metabolism in Bifidobacteria. **Int. Dairy J.**, v.6, p.905-919, 1996.
- BOUHNİK, Y.; FLOURIE, B.; ANDRIEUX, C.; BISETTI, N.; BRIET, F.; RAMBAOUD, J.C. Effects of *Bifidobacterium* sp fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. **Europ. J. Clin. Nutr.**, v.50, p.269-273, 1996.
- BRASIL (2000) Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 15, de 21 de fevereiro de 2000. **Diário Oficial da União**, 25 fevereiro 2000, Seção 1.
- CHENG, H.H.; LAI, M.H. Fermentation of resistant rice starch produces propionate reducing serum and hepatic cholesterol in rats. **J. Nutr.**, v.130, p.1991-1995, 2000.
- DJOUZI, Z.; ANDRIEUX, C. Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with human faecal flora. **Brit. J. Nutr.**, v.78, p.313-324, 1997.
- EZAKI, T.; OYAIZU, H.; YABUUCHI, E. The genera *Peptococcus* and *Peptostreptococcus*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (Eds) The Prokaryotes. 1992, 2^a ed, New York: Springer-Verlag, v.2, Cap.83. p.1886-1887.
- FRANKS, A.H.; HARMSSEN, H.J.M.; RAANGS, G.C.; JANSEN, G.J.; SCHUT, F.; WELLING, G.W. Variations of bacterial populations in human faeces measured by

- fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Applied Environm. Microbiol.**, v.64, p.3336-3345, 1998.
- GALLAHER, D.D.; STALLINGS, W.H.; BLESSING, L.L.; BUSTA, F.F.; BRADY, L.J. Probiotics, cecal microflora, and aberrant crypts in the rat colon. **J. Nutr.**, v.126, p.1362-1371, 1996.
- GIBSON, G.R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. **J. Nutr.**, v.129, n.7, p.1438S-1441S, 1999.
- GIBSON, G.R.; BEATTY, E.R.; WANG, X.; CUMMINGS, J.H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**, v.108, p.975-982, 1995.
- HARA, H.; HAGA, S.; KASAI, T.; KIRIYAMA, S. Fermentation products of sugar-beet fiber by cecal bacteria lower plasma cholesterol concentration in rats. **J. Nutr.**, v.128, p.688-693, 1998.
- HARA, H.; HAGA, S.; AOYAMA, Y.; KIRIYAMA, S. Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. **J. Nutr.**, v.129, p.942-948, 1999.
- HIPPE, H.; ANDREESE, J.R.; GOTTSCHALK, G. The genus *Clostridium* – non medical. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (Eds) The Prokaryotes. 1992, 2^a ed, New York: Springer-Verlag, v.2, Cap.81, p.1821-1839
- KOCHAN, I.; KVACH, J.T.; WILES, T.I. Virulence-associated acquisition of iron in mammalian serum by *Escherichia coli*. **J. Infectious Diseases**, v.135, n.4, p.623-632, 1977.
- KOLENBRANDER, P.E.; MOORE, L.V.H. The genus *Veillonella*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (Eds) The Prokaryotes. 1992, 2^a ed, New York: Springer-Verlag, v.2, Cap.95. p.2036.
- KOT, E.; FURMANOV, S.; BEZKOROVAINY, A. Accumulation of iron in lactic acid bacteria and bifidobacteria. **J. Dairy Sci.**, v.60, n.3, p.547-550, 1995.
- KOT, E.; BEZKOROVAINY, A. Distribution of Accumulated iron in *Bifidobacterium thermophilum*. **J. Agric. Food Chem.**, v.41, n.2, p.177-181, 1993.
- LANGENDIJK, P.S.; SCHUT, F.; JANSEN, G.J.; RAANGS, G.W.; KAMPHUIS, G.R.; WILKINSON, M.H.F; WELLING, G.W. Quantitative fluorescent in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in faecal samples. **Applied Environm. Microbiol.**, v. 61, p.3069-3075, 1995.

- LE BLAY, G.; MAICHEL, C.; BLOTTIERE, H.M.; CHERBUT, C. Prolonged intake of fructooligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. **J. Nutr.**, v.129, n.12, p.2231-2235, 1999.
- LEVETT, P.N. (Ed.) anaerobic microbiology: a practical approach. Oxford University Press: New York, 1991. p. 34-40.
- LUND, E.K.; WHARF, S.G.; FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; JOHNSON, I.T. Increases in the concentrations of available iron in response to dietary iron supplementation are associated with changes in crypt cell proliferation in rat large intestine. **J. Nutr.**, v.128, n.2, p.175-179.1998.
- MANZ, W.; MANN, R.; LUDWIG, W.; VANCANNEYT, M.; SCHLEIFER, K..H. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. **Microbiology** v.142, p.1097-1106, 1996.
- OHTA, A.; OHTUKI, M.; TAKIZAWA, T.; INABA, H.; ADACHI, T.; KIMURA, S. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of magnesium and calcium by cectomized rats. **Intern. J. Vit. Nutr. Res.**, v.64, n.5, p.316-323, 1994.
- OHTA, A.; OHTSUKI, M.; BABA, S.; TAKIZAWA, T.; ADACHI, T.; KIMURA, S. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v.4, n.3, p.281-291, 1995.
- OHTA, A.; MOTOHASHI, Y.; OHTSUKI, M.; HIRAYAMA, M.; ADACHI, T.; SAKUMA, K. Dietary fructooligosaccharides change the concentration of calbindin-D9K differently in the mucosa of the small and large intestine of rats. **J. Nutr.**, v.128, p.934-939, 1998.
- PEREIRA, D.I.A.; MCCARTNEY, A.L.; GIBSON, G.R. An *in vitro* study on the probiotic potential of a bile salt hydrolytic *Lactobacillus fermentum* and determination of its cholesterol-lowering properties. **Appl. Environm. Microbiol.**, *in press*.
- PIARD, J.C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. **Lait**, v.71, n.5, p.525-541, 1991.
- REIFEN, R.; MATAS, Z.; ZEIDEL, L.; BERKOVITCH, Z.; BUJANOVER, Y. Iron Supplementation may aggravate inflammatory status of colitis in a rat model. **Dig. Dis. Sci.**, v.45, n.2, p.394-397, 2000.

- SAKAI, K.; OHTA, A.; SHIGA, K.; TAKASAKI, M.; TOKONAGA, T.; HARA, H. The cecum and dietary short-chain fructooligosaccharides are involved in preventing postgastrectomy anemia in rats. **J. Nutr.**, v.130, n.6, p.1608-1612, 2000a.
- SAKAI, K.; OHTA, A.; TAKASAKI, M.; TOKUNAGA, T. The effect of short chain fructooligosaccharides in promoting recovery from post-gastrectomy anemia is stronger than that of inulin. **Nutr. Res.**, v.20, n.3, p.403-412, 2000b.
- SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacterium*. In: SNEATH, P.H.A. et al. (Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams & Wilkins: Baltimore. v.1, p.1418-1434, 1986.
- SCHAAL, K.P. The Genera *Actinomyces*, *Arcanobacterium*, and *Rothia*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (Eds) The Prokaryotes. 1992, 2^a ed, New York: Springer-Verlag, v.1, Cap.38, p.886.
- SCHOLZ-AHRENS, K.E.; AÇIL, Y.; SCHREZENMEIR, J. Effect of oligofructose or dietary calcium on repeated calcium and phosphorus balances, bone mineralization and trabecular structure in ovariectomized rats. **Brit. J. Nutr.**, v.88, n.4, p.365-377, 2002.
- SCHULTINK, W.; DILLON, D. Supplementation strategies to alleviate iron deficiency experiences from indonesia. **Nutr. Res.**, v.18, n.12, p.1943-1952, 1998.
- SERIL, D.N.; LIAO, J.; HO, K.L.K.; WARSI, A.; YANG, C.S.; YANG, G.Y. Dietary iron supplementation enhances DSS-Induced colitis and associated colorectal carcinoma development in mice. **Dig. Dis. Sci.**, v.47, n.6, p.1266-1278, 2002.
- SILVA, A.M.; BAMBIRRA, E.A.; OLIVEIRA, A.L.; SOUZA, P.P.; GOMES, D.A.; VIERA, E.C.; NICOLI, J.R. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. **J. Applied Microb.**, v.86, p.331-336, 1999.
- SMITH, L.D.S. The genus *Clostridium* – medical. In: Balows, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K.H. (Eds) The Prokaryotes. 1992, 2^a ed, New York: Springer-Verlag, v.2, Cap.82. p.1871-1874.
- STOLTZFUS, R. J.; DREYFUSS, M. L. Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anemia. International Nutritional Anemia Consultative Group (INAOCG). ILSI Press: USA, 1999.
- TRINIDAD, T.P.; WOLEVER, T.M.S.; THOMPSON, L.U. Effect of acetate and propionate on calcium absorption from de rectum and distal colon of humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.63, n.4, p.574-578, 1996.

- VAN LOO, J.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; ENGLYST, H.; FRANCK, A.; HOPKINS, M.; KOK, N.; MACFARLANE, G.; NEWTON, D.; QUIGLEY, M.; ROBERFROID, M.; VAN VLIET, T.; VAN DEN HEUVEL, E. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095) **Brit. J. Nutr.**, n.2, v.81, p.121-132, 1999.
- WEISS, N. The genera *Pediococcus* and *Aerococcus*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (Eds) **The Prokaryotes**. 1992, 2^a ed, New York: Springer-Verlag, v.2, Cap.68.

Efeito de Prebiótico (FOS) Associado a Diferentes Níveis de Ferro na Modulação de Microbiota Humana e Produção de Ácidos Orgânicos: Estudo em Modelo Intestinal

1. Introdução

Atualmente existe uma tendência em se consumir alimentos adicionados com vitaminas e minerais, no intuito de diminuir problemas de saúde, como anemia, osteoporose, aumentar a resistência a infecções.

No entanto, o organismo humano é um ente simbiótico, com as bactérias do intestino exercendo um papel fundamental na saúde do hospedeiro. As interações microbianas mostram-se extremamente complexas. A inclusão de uma fonte de energia ou alteração dos micronutrientes presentes no meio podem ter efeito no balanço populacional. Esses efeitos podem ser positivos, com o estímulo a um grupo potencialmente benéfico (FULLER, 1989; GIBSON & ROBERFROID, 1995) ou negativos, diretos ou indiretos como o efeito supressor de metabólitos produzidos por um grupo ou cepa microbiana sobre outros microrganismos (IBRAHIM & BEZKOROVAINY, 1993, CHEN et al., 1999). Todas estas alterações se refletem na saúde do hospedeiro.

No intuito de tentar individualizar o efeito de ferro, associado ou não com pré- e probióticos, sobre a microbiota intestinal, foram realizados experimentos *in vitro* utilizando microbiota humana. Nesses modelos, os resultados obtidos não levam em consideração a interferência de fatores do hospedeiro como absorção de nutrientes, estresse físico e,ou, emocional, limitando-se ao efeito dos constituintes sobre a microbiota.

O modelo intestinal simula as condições ambientais do cólon sendo composto por 3 vasos interligados, cada um com diferente pH, representando os diferentes segmentos do cólon humano. O primeiro vaso de fermentação (pH 5,5 – 5,8) simula as condições do cólon ascendente, o segundo (pH 6,2 – 6,5) o cólon transverso e o terceiro (pH 6,7- 6,9) o cólon descendente (MACFARLANE et al., 1998).

Os resultados obtidos na experimentação com *batch cultures* indicaram maiores efeitos de FOS sobre a microbiota humana. O objetivo desta experimentação foi avaliar a influência de prebiótico (FOS) associados a dois níveis de ferro (50 e 150% dos níveis recomendados na composição de meio de cultura) na microbiota colônica humana e na produção de ácidos orgânicos utilizando modelos intestinais.

2. Material e Métodos

Inicialmente utilizou-se o meio basal (Tabela 1). No primeiro dia (dia 0) procedeu-se à inoculação dos meios (180 mL por vaso), com 100 mL de amostra fecal previamente diluída a 20% em Tampão fosfato (PBS) pH 7,2, por vaso. Este meio foi mantido por 24 h (dia 1) para diferenciação das populações, devido à diferença de pH de cada vaso. Após este período, os recipientes foram interligados e conectada a fonte de alimentação (MACFARLANE et al., 1998). O meio basal foi utilizado durante 11 dias, quando foi trocado por um meio contendo Raftilose® P95 (FOS) (35/L) no lugar de amido. Este meio experimental foi fornecido durante outros 11 dias. O cálculo da quantidade de FOS baseou-se no fluxo diário, incorporando-se 5g de FOS ao modelo por dia. O primeiro vaso tem capacidade de 280 mL, enquanto os outros dois apresentam capacidade de 300 mL.

Tabela 1 – Composição do meio basal para fermentação em modelo intestinal

Ingredientes	g/L
Amido	5
Água peptonada	5
Triptona	5
Extrato de levedura	4,5
NaCl	4,5
KCl	4,5
Caseína	3
Pectina	2
Xilano	2
Arabinogalactano	2
NaHCO ₃	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,25
Goma guar	1
Inulina	1
L- Cisteína HCL	0,5
Mucina	4
Sais biliares N°3	0,4
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	0,5
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,15
Tween 80	1 mL
Solução de Resazurina	4 mL
Vitamina K1	10 µL
FeSO ₄ .7H ₂ O	*

Adaptado de MACFARLANE et al., 1998.

* Variável segundo o meio: 11,0274 mg (baixo teor de sulfato ferroso) ou 33,0822 mg (alto teor de sulfato ferroso).

OBS: o pH do meio é ajustado no vaso de fermentação.

2.1. Contagem microbiológica de bactérias anaeróbicas totais, *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. e enterobactérias

Amostras foram colhidas nos tempos 0, 1, 9, 11, 20 e 22 (dias), para determinação de FISH, AGCC e determinações microbiológicas. Os seguintes grupos bacterianos foram determinados:

- Bactérias anaeróbicas totais: Ágar Wilkins-Chalgren (Oxoid). Incubação em ambiente anaeróbico a 37°C por 48 hs.
- *Lactobacillus* sp.: Ágar Rogosa (82g/L - Oxoid) suplementado com 1,32 ml/L de ácido acético glacial. Incubação em ambiente anaeróbico a 37°C por até 5 dias.
- Enterobactérias: Ágar Mac Conkey N°3 (Oxoid). Incubação em ambiente aeróbico a 37°C por 48 hs.
- *Bifidobacterium* spp.: Ágar Beerens (Columbia ágar sangue base (Oxoid), 44g/L; glicose, 5g/L; ágar técnico no3 (Oxoid), 5/L; L-cisteína HCl (Sigma), 0,5 g/L; ácido propiônico, 5 mL/L; pH ajustado para 5,0 – conforme protocolo interno do laboratório de microbiologia (*Food Microbial Science Unit*, Universidade de Reading). Incubação em ambiente anaeróbico a 37°C por até 5 dias.

2.2. Contagem total celular (DAPI), bacteróides, bifidobactérias, clostrídios e bactérias sulfato redutoras pelo método de FISH.

A hibridização fluorescente *in situ* – FISH foi utilizada para determinação de bifidobactérias, bacteróides, clostrídios, bactérias sulfato redutoras e contagem celular total. Empregou-se o protocolo interno do laboratório de microbiologia (*Food Microbial Science Unit*, Universidade de Reading), que consta de preparo da amostra, hibridização, enxague e contagem.

2.2.1. Preparo da amostra

- a) Colocaram-se 1125µl de solução de paraformaldeído a 4%, previamente esterilizado a frio (membrana Millipore 0,2µm) e 375µl da amostra em tubos Eppendorfs de 1,5 mL, em duplicata.
- b) O tubo foi misturado (Vortex) e mantido a 4°C por pelo menos 4 horas.
- c) Após este período, os Eppendorfs foram centrifugados a 6000xg por 5min (centrífuga Microcentaur, Sanyo Instruments, Sanyo Gallenkamp PLC, Holanda).

- d) O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspenso em 1mL de PBS filtrado
- e) Os procedimento c) e d) foram repetidos
- f) O tubo foi centrifugado novamente
- g) Após a terceira centrifugação, tentou-se remover a maior quantidade de sobrenadante possível e cuidadosamente ressuspendeu-se o sedimento em 150µL de PBS filtrado
- h) Adicionaram-se 150µL de etanol 96% filtrado.
- i) Misturou-se, com auxílio de Vortex e a amostra foi estocada a -20°C. As amostras preparadas foram analisadas no período de 3 meses.

2.2.2. Hibridização

- a) Adicionaram-se 16µL da amostra (PBS/Etanol, -20°C) a 200µL de tampão de hibridização com dodecil sulfato de sódio - SDS e 64µL de água para HPLC filtrada. Tanto o tampão quanto a água encontravam-se à temperatura de hibridização.
- b) A mistura foi mantida em estufa com a temperatura adequada de hibridização (50°C para bifidobactérias e clostrídios; 45°C para bacteróides), por pelo menos 5 minutos.
- c) Em um Eppendorf de 0,5mL adicionou-se a sonda (50ng/µL) e posteriormente a mistura da amostra, respeitando uma proporção de 5µL sonda + 45 µL da amostra. Misturou-se com auxílio de Vortex.
- d) A mistura de hibridização permaneceu em estufas (calor seco) por uma noite, nas temperaturas adequadas para cada sonda (50°C para bifidobactérias e clostrídios; 45°C para bacteróides).

Sondas utilizadas (marcadas com Cy3 ou Cy5) (MWG Oligo, MGW-Biotech UK Ltd):

- Bif164 5'-CAT CCG GCA TTA CCA CCC-3' (bifidobactérias) (LANGENDIJK et al., 1995)
- Bac303 5'-CCA ATG TGG GGG ACC TT-3' (bacteróides) (MANZ et al., 1996)
- His150 5'-TTA TGC GGT ATT AAT CT(CT) CCT TT-3' (clostrídios e grupo histolítico) (FRANKS et al., 1998)
- SRB687 5'- TAC GGA TTT CAC TCCT – 3' (DEVEREUX et al., 1992)

A técnica para a determinação de bactérias sulfato redutoras (SRB) apresenta as seguintes modificações: tampão de hibridização acrescido de formamida (10%), tampão de enxágüe com SDS (0,01%) e temperatura de hibridização de 48°C. No caso específico de determinação de SRB, o tempo de hibridização é de no mínimo 3 horas.

2.2.3. Enxagüe

- a) Adicionou-se aproximadamente 5 mL tampão de hibridização para enxagüe, pré-aquecido e 20 μ L de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) (500ng/ μ L) em um tubo de 5mL (Sterilin).
- b) A seguir foi adicionada a quantidade de mistura de hibridização (entre 5 e 100 μ L, para as sondas e 2 ou 3 para DAPI). O tubo foi mantido em estufa de hibridização por pelo menos 30 min. A mistura de hibridização restante (com a sonda), foi recolocada na estufa para o caso de ser necessário repetir o procedimento.
- c) O conteúdo do tubo foi filtrado em membranas Millipore GTBP 0,2 μ L, utilizando-se um sistema a vácuo. O tubo foi lavado com tampão de enxagüe, para retirar células que possam ter ficado sedimentadas.
- d) A membrana foi colocada sobre uma lâmina, posteriormente foi adicionada uma gota de reagente AntiFade (Qbiogene Molecular Cytogenetics, UK) e a lamínula.
- e) As lâminas assim preparadas foram mantidas protegidas de luminosidade a 4°C até o momento da contagem.

2.2.4. Contagem

- a) As lâminas foram retiradas da refrigeração pelo menos 10 min. antes da contagem.
- b) Foram colocadas no microscópio, com óleo de imersão e seleção da lente adequada.
- c) Para contar os microrganismos marcados foram utilizados filtro azul (DM400) para DAPI e verde (DM510) para outras sondas.
- d) Foram contados todos os microrganismos marcados que se encontravam dentro do campo marcado em uma das objetivas do microscópio.
- e) Em geral foram contados 15 campos por lâmina. Quando a contagem era muito alta e homogênea optou-se por contar apenas 10 campos. Como regra geral deve-se contar pelo menos 300 células no total.
- f) As lâminas foram refrigeradas ou descartadas, dependendo se esta seria posteriormente fotografada ou não.

2.2.5. Cálculo das concentrações

Para o cálculo utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Log UFC/mL} = \text{Log} (155,56 \cdot \text{CC} \cdot 4873,74 \cdot (1000/\text{QU}))$$

onde CC= média das contagens dos campos (por amostra) e QU = quantidade da amostra utilizada para preparação da lâmina.

2.3. Determinação de Ácidos Graxos de Cadeia Curta

A determinação de concentração de ácidos graxos de cadeia curta foi feita empregando-se cromatografia gasosa (PEREIRA et al., **no prelo**).

Utilizou-se sistema Hewlett Packard 5890 Series II, com software HP 3365 series IX Chemstation APG-TPC, versão A.06.03, com coluna capilar de sílica fundida Permabond FFAP 0,25 μm 25m x 0,32 mm (Macherey-Nagel, Alemanha). Como gás carreador empregou-se hélio, a com um fluxo de 2,42 ml/min. As temperaturas do injetor e detector, foram, respectivamente, 240°C (isoterma) e 250°C (isoterma), enquanto a temperatura inicial da coluna foi de 140°C. A pressão inicial foi estabelecida em 40Kpa. Os parâmetros de corrida foram um patamar inicial de 5 minutos a 140°C, com um aumento posterior de 20°C/ min até ser alcançada uma temperatura de 240°C, mantida por ulteriores 5 minutos. As amostras foram analisadas utilizando um padrão interno (ácido 2-etilbutírico 99% de pureza, densidade 0,924, peso molecular 116,16, na concentração de 3,7 mMol, correspondente a 470 $\mu\text{L/L}$)

2.3.1. Preparo das amostras

- a) As amostras foram centrifugadas a 6000xg por 5 min (centrífuga Microcentaur, Sanyo Instruments, Sanyo Gallenkamp PLC, Holanda) para sedimentação de bactérias e sólidos.
- b) Filtrou-se o sobrenadante usando-se filtro polysulfone 0,45 μm .
- c) Adicionaram-se 200 μL da amostra centrifugada e filtrada a 800 μL de acetonitrilo contendo 3,7mM de ácido 2-etilbutírico (padrão interno), previamente colocado em tubos de 2mL. A mistura foi mantida refrigerada até o momento da análise (-20°C). Em alguns casos houve precipitação, que se manteve no fundo do vidro. No momento da

injeção foram tomados cuidados para evitar a aspiração e injeção desse precipitado.

2.3.2. Preparo dos padrões externos de ácidos orgânicos

Os ácidos utilizados para preparar os padrões, com suas características estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Características dos ácidos utilizados para a preparação dos padrões para cromatografia gasosa.

Padrões	Pureza (%)	PM (g/mol)	d (g/mL)	Laboratório
Acético	99,5	60,05	1,05	Sigma
Propiônico	99,0	74,08	0,99	Sigma
N-butírico	99,0	88,11	0,964	Sigma
DL-lático	98,0	90,08	1,165	Sigma
N-valérico	99,0	102,14	0,938	Sigma
Isovalérico	98,0	102,14	0,925	Fluka
Isobutírico	99,5	88,11	0,948	Fluka
N-capróico	99,5	116,2	0,93	Sigma

- Inicialmente foi preparado um padrão-mãe (mantido a -20°C), com que consistiu em incorporar 200mM de cada ácido a 1 L de acetonitrilo. Prepararam-se 20 mL deste padrão com os ácidos acético (230 μL), propiônico (302 μL), n-butírico (370 μL), DL-lático (316 μL), n-valérico (440 μL), isovalérico (450 μL), isobutírico (374 μL) e n-capróico (502 μL).
- A partir do padrão-mãe prepararam-se os padrões secundários: 100, 50, 25, 5 e 2,5mM.
- Os padrões a serem injetados foram preparados a partir dos padrões secundários, tratando-os como se fossem amostras: 200 μL de padrão em 800 μL de acetonitrilo contendo padrão interno.
- Foram obtidos os seguintes padrões: P1 (0,5mM), P2 (1mM), P3 (5mM), P4 (10 mM) e P5 (20mM).
- Estes padrões foram utilizados para preparar a curva de calibração. O tempo de retenção esperado para cada ácido está citado na Tabela 3.

Tabela 3 - Tempo de retenção estimado para as condições previamente estipuladas, em análise de ácidos graxos de cadeia curta.

Ácido	Tempo de retenção (min)
Acético	1,815
Propiônico	2,179
Isobutírico	2,327
N-butírico	2,731
Isovalérico	3,061
N-valérico	3,770
2-etilbutírico (padrão interno)	4,039
N-capróico	5,355
L-lático	7,478
D-Lático	8,383

2.3.3. Cálculo das concentrações de ácidos orgânicos

Injetou-se 1µL das amostras e padrões. A integração dos picos foi feita pelo sistema. Nos casos onde o próprio programa não fez os cálculos, utilizou-se a seguinte fórmula,

$$\frac{\text{Área do ácido}}{\text{Área PI}} = m \cdot \frac{\text{massa ácido}}{3.7} + b$$

Onde área PI = área do padrão interno no cromatograma e (m) e (b) dependem de cada ácido (Tabela 4) sendo seus valores fornecidos pela Tabela de calibração. Uma vez obtido o resultado da concentração dos ácidos nas amostras (mMol), o valor foi multiplicado por 5 (diluição da amostra inicial), para a obtenção das concentrações por 1µL da amostra original.

Tabela 4 – Valores dos coeficientes (m) e (b) necessários para o cálculo de concentração dos ácidos, obtidos a partir da curva de calibração.

Ácido	m	b	Correlação
Acético	0,243714	0,052894	0,99834
Propiônico	0,362268	0,060735	0,99798
Isobutírico	0,478714	0,072752	0,99877
N-butírico	0,587180	0,118292	0,99916
Isovalérico	0,694132	0,083665	0,99892
N-valérico	0,720948	0,061354	0,99859
N-caprótico	0,930519	0,071125	0,99808
L-lático	0,082158	0,021253	0,99253
D-Lático	0,192845	0,026038	0,99121

2.4. Análise estatística

O experimento foi montado em um esquema fatorial de 2x2, sendo 2 níveis de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (baixo - 11,0274 mg/kg; alto - 33,0822 mg/kg) e 2 tipos de carboidratos (amido e Raftilose® P95), com 2 repetições. Os diferentes parâmetros foram analisados utilizando-se o teste t de Student com um nível de significância de até 10%, utilizando-se o software SAEG (Sistema de Análise Estatística, Universidade Federal de Viçosa).

3. Resultados e discussão

3.1. Contagem celular total (DAPI), bacteróides, bifidobactérias, clostrídios e bactérias sulfato redutoras pelo método de FISH e contagem microbiológica de bactérias anaeróbicas totais, *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. e enterobactérias.

Os resultados obtidos com os modelos intestinais foram analisados e interpretados dentro dos diferentes pH, com cada recipiente sendo considerado como um segmento intestinal independente. A Tabela 5 indica os resultados obtidos na contagem total (DAPI), bacteróides (BAC), bifidobactérias (BIF), clostrídios (CLOS) e bactérias sulfato redutores (SRB) (Log UFC/g) no inóculo inicial, com 24 horas de fermentação, após incorporação de FOS (no 11 dia) e valores finais (22 dias), nos diferentes recipientes, em meio com baixo teor de sulfato ferroso, enquanto a Tabela 6 indica os valores dos mesmos parâmetros para

as repetições realizadas com meio contendo alto teor de sulfato ferroso.

As Figuras 1 e 2 indicam as variações observadas nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Na Figura 1 verifica-se um ligeiro aumento na quantidade total de células (DAPI) e sulfato redutores e diminuição na concentração de bacteróides, bifidobactérias e clostrídios, após 11 dias de fermentação no recipiente que simula o cólon transversal, em dieta com baixo teor de sulfato ferroso em comparação com os valores iniciais. A incorporação de FOS resulta em diminuição dos níveis de SRB, em todos os recipientes.

Em dieta contendo alto teor de sulfato ferroso verifica-se diminuição de bifidobactérias, clostrídios e SRB no cólon ascendente e manutenção de DAPI em todos os recipientes, independente da incorporação de FOS. A suplementação de FOS resultou em aumento de clostrídios em todos os recipientes (Figura 2).

As comparações pelo teste de t, entre as alterações encontradas nos diferentes grupos bacterianos analisados pela técnica de FISH, com as dietas controle ou FOS, em meio com baixo (11 mg FeSO_4/L meio) ou alto (33 mg FeSO_4/L meio) teor de sulfato ferroso, para o cólon ascendente, transversal e descendente estão indicadas respectivamente nas Tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 5 - Contagem total (DAPI), bacteroides (BAC), bifidobactérias (BIF), clostrídios (CLOS) e bactérias sulfato redutores (SRB) (Log UFC/g) no inóculo inicial, com 24 horas de fermentação, após incorporação de FOS (no 11 dia) e valores finais (22 dias), nos diferentes segmentos de modelo intestinal, em meio com baixo teor de sulfato ferroso (11 mg/L) . Média de 15 campos.

Cólon ascendente	DAPI	Δ	BAC	Δ	BIF	Δ	CLOS	Δ	SRB	Δ
Inóculo Inicial	$1,29 \times 10^{10}$		$8,32 \times 10^8$		$6,76 \times 10^8$		$1,32 \times 10^7$		$1,17 \times 10^7$	
Inóculo Inicial	$1,51 \times 10^{10}$		$6,03 \times 10^7$		$2,51 \times 10^8$		1×10^7		$3,89 \times 10^7$	
24 horas	$7,41 \times 10^{10}$		$1,35 \times 10^{10}$		$1,55 \times 10^{10}$		$4,68 \times 10^7$		$5,13 \times 10^8$	
24 horas	$4,17 \times 10^{10}$		$4,68 \times 10^9$		$2,40 \times 10^9$		$1,74 \times 10^8$		$3,39 \times 10^8$	
Incorp. FOS	$9,76 \times 10^{10}$	0,11	$3,59 \times 10^{10}$	0,42	$5,06 \times 10^9$	-0,49	$7,34 \times 10^7$	0,20	$1,23 \times 10^8$	-0,62
Incorp. FOS	$8,00 \times 10^{10}$	0,28	$4,94 \times 10^9$	0,02	$1,73 \times 10^9$	-0,14	$3,85 \times 10^7$	-0,66	$1,76 \times 10^9$	0,72
Final	$5,15 \times 10^{10}$	-0,28	$2,92 \times 10^{10}$	-0,09	$5,32 \times 10^9$	0,02	$4,90 \times 10^7$	-0,18	$3,07 \times 10^7$	-0,60
Final	$3,13 \times 10^{10}$	-0,41	$7,25 \times 10^9$	0,17	$4,41 \times 10^9$	0,41	$1,80 \times 10^8$	0,67	$2,92 \times 10^7$	-1,78

Cólon transversal	DAPI	Δ	BAC	Δ	BIF	Δ	CLOS	Δ	SRB	Δ
Inóculo Inicial	$1,29 \times 10^{10}$		$8,32 \times 10^8$		$6,76 \times 10^8$		$1,32 \times 10^7$		$1,17 \times 10^7$	
Inóculo Inicial	$1,51 \times 10^{10}$		$6,03 \times 10^7$		$2,51 \times 10^8$		1×10^7		$3,89 \times 10^7$	
24 horas	$7,24 \times 10^{10}$		$1,00 \times 10^{10}$		$1,70 \times 10^{10}$		$1,29 \times 10^8$		$3,80 \times 10^8$	
24 horas	$3,39 \times 10^{10}$		$4,47 \times 10^9$		$3,89 \times 10^9$		$6,03 \times 10^8$		$2,75 \times 10^8$	
Incorp. FOS	$3,17 \times 10^{10}$	-0,36	$7,56 \times 10^9$	-0,12	$4,43 \times 10^9$	-0,58	$1,38 \times 10^8$	0,03	$4,13 \times 10^8$	0,04
Incorp. FOS	$6,28 \times 10^{10}$	0,27	$5,91 \times 10^9$	0,12	$1,44 \times 10^9$	-0,43	$7,16 \times 10^7$	-0,93	$1,50 \times 10^9$	0,74
Final	$3,47 \times 10^{10}$	0,04	$1,57 \times 10^{10}$	0,32	$6,61 \times 10^9$	0,17	$3,59 \times 10^7$	-0,59	$3,24 \times 10^7$	-1,11
Final	$2,66 \times 10^{10}$	-0,37	$5,34 \times 10^9$	-0,04	$4,29 \times 10^9$	0,47	$4,34 \times 10^8$	0,78	$2,69 \times 10^7$	-1,75

Cólon descendente	DAPI	Δ	BAC	Δ	BIF	Δ	CLOS	Δ	SRB	Δ
Inóculo Inicial	$1,29 \times 10^{10}$		$8,32 \times 10^8$		$6,76 \times 10^8$		$1,32 \times 10^7$		$1,17 \times 10^7$	
Inóculo Inicial	$1,51 \times 10^{10}$		$6,03 \times 10^7$		$2,51 \times 10^8$		1×10^7		$3,89 \times 10^7$	
24 horas	$4,27 \times 10^{10}$		$6,61 \times 10^9$		$1,35 \times 10^{10}$		$3,63 \times 10^7$		2×10^8	
24 horas	$3,31 \times 10^{10}$		$1,32 \times 10^{10}$		$3,80 \times 10^9$		$3,39 \times 10^8$		$8,51 \times 10^8$	
Incorp. FOS	$4,74 \times 10^{10}$	0,05	$4,26 \times 10^9$	-0,19	$9,62 \times 10^9$	-0,15	$3,47 \times 10^7$	-0,02	$2,28 \times 10^8$	0,06
Incorp. FOS	$3,13 \times 10^{10}$	-0,02	$9,75 \times 10^9$	-0,13	$2,37 \times 10^9$	-0,21	$1,88 \times 10^8$	-0,26	$1,01 \times 10^9$	0,08
Final	$4,03 \times 10^{10}$	-0,07	$5,87 \times 10^9$	0,14	$6,78 \times 10^9$	0,15	$5,15 \times 10^7$	0,17	$1,88 \times 10^8$	-0,08
Final	$5,44 \times 10^{10}$	0,24	$5,08 \times 10^9$	-0,28	$1,97 \times 10^9$	-0,08	$1,22 \times 10^8$	-0,19	$5,61 \times 10^8$	-0,26

Δ = diferença (Log_{10}) entre os valores de incorporação de FOS (dia 11) e após 24 horas de fermentação e entre o valor final (22 dias) e o valor no início da incorporação de FOS (dia 11).

Tabela 6 - Contagem total (DAPI), bacteroides (BAC), bifidobactérias (BIF), clostrídios (CLOS) e bactérias sulfato redutores (SRB) (UFC/mL), no inóculo inicial, com 24 horas de fermentação, após incorporação de FOS (no 11 dia) e valores finais (22 dias), nos diferentes segmento de modelo intestinal, em meio com alto teor de sulfato ferroso (33 mg/L). Média de 15 campos.

Cólon ascendente	DAPI	Δ	BAC	Δ	BIF	Δ	CLOS	Δ	SRB	Δ
Inóculo Inicial	$1,05 \times 10^{10}$		$6,17 \times 10^8$		$2,57 \times 10^8$		$4,07 \times 10^6$		$1,51 \times 10^7$	
Inóculo Inicial	$1,51 \times 10^{10}$		$6,03 \times 10^7$		$2,51 \times 10^8$		1×10^7		$3,89 \times 10^7$	
24 horas	$7,76 \times 10^{10}$		$6,03 \times 10^9$		$1,95 \times 10^{10}$		$8,32 \times 10^7$		$3,80 \times 10^8$	
24 horas	$6,03 \times 10^{10}$		$5,01 \times 10^9$		$3,80 \times 10^9$		$2,51 \times 10^9$		$1,48 \times 10^8$	
Incorp. FOS	$3,34 \times 10^{10}$	-0,37	$3,85 \times 10^9$	-0,19	$2,64 \times 10^{10}$	0,13	$3,09 \times 10^7$	-0,43	$5,78 \times 10^7$	-0,82
Incorp. FOS	$1,06 \times 10^{11}$	0,24	$6,48 \times 10^9$	0,11	$2,20 \times 10^8$	-1,24	$8,05 \times 10^7$	-1,49	$2,21 \times 10^7$	-0,82
Final	$3,22 \times 10^{10}$	-0,02	$1,01 \times 10^9$	-0,58	$1,91 \times 10^{10}$	-0,14	$2,25 \times 10^8$	0,86	$3,93 \times 10^7$	-0,17
Final	$4,31 \times 10^{10}$	-0,39	$2,73 \times 10^9$	-0,38	$1,11 \times 10^9$	0,70	$1,45 \times 10^9$	1,26	$4,61 \times 10^7$	0,32

Cólon transverso	DAPI	Δ	BAC	Δ	BIF	Δ	CLOS	Δ	SRB	Δ
Inóculo Inicial	$1,05 \times 10^{10}$		$6,17 \times 10^8$		$2,57 \times 10^8$		$4,07 \times 10^6$		$1,51 \times 10^7$	
Inóculo Inicial	$1,51 \times 10^{10}$		$6,03 \times 10^7$		$2,51 \times 10^8$		1×10^7		$3,89 \times 10^7$	
24 horas	$4,47 \times 10^{10}$		$7,08 \times 10^9$		$7,76 \times 10^9$		$5,13 \times 10^7$		$5,76 \times 10^8$	
24 horas	$6,61 \times 10^{10}$		$4,57 \times 10^9$		$3,55 \times 10^9$		$6,03 \times 10^8$		$1,95 \times 10^8$	
Incorp. FOS	$3,06 \times 10^{10}$	-0,16	$1,76 \times 10^{10}$	0,40	$1,82 \times 10^{10}$	0,37	$4,15 \times 10^7$	-0,09	$6,98 \times 10^7$	-0,92
Incorp. FOS	$8,36 \times 10^{10}$	0,10	$3,67 \times 10^9$	-0,10	$8,33 \times 10^8$	-0,63	$1,11 \times 10^8$	-0,73	$2,69 \times 10^7$	-0,86
Final	$3,13 \times 10^{10}$	0,01	$1,39 \times 10^{10}$	-0,10	$1,03 \times 10^{10}$	-0,25	$6,31 \times 10^8$	1,18	$3,72 \times 10^7$	-0,27
Final	$6,93 \times 10^{10}$	-0,08	$2,46 \times 10^9$	-0,17	$1,37 \times 10^9$	0,21	$2,92 \times 10^9$	1,42	$5,07 \times 10^7$	0,28

Cólon descendente	DAPI	Δ	BAC	Δ	BIF	Δ	CLOS	Δ	SRB	Δ
Inóculo Inicial	$1,05 \times 10^{10}$		$6,17 \times 10^8$		$2,57 \times 10^8$		$4,07 \times 10^6$		$1,51 \times 10^7$	
Inóculo Inicial	$1,51 \times 10^{10}$		$6,03 \times 10^7$		$2,51 \times 10^8$		1×10^7		$3,89 \times 10^7$	
24 horas	$7,08 \times 10^{10}$		$1,26 \times 10^{10}$		$1,32 \times 10^{10}$		$6,46 \times 10^7$		$4,47 \times 10^8$	
24 horas	$7,76 \times 10^{10}$		$4,90 \times 10^9$		$3,98 \times 10^9$		$4,47 \times 10^8$		$1,26 \times 10^8$	
Incorp. FOS	$2,37 \times 10^{10}$	-0,47	$1,42 \times 10^{10}$	0,05	$1,65 \times 10^{10}$	0,10	$3,76 \times 10^7$	-0,23	$1,34 \times 10^8$	-0,52
Incorp. FOS	$6,97 \times 10^{10}$	-0,05	$4,45 \times 10^9$	-0,04	$1,87 \times 10^9$	-0,33	$5,57 \times 10^7$	-0,90	$2,69 \times 10^7$	-0,67
Final	$4,08 \times 10^{10}$	0,24	$9,18 \times 10^9$	-0,19	$1,16 \times 10^{10}$	-0,15	$4,60 \times 10^8$	1,09	$4,68 \times 10^7$	-0,46
Final	$3,89 \times 10^{10}$	-0,25	$2,88 \times 10^9$	-0,19	$1,34 \times 10^9$	-0,15	$1,26 \times 10^9$	1,35	$5,56 \times 10^7$	0,32

Δ = diferença (Log_{10}) entre os valores de incorporação de FOS (dia 11) e após 24 horas de fermentação e entre o valor final (22 dias) e o valor no início da incorporação de FOS (dia 11).

Figura 1 - Contagem celular total (DAPI), bacteróides, bifidobactérias, clostrídios e bactérias sulfato redutoras (Log UFC/mL), em meio com baixo teor de sulfato ferroso (11mg FeSO₄/L), no tempo inicial, com 24 horas de fermentação, após incorporação de FOS (no 11 dia) e valores finais (22 dias), nos diferentes segmentos de modelo intestinal.

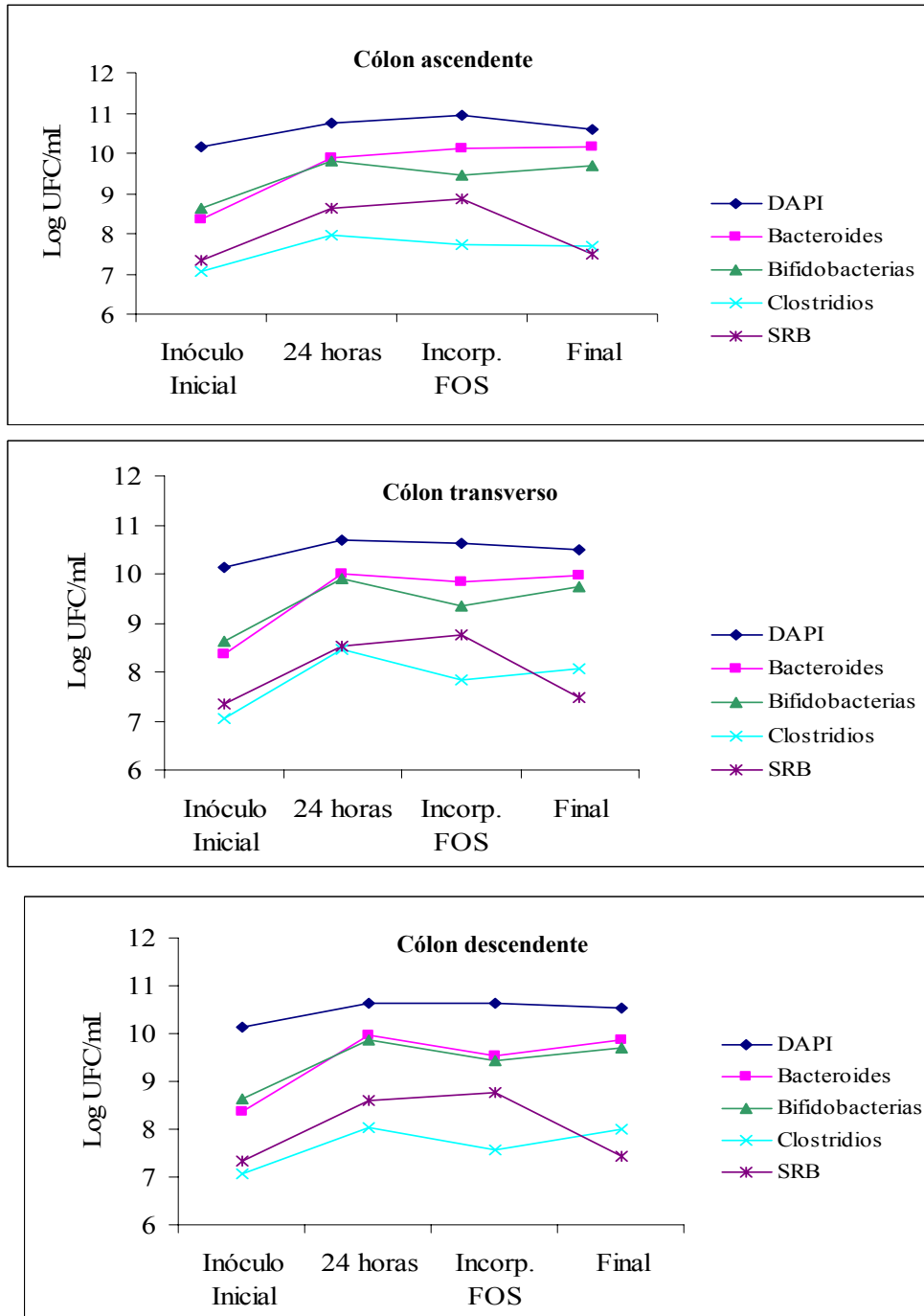


Figura 2 - Contagem celular total (DAPI), bacteróides, bifidobactérias, clostrídios e bactérias sulfato redutoras (Log UFC/mL), em meio com alto teor de sulfato ferroso (33 mg FeSO₄/L), no tempo inicial, com 24 horas de fermentação, após incorporação de FOS (no 11 dia) e valores finais (22 dias), nos diferentes segmentos de modelo intestinal.

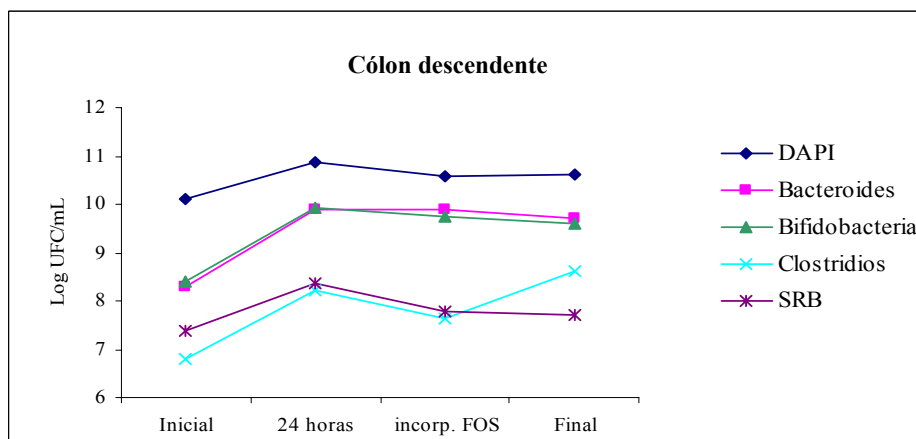
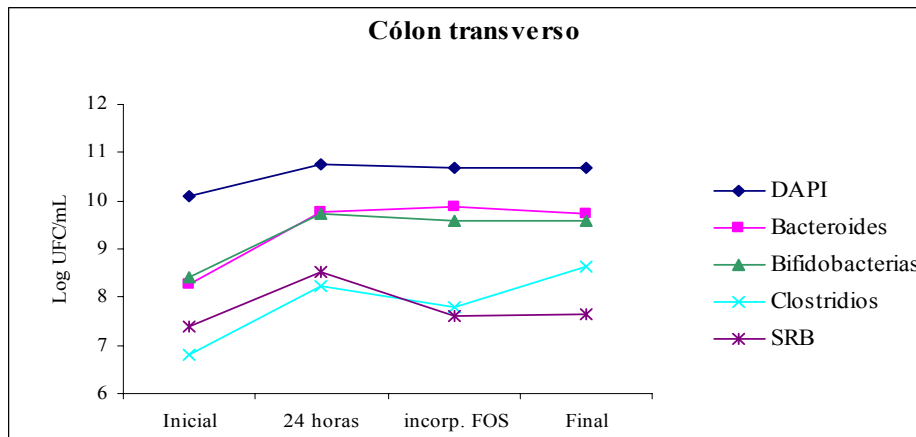
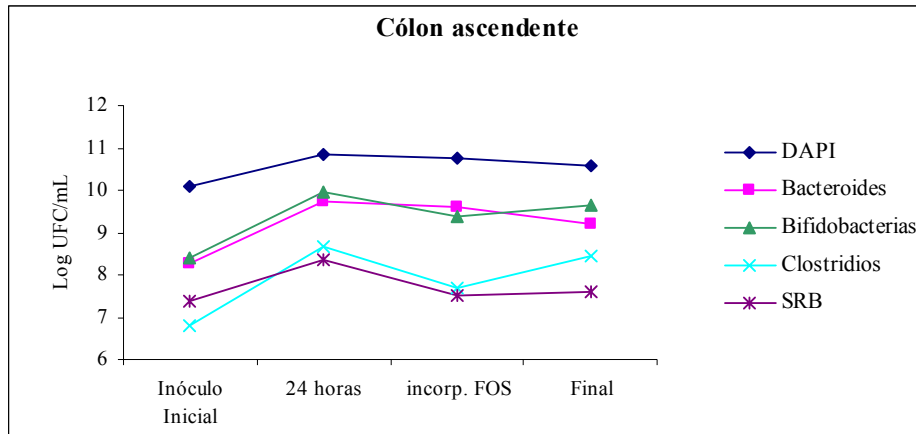


Tabela 7 – Diferença entre as contagens finais e iniciais (Log UFC/g) de cada período experimental da contagem celular total (DAPI), bacteróides (Bac), bifidobactérias (Bif), clostrídios (Clos) e sulfato redutores (SRB), no recipiente representado o cólon ascendente, na comparação entre dietas com baixo ou alto teor de sulfato ferroso e sem ou com FOS, obtidas por meio da técnica de FISH.

Dietas	DAPI	Bac	Bif	Clos	SRB
Baixo Fe	0,04 ^a	0,22 ^a	-0,34 ^{a*}	-0,14 ^a	0,10 ^{a***}
Baixo Fe + FOS	-0,10 ^a	0,10 ^a	0,10 ^b	-0,09 ^a	-0,37 ^b
Alto Fe	-0,07 ^{a***}	-0,14 ^{a***}	-0,56 ^{a***}	-0,99 ^{a*}	-0,07 ^a
Alto Fe + FOS	-0,29 ^b	-0,57 ^b	0,29 ^b	0,54 ^b	-0,18 ^a
Baixo Fe	0,04 ^a	0,22 ^a	-0,34 ^a	-0,14 ^{a*}	0,10 ^a
Alto Fe	-0,07 ^a	-0,14 ^a	-0,56 ^a	-0,99 ^b	-0,07 ^a
Baixo Fe + FOS	-0,10 ^a	0,10 ^{a**}	0,10 ^a	-0,09 ^a	-0,37 ^a
Alto Fe + FOS	-0,29 ^a	-0,57 ^b	0,29 ^a	0,54 ^a	-0,18 ^a

Dieta com baixo conteúdo de ferro (11,0274 mg/L); Alto conteúdo de ferro (33,0822 mg/L), FOS: Raftilose® P95.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de t, para 10% de significância.

^{**} significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de t.

^{*} significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de t.

^{***} significativo ao nível de 10% de probabilidade pelo teste de t.

Tabela 8 – Diferença entre as contagens finais e iniciais (Log UFC/ g) de cada período experimental de Contagem celular total (DAPI), bacteróides (Bac), bifidobactérias (Bif), clostrídios (Clos) e sulfato redutores (SRB), no recipiente representado o cólon transversal, na comparação entre dietas contendo baixo ou alto teor de sulfato ferroso e sem ou com FOS, obtidas por meio da técnica de FISH.

Dieta	DAPI	Bac	Bif	Clos	SRB
Baixo Fe	0,31 ^a	-0,18 ^{a***}	-0,55 ^{a**}	-0,03 ^a	0,20 ^{a*}
Baixo Fe + FOS	0,10 ^a	0,15 ^b	0,16 ^b	0,13 ^a	-0,27 ^b
Alto Fe	-0,14 ^{a***}	0,11 ^{a***}	-0,13 ^a	-0,46 ^{a*}	-0,05 ^a
Alto Fe + FOS	-0,57 ^b	-0,24 ^b	-0,05 ^a	0,75 ^b	-0,14 ^a
Baixo Fe	0,31 ^{a***}	-0,18 ^a	-0,55 ^a	-0,03 ^a	0,20 ^a
Alto Fe	-0,14 ^b	0,11 ^a	-0,13 ^a	-0,46 ^a	-0,05 ^a
Baixo Fe + FOS	0,10 ^{a**}	0,15 ^{a*}	0,16 ^a	0,13 ^a	-0,27 ^a
Alto Fe + FOS	-0,57 ^b	-0,24 ^b	-0,05 ^a	0,75 ^a	-0,14 ^a

Dieta com baixo conteúdo de ferro (11,0274 mg/L); Alto conteúdo de ferro (33,0822 mg/L), FOS: Raftilose® P95.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de t, para 10% de significância.

^{*} significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de t.

^{**} significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de t.

^{***} significativo ao nível de 10% de probabilidade pelo teste de t.

Tabela 9 – Diferença entre as contagens finais e iniciais (Log UFC/ g) de cada período experimental de Contagem celular total (DAPI), bacteróides (Bac), bifidobactérias (Bif), clostrídios (Clos) e sulfato redutores (SRB), no recipiente representado o cólon descendente, na comparação entre dietas contendo baixo ou alto teor de sulfato ferroso e sem ou com FOS, obtidas por meio da técnica de FISH.

Dietas	DAPI	Bac	Bif	Clos	SRB
Baixo Fe	-0,16 ^{a***}	-0,43 ^{a**}	-0,42 ^{a**}	-3,51 ^{a***}	-1,60 ^a
Baixo Fe + FOS	0,15 ^b	0,57 ^b	0,19 ^b	0,37 ^b	-0,22 ^a
Alto Fe	0,11 ^{a***}	-0,09 ^{a*}	-0,19 ^a	-0,60 ^{a***}	-0,28 ^a
Alto Fe + FOS	-0,24 ^b	-0,29 ^b	-0,23 ^a	0,89 ^b	-0,08 ^a
Baixo Fe	-0,16 ^a	-0,43 ^{a**}	-0,42 ^{a*}	-3,51 ^a	-1,60 ^a
Alto Fe	0,11 ^a	-0,09 ^b	-0,19 ^b	-0,60 ^a	-0,28 ^a
Baixo Fe + FOS	0,15 ^{a**}	0,57 ^{a**}	0,19 ^{a**}	0,37 ^a	-0,22 ^a
Alto Fe + FOS	-0,24 ^b	-0,29 ^b	-0,23 ^b	0,89 ^a	-0,08 ^a

Dieta com baixo conteúdo de ferro (11,0274 mg/L); Alto conteúdo de ferro (33,0822 mg/L), FOS: Raftilose® P95.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de t, para 10% de significância.

^{***} significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de t.

^{*} significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de t.

^{**} significativo ao nível de 10% de probabilidade pelo teste de t.

A incorporação de FOS resultou em aumento de bifidobactérias e lactobacilos, independente do teor de sulfato ferroso inicial do meio, indicando que FOS igualaria as condições de crescimento. O fato de FOS aumentar a contagem desses grupos bacterianos era esperado, pois experimentos anteriores (MITSUOKA, 1992; ROBERFROID et al., 1998; HAVENAAR et al., 1999) foram consistentes em mostrar um aumento na quantidade de bifidobactérias associado ou não com aumento de lactobacilos, quando há suplementação com prebióticos.

O pH do meio também influencia o efeito de FOS e ferro, pela seleção de microrganismos mais adaptados aos diferentes pHs, mas também porque pode solubilizar parte de complexos minerais. No caso específico do ferro, como está sendo enfatizado, esse mineral indispensável à maioria dos microrganismos também pode ser potencialmente danoso às células pois está implicado na produção substâncias danosas como radicais livres e peróxido de hidrogênio, ao participar da reação de Fenton (VONK et al., 1988). No modelo intestinal deve-se considerar que, ao serem interligados, os vasos de fermentação apresentarão alterações nos constituintes do meio, simulando o cólon, como diminuição da

concentração do substrato inicial, que é parcialmente fermentado nos primeiros recipientes, e formação de metabólitos que passam de um para outro. O efeito diferenciado pode ser visto especialmente com relação aos dados obtidos em no último recipiente, representando o cólon descendente.

Em pH mais ácido há uma maior solubilidade do sulfato ferroso. Isto implica em maior quantidade de ferro livre no meio, mas também maior quantidade de sulfato, que pode exercer ação sobre os microrganismos. Em meios com menor teor de sulfato ferroso observa-se um decréscimo menor de clostrídios. Isto pode ser devido à formação de esporos em meio adverso, que diminuiria a ação de potenciais bacteriocinas presentes. Pelo método microbiológico observa-se um aumento de bifidobactérias em meio com alto teor de sulfato ferroso, o que pode indicar uma maior disponibilidade do mineral para o crescimento.

A contagem total bacteriana (DAPI) mostrou-se estável, independente do meio ou pH, indicando um sistema onde o máximo de concentração populacional foi alcançado, o mesmo observado com relação à contagem de anaeróbios totais (ágar WC). Esta estabilidade já foi observada no experimento anterior (capítulo anterior).

Em meio contendo alto teor de sulfato ferroso que ao ser suplementado com FOS resultou em diminuição da contagem total ($p < 0,10$), juntamente com diminuição de bacteróides e aumento de clostrídios em todos os pHs. Os eventos podem estar associados (aumento de clostrídios levando a uma diminuição de bacteróides) ou serem independentes, com o FOS estimulando grupos que produziram antibiose, como por exemplo bifidobactérias. Exemplos de antibiose foram obtidos em experimentações realizadas por GIBSON & WANG (1994), os quais observaram que algumas cepas de *B. infantis* secretam substâncias antimicrobianas, as quais atuam sobre *C. perfringens* e *E. coli* em pH 7,0 ou 5,3, com efeito inibitório estendido para *Bacteróides fragilis*, enquanto outras 8 cepas de bifidobactérias mostraram-se capazes de secretar substâncias bacteriostáticas ou bactericidas, sendo que estas substâncias não estariam relacionadas com a presença de acetato ou lactato.

Embora o principal grupo bacteriano que fermenta os FOS seja o das bifidobactérias (exceto *B. bifidum*), algumas espécies de lactobacilos como *L. acidophilus* e *L. casei* também podem utilizá-los como substrato (KAPLAN & HUTKINS, 2000), além de existirem evidências de que *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *E. faecium*, *Bacteróides vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* e *B. fragilis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Clostridium* spp. (principalmente *C. butyricum*) também podem utilizá-lo (O'SULLIVAN, 1996; ROBERFROID et al., 1998,

HAVENAAR et al., 1999). Os resultados obtidos com os modelos intestinais indicaram que FOS, em meios com alto conteúdo de ferro, pode estimular o crescimento de clostrídios, fato que pode ter importância para a área médica, pois muitas espécies de clostrídios, como *C. perfringens*, *C. botulinicum*, *C. difficile* entre outros, estão relacionados com doenças intestinais (BROOKS et al., 1995). Outros trabalhos devem ser realizados nesta área para determinar quais espécies podem utilizar FOS, de modo a verificar a importância na ecologia microbiana intestinal deste fato.

Observou-se que a adição de FOS a meios pobres em ferro reduziu ($p < 0,05$) a concentração de bactérias sulfato-redutoras (SRB), bactérias que estão sendo associadas a colite ulcerativa. A biodisponibilidade de sulfato modula o crescimento *in vitro* de SRB, pois estas apresentam como característica a utilização de sulfato como receptor nas reações de oxiredução, com tendo H_2S como produto final do metabolismo (GIBSON et al., 1991). A diminuição de SRB pela incorporação de FOS pode ser resultado de antibiose (menos provável, pois não foi observada em ambientes com alto teor de sulfato ferroso), de uma estimulação de grupos bacterianos que também utilizem sulfato ferroso, em uma competição nutricional ou mesmo a uma menor produção de ácidos graxos de cadeia curta, que normalmente são utilizados como fonte de energia por bactérias deste grupo (WILLIS et al., 1997). O efeito inibitório não foi observado em dietas contendo alto teor de sulfato ferroso nem no último segmento do modelo intestinal (cólon descendente).

A incorporação de FOS ao meio com baixo teor de sulfato ferroso resultou em aumento significativo de todas as populações estudadas (inclusive DAPI), exceto de SRB, no cólon descendente (Tabela 9). No meio contendo alto teor de sulfato ferroso observa-se que a incorporação de FOS resultou em diminuição da contagem total ($p < 0,10$) e bacteróides ($p < 0,05$) e aumento de clostrídios ($p < 0,05$), conforme citado anteriormente, enquanto a população de bifidobactérias manteve-se estável. Nesse segmento há uma menor dissociação de ferro, além de possível diminuição no teor desse mineral no meio devido à sua utilização por microrganismos nos vasos de fermentação anteriores.

Embora exista evidência de que bacteróides possam fermentar FOS (ROBERFROID et al., 1998), os resultados encontrados estão de acordo com os apresentados por RAO (1999), onde a suplementação com FOS derivado de chicória levou a diminuição significativa de bacteróides.

No cólon descendente verificou-se que a dieta com alto teor de sulfato ferroso resultou em uma diminuição menos acentuada de todos os grupos avaliados, mas em um aumento na contagem bacteriana total, indicando o aumento de outros grupos não contemplados pela técnica de FISH em detrimento das populações analisadas.

A técnica de FISH é utilizada para grupos com maior representatividade, devido às diluições empregadas para permitir uma melhor contagem populacional. Assim, juntamente com as análises de hibridização foram realizadas análises microbiológicas por plaqueamento.

As Tabelas 10 e 11 mostram os resultados das contagens de anaérobios totais, enterobactérias, bifidobactérias e lactobacilos (UFC/mL) no inóculo inicial, com 24 h de fermentação, após incorporação de FOS (no 11 dia) e valores finais (22 dias), nos diferentes recipientes, em meio com baixo e alto teor de sulfato ferroso, respectivamente.

A Figura 3 sumariza os resultados indicados na Tabela 10, enquanto a Figura 4 sumariza os dados da Tabela 11. Nas dietas com baixo teor de sulfato ferroso verifica-se uma diminuição acentuada do nível de enterobactérias, em todos os recipientes. A incorporação de FOS recupera os níveis deste grupo populacional, além de promover aumento da contagem de lactobacilos, mais acentuada no cólon transversal (Figura 3). As dietas com alto teor de sulfato ferroso levaram a uma diminuição de bifidobactérias (em todos os recipientes), lactobacilos e anaeróbios totais (cólon transversal), mas a população de enterobactérias permaneceu estável. A incorporação de FOS resultou em um aumento na população de bifidobactérias e lactobacilos em todos os recipientes (Figura 4).

As comparações pelo teste de t, entre as alterações encontradas nos diferentes grupos bacterianos, com as dietas controle ou FOS, em meio com baixo (11 mg FeSO_4/L meio) ou alto (33 mg FeSO_4/L meio) teor de sulfato ferroso, para diferentes segmentos intestinais representados no modelo intestinal, estão indicadas respectivamente nas Tabelas 12, 13 e 14.

Tabela 10 - Contagem anaérobios totais, enterobactérias, bifidobactérias e lactobacilos (UFC/mL) no inóculo inicial, com 24 horas de fermentação, após incorporação de FOS (no 11 dia) e valores finais (22 dias), nos diferentes segmentos de modelo intestinal, em meio com baixo teor de sulfato ferroso (11 mg/L) . Média de triplicata.

Cólon ascendente	Anaerobios totais	Δ	Enterobacteria	Δ	Bifidobacteria	Δ	Lactobacilos	Δ
Inóculo Inicial	1,5x10 ¹⁰		3,47x10 ⁵		1,56x10 ⁹		2,62x10 ⁴	
Inóculo Inicial	3,13x10 ⁶		2,27x10 ⁵		7,50x10 ⁵		3,20x10 ⁴	
24 horas	4,22x10 ⁹		7,00x10 ⁴		1,23x10 ⁹		1,55x10 ⁴	
24 horas	1,13x10 ⁶		2,00x10 ⁴		1,72x10 ⁵		5,00x10 ²	
Incorp. FOS	5,61x10 ⁸	-0,88	1x10 ⁰	-4,85	7,26x10 ⁶	-2,23	4,07x10 ⁴	0,42
Incorp. FOS	1,50x10 ⁶	0,12	1,00x10 ¹	-3,30	1,00x10 ⁶	0,77	9,67x10 ²	0,29
Final	2,10x10 ⁷	-1,43	8,84x10 ⁵	5,95	1,46x10 ⁷	0,30	1,13x10 ⁶	1,45
Final	1,63x10 ⁸	2,04	1,22x10 ⁶	5,08	1,02x10 ⁷	1,01	1,90x10 ⁶	3,29

Cólon transversal	Anaerobios totais	Δ	Enterobacteria	Δ	Bifidobacteria	Δ	Lactobacilos	Δ
Inóculo Inicial	1,5x10 ¹⁰		3,47x10 ⁵		1,56x10 ⁹		2,62x10 ⁴	
Inóculo Inicial	3,13x10 ⁶		2,27x10 ⁵		7,50x10 ⁵		3,20x10 ⁴	
24 horas	4,17x10 ⁹		4,55x10 ⁷		5,67x10 ⁸		7,38x10 ⁴	
24 horas	3,33x10 ⁵		1,17x10 ⁴		7,33x10 ⁴		1,03x10 ⁴	
Incorp. FOS	9,77x10 ⁷	-1,63	1,20x10 ²	-5,58	7,27x10 ⁶	-1,89	3,01x10 ⁴	-0,39
Incorp. FOS	7,37x10 ⁶	1,34	5,00x10 ³	-0,37	1,48x10 ⁶	1,30	7,50x10 ²	-1,14
Final	1,84x10 ⁷	-0,72	3,06x10 ⁵	3,40	1,52x10 ⁷	0,32	3,08x10 ⁶	0,01
Final	1,08x10 ⁹	2,17	1,30x10 ⁶	2,42	1,59x10 ⁸	2,03	3,04x10 ⁶	3,61

Cólon descendente	Anaerobios totais	Δ	Enterobacteria	Δ	Bifidobacteria	Δ	Lactobacilos	Δ
Inóculo Inicial	1,5x10 ¹⁰		3,47x10 ⁵		1,56x10 ⁹		2,62x10 ⁴	
Inóculo Inicial	3,13x10 ⁶		2,27x10 ⁵		7,50x10 ⁵		3,20x10 ⁴	
24 horas	3,95x10 ⁹		3,52x10 ⁶		9,63x10 ⁸		9,00x10 ³	
24 horas	7,00x10 ⁵		2,48x10 ⁵		9,00x10 ⁴		4,50x10 ³	
Incorp. FOS	7,11x10 ⁷	-1,74	4,58x10 ³	-2,88	4,94x10 ⁶	-2,29	1,73x10 ⁴	0,28
Incorp. FOS	3,20x10 ⁷	1,66	7,50x10 ³	-1,52	1,33x10 ⁶	1,17	1,00x10 ³	-0,65
Final	3,43x10 ⁷	-0,32	1,02x10 ⁵	1,35	2,11x10 ⁷	0,63	1,03x10 ⁵	0,77
Final	2,13x10 ⁷	-0,18	3,32x10 ⁵	1,65	1,82x10 ⁶	0,14	1,09x10 ⁶	3,04

Δ = diferença (Log₁₀) entre os valores de incorporação de FOS (dia 11) e após 24 horas de fermentação e entre o valor final (22 dias) e o valor no início da incorporação de FOS (dia 11).

Tabela 11 - Contagem anaérobios totais, enterobactérias, bifidobactérias e lactobacilos (UFC/mL) no inóculo inicial, com 24 horas de fermentação, após incorporação de FOS (no 11 dia) e valores finais (22 dias), nos diferentes segmentos de modelo intestinal, em meio com alto teor de sulfato ferroso (33 mg/L). Média de triplicata.

Cólon ascendente	Anaerobios totais	Δ	Enterobacteria	Δ	Bifidobacteria	Δ	Lactobacilos	Δ
Inóculo Inicial	$2,47 \times 10^9$		$6,67 \times 10^3$		$4,27 \times 10^8$		$3,02 \times 10^1$	
Inóculo Inicial	$3,13 \times 10^6$		$2,27 \times 10^5$		$7,50 \times 10^5$		$3,20 \times 10^4$	
24 horas	$3,67 \times 10^8$		$5,00 \times 10^3$		$1,52 \times 10^5$		$3,00 \times 10^1$	
24 horas	$1,38 \times 10^6$		$3,33 \times 10^4$		$1,10 \times 10^5$		$1,67 \times 10^3$	
Incorp. FOS	$1,04 \times 10^8$	-0,55	$5,33 \times 10^4$	1,03	$6,02 \times 10^7$	2,60	$6,71 \times 10^5$	4,35
Incorp. FOS	$1,08 \times 10^9$	2,89	$9,75 \times 10^4$	0,47	$1,13 \times 10^5$	0,01	$3,00 \times 10^1$	-1,74
Final	$5,75 \times 10^7$	-0,26	$6,42 \times 10^5$	1,08	$3,99 \times 10^7$	-0,18	$2,19 \times 10^7$	1,51
Final	$2,67 \times 10^7$	-1,61	$1,89 \times 10^5$	0,29	$2,68 \times 10^6$	1,38	$3,26 \times 10^5$	4,04
Cólon transversos	Anaerobios totais	Δ	Enterobacteria	Δ	Bifidobacteria	Δ	Lactobacilos	Δ
Inóculo Inicial	$2,47 \times 10^9$		$6,67 \times 10^3$		$4,27 \times 10^8$		$3,02 \times 10^1$	
Inóculo Inicial	$3,13 \times 10^6$		$2,27 \times 10^5$		$7,50 \times 10^5$		$3,20 \times 10^4$	
24 horas	$1,98 \times 10^8$		$3,33 \times 10^3$		$3,07 \times 10^5$		$3,00 \times 10^1$	
24 horas	$1,33 \times 10^6$		$2,5 \times 10^4$		$1,57 \times 10^5$		$1,67 \times 10^3$	
Incorp. FOS	$3,91 \times 10^7$	-0,71	$1,25 \times 10^4$	0,57	$2,58 \times 10^7$	1,93	$1,39 \times 10^6$	4,67
Incorp. FOS	$2,34 \times 10^9$	3,24	$7,42 \times 10^4$	0,47	$2,05 \times 10^5$	0,12	$3,00 \times 10^1$	-1,74
Final	$5,66 \times 10^7$	0,16	$8,08 \times 10^4$	0,81	$2,06 \times 10^7$	-0,10	$1,01 \times 10^7$	0,86
Final	$8,11 \times 10^8$	-0,46	$3,78 \times 10^5$	0,71	$7,18 \times 10^6$	1,54	$3,90 \times 10^5$	4,11
Cólon descendente	Anaerobios totais	Δ	Enterobacteria	Δ	Bifidobacteria	Δ	Lactobacilos	Δ
Inóculo Inicial	$2,47 \times 10^9$		$6,67 \times 10^3$		$4,27 \times 10^8$		$3,02 \times 10^1$	
Inóculo Inicial	$3,13 \times 10^6$		$2,27 \times 10^5$		$7,50 \times 10^5$		$3,20 \times 10^4$	
24 horas	$2,90 \times 10^7$		$8,33 \times 10^3$		$1,98 \times 10^5$		$3,00 \times 10^1$	
24 horas	$7,67 \times 10^5$		$4,17 \times 10^4$		$2,28 \times 10^5$		$6,67 \times 10^2$	
Incorp. FOS	$1,10 \times 10^8$	0,58	$8,33 \times 10^3$	0,00	$3,86 \times 10^7$	2,29	$2,54 \times 10^6$	4,93
Incorp. FOS	$4,59 \times 10^7$	1,78	$5,09 \times 10^6$	2,09	$9,00 \times 10^4$	-0,40	$3,00 \times 10^1$	-1,35
Final	$1,87 \times 10^7$	-0,77	$2,33 \times 10^4$	0,45	$1,71 \times 10^7$	-0,35	$9,63 \times 10^6$	0,58
Final	$7,81 \times 10^8$	1,23	$8,17 \times 10^5$	-0,79	$8,67 \times 10^6$	1,98	$2,38 \times 10^5$	3,90

Δ = diferença (Log_{10}) entre os valores de incorporação de FOS (dia 11) e após 24 horas de fermentação e entre o valor final (22 dias) e o valor no início da incorporação de FOS (dia 11).

Figura 3 - Contagem por plaqueamento de anaeróbios totais, bifidobactérias, lactobacilos e enterobactérias (Log UFC/mL), em meio com baixo teor de sulfato ferroso (11 mg FeSO₄/L), no tempo inicial, com 24 horas de fermentação, após incorporação de FOS (no 11 dia) e valores finais (22 dias), nos diferentes segmentos de modelo intestinal.

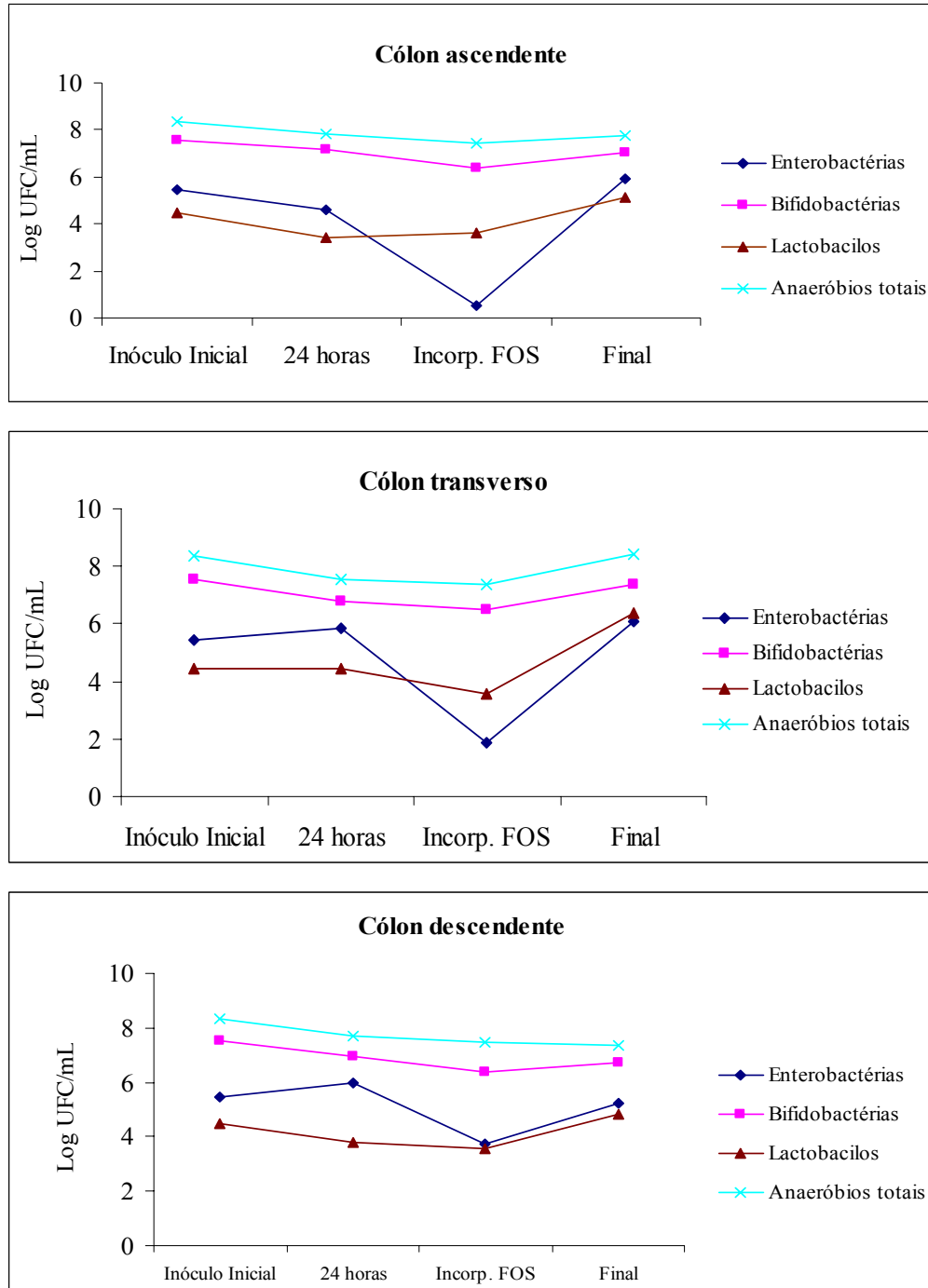


Figura 4 - Contagem por plaqueamento de anaeróbios totais, bifidobactérias, lactobacilos e enterobactérias (Log UFC/mL), em meio com alto teor de sulfato ferroso (33 mg FeSO₄/L), no tempo inicial, com 24 horas de fermentação, após incorporação de FOS (no 11 dia) e valores finais (22 dias), nos diferentes segmentos de modelo intestinal.

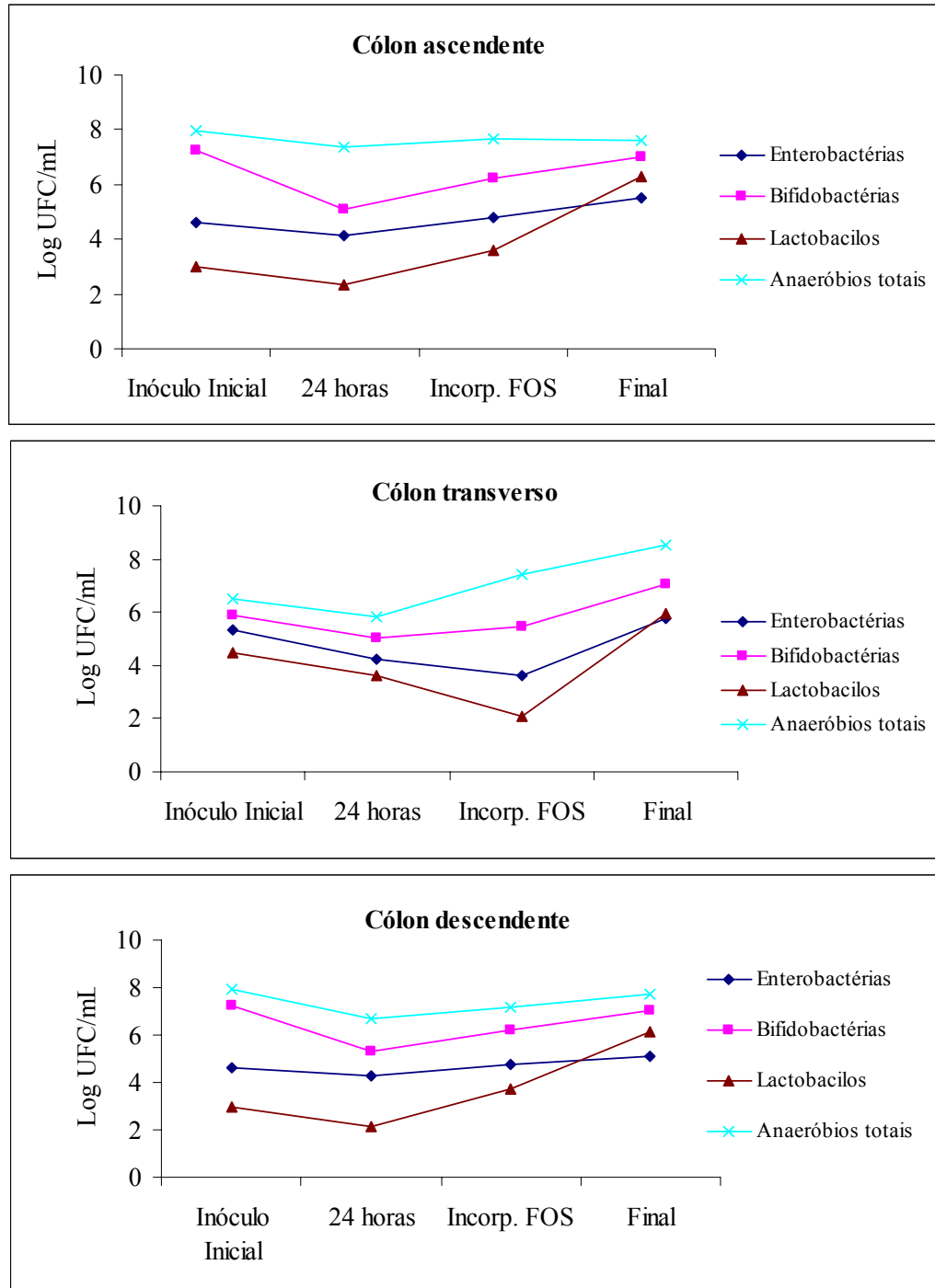


Tabela 12 – Diferença entre as contagens finais e iniciais (Log UFC/ g), de cada período experimental de anaeróbios totais (WC), bifidobactérias (Bif), lactobacilos (Lac) e enterobactérias (MC), no pH 5,5, representado o cólon ascendente, na comparação entre dietas com baixo ou alto teor de sulfato ferroso e sem ou com FOS, obtidas por meio de plaqueamento microbiológico.

Dieta	WC	Bif	Lac	MC
Baixo Fe	-0,39 ^a	-0,78 ^{a***}	0,18 ^a	-4,07 ^{a**}
Baixo Fe + FOS	0,42 ^a	0,80 ^b	1,86 ^a	5,43 ^b
Alto Fe	0,32 ^a	1,13 ^a	1,22 ^a	0,67 ^a
Alto Fe + FOS	-1,00 ^a	0,46 ^a	2,96 ^a	0,49 ^a
Baixo Fe	-0,39 ^a	-0,78 ^{a***}	0,18 ^a	-4,07 ^{a**}
Alto Fe	0,32 ^a	1,13 ^b	1,22 ^a	0,67 ^b
Baixo Fe + FOS	0,42 ^a	0,80 ^a	1,86 ^a	5,43 ^{a**}
Alto Fe + FOS	-1,00 ^a	0,46 ^a	2,96 ^a	0,49 ^b

Dieta com baixo conteúdo de ferro (11,0274 mg/L); Alto conteúdo de ferro (33,0822 mg/L), FOS: Raftilose® P95.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de t, para 10% de significância.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de t.

*** significativo ao nível de 10% de probabilidade pelo teste de t.

Tabela 13 – Diferença entre as contagens finais e iniciais (Log UFC/ g) de anaeróbios totais (WC), bifidobactérias (Bif), lactobacilos (Lac) e enterobactérias (MC), no recipiente representado o cólon transverso, na comparação entre dieta com baixo ou alto teor de sulfato ferroso e sem ou com FOS, obtidas por meio de plaqueamento microbiológico.

Dieta	WC	Bif	Lac	MC
Baixo Fe	-0,19 ^a	-0,30 ^a	-0,88 ^a	-4,02 ^{a**}
Baixo Fe + FOS	0,31 ^a	0,80 ^a	1,28 ^a	5,27 ^b
Alto Fe	0,60 ^a	0,70 ^a	1,35 ^a	0,47 ^a
Alto Fe + FOS	-0,53 ^a	0,41 ^a	2,77 ^a	0,67 ^a
Baixo Fe	-0,19 ^a	-0,30 ^a	-0,88 ^a	-4,02 ^{a**}
Alto Fe	0,60 ^a	0,70 ^a	1,35 ^a	0,47 ^b
Baixo Fe + FOS	0,31 ^a	0,80 ^a	1,28 ^a	5,27 ^{a**}
Alto Fe + FOS	-0,53 ^a	0,41 ^a	2,77 ^a	0,67 ^b

Dieta com baixo conteúdo de ferro (11,0274 mg/L); Alto conteúdo de ferro (33,0822 mg/L), FOS: Raftilose® P95.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de t, para 10% de significância.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de t.

Tabela 14 – Diferença entre as contagens finais e iniciais (Log UFC/ g) de anaeróbios totais (WC), bifidobactérias (Bif), lactobacilos (Lac) e enterobactérias (MC), no recipiente representado o cólon transversal, na comparação entre dieta com baixo ou alto teor de sulfato ferroso e sem ou com FOS, obtidas por meio de plaqueamento microbiológico.

Dieta	WC	Bif	Lac	MC
Baixo Fe	-0,26 ^a	-0,59 ^a	-0,23 ^a	-2,23 ^{a**}
Baixo Fe + FOS	0,18 ^a	0,37 ^a	1,21 ^a	1,51 ^b
Alto Fe	0,53 ^a	0,87 ^a	1,57 ^a	0,50 ^a
Alto Fe + FOS	-0,01 ^a	0,73 ^a	2,79 ^a	-0,36 ^a
Baixo Fe	-0,26 ^a	-0,59 ^a	-0,23 ^a	-2,23 ^{a**}
Alto Fe	0,53 ^a	0,87 ^a	1,57 ^a	0,50 ^b
Baixo Fe + FOS	0,18 ^a	0,37 ^a	1,21 ^a	1,51 ^{a**}
Alto Fe + FOS	-0,01 ^a	0,73 ^a	2,79 ^a	-0,36 ^b

Dieta com baixo conteúdo de ferro (11,0274 mg/L); Alto conteúdo de ferro (33,0822 mg/L), FOS: Raftilose® P95.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de t, para 10% de significância.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de t.

O grupo das enterobactérias diminuiu ($p < 0,01$) durante o período de suplementação de dietas controle com baixo teor de sulfato ferroso, independente do pH do meio. A posterior incorporação de FOS resultou em crescimento do grupo das enterobactérias indicando que a Raftilose® P95 é utilizada por este grupo bacteriano (Hartermink et al., 1997, citados por LE BLAY et al., 1999), ou que os grupos que utilizam FOS produzem metabólitos que favorecem o crescimento de enterobactérias, em um efeito indireto. Embora os dados indiquem uma diferença acentuada entre meio pobre em ferro + FOS e meio rico em ferro + FOS, estes dados se referem à diferença entre a população inicial e a final, e indicam que, em meio rico em ferro existe uma estabilidade na população de enterobactérias. A incorporação de FOS a meios pobres em ferro eleva a população aos níveis iniciais (Tabela 10), sugerindo uma melhor utilização da fonte de ferro presente no meio e propiciando o crescimento bacteriano. O fato de ferro ser necessário ao grupo de enterobactérias foi demonstrado por KOCHAN et al. (1977).

Verifica-se que os valores de enterobactérias em meio com baixo ou alto teor de sulfato ferroso são semelhantes após a incorporação de FOS (Tabelas 10 e 11) atingindo cerca de 10^5 UFC/g. O crescimento nas dietas com alto teor de sulfato ferroso é menor, já que os níveis iniciais encontram-se próximos aos valores finais (Figura 4), enquanto na dieta com

baixo teor de sulfato ferroso as populações iniciais são muito baixas sendo maior a diferença entre a contagem antes e após a incorporação de FOS (Figura 3).

Como citado anteriormente, a virulência de vários patógenos depende da biodisponibilidade de ferro. Esta importância pode ser evidenciada pelo fato de muitos microrganismos secretarem sideróforos, substâncias quelantes e sequestrantes de ferro, disponibilizando-o para a célula ou grupo bacteriano. Até o presente, a produção de sideróforos só foi encontradas em bactérias gram-negativas. Um exemplo clássico da importância do ferro foi o estudo realizado em 1977 por KOCHAN et al. Os pesquisadores trabalharam com injeção de ferro e cepas não virulentas de *E. coli*. Os resultados mostraram uma potencialização da virulência da cepa, com a mortalidade em ratos passando de 20 para 80% com a injeção de ferro, indicando que a virulência de uma cepa pode estar ligada à capacidade da célula em obter ferro do ambiente.

O aumento de populações que possam indisponibilizar ferro para potenciais patógenos seria de grande benefício para o hospedeiro. O conceito de que o hospedeiro pode apresentar habilidades nativas ou adquiridas para restringir a utilização de ferro ou outros nutrientes essenciais por microrganismos nocivos foi batizado de imunidade nutricional por KOCHAN et al. (1977).

Diversas pesquisas sobre a utilização de ferro por microrganismos foram realizadas pelo grupo do Dr. BEZKOROVAINY, que publicaram artigos sobre a incorporação de ferro por bifidobactérias. Foi demonstrada a absorção de ferro do meio e seu acúmulo por algumas espécies de bifidobactérias. A indisponibilização de ferro para outros microrganismos foi sugerido como mais um dos benefícios das bifidobactérias.

O acúmulo de ferro por *B. thermophilum* depende do conteúdo de mineral no meio no qual as células estão crescendo. Este acúmulo seria bifásico, com uma 1ª fase rápida (ligação na superfície da célula) seguida por uma 2ª fase mais lenta, indicando que a célula de bifidobactéria poderia conter ferroxidase, que converte ferro reduzido para a forma oxidada na presença de O₂. A ferroxidase aparenta ser muito mais ativa em pH 6,5 do que 5,0 (KOT et al., 1994). O conteúdo de ferro tende a ser maior em células que cresceram em meios pobres e com o ferro apresentado na forma ferrosa e o mecanismo para transporte de ferro aparenta ser induzido por baixas concentrações de ferro no meio. Bifidobactérias aparentemente não produzem sideróforos (KOT & BEZKOROVAINY, 1991), e o mecanismo de interiorização aparenta ser um processo dependente de energia (KOT & BEZKOROVAINY, 1993), o que foi comprovado posteriormente em um trabalho onde se demonstrou que a ausência de glicose levou a um acúmulo muito lento de ferro (KOT et al., 1995).

A absorção de ferro também pode ser mediada por ferro-redutase (ativada por O_2 e H_2O_2) e é acentuada em ambientes com menor teor de sulfato ferroso. Ao mesmo tempo que este mineral é indispensável para o crescimento bacteriano, altas concentrações são tóxicas para a célula. O mecanismo desenvolvido pela bifidobactérias para evitar danos celulares está relacionado com a transformação de Fe^{+2} em $Fe(OH)_3$, inócuo para a célula, o qual é precipitado e permite maiores depósitos do mineral e a sobrevivência em ambientes com maior teor de ferro (KOT et al., 1994). Trabalhos posteriores indicaram que lactobacilos também acumulam ferro por meio de mecanismo aparentemente semelhante ao das bifidobactérias, com ação de uma ferroxidase, o que os coloca como potenciais agentes benéficos no fenômeno da imunidade nutricional (KOT et al., 1995).

Embora tenha sido demonstrado que as bifidobactérias necessitam de ferro para o seu crescimento (Bezkorovainy e Topouzian, 1983 citados por BEZKOROVAINY et al., 1996), deve-se enfatizar a capacidade das bifidobactérias em incorporar uma quantidade de ferro muito superior à necessária para o seu crescimento. Esse processo indisponibilizaria o mineral para microrganismos patogênicos ou putrefativos. O mecanismo utilizado para esta incorporação englobaria o uso de radicais livres produzidos por peróxido de hidrogênio e ferro (reação de Fenton), os quais alterariam a superfície da bifidobactéria, levando a um aumento na ligação da superfície celular com $Fe(OH)_3$. O lactato produzido no lume também pode servir como agente seqüestrante (BEZKOROVAINY & KOT, 1998) podendo ser um fator importante na prevenção de câncer de cólon em indivíduos que recebem probióticos como suplementos. O ferro catalizaria a formação de mediadores sensíveis à oxidação, incluindo citocinas e eicosanóides, muitos dos quais são quimiotáteis para os neutrófilos. A persistência de ferro no lúmen pode estar associada a biomineralização, fibrose e câncer, pois o ferro exerce papel fundamental na reação inflamatória dos neutrófilos (GHIO et al., 1997).

Os dados indicam que meio pobre em ferro (sem FOS), ao chegarem ao cólon descendente, resultam em decréscimo acentuado da população de bacteróides ($p<0,05$), bifidobactérias ($p<0,05$), enterobactérias ($p<0,01$), clostrídios, SRB e lactobacilos. No entanto, enquanto a incorporação de FOS em outros ambientes (cólon ascendente e transversal) iguala as condições dos meios, no cólon descendente observa-se que o efeito de FOS é mais acentuado, com aumento de DAPI ($p<0,01$), bacteróides ($p<0,01$) e bifidobactérias ($p<0,01$), quando comparado com alto teor de sulfato ferroso acrescido de FOS. A exceção é o grupo dos lactobacilos, que apresentaram maior crescimento em meios com alto teor de sulfato ferroso e FOS, indicando que este grupo, além de potencialmente utilizar a Raftilose® P95, também é favorecido por maiores concentrações de ferro no

meio (Tabela 14).

Analisando o resultado de diversos trabalhos, ROBERFROID et al. (1998) concluíram não haver correlação entre o efeito de diferentes doses de frutanos sobre o aumento de bifidobactérias, mas que o número inicial de bifidobactérias fecais, independente da dose do prebiótico, seria mais importante para a obtenção dos aumentos verificados nas contagens desse grupo bacteriano, indicando que FOS exerceria maior efeito quando os níveis iniciais de bifidobactérias são menores. Alcançado um certo nível populacional, a incorporação de FOS traria poucos benefícios em uma microbiota estável.

3.2. Produção de ácidos graxos de cadeia curta.

A modulação da produção de ácidos graxos de cadeia curta em meios com baixo (11 mg FeSO₄/L) ou alto (33 mg FeSO₄/L) teor de sulfato ferroso está indicada nas Tabelas 15a,b e 16a,b.

As comparações pelo teste de t, entre as alterações encontradas na produção dos diferentes ácidos orgânicos, com as dietas controle ou FOS, em meio com baixo (11 mg FeSO₄/L meio) ou alto (33 mg FeSO₄/L meio) teor de sulfato ferroso, para os diferentes recipientes, representando o cólon ascendente, transversal e descendente, estão indicadas respectivamente nas Tabelas 17, 18 e 19.

Tabela 15a – Concentração de ácidos acético, propiônico, isobutírico e n-butírico (mMol/μL) no inóculo inicial, com 24 horas de fermentação, nos dias 9 e 11 (estabilidade sem FOS) e valores finais, dias 20 e 22 (9 e 11 após incorporação de FOS), nos diferentes segmentos de modelo intestinal, meio com baixo teor de sulfato ferroso (11 mg/L)

Cólon ascendente	acético	Δ	propionico	Δ	isobutírico	Δ	n-butírico	Δ
Inóculo inicial	4,67		3,88		0,00		10,79	
Inóculo inicial	4,68		3,32		0,00		5,57	
24 horas	8,23		7,83		0,00		18,46	
24 horas	17,33		32,33		0,31		32,93	
Dia 9	7,76	-0,47	11,44	3,61	0,00	0,00	23,64	5,18
Dia 9	7,26	-10,07	6,70	-25,63	0,33	0,02	15,77	-17,16
Dia 11	11,18	2,95	10,91	3,08	0,00	0,00	24,88	6,42
Dia 11	7,83	-9,50	7,01	-25,32	0,00	-0,31	25,24	-7,69
Dia 20	19,82	8,64	17,66	6,75	0,65	0,65	43,41	18,53
Dia 20	20,82	12,99	17,64	10,63	0,83	0,83	46,85	21,61
Dia 22	25,22	14,04	16,95	6,04	0,20	0,20	46,27	21,39
Dia 22	20,43	12,60	16,24	9,23	0,39	0,39	51,19	25,95

Cólon transversos	acético	Δ	propionico	Δ	isobutírico	Δ	n-butírico	Δ
Inóculo inicial	4,67		3,88		0,00		10,79	
Inóculo inicial	4,68		3,32		0,00		5,57	
24 horas	4,80		4,54		0,00		12,11	
24 horas	10,30		10,80		0,00		18,68	
Dia 9	7,93	3,13	8,74	4,20	0,00	0,00	22,99	10,88
Dia 9	8,02	-2,28	7,99	-2,81	0,00	0,00	23,80	5,12
Dia 11	10,16	5,36	12,53	7,99	2,99	2,99	23,00	10,89
Dia 11	9,54	-0,76	9,77	-1,03	0,81	0,81	33,39	14,71
Dia 20	22,70	12,54	18,11	5,58	0,44	-2,55	58,36	35,36
Dia 20	21,98	12,44	17,88	8,11	1,66	0,85	54,37	20,98
Dia 22	30,06	19,90	19,55	7,02	1,58	-1,41	56,18	33,18
Dia 22	11,72	2,18	9,89	0,12	3,36	2,55	36,13	2,74

Cólon descendente	acético	Δ	propionico	Δ	isobutírico	Δ	n-butírico	Δ
Inóculo inicial	4,67		3,88		0,00		10,79	
Inóculo inicial	4,68		3,32		0,00		5,57	
24 horas	8,13		7,63		0,00		15,80	
24 horas	11,53		12,43		0,59		19,27	
Dia 9	29,18	21,05	25,65	18,02	1,87	1,87	37,92	22,12
Dia 9	12,23	0,70	12,19	-0,24	1,19	0,60	33,41	14,14
Dia 11	11,20	3,07	13,56	5,93	1,89	1,89	27,79	11,99
Dia 11	10,56	-0,97	10,82	-1,61	1,56	0,97	36,11	16,84
Dia 20	38,73	27,53	25,89	12,33	4,15	2,26	67,19	39,40
Dia 20	20,67	10,11	17,66	6,84	4,75	3,19	58,05	21,94
Dia 22	44,82	33,62	33,09	19,53	5,79	3,90	82,71	54,92
Dia 22	13,34	2,78	9,83	-0,99	3,38	1,82	36,55	0,44

Δ = diferença (mMol/μL) entre os valores dos dias 9 e 24 horas, 11 e 24 horas; 20 e 11 dias; e 22 e 11 dias.

Tabela 15b – Concentração de ácidos isovalérico, n-valérico, capróico, L-láctico e D-láctico (mMol/ μ L) no inóculo inicial, com 24 horas de fermentação, nos dias 9 e 11 (estabilidade sem FOS) e valores finais, dias 20 e 22 (9 e 11 após incorporação de FOS), nos diferentes segmentos de modelo intestinal, meio com baixo teor de sulfato ferroso (11 mg/L).

Cólon ascendente	isovalerico	Δ	n-valerico	Δ	caproico	Δ	l-lactico	Δ	d-lactico	Δ
Inóculo inicial	0,00		0,05		0,00		0,00		0,00	
Inóculo inicial	0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	
24 horas	1,16		4,59		0,00		0,00		0,00	
24 horas	2,10		4,53		0,59		0,00		0,00	
Dia 9	0,00	-1,16	4,11	-0,48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 9	1,03	-1,07	2,74	-1,79	0,27	-0,32	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 11	0,00	-1,16	2,71	-1,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 11	0,25	-1,85	0,91	-3,62	0,00	-0,59	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 20	1,65	1,65	3,93	1,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 20	2,04	1,79	2,26	1,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,89	0,89
Dia 22	1,15	1,15	4,38	1,67	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 22	2,57	2,32	1,80	0,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	0,36
Cólon transverso	isovalerico	Δ	n-valerico	Δ	caproico	Δ	l-lactico	Δ	d-lactico	Δ
Inóculo inicial	0,00		0,05		0,00		0,00		0,00	
Inóculo inicial	0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	
24 horas	0,18		3,46		0,00		10,29		3,39	
24 horas	1,22		2,53		0,29		0,00		0,00	
Dia 9	2,06	1,88	3,86	0,40	0,00	0,00	0,00	-10,29	0,00	-3,39
Dia 9	1,44	0,22	1,00	-1,53	0,21	-0,08	0,00	0,00	0,77	0,77
Dia 11	5,56	5,38	9,70	6,24	0,21	0,21	0,00	-10,29	0,00	-3,39
Dia 11	3,83	2,61	1,30	-1,23	0,00	-0,29	0,00	0,00	1,22	1,22
Dia 20	3,33	-2,23	5,97	-3,73	0,00	-0,21	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 20	4,39	0,56	2,69	1,39	0,16	0,16	0,00	0,00	2,58	1,36
Dia 22	3,01	-2,55	5,72	-3,98	0,68	0,47	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 22	5,45	1,62	2,05	0,75	2,76	2,76	0,00	0,00	5,53	4,31
Cólon descendente	isovalerico	Δ	n-valerico	Δ	caproico	Δ	l-lactico	Δ	d-lactico	Δ
Inóculo inicial	0,00		0,05		0,00		0,00		0,00	
Inóculo inicial	0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	
24 horas	1,88		2,99		0,00		0,00		0,00	
24 horas	2,39		2,51		0,18		0,00		0,00	
Dia 9	2,75	0,87	4,66	1,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 9	3,02	0,63	1,64	-0,87	0,00	-0,18	0,00	0,00	1,92	1,92
Dia 11	2,67	0,79	4,49	1,5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 11	4,10	1,71	1,05	-1,46	0,00	-0,18	0,00	0,00	9,09	9,09
Dia 20	6,20	3,53	8,25	3,76	0,75	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 20	3,83	-0,27	8,06	7,01	2,08	2,08	0,00	0,00	41,60	32,51
Dia 22	7,37	4,70	10,01	5,52	0,73	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 22	5,62	1,52	5,02	3,97	1,86	1,86	0,00	0,00	15,78	6,69

Δ = diferença (mMol/ μ L) entre os valores dos dias 9 e 24 horas, 11 e 24 horas; 20 e 11 dias; e 22 e 11 dias.

Tabela 16a – Concentração de ácidos acético, propiônico, isobutírico e n-butírico (mMol/ μ L) no inóculo inicial, com 24 horas de fermentação, nos dias 9 e 11 (estabilidade sem FOS) e valores finais, dias 20 e 22 (9 e 11 após incorporação de FOS), nos diferentes segmentos de modelo intestinal, meio com alto teor de sulfato ferroso (33 mg/L)

Cólon ascendente	acetico	Δ	propionico	Δ	isobutirico	Δ	n-butirico	Δ
Inóculo inicial	5,28		4,31		0,00		7,10	
Inóculo inicial	4,68		3,32		0,00		5,57	
24 horas	20,39		15,21		0,00		34,2	
24 horas	33,61		24,74		0,71		44,58	
Dia 9	7,87	-12,52	3,16	-12,05	0,00	0,00	26,59	-7,61
Dia 9	32,09	-1,52	21,78	-2,96	19,25	18,54	54,41	9,83
Dia 11	12,98	-7,41	9,77	-5,44	2,43	2,43	28,95	-5,25
Dia 11	13,35	-20,26	11,80	-12,94	0,00	-0,71	24,87	-19,71
Dia 20	109,36	96,38	34,95	25,18	4,82	2,39	68,01	39,06
Dia 20	21,25	7,90	18,65	6,85	0,91	0,91	44,24	19,37
Dia 22	49,25	36,27	11,21	1,44	0,57	-1,86	24,51	-4,44
Dia 22	22,49	9,14	24,15	12,35	1,08	1,08	34,75	9,88

Cólon transverso	acetico	Δ	propionico	Δ	isobutirico	Δ	n-butirico	Δ
Inóculo inicial	5,28		4,31		0,00		7,10	
Inóculo inicial	4,68		3,32		0,00		5,57	
24 horas	7,92		6,83		0,00		18,00	
24 horas	20,77		17,9		0,93		33,83	
Dia 9	5,80	-2,12	3,17	-3,66	0,27	0,27	28,54	10,54
Dia 9	11,83	-8,94	9,34	-8,56	0,00	-0,93	29,01	-4,82
Dia 11	10,41	2,49	4,23	-2,60	0,00	0,00	28,17	10,17
Dia 11	13,1	-7,67	12,61	-5,29	0,00	-0,93	29,62	-4,21
Dia 20	58,96	48,55	24,17	19,94	5,43	5,43	57,48	29,31
Dia 20	21,58	8,48	20,17	7,56	0,90	0,90	38,10	8,48
Dia 22	16,58	6,17	14,72	10,49	1,27	1,27	31,94	3,77
Dia 22	26,81	13,71	22,34	9,73	2,67	2,67	44,09	14,47

Cólon descendente	acetico	Δ	propionico	Δ	isobutirico	Δ	n-butirico	Δ
Inóculo inicial	5,28		4,31		0,00		7,10	
Inóculo inicial	4,68		3,32		0,00		5,57	
24 horas	8,04		7,64		0,00		17,71	
24 horas	24,19		20,82		2,54		32,34	
Dia 9	17,01	8,97	9,51	1,87	4,00	4,00	39,45	21,74
Dia 9	25,81	1,62	20,08	-0,74	2,00	-0,54	51,07	18,73
Dia 11	82,13	74,09	36,67	29,03	8,23	8,23	77,34	59,63
Dia 11	14,04	-10,15	13,93	-6,89	0,15	-2,39	30,86	-1,48
Dia 20	51,04	-31,09	19,56	-17,11	4,8	-3,43	51,05	-26,29
Dia 20	23,02	8,98	21,05	7,12	2,14	1,99	39,28	8,42
Dia 22	57,11	-25,02	20,98	-15,69	4,11	-4,12	45,63	-31,71
Dia 22	24,58	10,54	22,63	8,70	1,85	1,70	40,19	9,33

Δ = diferença (mMol/ μ L) entre os valores dos dias 9 e 24 horas, 11 e 24 horas; 20 e 11 dias; e 22 e 11 dias.

Tabela 16b – Concentração de ácidos isovalérico, n-valérico, capróico, L-láctico e D-láctico (mMol/ μ L) no inóculo inicial, com 24 horas de fermentação, nos dias 9 e 11 (estabilidade sem FOS) e valores finais, dias 20 e 22 (9 e 11 após incorporação de FOS), nos diferentes segmentos de modelo intestinal, meio com alto teor de sulfato ferroso (33 mg/L).

Cólon ascendente	isovalerico	Δ	n-valerico	Δ	caproico	Δ	l-lactico	Δ	d-lactico	Δ
Inóculo inicial	0,00		0,49		0,00		0,00		0,00	
Inóculo inicial	0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	
24 horas	0,00		1,40		1,16		0,00		1,26	
24 horas	2,64		4,27		0,10		0,00		0,00	
Dia 9	0,03	0,03	0,33	-1,07	0,45	-0,71	0,00	0,00	0,00	-1,26
Dia 9	4,04	1,40	5,42	1,15	0,53	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 11	5,87	5,87	8,87	7,47	1,90	0,74	0,00	0,00	0,00	-1,26
Dia 11	0,77	-1,87	1,63	-2,64	0,00	-0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 20	4,21	-1,66	7,64	-1,23	2,77	0,87	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 20	4,02	3,25	2,17	0,54	0,33	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 22	15,30	9,43	3,35	-5,52	1,10	-0,80	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 22	1,61	0,84	0,67	-0,96	0,00	0,00	0,00	0,00	1,92	1,92

Cólon transverso	isovalerico	Δ	n-valerico	Δ	caproico	Δ	l-lactico	Δ	d-lactico	Δ
Inóculo inicial	0,00		0,49		0,00		0,00		0,00	
Inóculo inicial	0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	
24 horas	0,00		1,38		0,00		5,83		5,48	
24 horas	2,92		4,77		1,12		0,00		0,00	
Dia 9	4,91	4,91	4,75	3,37	0,01	0,01	0,00	-5,83	0,62	-4,86
Dia 9	0,72	-2,20	3,38	-1,39	0,34	-0,78	1,59	1,59	5,84	5,84
Dia 11	0,00	0,00	0,63	-0,75	0,52	0,52	0,00	-5,83	0,00	-5,48
Dia 11	1,21	-1,71	1,45	-3,32	0,00	-1,12	0,00	0,00	2,63	2,63
Dia 20	6,06	6,06	7,12	6,49	2,01	1,49	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 20	2,79	1,58	2,54	1,09	0,04	0,04	0,81	0,81	3,28	0,65
Dia 22	2,53	2,53	2,35	1,72	0,25	-0,27	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 22	6,59	5,38	3,59	2,14	0,11	0,11	0,00	0,00	2,34	-0,29

Cólon descendente	isovalerico	Δ	n-valerico	Δ	caproico	Δ	l-lactico	Δ	d-lactico	Δ
Inóculo inicial	0,00		0,49		0,00		0,00		0,00	
Inóculo inicial	0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	
24 horas	1,22		2,51		0,00		0,00		4,59	
24 horas	4,11		4,58		0,50		0,00		0,00	
Dia 9	7,41	6,19	8,72	6,21	1,29	1,29	0,00	0,00	9,20	4,61
Dia 9	4,02	-0,09	3,11	-1,47	0,81	0,31	0,00	0,00	5,98	5,98
Dia 11	10,54	9,32	11,25	8,74	1,18	1,18	0,00	0,00	0,00	-4,59
Dia 11	2,30	-1,81	1,66	-2,92	0,00	-0,50	0,00	0,00	2,62	2,62
Dia 20	8,57	-1,97	7,81	-3,44	1,09	-0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 20	4,90	2,60	3,16	1,50	0,08	0,08	0,00	0,00	9,21	6,59
Dia 22	7,03	-3,51	7,60	-3,65	2,04	0,86	0,00	0,00	0,00	0,00
Dia 22	3,69	1,39	4,44	2,78	0,13	0,13	0,00	0,00	0,00	-2,62

Δ = diferença (mMol/ μ L) entre os valores dos dias 9 e 24 horas, 11 e 24 horas; 20 e 11 dias; e 22 e 11 dias.

Tabela 17 – Concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Diferença entre a concentração final e inicial (mMol/ μ L) de AGCC no segmento representado o cólon ascendente na comparação entre dietas contendo baixo e alto teor de sulfato ferroso sem e com FOS.

Dieta	Acético	Propiônico	Isobutírico	n-Butírico	Isovalérico	n-Valérico	Capróico	D-Lactato	L-Lactato
Baixo Fe	3,83 ^a	5,42 ^a	0,08 ^a	14,20 ^{a***}	0,32 ^{a***}	2,59 ^a	0,68 ^a	0	0
Alto Fe	11,60 ^a	7,81 ^a	5,42 ^a	27,37 ^b	2,68 ^b	3,82 ^a	0,72 ^a	0	0
Baixo Fe	3,83 ^{a**}	5,42 ^{a***}	0,08 ^{a*}	14,20 ^{a*}	0,32 ^{a**}	2,59 ^{a*}	0,68 ^a	0 ^b	0
Baixo Fe + FOS	12,07 ^b	8,16 ^b	0,52 ^b	21,87 ^b	1,73 ^b	1,28 ^b	0,05 ^a	0,31 ^{a***}	0
Alto Fe	11,60 ^a	7,81 ^a	5,42 ^a	27,37 ^a	2,68 ^a	3,82 ^{a*}	0,72 ^a	0 ^a	0
Alto Fe + FOS	37,42 ^a	11,46 ^a	0,63 ^a	15,97 ^a	2,96 ^a	-1,79 ^b	0,10 ^a	0,48 ^a	0
Baixo Fe + FOS	12,07 ^a	8,16 ^a	0,52 ^a	21,87 ^a	1,73 ^a	1,28 ^{a*}	0,05 ^a	0,31 ^a	0
Alto Fe + FOS	37,42 ^a	11,46 ^a	0,63 ^a	15,97 ^a	2,96 ^a	-1,79 ^b	0,10 ^a	0,48 ^a	0

Dieta com baixo conteúdo de ferro (11,0274 mg/L); Alto conteúdo de ferro (33,0822 mg/L), FOS : Raftilose® P95.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de t, para 10% de significância.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de t.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de t.

*** significativo ao nível de 10% de probabilidade pelo teste de t.

Tabela 18 – Concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Diferença entre a concentração final e inicial (mMol/ μ L) de AGCC no segmento representado o cólon transversal na comparação entre dietas contendo baixo e alto teor de sulfato ferroso sem e com FOS.

Dieta	Acético	Propiônico	Isobutírico	n-Butírico	Isovalérico	n-Valérico	Caprónico	D-Lactato	L-Lactato
Baixo Fe	4,24 ^a	6,16 ^a	0,95 ^a	17,61 ^a	3,22 ^a	3,94 ^a	0,10 ^a	0,50 ^a	0
Alto Fe	5,31 ^a	3,52 ^a	0,07 ^a	22,50 ^a	1,71 ^a	2,31 ^a	0,22 ^a	2,27 ^a	0
Baixo Fe	4,24 ^{a*}	6,16 ^a	0,95 ^a	17,61 ^a	3,22 ^{a*}	3,94 ^{a*}	0,10 ^a	0,50 ^a	0
Baixo Fe + FOS	11,77 ^b	5,21 ^a	-0,1387 ^a	23,06 ^a	-0,65 ^b	1,39 ^b	0,80 ^a	1,42 ^a	0
Alto Fe	5,31 ^a	3,52 ^{a*}	0,067 ^{a*}	22,50 ^{a***}	1,71 ^a	2,31 ^a	0,22 ^a	2,27 ^a	0
Alto Fe + FOS	19,23 ^a	11,93 ^b	2,5682 ^b	14,01 ^b	3,89 ^a	2,86 ^a	0,34 ^a	0,09 ^a	0
Baixo Fe + FOS	11,77 ^a	5,21 ^{a*}	-0,1387 ^{a***}	23,06 ^a	-0,65 ^{a*}	1,39 ^{a*}	0,80 ^a	1,42 ^a	0
Alto Fe + FOS	19,23 ^a	11,93 ^b	2,5682 ^b	14,01 ^a	3,89 ^b	2,86 ^b	0,34 ^a	0,09 ^a	0

Dieta com baixo conteúdo de ferro (11,0274 mg/L); Alto conteúdo de ferro (33,0822 mg/L), FOS : Raftilose® P95.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de t, para 10% de significância.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de t.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de t.

*** significativo ao nível de 10% de probabilidade pelo teste de t.

Tabela 19 – Concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Diferença entre a concentração final e inicial (mMol/ μ L) de AGCC no segmento representado o cólon descendente, na comparação entre dietas contendo baixo e alto teor de sulfato ferroso, sem e com FOS.

Dieta	Acético	Propiônico	Isobutírico	n-Butírico	Isovalérico	n-Valérico	Caprónico	D-Lactato	L-Lactato
Baixo Fe	11,12 ^a	11,95 ^a	1,63 ^a	25,63 ^{a***}	3,14 ^{a***}	2,94 ^a	0 ^{a*}	2,26 ^a	0 ^a
Alto Fe	29,77 ^a	16,23 ^a	3,60 ^a	43,34 ^b	6,07 ^b	5,94 ^a	0,82 ^b	4,45 ^a	0,40 ^a
Baixo Fe	11,12 ^a	11,95 ^a	1,63 ^{a*}	25,63 ^a	3,14 ^a	2,94 ^{a***}	0 ^{a**}	2,26 ^a	0
Baixo Fe + FOS	18,51 ^a	9,43 ^a	2,79 ^b	29,17 ^a	2,37 ^a	5,07 ^b	1,35 ^b	9,80 ^a	0
Alto Fe	29,77 ^{a*}	16,23 ^{a*}	3,60 ^{a***}	43,34 ^{a**}	6,07 ^{a*}	5,94 ^{a*}	0,82 ^{a***}	4,45 ^a	0,40 ^a
Alto Fe + FOS	-9,15 ^b	-4,25 ^b	-0,96 ^b	-10,06 ^b	-0,37 ^b	-0,6996 ^b	0,25 ^b	0,99 ^a	0,20 ^a
Baixo Fe + FOS	18,51 ^{a*}	9,43 ^{a***}	2,79 ^{a*}	29,17 ^{a*}	2,37 ^{a***}	5,07 ^{a**}	1,35 ^{a*}	9,80 ^a	0 ^a
Alto Fe + FOS	-9,15 ^b	-4,25 ^b	-0,96 ^b	-10,06 ^b	-0,37 ^b	-0,70 ^b	0,25 ^b	0,99 ^a	0,20 ^a

Dieta com baixo conteúdo de ferro (11,0274 mg/L); Alto conteúdo de ferro (33,0822 mg/L), FOS : Raftilose® P95.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de t, para 10% de significância.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de t.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de t.

*** significativo ao nível de 10% de probabilidade pelo teste de t.

A produção de ácidos orgânicos em meio suplementado com FOS foi inferior aos encontrados por VELÁZQUEZ et al. (2000) (22,7 mg/mL \pm 1,2 de acetato e 9,8 mg/mL \pm 0,7 de propionato). O único valor próximo refere-se à produção de butirato com 24h (6,0 mg/mL \pm 0,4) em meio com FOS. Esta diferença pode ser devida à quantidade de inóculo fecal utilizado (1% contra 1,7%), mas também ao fato de a produção *in vitro* de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) depender da composição microbiana do inóculo e da capacidade em utilizar o substrato oferecido, além da observação da presença de ácidos orgânicos no tempo 0 h (4,4 mg/mL \pm 1,5 de acetato, 1,5 mg/mL \pm 0,1 de propionato e 0,06 mg/mL + 0,02 de butirato).

Os dados obtidos mostram que tanto o teor de sulfato ferroso quanto as condições ambientais (segmento intestinal) podem influenciar na produção de ácidos orgânicos. Meio pobre em ferro resultou na produção de menores quantidades de AGCC, quando comparados com o meio com maior teor de sulfato ferroso. No segmento mais distal (cólon descendente) a concentração encontrada, embora menor que a do meio com alto teor, foi superior à encontrada nos outros segmentos. Os valores negativos indicam concentração inferior à apresentada na fase de suplementação de dieta sem FOS.

Por outro lado, a incorporação de FOS estimulou a produção de quase todos os AGCC avaliados, em diferentes graus, dependendo do teor de sulfato ferroso do meio. A produção foi maior no cólon ascendente, com pH menor mas também maior suprimento de nutrientes. Em meios sem FOS, a quantidade de AGCC foi superior no cólon descendente, sendo observado, inclusive, que, nesse segmento, a incorporação de FOS no meio contendo alto teor de sulfato ferroso resultou em uma diminuição na produção dos ácidos acético, propiônico, butírico e láctico. Esse resultado sugere uma interação negativa entre as populações bacterianas, com diminuição dos grupos responsáveis pela produção dos ácidos graxos, e, ou, a diminuição do metabolismo bacteriano.

A produção de acetato seria originada principalmente pela fermentação de carboidratos por bactérias glicolíticas e por bifidobactérias pela via da frutose-6-fosfato fosfoacetolase, enquanto a principal origem de propionato seria a fixação de CO₂ por bactérias gram-negativas (*Bacteróides*) (VELÁZQUEZ et al., 2000). Os principais grupos produtores de ácido acético são *Bacteróides*, *Bifidobacteria*, *Eubacteria*, *Lactobacilli*, *Clostridia*, *Peptococci*, *Veillonella*, *Peptostreptococci*, *Propionibacteria*, *Fusobacteria* e *Butyrivibri*, enquanto ácido propiônico é produzido principalmente por *Bacteróides*, *Propionibacteria* e *Veillonella* (GIBSON, 1999).

Considerando os principais ácidos graxos (acético, propiônico, butírico e láctico),

verifica-se que o teor de sulfato ferroso exerce diferença significativa na produção de butirato ($p < 0,10$), no cólon ascendente e descendente, enquanto a incorporação de FOS aos meios acentua a diferença de produção de ácidos propiônico ($p < 0,05$) no cólon transverso e descendente, além de acético e n-butírico em pH mais elevado (6,8). No recipiente que simula o cólon transverso, que apresenta pH 6,2, começa a haver formação de ácido láctico (ainda que pouca) em todas as dietas experimentais, indicando que um pH mais alto favorece o crescimento e desenvolvimento dos grupos de bactérias do ácido láctico. As concentrações de ácido láctico ainda maiores encontrados em pH 6,8 (cólon descendente) reforçam a idéia de que pH mais altos beneficiam as bactérias produtoras de ácido láctico.

A incorporação de FOS resultou na produção de D-lactato no cólon ascendente (pH 5,5), reforçando a hipótese de que Raftilose® P95 estimula o grupo de bactérias do ácido láctico independente do teor de ferro da dieta (Tabela 17).

Houve um aumento acentuado na produção de acetato, propionato, n-butirato e D-Lactato). no cólon descendente. A dieta contendo maior teor de sulfato ferroso apresentou maiores concentrações de todos os ácidos graxos e inclusive produção de L-lactato, quando comparada com a dieta de menor teor de sulfato ferroso.

Os modelos intestinais confirmaram os dados obtidos em culturas em série relativa à produção de ácido butírico: a incorporação de FOS em meio com baixo nível de ferro aumenta a produção desse ácido.

O butirato é a principal fonte de energia das células epiteliais da mucosa colônica, sendo um dos responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa, reparo de colites ulcerativas e proliferação de colonócitos; estimula o transporte de eletrólitos no cólon, resultando em maior absorção de íons e fluídos, prevenindo diarreia, além de atuar na modulação do metabolismo de ácidos nucléicos, com efeito principalmente na regulação da expressão gênica e crescimento. Baixas concentrações deste ácido reduzem a síntese de DNA e suprimem a proliferação de vários tipos celulares. O butirato inibe a ação enzima histona deacetilase no núcleo celular, permitindo que ocorra a hiperacetilação de proteínas histonas. Esta hiperacetilação leva à abertura da estrutura do DNA, facilitando o acesso de enzimas que reparam danos no DNA (CUMMINGS & MACFARLANE, 1991; TOOPING, 1996). Assim, o butirato suprime certos eventos moleculares chaves responsáveis pela formação de clones das células displásicas (YOUNG, 1996). FLICKINGER et al. (2000) concluíram que FOS é um substrato para a rápida produção de butirato, embora segundo CUMMINGS & MACFARLANE (1991) a melhor fonte para testar a produção de butirato seja o amido. LE BLAY et al. (1999) também observaram

aumento na produção cecal de butirato com a ingestão de FOS por ratos.

O butirato pode ser produzido por certos microrganismos como *Clostridium*, *Butyrivibrium*, *Peptostreptococci* e especialmente *Fusobacterium* e *Eubacterium* (GIBSON, 1999, VELÁZQUEZ et al., 2000), formados por meio de reações de troca entre acetato livre e a acetil-S coenzima A, utilizada para formar butirato, em uma reação de condensação de unidades acetil (MILLER & WOLIN, 1996). Esta hipótese é reforçada por observações que mostram que o enxofre tem papel essencial na promoção de fermentação de carboidratos complexos e produção de n-butirato no rumem (WHANGER & MATRONE, 1965, 1966). Assim, meios com maior quantidade de sulfato ferroso (fonte de ferro utilizada nesta experimentação) seriam mais propícios à formação de butirato.

Em ambiente com alto conteúdo de ferro há maior produção de quase todos os ácidos orgânicos, quando comparado com meios com menor teor de sulfato ferroso (sem FOS). A incorporação de FOS a meios com baixo teor de sulfato ferroso resultou em produção de AGCC semelhante ao de ambiente com alto teor de sulfato ferroso.

DJOUZI & ANDRIEUX (1997) observaram aumento na produção de butirato quando trabalharam com FOS, galactooligosacarídeos (GOS) e transgalactooligosacarídeos (TOS), sugerindo que outras bactérias, como *Clostridium*, *Eubacterium* ou *Peptostreptococcus*, produtoras de butirato, estariam envolvidas no metabolismo de FOS e TOS, tanto pela fermentação dos substratos quanto pela utilização de metabólitos produzidos por bifidobactérias. Os pesquisadores sugeriram que o aumento na produção de propionato poderia estar relacionado à habilidade de hidrólise de GOS por *Bacteróides*.

As diferenças no conteúdo de ferro dos meios parecem afetar mais a produção de outros ácidos graxos, como isovalérico, assim como a incorporação de FOS altera a produção de isovalérico, n-valérico e capróico (em dietas com baixo teor de sulfato ferroso) e isobutírico, isovalérico e capróico em dietas com alto teor de sulfato ferroso.

Verifica-se um aumento acentuado na produção de ácido acético ($p < 0,01$) e de lactato ($p < 0,10$), em meios com baixo teor de sulfato ferroso adicionado com FOS (cólon ascendente), o que condiz com o aumento observado no grupo de bifidobactérias (Tabelas 5 e 10). Cepas de *B. longum* ATCC 15707, quando crescidas em leite, apresentam uma produção de acetato: lactato da ordem de 1,6:1, enquanto outras cepas e gêneros de bifidobactérias apresentaram proporção variável, de 0,4: 1,0 (*B. bifidum* ATCC 11147) a 3,1:1,0 (*B. infantis* ATCC 27920) (DESJARDINS & ROY, 1990), indicando que, dependendo das espécie de bifidobactérias presentes em cada amostra, poderia haver maior ou menor produção de ácidos graxos, ainda que houvesse um mesmo grau de estimulação e

crescimento bacteriano.

Os resultados apresentados na Tabelas 15b e 16b estão de acordo com as observações realizadas por KOT & BEZKOROVAINY (1993). Estes pesquisadores observaram que um aumento na produção de lactato e na absorção de ferro pela célula em pH 6,5 do que em pH 5,5, exceto quando o meio contém pouco ferro. Em meios com menor teor de sulfato ferroso, a absorção é maior em pH 5,0 do que 6,5. Se glicose for excluída do meio ocorre pouca absorção de ferro, indicando que o mecanismo de incorporação de ferro é dependente de energia, além de pouca produção de lactato (KOT & BEZKOROVAINY, 1993).

4. Conclusões

O teor de sulfato ferroso de uma dieta influencia alguns grupos microbianos, notadamente o grupo das enterobactérias, que diminuiu em meios com baixos níveis de ferro e bifidobactérias, que aumentam em meios com alto teor de sulfato ferroso. O efeito da incorporação de FOS sobre a microbiota humana e produção de ácidos orgânicos depende do teor de sulfato ferroso e do segmento intestinal avaliado e a sua incorporação em dietas com baixo teor de sulfato ferroso resulta na diminuição dos níveis de bactérias sulfato redutoras e aumento da população de enterobactérias, enquanto a incorporação em dietas com alto teor de sulfato ferroso resulta em um aumento de clostrídios, bifidobactérias e lactobacilos.

A incorporação de FOS resultou em aumento de bifidobactérias e lactobacilos, independente do teor de sulfato ferroso inicial do meio, indicando que FOS igualaria as condições de crescimento destes grupos.

Os dados obtidos mostram que tanto o teor de sulfato ferroso quanto as condições dos segmentos intestinais podem influenciar na produção de ácidos orgânicos. Meio pobre em ferro resultou na produção de menores quantidades de AGCC, quando comparados com o meio com maior teor de sulfato ferroso. A incorporação de FOS estimulou a produção de quase todos os AGCC avaliados, em diferentes graus, dependendo do teor de sulfato ferroso do meio, e com maior produção no cólon ascendente.

A formação de ácido láctico indica que pH mais elevado favorece o crescimento e desenvolvimento dos grupos de bactérias do ácido láctico, enquanto a produção de D-lactato em no cólon ascendente (pH 5,5) após a incorporação de FOS reforça a hipótese de que Raftilose® P95 estimula o grupo de bactérias do ácido láctico independente do teor de sulfato ferroso da dieta.

Dietas contendo maiores teores de ferro apresentaram maiores concentrações de todos os ácidos graxos e inclusive produção de L-lactato, enquanto a incorporação de FOS em meio com baixo teor de sulfato ferroso aumentou a produção de ácido butírico e resultou em produção de AGCC semelhante ao de ambiente com alto teor de sulfato ferroso.

O pH do ambiente influencia o efeito de ferro e FOS sobre a microbiota intestinal. O efeito pode ser devido a uma maior quantidade de ferro disponível, o que pode ser benéfico para alguns grupos bacterianos mas, se em altas quantidades, tóxico para outros.

Os experimentos realizados são indicativos de que a concentração mineral presente em uma dieta poderia vir a influenciar a saúde do hospedeiro, não apenas devido à biodisponibilidade *per si*, mas também por influenciar na ecologia microbiana.

5. Referências Bibliográficas

- BEZKOROVAINY, A.; KOT, A. Interaction of Bifidobacteria with ferric iron. **Int. Dairy J.**, v.8, p.507-512, 1998.
- BEZKOROVAINY, A.; KOT, E.; MILLER-CATCHPOLE, R.; HALOFTIS, G.; FURMANOV, S. Iron metabolism in Bifidobacteria. **Int. Dairy J.**, v.6, p.905-919, 1996.
- BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; NICHOLAS ORNSTON, L.; JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. (Ed.) Medical microbiology. 20th ed., Norwalk, Connecticut: Appleton e Lange. 1995. 656p.
- CHEN, R.M.; WU, J.J.; LEE, S.C.; HUANG, A.H.; WU, H.M. Increase of intestinal *Bifidobacterium* and suppression of coliform bacteria with short-term yogurt ingestion. **J. Dairy Sci.**, v.82, n.11, p.2308-2314, 1999.
- CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. **J. Applied Bacter.**, v.70, n.6, p.443-459, 1991.
- DESJARDINS, M. L.; ROY, D. Growth of bifidobacteria and their enzyme profile. **J. Dairy Sci.**, v.73, n.2, p.299-307, 1990.
- DEVEREUX, R.; KANE, M.D.; WINFREY, J.; STAHL, D.A. Genus-and group-specific hybridisation probes for determinative and environmental studies of sulphate-reducing bacteria. **Systematic Applied Microbiol.** v.15, p.601-609, 1992.
- DJOUZI, Z.; ANDRIEUX, C. Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with human faecal flora. **Brit. J. Nutr.**, v.78, p.313-324, 1998.

- FLICKINGER, E.A.; WOLF, B.W.; GARLEB, K.A.; CHOW, J.; LEYER, G.J.; JOHNS, P.W.; FAHEY Jr.; G.C. Glucose-based oligosaccharides exhibit different *in vitro* fermentation patterns and affect *in vivo* apparent nutrient digestibility and microbial populations in dogs. **J. Nutr.**, v.130, p.1267-1273, 2000.
- FRANKS, A.H.; HARMSSEN, H.J.M.; RAANGS, G.C.; JANSEN, G.J.; SCHUT, F.; WELLING, G.W. Variations of bacterial populations in human faeces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Applied Environm. Microbiol.**, v.64, p.3336-3345, 1998.
- GHIO, A.J.; PIANTADOSI, C.A.; CRUMBLISS, A.L. Hypothesis: iron chelation plays a vital role in neutrophilic inflammation. **Biometals**, v.10, n.2, p.135-142, 1997. (Abstr.)
- GIBSON, G.R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. **J. Nutr.**, v.129, n.7, p.1438S-1441S, 1999.
- GIBSON, G.R.; CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. Growth and activities of sulphate-reducing bacteria in gut contents of healthy and patients with ulcerative colitis. **FEMS Microbiology Ecology**, v.86, p.103-112, 1991.
- GIBSON, G.; ROBERFROID, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.
- GIBSON, G.R.; WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **J. Applied Bacter.**, v.77, n.4, p.412-420, 1994.
- HAVENAAR, R.; BONNIN-MAROL, S.; VAN DOKKUM, W.; PETITET, S.; SCHAAFASMA, G. Inulin: fermentation and microbial ecology in the intestinal tract. **Food Rev. Intern.**, v.15, n.1, p.109-120, 1999.
- IBRAHIM, S. A.; BEZKOROVAINY, A. Inhibition of *Escherichia coli* by Bifidobacteria. **J. Food Protect.**, v.56, n.8, p.713-715, 1993.
- KAPLAN, H.; HUTKINS, R.W. Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. **Appl. Environm. Microbiol.**, v.66, n.6, p.2682-2684, 2000.
- KOCHAN, I.; KVACH, J.T.; WILES, T.I. Virulence-associated acquisition of iron in mammalian serum by *Escherichia coli*. **J. Infectious Diseases**, v.135, n.4, p.623-632, 1977.
- KOT, E.; FURMANOV, S.; BEZKOROVAINY, A. Accumulation of iron in lactic acid bacteria and bifidobacteria. **J. Dairy Sci.**, v.60, n.3, p.547-550, 1995.

- KOT, E.; BEZKOROVAINY, A. Uptake of iron by *Bifidobacterium thermophilum* depends on the metal content of its growth medium. **J. Dairy Sci.**, v.74, n.9, p.2920-2926, 1991.
- KOT, E.; BEZKOROVAINY, A. Distribution of Accumulated iron in *Bifidobacterium thermophilum*. **J. Agric. Food Chem.**, v.41, n.2, p.177-181, 1993.
- KOT, E.; HALOFTIS, G.; BEZKOROVAINY, A. Iron Accumulation by Bifidobacteria at low pO₂ and in air: action of putative ferroxidase. **J. Agric. Food Chem.**, v.42, n.3, p.685-688, 1994.
- LANGENDIJK, P.S.; SCHUT, F.; JANSEN, G.J.; RAANGS, G.W.; KAMPHUIS, G.R.; WILKINSON, M.H.F; WELLING, G.W. Quantitative fluorescent in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in faecal samples. **Applied Environm. Microbiol.**, v. 61, p.3069-3075, 1995.
- LE BLAY, G.; MAICHEL, C.; BLOTTIERE, H.M.; CHERBUT, C. Prolonged intake of fructooligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. **J. Nutr.**, v.129, n.12, p.2231-2235, 1999.
- MACFARLANE, G.T.; MACFARLANE, S.; GIBSON, G.R. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. **Microbial Ecology**, v.35, p.180-187, 1998.
- MANZ, W.; MANN, R.; LUDWIG, W.; VANCANNEYT, M.; SCHLEIFER, K.H. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. **Microbiology** v.142, p.1097-1106, 1996.
- MILLER, T. L.; WOLIN, M. J. Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. **Appl. Environ, Microb.**, v.62, n.5, p.1589-1592, 1996.
- MITSUOKA, T. Intestinal flora and aging. **Nutr. Rev.**, v.50, n.12, p.438-446, 1992.
- O'SULLIVAN, M. G. Metabolism of bifidogenic factors by gut flora - an overview. In: Oligosaccharides and probiotic bacteria. **Bull. Intern. Dairy Fed.**, n.313, p.23-29, 1996.

- PEREIRA, D.I.A.; MCCARTNEY, A.L.; GIBSON, G.R. An *in vitro* study on the probiotic potential of a bile salt hydrolytic *Lactobacillus fermentum* and determination of its cholesterol-lowering properties. **Appl. Environm. Microbiol.**, *in press*.
- RAO, A.V. Dose-response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects. **J. Nutr.**, v.129, n.7, p.1442S-1445S, 1999.
- ROBERFROID, M.B.; VAN LOO, J.A.E.; GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **J. Nutr.**, v.128, n.1, p.11-19, 1998.
- TOOPING, D.L. Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria. **Asian Pacific J. Clin. Nutr.**, v.5, n.1, p.15-19, 1996.
- VELÁZQUEZ, M.; DAVIES, C.; MARETT, R.; SLAVIN, J.L.; FEIRTAG, J.M. Effect of oligosaccharides and fibre substitutes on short-chain fatty acid production by human faecal microflora. **Anaerobe**, v.6, n.2, p.87-92, 2000.
- VONK, A. D.; SCHAAFSMA, G.; DEKKER, P. R.; WAARD, H. Relationship between intestinal transit time and iron absorption from milk and yogurt in rats. **Neth. Milk Dairy J.**, n.42, p.147-154, 1988.
- WHANGER, P.D.; MATRONE, G. Effect of dietary sulfur upon the fatty acid production in the rumen. **Bioch. Biophys. Acta**, v.98, p.454-461, 1965.
- WHANGER, P.D.; MATRONE, G. Effect of dietary sulfur upon the production and absorption of lactate in sheep. **Bioch. Biophys. Acta**, v.124, p.273-279, 1966.
- WILLIS, C.L.; CUMMINGS, J.H.; NEALE, G.; GIBSON, G.R. Nutritional aspects of dissimilatory sulfate reduction in the human large intestine **Current Microbiology**, v.35, p.294-298, 1997.
- YOUNG, G. P. Prevention of colon cancer: role of short chain fatty acids produced by intestinal flora. **Asian Pacific J. Clin. Nutr.**, v.5, p.44-47, 1996.

RESUMO E CONCLUSÕES

O crescimento do setor de alimentos conhecidos como funcionais os quais, além da função nutritiva, proporcionam benefícios adicionais à saúde do consumidor, tem sido traduzido por maior oferta de alimentos enriquecidos com vitaminas e minerais e de alimentos contendo probióticos e prebióticos.

A observação do aumento da biodisponibilidade de minerais, principalmente cálcio, ferro e magnésio, pelo consumo de probióticos e prebióticos é recente. Os mecanismos envolvidos não são completamente conhecidos, mas incluem alterações na ecologia microbiana e na histologia intestinal, além de produção de ácidos graxos de cadeia curta que, pela redução do pH intestinal e formação de complexos com baixo peso molecular, como acetato de cálcio, facilitariam a absorção dos minerais.

Ao mesmo tempo, os minerais apresentam interações entre si, como inibição da absorção de ferro pelo cálcio, além de poderem atuar sobre o desenvolvimento da microbiota e sua utilização das fontes de energia presente.

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito do prebiótico, probiótico e simbiótico na biodisponibilidade de cálcio, ferro e magnésio em modelo animal bem como a possível interferência desses produtos e do ferro na microbiota e na histologia intestinal. Pretendeu-se, ainda, avaliar a interação do cálcio com ferro e magnésio na presença de prebiótico. Foram analisados os efeitos de diferentes níveis de sulfato ferroso sobre a microbiota colônica humana, sua produção de ácidos graxos e utilização de FOS, em estudos *in vitro*.

Para atingir os objetivos propostos, a tese foi dividida em 4 experimentos, sendo 2 ensaios biológicos (*in vivo*) desenvolvidos no Brasil e dois ensaios *in vitro*, realizados na Inglaterra.

A primeira experimentação avaliou o efeito de dietas contendo prebiótico (Raftilose® P95 - FOS), probiótico (*Bifidobacterium longum*) e simbiótico na absorção de ferro; na mucosa intestinal e na modulação da microbiota cecal e colônica de ratos anêmicos enquanto a segunda experimentação *in vivo* avaliou o efeito de dietas contendo prebiótico (FOS) na biodisponibilidade de ferro, cálcio e magnésio em animais submetidos a dietas deficientes em ferro; além da interação cálcio-ferro e cálcio-magnésio.

Os experimentos *in vitro* avaliaram a influência de prebiótico (FOS), probiótico (*Bifidobacterium longum*) e simbiótico associados a diferentes concentrações de ferro na

microbiota colônica humana e na produção de ácidos orgânicos; primeiramente em fermentações em série e posteriormente em modelo intestinal.

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

A suplementação de ratos anêmicos com pré-, pró- e simbiótico pode ter significância biológica, pois resultou em uma tendência da recuperação dos níveis de hemoglobina.

A utilização de 3% a 5% de Raftilose[®] P95 mostrou efeitos colaterais, com o aparecimento de diarreia nos animais, indicando que as doses de prebióticos a serem incorporadas devem ser cuidadosamente estudadas, dependendo do tipo de prebiótico a ser administrado.

A suplementação com FOS (1%) não afetou a biodisponibilidade de ferro em animais submetidos a dietas deficientes em ferro, porém aumentou a absorção de magnésio e cálcio;

Houve interação negativa entre cálcio e ferro e entre cálcio e magnésio, porém o aumento de cálcio na dieta não resultou em aumento do teor de cálcio no fêmur;

As fermentações em série indicaram que o meio contendo menor teor de sulfato ferroso e suplementado com FOS induz maiores alterações microbiológicas e na produção de ácidos orgânicos.

O teor de ferro das dietas influenciou a contagem de enterobactérias, com uma diminuição acentuada nos meios contendo menor quantidade de ferro; e de bifidobactérias, que aumentaram em meios com alto teor de ferro.

Enterobactérias de origem humana foram estimuladas pela incorporação de FOS, principalmente nas dietas com baixo teor de ferro, indicando que o grupo utiliza este substrato.

O efeito da incorporação de FOS sobre a microbiota humana e produção de ácidos orgânicos depende do teor de ferro e do pH do meio.

O crescimento de bactérias do ácido láctico é favorecido por pH mais neutros (acima de 6,0), e a incorporação de FOS em pH mais ácidos favoreceu o este grupo bacteriano, independente do teor de ferro da dieta;

Os experimentos realizados durante esta tese constituem um indicativo de que a concentração mineral presente em uma dieta poderia vir a influenciar a saúde do hospedeiro, não apenas devido à biodisponibilidade *per se*, mas também por poder influenciar a ecologia microbiana, uma vez que alguns minerais, como o ferro, são indispensáveis ao crescimento dos microorganismos. A ingestão de elementos que possam vir a aumentar a biodisponibilidade dos minerais normalmente presentes, em vez de ingestão de suplementos minerais seria uma alternativa para melhorar o estado nutricional do hospedeiro sem no entanto alterar o balanço da microbiana intestinal. Embora existam substâncias prebióticas nos alimentos normalmente

consumidos, como na cenoura, chicória e outros, a quantidade é insuficiente para alterar de forma significativa a microbiota do hospedeiro. A utilização de alimentos formulados com prebióticos seria mais eficiente na modulação microbiana. Novos estudos são necessários para verificar o grau de interação entre os diversos grupos microbianos e concentrações de minerais e também inferir sobre os efeitos de possíveis alterações na saúde do hospedeiro.

A utilização de FOS e probióticos está sendo estudada, como no presente caso, para verificar se poderiam levar a um aumento de biodisponibilidade de minerais. Os resultados podem vir a diferir com a utilização de outras espécies e/ou outros tipos de probióticos, ou mesmo dependendo da fonte alimentar de ferro utilizada, indicando a necessidade de novos estudos na área.

ANEXO 1 – Dados analíticos do prebiótico utilizado (Raftilose® P95)



RAFTILOSE® P95 Product Sheet

Release : 11/99

Description

- RAFTILOSE® P95**
- is a powder containing mainly oligofructose produced by partial enzymatic hydrolysis of chicory inulin;
 - is a food ingredient composed of oligofructose, fructose, glucose and sucrose
- oligofructose**
- is a mixture of oligosaccharides which are composed of fructose units linked together by $\beta(2-1)$ linkages. Part of these molecules are terminated by a glucose unit. The total number of fructose or glucose units (= Degree of Polymerisation or DP) of oligofructose ranges mainly between 2 and 8.

Compositional Specifications

All values expressed on dry matter.

Analytical Methods : see our Technical Brochures.

oligofructose	≥ 93.2 %
glucose + fructose + sucrose	< 6.8 %
Dry Matter (d.m.)	97 ± 1.5 %
Carbohydrate content	> 99.5 %
Ash (sulphated)	< 0.2 %
Heavy Metals	< 0.2 mg/kg
pH (50°Brix)	5.0 - 7.0

Microbiological Specifications

All values expressed on dry matter.

Analytical Methods : see our Technical Brochures.

Mesophilic bacteria - total count	max. 1000/g
yeasts	max. 20/g
moulds	max. 20/g
Thermophilic aerobic bacteria	max. 1000/g
Enterobacteriaceae	absent in 1 g
Bacillus cereus	max. 100/g
Staphilococcus aureus	absent in 1 g
Escherichia coli	absent in 1 g
Clostridium perfringens	absent in 1 g
Clostridium botulinum	absent in 1 g
Salmonella	absent in 25 g
Shigella	absent in 10 g

doc.A3-04*11/99

ORAFI Active Food Ingredients

Aandorenstraat 1 B-3300 TIENEN BELGIUM Tel. +32(0)16 801 301 Fax +32(0)16 801 308 E-mail: afi@orafit.com

RAFTILOSE®P95 PRODUCT SHEET

Nutritional Information

All values are average values expressed per 100 g commercial product.

Carbohydrates	5 (97 ¹⁾)	gluten	N.D.
Sugars	5	lactose	N.D.
Dietary Fibre ²⁾	92	Milk/meat/egg components	N.D.
Protein	N.D.	Seed/soy components	N.D.
Fat	N.D.	Insecticides, pesticides	N.D.
Vitamins and Minerals	Negligeable	Nuts, nut components	N.D.
Caloric value ³⁾	158 kcal/662 kJ	Other allergens	N.D.
Broteinheite ⁴⁾	0.4	Enzymatic activity	N.D.
		Folate	N.D.

N.D. = Not Detectable

1) including dietary fibre

2) measured by AOAC Method 997.08

3) based on a caloric value of 1.5 kcal/g for pure oligofructose. To be adapted to local regulations.

4) in accordance with German regulations.

Other Information *see also our Technical Brochures*

Aspect	fine white powder
Behaviour	hygroscopic
Taste	slightly sweet, without aftertaste
Solubility in water	>750 g/l
Wettability in water	Excellent.
Dispersability in water	Excellent. May require stirring.
Properties and Applications	See our Technical Brochures.
Particle Sizes	See document "Particle Sizes".
Density	Approx. 600 ± 70 g/l
Labelling - Ingredients List	oligofructose, fructo-oligosaccharides
Safety	Safe. Not toxic. Not dangerous. Excessive consumption may cause laxative effects. Is, like other fine powders, when mixed with air and ignited, capable of causing an explosion.
Packaging	Paper bags on pallets, see 'Packaging Sheet Powders'
EU Customs Tariff Code	17 02 90 99
Optimal storage conditions	Cool and dry, in its original airtight packaging.
Maximum durability	See packaging (minimum 18 months upon delivery)
Transport conditions	According to document 'Transport Conditions'
Irradiation	Not irradiated
GMO	Not containing GMOs or GMO-derived components. Not produced using GMO-based technology.
Kosher	Certified, Orthodox Union
Halal	See our Halal document
Plant origin	Suitable for vegetarians & vegans
Produced by	ORAFIT - address on front side
Represented by	

doc.A3-04*11/99

To the best of our knowledge, this information is reliable but should not be considered as a warranty of any kind. Specifications might be subject to change without notice.

ANEXO 2 – Composição dos meios de cultura utilizados

Água peptonada reduzida estéril (diluição inicial das fezes dos animais):

Peptona	1,0 g
NaCl	8,0 g
Tween 80	1,0 g
L-cisteína HCl.H ₂ O	0,5 g
Glicerol	10,0 g
Água destilada	1000 mL

pH final:
Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Água para diluição de fezes

KH ₂ PO ₄	4,5 g
Na ₂ HPO ₄	6,0 g
L-cisteína HCl.H ₂ O	0,5 g
Tween 80.....	0,5 g
Água destilada	1000 mL

Ajustar para pH 6,8.

* adicionar na forma de solução 5% esterilizada a frio, no meio pronto (esterilizado e frio)

Meio TPY (SCARDOVI et al., 1986)

Trypticase (BBL)	10,0 g
Phytone (BBL)	5,0 g
Glicose	5,0 g
Extrato de levedura (Difco)	2,5 g
Tween 80	1,0 g
Cisteína hidrocloreídica	0,5 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,5 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
CaCl ₂	0,15 g
FeCl ₃	0,03 g
Ágar	15,0 g
Água destilada.....	1000 mL

pH final do meio é de 6,5, depois de autoclavado a 121°C por 15 min.

SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacterium*. In: SNEATH, P.H.A. et al. (Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams & Wilkins: Baltimore. v.1, p.1418-1434, 1986.

Ágar LAMVAB (HARTEMINK et al., 1997).

Solução A:

Caldo MRS 104,4 g/L
Cisteína hidrocloreídrica* 0,5 g/L
Verde de Bromocresol 0,05 g/L
pH final do meio é de 5,0 + 0,1, usando HCl 4M, antes de autoclavar.

Solução B:

Ágar 40,0 g/L

As soluções A e B são esterilizadas a 121°C por 15 minutos.

Solução C:

Vancomicina Hidrocloreídrica 2 mg/mL em água
Esta solução deve ser mantida entre 0 e 4°C e permanece estável por pelo menos 3 meses.
Esterilizar a frio, usando, filtro 0,2 µm

- Preparar cada solução em separado. As soluções A e B se preparam em partes iguais.
- A solução A deve preparar-se da seguinte maneira: colocar aproximadamente 800 ml de água destilada em agitação, adicionar primeiro o caldo MRS, esperar sua completa dissolução, logo adicionar a Cisteína-HCl dissolvida em 50 ml de água e por último o verde de bromocresol. Ajustar o pH do meio a $5,0 \pm 0,1$ com HCl 4M e completar até 1000 ml. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Resfriar a temperatura ambiente.
- A solução B se prepara, adicionando-se o ágar a 1000 ml de água destilada, esquentar para sua completa dissolução, esterilizar a 121°C por 15 minutos. Resfriar em banho de água até 50°C.
- Preparar a solução C, adicionando a quantidade de miligramas que se precisem para o volume a preparar, pode-se estocar em refrigeração de 0 a 4°C até três meses. Esterilizar por filtração e ter pronta para seu uso.
- O preparo do meio envolve a esterilização de volumes iguais das soluções A e B.
- Depois de resfriadas as soluções, adicionar 10 ml da solução C para cada 500 ml da solução A.
- Depois da completa dissolução, adicionar a solução B (mesmo volume da sol. A) à mistura solução A-C.
- Homogeneizar bem e adicionar 20 ml aproximadamente por placa de petri. A concentração final de vancomicina fica de 20 mg/ml
- Esperar sua completa solidificação, fazer prova de esterilidade e estocar em refrigeração.

Composição final do meio (para 1 L):

Caldo MRS 52,2 g
Cisteína hidrocloreídrica* 0,25 g
Verde de Bromocresol 0,025 g
Ágar 20,0 g
Vancomicina Hidrocloreídrica 20 mg

Ágar Raffinose-*Bifidobacterium* (RB) (HARTEMINK et al., 1996).

D (+) Rafinose	7,5 g
Caseinato de sódio	5,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Cloridrato de lítio	3,0 g
Propionato de sódio	15,0 g
Cisteína hidrocloreídrica	0,5 g
Tioglicolato de sódio	0,5 g
Sol. 1% Púrpura de bromocresol	15 mL
Solução de sais	40 mL
Ágar bacteriológico n.1 (OXOID)	18,0 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

Composição de sais:

MnSO ₄	0,2 g
CaCl ₂	0,2 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
NaHCO ₃	10,0 g
NaCl	2,0 g
Água destilada	1000 mL

- Preparar a solução de sais na ordem como se indica na tabela acima. Armazenar em refrigeração até o momento do uso.
- Colocar em agitação aproximadamente 800 ml de água
- Adicionar de primeiro a D(+) Rafinose, quando se dissolver completamente, adicionar o caseinato de sódio, logo o extrato de levedura, cloreto de lítio, propionato de sódio, esperar a completa dissolução de cada um dos reativos adicionados.
- Dissolver em 50 ml de água destilada os 0,5 g de L-cisteína HCl e logo adicionam-se ao meio que se esta preparando
- Logo adicionar o tioglicolato de sódio, esperar sua completa dissolução e adicionar os 15 ml de púrpura de bromocresol preparada a 1%
- Adicionar os 40 ml da solução de sais previamente preparada.
- Medir o pH do meio, o qual deve estar em $6,7 \pm 0,1$, ajustar com NaOH 4N.
- Adicionar a quantidade de água restante
- Por último adicionar o ágar, esquentar para sua completa dissolução.
- Esterilizar a 121°C por 20 minutos.
- Esperar resfriar o meio até uma temperatura de 50°C e adicionar aproximadamente 20 ml por placa de petri.
- Esperar sua completa solidificação, voltar as placas e armazenar
- Armazenar sob refrigeração.

HARTEMINK, R., KOK, B.J., WEENK, G.H., ROMBOUTS, F.M. Raffinose-*Bifidobacterium* (RB) agar, a new selective medium for Bifidobacteria. **J. Microbiol. Meth.**, v.27, n.1, p.33-43, 1996.

HARTEMINK, R., DOMENECH, V.R., ROMBOUTS, F.M. LAMVAB – a new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. **J. Microbiol. Meth.**, v.29, n.2, p.77-84, 1997.

REAGENTES UTILIZADOS NO REINO UNIDO

1. Água peptonada

Água peptonada (Oxoid).....	7,5g/L
L-cisteina HCl (Sigma).....	0,5g/L

Ajustar o pH para 7,0 e autoclavar.

2. Ágar Beerens (Bifidobacteria)

Ágar Columbia Base Sangue (Oxoid)	44 g/L
Glicose	5,0 g/L
Ágar técnico N°3	5,0 g/L
L-cisteina HCl (Sigma).....	0,5g/L

Misturar os ingredientes e levar à ebulição sob vapor (3/4 – 1 hora). Não autoclavar. Resfriar para 55°C. Adicionar 5 mL/L de ácido propiônico, misturar e ajustar o pH para 5,0, usando NaOH. Plaquear.

Este ágar deve ser usado nas próximas 48 horas.

3. Ágar rogosa (contagem de Lactobacilli)

Ágar rogosa (Oxoid)	82 g/L
---------------------------	--------

Dissolver em vapor (não esterilizar). Normalmente necessita ½ hora para 500 mL e ¾ - 1 hora para 1 L. Não devem ser vistos grumos do ágar.

Adicionar 1,32 mL/L de ácido acético glacial e levar à ebulição por outros 2-3 minutos (em vapor). Resfriar e plaquear.

4. Ágar sangue

Ágar Columbia base Sangue (Oxoid)	44 g/L
Sangue de cavalo	50 mL/L
L-cisteina HCl (Sigma).....	0,5g/L

5. BHI Suplementado

BHI	37,0 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L
Solução de Resazurina	4 mL/L
L-Cisteina HCl	0,5 g/L
Solução de Vit. K	0,2 ml/L
Solução de Hemina	10 mL/L

6. Solução de Resazurina

Dissolver 25 mg de resazurina em 100 mL de água destilada.

7. Solução de Vit. K

Dissolver 0,15 mL de Vit.K em 30 mL de ethanol. Descartar após 1 mês. Manter a 4°C no escuro.

8. Solução de Hemina

Dissolver 50 mg de Hemin em 1 mL de NaOH 1M. Completar até 100 mL com água ultra pura (grau HPLC). Esterilizar.

Soluções utilizadas em FISH

1. PBS

Utilizar os tabletes pré-fabricados (1/100mL)ou,

NaCl.....	8g/L
KCl	0,2g/L
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1,44g/L
KH ₂ .PO ₄	0,24g/L

Ajustar o pH para 7.4 e filtrar em membrana 0.2µm

2. Paraformaldeído a 4% (50ml)

Adicionar 2g de paraformaldeído a 30ml de água ultrapura.

Adicionar 100µl de NaOH 1N e aquecer levemente até completa dissolução.

Adicionar 100µl de HCl 1N

Adicionar 16.6ml de 3xPBS (PBS 3 vezes concentrado: utilizar a receita para PBS triplicando a quantidade dos componentes).

Ajustar o pH para 7,2

Completar o volume para 50 mL (balão volumétrico), utilizando água ultrapura (grau HPLC).

Filtrar em membrana 0,2µm e estocar a 4oC. Deve ser usado nos próximos 3 dias.

3. Tampão de Hibridização (com SDS)

Tris-HCl 40mM
NaCl 1.8M

Adicionar 2ml de uma solução de SDS (Dodecil sulfato de sódio) a 10% para cada 100ml de tampão

Ajustar o pH para 7,2. Filtrar em membrana 0,2 μ m e manter em estufa de hibridização.

4. Tampão de Hibridização (sem SDS) – para enxágue

Tris-HCl 20mM
NaCl 0,9M

Ajustar o pH para 7,2. Filtrar em membrana 0,2 μ m e manter em estufa de hibridização

5. Tampão de hibridização para bactérias sulfato redutoras (SRB)

Tris 20mM
NaCl 0,9M
SDS 0,01%
Formamide 10%

Ajustar o pH para 7,2. Filtrar em membrana 0,2 μ m e manter em estufa de hibridização

6. Tampão de enxágue para SRB

Tris-HCl 20mM
NaCl 0,386M
SDS 0,01%

Ajustar o pH para 7,2. Filtrar em membrana 0,2 μ m e manter em estufa de hibridização

ANEXO 3 - Dosagem do teor de ferro de dietas experimentais.

Toda a vidraria utilizada para determinação dos teores de ferro (balões volumétricos, funis, tubos de digestão, becker, pipetas) deve ser colocadas em imersão em solução de HCl 20% por pelo menos 24 horas, para descontaminação. Após este tempo deve ser enxaguada em água deionizada e seca em estufa.

Pesa-se 1,0 grama de cada dieta experimental, em papel de seda, e coloca-se em tubo digestor junto com 5 mL de mistura nitroperclórica (3 + 1 v/v), e mantido sob aquecimento (150°C). Juntamente com as amostras utiliza-se um branco (apenas papel de seda). O processo deve ser seguido para evitar que ocorra evaporação total do líquido. Caso o volume diminua, acrescentar, aos poucos, 1 mL da mistura.

Quando a mistura ficar transparente considerar-se-á que a digestão foi completada. Deixar secar (que permaneça aproximadamente 1 mL de líquido no tubo digestor) e diluir em água deionizada. A leitura será feita em espectrofotômetro de absorção atômica ($\lambda = 248,33$ nm, chama de ar/acetileno).

ANEXO 4 – Composição das misturas mineral e vitamínica para a dieta AIN-93G

Composição da mistura mineral para dieta AIN-93G

Ingredientes	g/kg da mistura
Carbonato de cálcio anidro (40,04%)	357
Fosfato de potássio monobásico (22,76% P, 23,73% K)	196,00
Citrato de potássio, tri-potássio, monohidrato (36,16% K)	70,78
Cloreto de sódio (39,34% Na, 60,66% Cl)	74,00
Sulfato de potássio (44, 87% K, 18,39% S)	46,60
Óxido de magnésio (60,32% Mg)	24,00
Citrato de ferro (16,5% Fe)	6,06
Carbonato de zinco (52,14% Zn)	1,65
Carbonato de manganês (47, 79% Mn)	0,63
Carbonato de cobre (57,47% Cu)	0,30
Iodato de potássio (59,3% I)	0,01
Selenato de sódio anidro (41,79% Se)	0,01025
Paramolibdato de amônio 4 hidrato (54,34% Mo)	0,00795
Meta silicato de sódio 9 hidrato (9,88% Si)	1,45
Sulfato de cromo e potássio 12 hidrato (10,42% Cr)	0,275
Cloreto de lítio (16,38% Li)	0,0174
Ácido bórico (17,5% B)	0,0815
Fluoreto de sódio (45,24% F)	0,0635
Carbonato de níquel (45% Ni)	0,0318
Vanadato de amônio (43,55% V)	0,0066
Sacarose	221,026

Composição da mistura de vitaminas (AIN-93G)

Ingredientes	g/kg da mistura
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina-HCl	0,700
Tiamina-HCl	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,200
D-biotina	0,020
Vitamina B12 (cianocobalamina: 0,1% em manitol)	2,500
Vitamina E (all-rac-A-acetato de tocoferila: 500 UI/g)	15,000
Vitamina A (all-trans-palitato de retinil: 500.000 UI/g)	0,800
Vitamina D (colecalfiferol: 400.000 UI/g)	0,250
Vitamina K filoquinona)	0,075
Sacarose	974,655

Fonte: REEVES et al., 1993.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.

ANEXO 5 – Tabelas de análise de variância

Efeito de Prebiótico (FOS), probiótico (*Bifidobacterium longum*) e simbiótico (FOS + *B. longum*) na biodisponibilidade de ferro, histologia intestinal e modulação de alguns grupos microbianos em ratos

Tabela 1 – Resumo da análise de variância das variáveis ganho de peso (GP), nível de hemoglobina (HB), ganho de hemoglobina (GHB) e peso do ceco (P Ceco) de animais alimentados com dietas controle ou com prebiótico, probiótico ou simbiótico e 3 níveis de ferro (6, 12 e 24 mg ferro/kg)

F.V.	G.L.	Q.M.			
		GP	HB	GHB	P Ceco
D	3	98,52778 ^{ns}	0,9072754 ^{ns}	3,264533 ^{ns}	42,85357 ^{**}
Fe	2	196,6250 ^{ns}	52,11158 ^{**}	55,98166 ^{**}	2,113539 [*]
D x Fe	6	639,6944 ^{ns}	2,054142 ^{ns}	2,042032 ^{ns}	0,3706537 ^{ns}
Resíduo	84	339,5893	2,396985	2,845775	0,6943327
C.V.(%)		12,36	13,22	58,70	22,09

^{ns} não significativo a 5%, pelo teste de F

^{*} significativo a 5%, pelo teste de F

^{**} significativo a 1%, pelo teste de F

Tabela 2 – Resumo da análise de variância das variáveis superfície de absorção e comprimento de vilosidades do íleo de animais alimentados com dietas controle ou com prebiótico, probiótico ou simbiótico com 24 mg ferro/kg ou dieta controle isenta de ferro.

F.V.	G.L.	Q.M.	
		Superfície Absorção	Comprimento de Vilosidades
D	4	12950,65 ^{ns}	145,2399 ^{ns}
Resíduo	35	23600,60	123,8386
C.V.(%)		25,23	22,28

^{ns} não significativo a 5%, pelo teste de F

Tabela 3 – Resumo da análise de variância das variáveis aeróbios totais (Aerob. Tot.), bifidobactérias (BIF), coliformes (COL) e anaeróbios totais (Anaerob. Tot.) de contagens da microbiota cecal de animais alimentados com dietas controle ou com prebiótico, probiótico ou simbiótico e diferentes níveis de ferro (6, 12 e 24 mg/kg)

FV	GL	QM			
		Aerob. Tot.	BIF	COL	Anaerob. Tot.
D	3	4,430596 ^{**}	3,120029 ^{**}	3,546592 [*]	1,460720 [*]
Fe	2	0,2794941 ^{ns}	0,4377189 ^{ns}	2,530097 ^{ns}	1,117840 ^{ns}
D x Fe	6	0,8853831 ^{ns}	0,6812643 ^{ns}	1,186978 ^{ns}	0,4073749 ^{ns}
Resíduo	60	0,4900736	0,5773825	1,226872	0,5103623
CV (%)		9,17	10,44	34,88	8,64

^{ns} não significativo a 5%, pelo teste de F

^{*} significativo a 5%, pelo teste de F

^{**} significativo a 1%, pelo teste de F

Tabela 4 – Resumo da análise de variância das variáveis aeróbios totais (Aerob. Tot.), bifidobactérias (BIF), coliformes (COL) e anaeróbios totais (Anaerob. Tot.) de contagens da microbiota colônica de animais alimentados com dietas controle ou com prebiótico, probiótico ou simbiótico e diferentes níveis de ferro (6, 12 e 24 mg/kg)

FV	GL	QM			
		Aerob. Tot.	BIF	COL	Anaerob. Tot.
D	3	2,151220 ^{**}	1,116819 ^{ns}	0,3029141 ^{ns}	0,1225695 ^{ns}
Fe	2	0,9738057 ^{ns}	0,6319726 ^{ns}	2,977948 ^{ns}	0,1677515 ^{ns}
D x Fe	6	1,657554 ^{**}	0,8364649 ^{ns}	2,003175 ^{ns}	0,5770826 ^{***}
Resíduo	60	0,4615965	0,5393590	1,656038	0,2984620
CV (%)		8,35	9,40	27,30	6,28

^{ns} não significativo a 5%, pelo teste de F

^{*} significativo a 5%, pelo teste de F

^{**} significativo a 1%, pelo teste de F

Efeito de prebiótico na biodisponibilidade de ferro, cálcio e magnésio em ratos.

Tabela 5 – Resumo da análise de variância das variáveis ganho de peso (GP) e consumo alimentar (CA) de animais alimentados com dietas controle ou prebiótico e diferentes níveis de cálcio (2,5, 5,0 e 10,0 g/kg)

F.V.	G.L.	Q.M.	
		GP	CA
D	1	209,0667 ^{ns}	16,84318 ^{ns}
Ca	2	246,1167 ^{ns}	153,6826 ^{ns}
D x Ca	2	169,3167 ^{ns}	533,3057 ^{ns}
Testemunha vs fatorial	1	134,8666 ^{ns}	20,06062 ^{ns}
Resíduo	63	132,9842	531,7239
C.V.(%)		7,71	6,31

^{ns} não significativo a 5%, pelo teste de F

Tabela 6 – Resumo da análise de variância das variáveis nível de hemoglobina (HB), hematócrito (HT) e teores de cálcio e magnésio no osso de animais alimentados com dietas controle ou prebiótico e diferentes níveis de cálcio (2,5, 5,0 e 10,0 g/kg).

F.V.	G.L.	Q.M.			
		HB	HT	Cálcio	Magnésio
D	1	0,6303756 ^{ns}	98,81667 ^{ns}	109,2059 ^{ns}	0,01133088 ^{ns}
Ca	2	42,89436 ^{**}	342,9497 ^{**}	176,9872 ^{ns}	2,249065 ^{**}
D x Ca	2	0,6699351 ^{ns}	11,51667 ^{ns}	159,9336 ^{ns}	0,04707501 ^{ns}
Testemunha vs fatorial	1	296,029564 ^{**}	1716,192597 ^{**}	226,4704 ^{ns}	0,3452831 ^{**}
Resíduo	63	1,301243	30,19049	127,1632	0,04009464
C.V.(%)		13,45	15,28	12,79	14,26

^{ns} não significativo a 5%, pelo teste de F

^{**} significativo a 1%, pelo teste de F

Efeito de Prebiótico (FOS), *Bifidobacterium longum* e simbiótico (FOS + *B. longum*) e de diferentes níveis de ferro na modulação da microbiota humana e na produção de ácidos orgânicos: estudos *in vitro*.

Tabela 7 – Resumo da análise de variância das variáveis contagem celular total (DAPI), bifidobactérias (BIF), bacteróides (BAC) e clostrídios (CLOS) de amostras obtidas em fermentação em série, com dietas controle, prebiótico, probiótico ou simbiótico e diferentes níveis de sulfato ferroso (11, 22 e 33 mg/L) e analisadas pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH).

F.V.	G.L.	Q.M.			
		DAPI	BIF	BAC	CLOS
D	3	0,05307978 ^{ns}	0,3664618 ^{ns}	0,4204136 ^{ns}	0,8540471 ^{ns}
Fe	2	0,07687286 ^{ns}	0,2171121 ^{ns}	0,1969822 ^{ns}	0,270072 ^{ns}
D x Fe	6	0,04219748 ^{ns}	0,1418695 ^{ns}	0,1306691 ^{ns}	0,632502 ^{ns}
Resíduo a	12	0,03311657	0,1740306	0,2811059	2,580989
T	2	0,1461530**	0,4889753**	3,725857**	0,7109478 ^{ns}
T x D	6	0,007544771 ^{ns}	0,03555256 ^{ns}	0,07865176***	0,2274369 ^{ns}
T x Fe	4	0,009400078 ^{ns}	0,03056495 ^{ns}	0,07011894***	0,3785618 ^{ns}
T x D x Fe	12	0,004937382 ^{ns}	0,0295589 ^{ns}	0,01198377 ^{ns}	0,0787541 ^{ns}
Resíduo	24	0,0198938	0,04791369	0,03165649	0,4295356
C.V.(%)		52,65	35,04	105,68	65,16

^{ns} não significativo a 5%, pelo teste de F

** significativo a 1%, pelo teste de F

*** significativo a 10% pelo teste de F

Tabela 8 – Resumo da análise de variância das variáveis concentração de ácidos acético, propiônico e isobutírico de amostras obtidas em fermentação em série, com dietas controle, prebiótico, probiótico ou simbiótico e diferentes níveis de sulfato ferroso (11, 22 e 33 mg/L).

F.V.	G.L.	Q.M.		
		Acético	Propiônico	Isobutírico
D	3	17,25495 ^{ns}	5,043511 ^{ns}	0,4323026 ^{ns}
Fe	2	23,56779 ^{ns}	0,682677 ^{ns}	0,4929604 ^{ns}
D x Fe	6	13,06357 ^{ns}	1,742733 ^{ns}	0,4323026 ^{ns}
Resíduo a	12	76,32607	3,749011	0,4474671
T	2	222,2439**	38,31141***	0,4247204 ^{ns}
T x D	6	7,268043 ^{ns}	4,683045**	0,4550493 ^{ns}
T x Fe	4	25,88511*	1,498914***	0,4247204 ^{ns}
T x D x Fe	12	10,0807 ^{ns}	2,934257 ^{ns}	0,4550494 ^{ns}
Resíduo	24	6,136323	2,101429	0,4474671
C.V.(%)		30,36	114,47	808,43

^{ns} não significativo a 5%, pelo teste de F

* significativo a 5%, pelo teste de F

** significativo a 1%, pelo teste de F

*** significativo a 10% pelo teste de F

Tabela 9 – Resumo da análise de variância das variáveis concentração de ácidos n-butírico, isovalérico, n-valérico e capróico de amostras obtidas em fermentação em série, com dietas controle, prebiótico, probiótico ou simbiótico e diferentes níveis de sulfato ferroso (11, 22 e 33 mg/L).

F.V.	G.L.	Q.M.			
		n-butírico	Isovalérico	n-valérico	capróico
D	3	5,362719 ^{ns}	0,3490032 ^{ns}	0,6246694 ^{ns}	0,4729574 ^{ns}
Fe	2	3,03635 ^{ns}	0,5820321 ^{ns}	1,050728 ^{ns}	1,105188 ^{ns}
D x Fe	6	5,460154	0,3567789 ^{ns}	0,6738768 ^{ns}	0,5432428 ^{ns}
Resíduo a	12	3,044126	0,4017103	0,9130922	0,7065746
T	2	142,8139**	0,6133066 ^{ns}	1,639754 ^{ns}	0,5481467 ^{ns}
T x D	6	5,097349 ^{ns}	0,3530728 ^{ns}	0,7898406 ^{ns}	0,7613382 ^{ns}
T x Fe	4	1,074446 ^{ns}	0,4894671 ^{ns}	0,4310749 ^{ns}	0,4576271 ^{ns}
T x D x Fe	12	6,042928 ^{ns}	0,3718478 ^{ns}	0,9090944 ^{ns}	0,7885799 ^{ns}
Resíduo	24	5,513628	0,4172162	0,8604994	0,7065745
C.V.(%)		123,74	647,33	459,18	565,61

^{ns} não significativo a 5%, pelo teste de F

** significativo a 1%, pelo teste de F

ANEXO 6 – DADOS BRUTOS DOS EXPERIMENTOS

1. Efeito de Prebiótico (FOS), probiótico (*Bifidobacterium longum*) e simbiótico (FOS + *B. longum*) na biodisponibilidade de ferro, histologia intestinal e modulação de alguns grupos microbianos em ratos.

Dieta	Rep.	Consumo (g)	ganho de peso (g)	Hemoglobina (g/dL) (início repleção)	Hemoglobina (g/dL) (fim repleção)	Ganho Hemoglobina (g/dL)
Controle	1	226,00	166	7,42	9,70	2,28
6 mg Fe/Kg	2	226,00	132	9,49	11,52	2,03
	3	226,00	134	9,75	10,04	0,29
	4	226,00	120	9,36	10,95	1,59
	5	221,80	158	8,26	8,29	0,03
	6	226,00	167	8,64	10,53	1,89
	7	224,45	163	7,46	9,16	1,71
	8	222,68	153	13,22	8,29	-4,93

Dieta	Rep.	Consumo (g)	ganho de peso (g)	Hemoglobina (g/dL) (início repleção)	Hemoglobina (g/dL) (fim repleção)	Ganho Hemoglobina (g/dL)
Controle	1	226,00	161	8,56	12,43	3,87
12 mg Fe/Kg	2	222,53	157	9,32	11,67	2,35
	3	226,00	162	8,22	12,28	4,06
	4	226,00	167	7,37	11,67	4,30
	5	221,27	178	9,58	10,53	0,96
	6	226,00	137	8,64	10,46	1,81
	7	226,00	129	13,05	11,44	-1,61
	8	226,00	175	7,46	12,21	4,75

Dieta	Rep.	Consumo (g)	ganho de peso (g)	Hemoglobina (g/dL) (início repleção)	Hemoglobina (g/dL) (fim repleção)	Ganho Hemoglobina (g/dL)
Controle	1	217,82	154	8,22	11,33	3,11
24 mg Fe/Kg	2	200,76	83	12,75	14,07	1,31
	3	226,00	175	7,33	12,93	5,60
	4	226,00	132	9,28	12,62	3,34
	5	226,00	160	7,46	13,50	6,04
	6	226,00	147	8,52	11,29	2,78
	7	226,00	151	9,62	14,41	4,79
	8	215,12	165	8,69	12,89	4,20

Dieta	Rep.	Consumo (g)	ganho de peso (g)	Hemoglobina (g/dL) (início repleção)	Hemoglobina (g/dL) (fim repleção)	Ganho Hemoglobina (g/dL)
Prebiótico	1	218,44	119	8,52	11,41	2,89
6 mg Fe/Kg	2	226,00	142	8,18	11,10	2,92
	3	224,16	159	7,50	10,15	2,65
	4	216,78	129	9,28	10,42	1,14
	5	223,63	141	8,69	10,30	1,62
	6	219,31	136	7,33	9,62	2,29
	7	226,00	131	12,29	14,52	2,24
	8	222,01	177	9,62	11,79	2,17

Dieta	Rep.	Consumo (g)	ganho de peso (g)	Hemoglobina (g/dL) (início repleção)	Hemoglobina (g/dL) (fim repleção)	Ganho Hemoglobina (g/dL)
Prebiótico	1	226,00	172	7,50	11,18	3,68
12 mg Fe/Kg	2	221,36	126	8,18	9,24	1,06
	3	226,00	140	7,29	11,71	4,42
	4	226,00	182	9,28	13,04	3,76
	5	226,00	177	8,73	12,78	4,05
	6	226,00	174	9,66	11,75	2,09
	7	225,72	160	8,52	10,91	2,40
	8	226,00	173	11,99	13,31	1,32

Dieta	Rep.	Consumo (g)	ganho de peso (g)	Hemoglobina (g/dL) (início repleção)	Hemoglobina (g/dL) (fim repleção)	Ganho Hemoglobina (g/dL)
Prebiótico	1	209,09	155	7,50	11,90	4,40
24 mg Fe/Kg	2	226,00	136	8,52	13,00	4,49
	3	226,00	164	8,14	12,97	4,83
	4	220,51	154	7,20	6,08	-1,12
	5	226,00	121	11,61	15,59	3,98
	6	226,00	168	8,77	14,33	5,56
	7	226,00	153	9,66	10,34	0,68
	8	147,00	105	9,28	14,45	5,17

Dieta	Rep.	Consumo (g)	ganho de peso (g)	Hemoglobina (g/dL) (início repleção)	Hemoglobina (g/dL) (fim repleção)	Ganho Hemoglobina (g/dL)
Probiótico	1	193,88	159	7,58	8,97	1,39
6 mg Fe/ Kg	2	226,00	155	8,09	10,49	2,40
	3	226,00	165	8,47	9,96	1,49
	4	226,00	151	7,16	10,04	2,88
	5	226,00	118	9,24	10,30	1,07
	6	223,65	136	8,77	11,03	2,26
	7	224,60	133	9,70	11,22	1,51
	8	219,37	172	11,31	12,43	1,12
Probiótico	1	226,00	128	10,51	13,76	3,26
12 mg Fe/ Kg	2	226,00	158	7,58	12,59	5,00
	3	226,00	137	8,77	12,89	4,12
	4	207,06	121	9,45	8,94	-0,51
	5	226,00	179	7,03	11,37	4,33
	6	226,00	154	8,01	11,14	3,13
	7	226,00	138	9,24	10,30	1,07
	8	226,00	149	8,47	10,46	1,98
Probiótico	1	226,00	137	7,63	11,18	3,55
24 mg Fe/ Kg	2	226,00	169	10,51	12,02	1,51
	3	226,00	155	7,03	14,83	7,80
	4	223,92	147	8,43	13,57	5,14
	5	226,00	154	9,96	15,59	5,63
	6	224,51	149	8,81	15,36	6,55
	7	226,00	160	8,01	11,67	3,66
	8	226,00	161	9,19	14,11	4,91
Dieta <th>Rep.</th> <th>Consumo (g)</th> <th>ganho de peso (g)</th> <th>Hemoglobina (g/dL) (início repleção)</th> <th>Hemoglobina (g/dL) (fim repleção)</th> <th>Ganho Hemoglobina (g/dL)</th>	Rep.	Consumo (g)	ganho de peso (g)	Hemoglobina (g/dL) (início repleção)	Hemoglobina (g/dL) (fim repleção)	Ganho Hemoglobina (g/dL)
Simbiótico	1	218,22	131	8,39	11,22	2,83
6 mg Fe/Kg	2	226,00	145	6,69	8,17	1,48
	3	226,00	154	9,15	9,85	0,70
	4	208,64	147	7,63	8,56	0,93
	5	226,00	152	9,75	11,94	2,19
	6	220,31	162	8,94	10,46	1,52
	7	223,05	143	7,97	10,95	2,98
	8	212,62	134	10,68	11,60	0,92
Simbiótico	1	226,00	147	7,97	13,61	5,65
12 mg Fe/Kg	2	226,00	142	7,63	11,44	3,82
	3	210,62	134	6,99	10,80	3,81
	4	223,99	117	10,00	11,75	1,75
	5	225,80	125	10,76	12,66	1,90
	6	225,87	166	9,19	10,91	1,72
	7	226,00	130	8,86	12,85	4,00
	8	224,20	143	8,43	10,53	2,10
Simbiótico	1	225,72	161	8,94	13,23	4,29
24 mg Fe/Kg	2	226,00	155	7,67	12,36	4,69
	3	226,00	117	9,15	15,10	5,94
	4	226,00	142	7,97	13,95	5,99
	5	226,00	165	10,04	13,35	3,30
	6	226,00	171	6,65	13,84	7,19
	7	226,00	156	8,39	9,92	1,53
	8	226,00	172	10,59	14,79	4,20

Legenda: Controle: AIN-93G; Prebiótico: FOS (Raftilose® P95); Probiótico: *B. longum*; Simbiótico: FOS + *B. longum*

Dieta	rep	Altura vilosidade (μm)							média	superfície de absorção (μm)		
		1	2	3	4	5	6	7		1	2	média
Controle 24 mg Fe/Kg	1	58,47	64,32	58,59	65,02	54,44	63,50		60,72	829,98	768,85	799,42
	2	45,25	43,10	39,41	51,98	51,09	47,27		46,35	669,34	789,27	729,31
	3	71,63	75,06	66,96	41,99	41,74	41,94		56,56	849,21	596,15	722,68
	4	60,47	56,40	61,59	66,92	61,92	58,62		60,99	820,42	728,40	774,41
	5	28,85	32,00	25,65	39,71	37,83	33,97		33,00	543,33	509,01	526,17
	6	55,52	56,74	58,30	52,64	46,66	51,19		53,51	722,97	590,54	656,76
	7	66,75	70,38	70,93	58,58	62,60	63,09		65,39	692,04	462,07	577,05
	8	67,88	50,75	49,06	31,50	35,49	26,97		43,61	498,16	359,81	428,99
Probiótico 24 mg Fe/Kg	1	55,28	55,04	58,19	57,16	55,34	45,48		54,42	771,10	727,73	749,42
	2	48,20	63,48	48,54	63,14	53,49	54,02		55,14	621,63	558,02	589,83
	3	47,65	43,07	38,74	42,83	46,54	45,24		44,01	393,62	577,65	485,63
	4	37,71	37,51	32,42	31,18	29,43	35,88		34,02	366,25	476,17	421,21
	5	46,53	51,54	48,28	69,29	71,17	69,84		59,44	746,61	908,34	827,47
	6	48,91	43,68	49,72	36,28	37,10	29,29		40,83	470,73	470,02	470,38
	7	74,71	70,19	61,58	78,78	77,13	90,71		75,52	580,45	1486,21	1033,33
	8	31,02	30,98	31,34	27,10	25,63	26,30		28,73	399,30	362,71	381,01
Prebiótico 24 mg Fe/Kg	1	48,85	49,71	38,57	34,14	33,45	38,08		40,47	404,31	483,66	443,99
	2	46,34	40,71	41,00	51,68	54,67	51,34		47,62	354,09	445,65	399,87
	3	45,22	46,72	51,21	48,12	46,65	44,15		47,01	509,84	503,17	506,50
	4	67,67	53,82	53,29	60,88	57,08	58,61		58,56	665,71	736,68	701,20
	5	39,32	45,21	40,37	42,27	42,31	42,53		42,00	702,60	718,94	710,77
	6	37,76	37,42	40,62	39,54	44,33	44,54		40,70	539,45	455,32	497,39
	7	36,77	37,51	41,23	39,84	42,90	41,31		39,93	597,37	843,31	720,34
	8	39,11	36,56	39,12	32,61	30,23	31,54		34,86	509,53	362,37	435,95
Simbiótico 24 mg Fe/Kg	1	77,27	74,27	73,28	61,11	72,20	69,58		71,28	649,45	745,75	697,60
	2	34,85	42,25	33,71	37,85	37,87	44,97		38,58	460,45	528,15	494,30
	3	33,18	28,76	34,35	39,75	41,06	38,93		36,00	327,59	601,43	464,51
	4	54,49	58,36	60,24	54,48	60,37	61,26		58,20	762,03	609,11	685,57
	5	63,40	58,89	59,59	59,12	53,46	48,52		57,16	662,98	674,26	668,62
	6	39,39	40,73	40,58	32,85	34,32	29,43		36,22	460,78	383,80	422,29
	7	43,16	33,03	45,49	48,12	33,43	29,20	42,24	39,24	657,03	691,91	674,47
	8	46,84	43,63	41,71	75,40	73,15	56,43		56,19	453,11	696,91	575,01
Controle Isento Ferro	1	64,99	70,85	72,64	51,15	55,45	56,62		61,95	702,69	478,60	590,64
	2	53,78	57,56	59,41	36,19	38,40	47,53		48,81	568,11	547,41	557,76
	3	46,14	51,88	49,66	49,12	52,55	46,48		49,31	480,10	467,32	473,71
	4	62,97	64,75	67,36	67,02	68,10	65,19		65,90	639,91	646,73	643,32
	5	52,70	50,64	50,46	43,33	43,21	43,32		47,28	498,64	537,66	518,15
	6	59,46	56,64	61,75	57,66	57,15	59,40		58,68	772,84	705,74	739,29
	7	44,06	45,57	45,60	66,06	68,09	57,47		54,47	495,47	862,74	679,11
	8	55,73	57,68	49,85	57,92	57,95	53,13		55,38	900,52	866,56	883,54

Legenda: Controle: AIN-93G; Prebiótico: FOS (Raftilose® P95); Probiótico: *B. longum*; Simbiótico: FOS + *B. longum*.

Contagem da microbiota cecal murina (Log UfC/g)					
Dieta	Rep.	Aeróbios	<i>Escherichia</i>	Anaeróbios	Bifidobactérias
Controle	1	8,402924	5,302142	8,51083	7,91276
6 mg Fe/Kg	2	7,623093	3,999844	8,043206	6,543912
	3	8,385523	4,78078	9,158892	8,694943
	4	8,548261	6,151546	8,573289	7,419214
	5	7,472656	2,542508	9,31441	7,468997
	6	8,81758	3,468846	8,828328	8,304376
	média	8,41993775	5,450182	8,919675	8,145057
Controle	1	7,250303	1,698853	7,698853	7,314803
12 mg Fe/Kg	2	8,185922	4,670499	9,021654	7,578185
	3	6,976982	3,606713	7,874319	6,278012
	4	7,715535	4,601591	8,727885	7,841516
	5	8,595703	4,632025	8,651769	7,943039
	6	8,618273	3,69815	9,585205	7,892664
	média	8,23974135	4,364004	9,000481	7,692607
Controle	1	7,719339	1,3	8,277934	7,356162
24 mg Fe/Kg	2	8,381314	3,3	8,325633	7,569256
	3	8,435709	3,445909	9,003073	7,907236
	4	8,200149	3,413725	8,48871	8,112695
	5	8,720306	2,174999	9,352054	8,611691
	6	7,693629	2,739387	8,423906	6,266196
	média	8,33540308	3,130232	8,848317	8,055
Probiótico	1	8,361617	4,787821	8,773463	8,243223
6 mg Fe/ Kg	2	8,075352	3,113748	8,172991	7,38092
	3	5,122642	3,430154	5,69776	5,39673
	4	8,543209	3,84733	8,647501	8,383853
	5	8,197815	3,963351	8,517106	6,565411
	6	8,133659	3,768796	8,352372	8,136773
	média	8,21838689	4,163568	8,462682	7,986829

Contagem da microbiota colônica murina (Log UfC/g)					
Dieta	Rep.	Aeróbios	<i>Escherichia</i>	Anaeróbios	Bifidobactérias
Controle	1	8,038487	5,661387	8,410281	8,095563
6 mg Fe/Kg	2	8,508185	5,322592	8,398114	7,399781
	3	8,357252	4,900123	8,46681	8,377244
	4	8,528036	4,783308	8,651421	8,293598
	5	7,69776	3,174882	9,262426	8,463429
	6	9,204142	5,03388	9,280488	8,79296
	média	8,644506	5,184934	8,919593	8,396836
Controle	1	7,699274	3,783833	7,910439	7,206449
12 mg Fe/Kg	2	8,020506	6,03571	8,73468	7,570574
	3	7,339893	5,937101	7,862772	6,728073
	4	8,017033	3,841985	8,802774	8,102091
	5	8,793891	5,492861	8,842017	8,251347
	6	8,731242	4,499597	9,421771	8,321806
	média	8,38065	5,584814	8,890997	7,980243
Controle	1	7,259925	1,992753	8,327207	7,381919
24 mg Fe/Kg	2	9,106738	4,157516	9,177992	8,175125
	3	9,181807	4,561324	9,402266	8,018702
	4	8,343424	4,561377	8,674417	8,125115
	5	8,951794	4,335176	9,19141	8,541142
	6	7,996613	5,055145	8,969879	7,979424
	média	8,827299	4,569153	9,079386	8,153597
Probiótico	1	9,201044	6,416585	9,248704	8,571155
6 mg Fe/ Kg	2	6,282932	1,981902	6,680872	5,157994
	3	8,730167	6,121744	8,75696	8,10873
	4	8,856076	5,386328	8,954174	8,531829
	5	8,9646	3,530944	8,90333	8,282443
	6	7,874822	1,981902	7,978362	7,1909
	média	8,806459	5,843048	8,839336	8,242431

Legenda: Controle: AIN-93G; Prebiótico: FOS (Raftilose® P95); Probiótico: *B. longum*; Simbiótico: FOS + *B. longum*

Contagem da microbiota cecal murina (Log UFC/g)					
Dieta	Rep.	Aeróbios	<i>Escherichia</i>	Anaeróbios	Bifidobactérias
Probiótico 12 mg Fe/ Kg	1	8,073987	3,188772	8,320659	7,991876
	2	7,762725	3,145425	8,243574	7,499671
	3	8,414153	2,39712	8,489841	7,165018
	4	7,095778	2,299898	7,890963	7,193383
	5	8,279543	2,397588	8,223663	8,185757
	6	8,270087	4,876192	8,365601	7,797586
média		8,13832797	4,118576	8,290258	7,797151
Probiótico 24 mg Fe/ Kg	1	8,607522	2,476653	8,83838	8,106741
	2	7,821339	2,776669	8,320737	7,978521
	3	7,757797	4,219543	7,811042	7,07731
	4	8,065779	1,999453	9,058259	7,791845
	5	8,5451	5,303436	9,299147	8,723631
	6	8,980312	4,456698	8,09068	8,254048
média		8,51220698	4,615088	8,847304	8,22428
Prebiótico 6 mg Fe/ Kg	1	7,428504	5,202871	8,490813	6,840736
	2	7,978443	1,99844	8,470465	7,824515
	3	6,527162	1,998245	7,253518	6,542313
	4	7,263636	2,176091	8,638489	6,973128
	5	8,120496	3,986694	8,293284	7,892016
	6	7,934801	3,572822	7,990016	7,201551
média		7,78023676	4,460716	8,352878	7,478247
Prebiótico 12 mg Fe/ Kg	1	6,820904	2,777214	6,844161	5,953306
	2	6,773424	3,288942	8,917985	7,166225
	3	6,476301	1,69815	8,679062	5,865467
	4	6,053747	2,396691	6,572783	6,547755
	5	7,915552	3,297654	7,963101	7,880042
	6	5,283634	2,77175	7,070967	5,090509
média		7,21837274	2,955746	8,374096	7,203273

Contagem da microbiota colônica murina (Log UFC/g)					
Dieta	Rep.	Aeróbios	<i>Escherichia</i>	Anaeróbios	Bifidobactérias
Probiótico 12 mg Fe/ Kg	1	8,742808	6,269821	8,960864	8,497024
	2	7,987711	4,61096	8,449359	7,686681
	3	8,713241	4,741014	8,928485	7,331388
	4	7,725069	2,407005	8,243329	7,414753
	5	8,698215	3,968368	8,904458	8,5981
	6	8,267138	6,192577	8,563498	7,787688
média		8,501569	5,768985	8,751674	8,160273
Probiótico 24 mg Fe/ Kg	1	9,332438	6,071882	9,646404	8,885644
	2	8,827612	5,301597	9,363115	8,717216
	3	9,1766	6,088818	9,245973	8,219795
	4	8,436386	4,6991	9,252701	8,719486
	5	8,014739	2,690457	8,054069	7,541715
	6	8,801468	4,548211	8,750063	7,327366
média		8,948887	5,652089	9,261829	8,530644
Prebiótico 6 mg Fe/ Kg	1	7,878686	6,453278	8,795565	7,420748
	2	8,705406	4,82929	8,806512	8,28028
	3	9,201044	6,416585	9,248704	8,571155
	4	8,530731	6,416602	8,598827	7,771373
	5	8,601219	6,156283	8,705803	7,944894
	6	7,99822	5,369177	8,724237	7,469783
média		8,70042	6,212799	8,872441	8,106187
Prebiótico 12 mg Fe/ Kg	1	5,951081	5,739341	8,661695	7,873784
	2	6,696826	5,043179	9,121707	7,049008
	3	6,448619	4,974573	8,680382	5,448619
	4	6,945975	3,687098	7,56216	6,574716
	5	8,26021	5,009411	8,576358	7,738513
	6	6,092386	1,981902	6,765027	6,162967
média		7,524621	5,156663	8,650097	7,386894

Legenda: Controle: AIN-93G; Prebiótico: FOS (Raftilose® P95); Probiótico: *B. longum*; Simbiótico: FOS + *B. longum*

Contagem da microbiota cecal murina (Log UFC/g)					
Dieta	Rep.	Aeróbios	<i>Escherichia</i>	Anaeróbios	Bifidobactérias
Prebiótico 24 mg Fe/ Kg	1	6,258057	1,60124	7,666633	5,844278
	2	6,427978	2,902934	8,664486	7,742569
	3	6,523368	2,738686	9,22104	6,722599
	4	7,365835	1,299509	7,738842	6,4756
	5	7,869353	2,97492	8,283878	7,820019
	6	8,252938	3,348643	8,781791	8,256532
	média	7,67532295	2,883005	8,70242	7,71439
Simbiótico 6 mg Fe/ Kg	1	6,95151	3,622937	6,874749	6,278441
	2	7,097395	1,697721	8,823203	7,15104
	3	6,060424	2,698697	8,091393	6,052805
	4	7,152917	1,698072	5,999102	5,698072
	5	7,236486	2,39638	8,10053	6,950263
	6	7,459143	4,002567	7,794125	7,274707
	média	7,14013491	3,400964	8,215635	6,879171
Simbiótico 12 mg Fe/ Kg	1	8,343697	5,269002	8,843111	8,213829
	2	7,088851	4,085306	6,697916	6,299976
	3	6,994426	1,69776	8,885563	6,843888
	4	8,435631	2,776825	8,353742	7,955562
	5	7,707176	2,812093	7,606635	6,751229
	6	7,762273	1,698189	7,770071	7,134352
	média	8,01721066	4,521353	8,47598	7,6723
Simbiótico 24 mg Fe/ Kg	1	6,98402	1,299509	8,615442	6,874554
	2	6,956102	2,874514	8,725773	7,234982
	3	7,506153	2,300678	7,711456	6,295215
	4	7,813297	2,395991	8,677024	7,67884
	5	6,791533	5,601201	8,601201	6,314061
	6	8,35583	1,696866	8,348144	7,31908
	média	7,76454249	4,824426	8,542679	7,209908

Contagem da microbiota colônica murina (Log UFC/g)					
Dieta	Rep.	Aeróbios	<i>Escherichia</i>	Anaeróbios	Bifidobactérias
Prebiótico 24 mg Fe/ Kg	1	7,355163	3,640088	9,093237	6,463997
	2	8,371674	4,168303	8,744923	7,919157
	3	7,35745	5,058304	8,947545	7,964205
	4	7,669024	4,536398	8,364321	7,426899
	5	8,151361	4,395486	8,410007	7,900636
	6	8,185533	4,11721	8,707035	7,957688
	média	8,015932	4,535319	8,787614	7,795885
Simbiótico 6 mg Fe/ Kg	1	8,268962	6,971412	8,510167	8,156646
	2	8,796088	2,678817	9,251689	8,299993
	3	7,555699	5,10721	8,400538	7,058805
	4	7,950535	4,787587	9,422777	8,119286
	5	7,387265	5,347091	8,343248	7,383762
	6	7,159437	6,483948	9,193186	7,92723
	média	8,210888	6,329826	9,053604	7,996208
Simbiótico 12 mg Fe/ Kg	1	9,175232	6,127863	9,388307	8,776205
	2	7,762878	5,563924	8,680119	8,124444
	3	7,071777	2,836248	8,877641	6,137278
	4	8,950248	4,549902	9,330059	8,86721
	5	8,67847	5,268487	8,600631	8,170712
	6	8,925989	5,050928	8,969455	8,490952
	média	8,7992	5,532091	9,075997	8,506572
Simbiótico 24 mg Fe/ Kg	1	8,292759	2,689615	8,060683	8,358001
	2	6,382737	3,382737	7,978233	6,41616
	3	8,165939	5,708756	8,155616	7,562127
	4	8,472843	3,171813	9,107992	8,228718
	5	7,995956	6,804095	9,168058	8,270183
	6	8,014739	2,690457	8,054069	7,541715
	média	8,148582	6,059792	8,729876	8,039777

Legenda: Controle: AIN-93G; Prebiótico: FOS (Raftilose[®] P95); Probiótico: *B. longum*; Simbiótico: FOS + *B. longum*

2. Efeito de FOS e níveis de cálcio sobre ganho de peso, consumo, hemoglobina, hematócrito, teor de cálcio e ferro nos ossos de ratos alimentados com dietas deficientes em ferro.

Dieta	Rep.	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	mg Ca osso (g)	mg Mg osso (g)	Consumo (g)	Ganho de Peso (g)
1	1	6,89	38	100,47	1,52	400,37	166
1	2	9,50	34	80,48	1,50	394,88	156
1	3	8,77	36	60,55	1,51	343,30	144
1	4	7,74	38	95,15	1,76	377,36	158
1	5	9,31	34	84,71	1,99	401,88	155
1	6	8,00	35	95,05	1,92	409,14	159
1	7	9,57	41	78,99	1,60	404,96	153
1	8	9,04	39	98,93	1,68	395,81	152
1	9	10,91	41	69,56	1,77	409,33	151
1	10	8,85	38	72,35	1,27	352,44	142
2	1	7,70	32	99,00	1,96	355,21	147
2	2	7,39	31	71,93	1,59	350,49	150
2	3	8,08	37	82,90	1,37	393,41	167
2	4	9,50	39	53,20	1,37	419,07	164
2	5	7,20	35	84,09	1,88	389,07	154
2	6	9,00	40	101,04	1,47	391,36	149
2	7	10,38	40	103,10	1,93	391,51	153
2	8	9,65	41	84,02	1,74	406,61	156
2	9	8,12	39	84,23	1,47	374,11	150
2	10	7,08	28	82,85	1,41	319,75	131
3	1	7,58	40	87,85	1,65	355,44	135
3	2	7,01	34	99,19	1,50	415,03	178
3	3	7,58	40	99,00	1,78	387,52	145
3	4	8,42	37	89,73	1,37	385,96	151
3	5	8,20	35	76,67	1,39	391,53	159
3	6	7,43	33	74,81	1,31	386,05	148
3	7	8,88	35	95,58	1,83	372,81	140
3	8	9,69	35	97,46	1,75	295,04	98
3	9	8,62	43	88,50	1,10	322,11	135
3	10	8,77	38	99,75	1,39	407,53	157
4	1	9,19	32	90,63	1,35	372,59	150
4	2	5,51	24	78,59	1,45	365,54	148
4	3	9,50	34	101,20	1,77	374,74	139
4	4	9,11	32	61,75	1,34	383,08	147
4	5	10,15	54	84,12	1,41	427,10	155
4	6	6,40	37	105,21	1,74	362,22	150
4	7	7,97	34	83,72	1,37	418,72	149
4	8	9,08	29	89,92	1,09	361,91	146
4	9	7,97	35	112,56	1,85	336,35	139
4	10	9,46	36	81,61	1,46	392,82	150

Dieta	Rep.	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	mg Ca osso (g)	mg Mg osso (g)	Consumo (g)	Ganho de Peso (g)
5	1	6,55	25	85,17	0,95	362,47	143
5	2	5,71	31	84,68	1,04	387,53	147
5	3	6,70	34	75,09	0,88	397,56	149
5	4	6,09	26	84,53	1,01	374,32	152
5	5	5,48	32	77,87	0,87	336,36	126
5	6	6,36	28	84,43	1,05	381,98	130
5	7	7,97	30	76,65	0,77	370,43	134
5	8	4,98	23	100,26	0,96	403,41	159
5	9	4,60	50	90,14	1,04	358,54	147
5	10	7,05	34	79,03	0,70	400,40	146
6	1	5,17	26	101,81	1,18	351,52	131
6	2	4,75	20	100,06	1,36	395,94	152
6	3	5,77	27	92,79	1,07	350,64	139
6	4	4,86	28	96,21	1,13	394,99	158
6	5	6,97	35	87,11	1,05	407,54	164
6	6	4,71	20	90,24	1,08	392,69	161
6	7	7,43	34	86,22	0,84	420,29	166
6	8	6,17	28	94,11	1,05	391,49	141
6	9	7,08	30	92,29	0,86	358,88	145
6	10	4,75	23	87,07	1,05	393,92	162
7	1	13,06	36	98,16	1,50	389,11	138
7	2	13,94	55	102,33	1,77	386,25	152
7	3	14,21	46	83,26	1,49	361,59	161
7	4	14,13	55	85,76	1,36	353,71	140
7	5	14,17	48	107,32	1,80	406,07	160
7	6	14,67	49	77,11	1,83	400,58	162
7	7	11,11	47	90,30	1,55	386,58	150
7	8	14,97	52	82,92	1,40	372,71	144
7	9	12,91	48	96,39	1,58	389,37	162
7	10	11,99	45	102,23	1,49	403,72	161

Legenda: Dietas (1) Controle + 0,25% cálcio; (2) Controle + 0,25% cálcio + FOS; (3) Controle + 0,50% cálcio; (4) Controle + 0,50% cálcio + FOS; (5) Controle + 1,00% cálcio; (6) Controle + 1,00% cálcio + FOS; (7) AIN-93G; dieta controle= dieta com 14 mg Fe/Kg; Rep.= repetição.

3. Efeito de prebiótico (FOS), *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) e simbiótico (FOS + *B. longum*) na contagem celular total, (DAPI), bacteroides (BAC), Bifidobacteria (BIF) e clostridia (CLOS), em amostras obtidas em fermentações em série, utilizando meios com teores de sulfato ferroso de 11, 22 e 33 mg/L. Valores referentes a cada repetição.

Primeira Repetição (Log UFC/mL)

Controle 11 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Controle 22 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Controle 33 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS
T0	10.14	7.97	9.26	7.84	t0	10.30	9.13	9.43	6.79	t0	10.32	9.27	9.40	7.47
T5	10.33	8.11	9.81	9.47	t5	10.37	8.60	9.75	8.96	t5	10.48	9.09	9.96	8.69
T10	10.28	8.00	9.72	9.55	t10	10.39	9.28	9.92	9.19	t10	10.53	9.92	9.74	8.94
T24	10.26	9.38	9.79	9.17	t24	10.35	9.73	10.22	8.85	t24	10.64	10.13	10.17	8.21
Probiótico 11 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Probiótico 22 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Probiótico 33 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS
T0	10.28	9.30	9.39	7.53	t0	10.29	9.11	9.48	7.03	t0	10.37	9.28	9.40	7.49
T5	10.36	9.02	9.81	8.82	t5	10.39	8.61	9.89	9.34	t5	10.43	9.14	9.81	8.39
T10	10.54	9.34	9.74	8.91	t10	10.56	9.77	9.69	9.25	t10	10.45	9.79	9.98	8.90
T24	10.39	9.81	10.07	8.99	t24	10.67	9.62	10.10	8.70	t24	10.59	10.27	10.16	8.82
Prebiótico 11 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Prebiótico 22 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Prebiótico 33 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS
T0	10.36	9.33	9.42	7.71	t0	10.31	9.37	9.45	7.44	t0	10.33	9.25	9.46	7.59
T5	10.43	9.21	10.05	8.92	t5	10.42	9.10	10.22	8.78	t5	10.45	9.06	10.12	8.64
T10	10.50	9.61	10.01	9.41	t10	10.46	9.52	9.92	9.40	t10	10.60	9.68	10.13	9.14
T24	10.48	9.58	10.10	9.58	t24	10.52	9.67	10.18	8.64	t24	10.61	9.68	10.02	9.88
Simbiótico 11 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Simbiótico 22 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Simbiótico 33 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS
T0	10.25	9.34	9.40	7.73	t0	10.38	9.33	9.46	7.68	t0	10.36	9.25	9.47	7.39
T5	10.43	9.10	10.07	8.91	t5	10.29	9.01	9.97	8.75	t5	10.57	9.09	10.06	8.76
T10	10.60	9.51	10.10	9.32	t10	10.56	9.34	9.74	8.95	t10	10.56	9.64	10.09	9.40
T24	10.53	9.87	10.19	9.18	t24	10.55	9.82	9.99	8.75	t24	10.56	9.75	10.04	9.76

Segunda repetição (Log UFC/mL)

Controle 11 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Controle 22 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Controle 33 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS
t0	10.24	9.03	9.20	7.57	t0	10.22	9.15	9.11	7.64	t0	10.20	8.99	9.05	7.47
t5	10.14	8.03	9.08	7.42	t5	10.23	8.59	9.46	8.82	t5	10.33	8.78	9.71	7.83
t10	10.25	8.36	9.08	8.13	t10	10.27	9.01	9.46	7.47	t10	10.29	9.44	9.76	7.49
t24	10.37	8.43	8.51	9.23	t24	10.46	9.54	9.93	7.60	t24	10.48	9.86	10.08	8.44
Probiótico 11 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Probiótico 22 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Probiótico 33 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS
t0	10.34	8.97	9.24	7.68	t0	10.40	9.24	9.26	8.52	t0	9.99	9.14	9.15	7.59
t5	10.30	9.02	9.46	8.89	t5	10.89	9.50	9.68	8.91	t5	10.40	9.02	9.63	8.13
t10	10.32	9.66	9.75	7.30	t10	10.77	10.05	10.17	7.27	t10	10.37	9.74	9.96	7.42
t24	10.57	9.79	10.04	7.49	t24	10.92	10.21	10.39	7.53	t24	10.58	9.88	10.22	7.64
Prebiótico 11 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Prebiótico 22 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Prebiótico 33 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS
t0	10.30	9.09	9.07	7.49	t0	10.28	9.10	9.04	7.44	t0	10.20	9.07	9.13	7.51
t5	10.42	8.82	9.42	8.98	t5	10.18	8.64	9.53	9.13	t5	10.60	8.57	9.67	9.13
t10	10.48	9.11	9.92	8.26	t10	10.48	9.25	10.17	8.77	t10	10.59	9.14	10.14	8.54
t24	10.69	9.38	10.07	7.79	t24	10.70	9.36	10.13	7.49	t24	10.75	9.37	10.14	7.65
Simbiótico 11 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Simbiótico 22 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS	Simbiótico 33 ppm FeSO ₄	DAPI	BAC	BIF	CLOS
t0	10.50	9.37	9.35	8.55	t0	10.26	9.09	9.03	7.53	t0	10.32	9.14	9.17	7.49
t5	10.82	9.53	10.18	8.39	t5	10.26	8.62	9.37	9.10	t5	10.31	8.91	9.75	9.25
t10	10.65	9.51	10.28	7.97	t10	10.48	9.11	10.17	8.80	t10	10.69	9.29	10.11	8.53
t24	10.65	9.88	10.31	7.42	t24	10.60	9.32	10.03	7.53	t24	10.65	9.47	10.43	7.81

Concentração de ácido isobutírico (mMol/ µL) dos recipientes contendo dietas controle, com probiótico, com prebiótico ou com simbiótico e com níveis de 11, 22 e 33 mg de sulfato ferroso/ L. Amostras de batch culture.

Recipiente A	mMol/µL	Δ	Recipiente E	mMol/µL	Δ	Recipiente I	mMol/µL	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	0,29	0,29	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00

Recipiente B	mMol/µL	Δ	Recipiente F	mMol/µL	Δ	Recipiente J	mMol/µL	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00

Recipiente C	mMol/µL	Δ	Recipiente G	mMol/µL	Δ	Recipiente K	mMol/µL	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00
t24	5,67	5,67	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00

Recipiente D	mMol/µL	Δ	Recipiente H	mMol/µL	Δ	Recipiente L	mMol/µL	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00

Legenda: Recipientes (A) baixo teor de sulfato ferroso (11mg/L) + controle; (B) baixo teor de sulfato ferroso + probiótico; (C) baixo teor de sulfato ferroso + prebiótico; (D) baixo teor de sulfato ferroso + simbiótico; (E) teor normal de ferro (22mg/L) + controle; (F) teor normal de ferro + probiótico; (G) teor normal de ferro + prebiótico; (H) teor normal de ferro + simbiótico; (I) alto teor de sulfato ferroso (33mg/L) + controle; (J) alto teor de sulfato ferroso + probiótico; (K) alto teor de sulfato ferroso + prebiótico; (L) alto teor de sulfato ferroso + simbiótico; Δ = Diferença com relação ao tempo 0, da respectiva repetição.

Concentração de ácido isovalérico (mMol/ µL) dos recipientes contendo dietas controle, com probiótico, com prebiótico ou com simbiótico e com níveis de 11, 22 e 33 mg de sulfato ferroso/ L. Amostras de batch culture.

Recipiente A	mMol/µL	Δ	Recipiente E	mMol/µL	Δ	Recipiente I	mMol/µL	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	0,36	0,36	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t24	1,02	1,02	t24	0,48	0,48	t24	1,02	1,02
t24	0,00	0,00	t24	0,48	0,48	t24	1,02	1,02

Recipiente B	mMol/µL	Δ	Recipiente F	mMol/µL	Δ	Recipiente J	mMol/µL	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00

Recipiente C	mMol/µL	Δ	Recipiente G	mMol/µL	Δ	Recipiente K	mMol/µL	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00
t24	5,32	5,32	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00

Recipiente D	mMol/µL	Δ	Recipiente H	mMol/µL	Δ	Recipiente L	mMol/µL	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00

Legenda: Recipientes (A) baixo teor de sulfato ferroso (11mg/L) + controle; (B) baixo teor de sulfato ferroso + probiótico; (C) baixo teor de sulfato ferroso + prebiótico; (D) baixo teor de sulfato ferroso + simbiótico; (E) teor normal de ferro (22mg/L) + controle; (F) teor normal de ferro + probiótico; (G) teor normal de ferro + prebiótico; (H) teor normal de ferro + simbiótico; (I) alto teor de sulfato ferroso (33mg/L) + controle; (J) alto teor de sulfato ferroso + probiótico; (K) alto teor de sulfato ferroso + prebiótico; (L) alto teor de sulfato ferroso + simbiótico; Δ = Diferença com relação ao tempo 0, da respectiva repetição.

Concentração de ácido n-valérico (mMol/ µL) dos recipientes contendo dietas controle, com probiótico, com prebiótico ou com simbiótico e com níveis de 11, 22 e 33 mg de sulfato ferroso/ L. Amostras de batch culture.

Recipiente A	mMol/µL	Δ	Recipiente E	mMol/µL	Δ	Recipiente I	mMol/µL	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	1,67	1,67	t10	0,03	0,03	t10	0,53	0,53
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	1,48	1,48	t24	0,00	0,00

Recipiente B	mMol/µL	Δ	Recipiente F	mMol/µL	Δ	Recipiente J	mMol/µL	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	0,79	0,79	t10	0,00	0,00	t10	0,09	0,09
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00
t24	0,40	0,40	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00

Recipiente C	mMol/µL	Δ	Recipiente G	mMol/µL	Δ	Recipiente K	mMol/µL	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	0,12	0,12	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00
t24	7,42	7,42	t24	0,81	0,81	t24	0,00	0,00

Recipiente D	mMol/µL	Δ	Recipiente H	mMol/µL	Δ	Recipiente L	mMol/µL	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,02	0,02
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	1,18	1,18	t24	0,00	0,00

Legenda: Recipientes (A) baixo teor de sulfato ferroso (11mg/L) + controle; (B) baixo teor de sulfato ferroso + probiótico; (C) baixo teor de sulfato ferroso + prebiótico; (D) baixo teor de sulfato ferroso + simbiótico; (E) teor normal de ferro (22mg/L) + controle; (F) teor normal de ferro + probiótico; (G) teor normal de ferro + prebiótico; (H) teor normal de ferro + simbiótico; (I) alto teor de sulfato ferroso (33mg/L) + controle; (J) alto teor de sulfato ferroso + probiótico; (K) alto teor de sulfato ferroso + prebiótico; (L) alto teor de sulfato ferroso + simbiótico; Δ = Diferença com relação ao tempo 0, da respectiva repetição.

Concentração de ácido caproico (mMol/ μ L) dos recipientes contendo dietas controle, com probiótico, com prebiótico ou com simbiótico e com níveis de 11, 22 e 33 mg de sulfato ferroso/ L. Amostras de batch culture.

Recipiente A	mMol/ μ L	Δ	Recipiente E	mMol/ μ L	Δ	Recipiente I	mMol/ μ L	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	T0	0,06	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	T0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	T5	0,00	-0,06
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	T5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	2,07	2,07	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,48	0,48	t24	0,00	0,00

Recipiente B	mMol/ μ L	Δ	Recipiente F	mMol/ μ L	Δ	Recipiente J	mMol/ μ L	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t5	0,00	0,00	t5	0,08	0,08	t5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t24	0,69	0,69	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00

Recipiente C	mMol/ μ L	Δ	Recipiente G	mMol/ μ L	Δ	Recipiente K	mMol/ μ L	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00
t24	6,75	6,75	t24	0,09	0,09	t24	0,00	0,00

Recipiente D	mMol/ μ L	Δ	Recipiente H	mMol/ μ L	Δ	Recipiente L	mMol/ μ L	Δ
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t0	0,00	-	t0	0,00	-	t0	0,00	-
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00	t5	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00
t10	0,00	0,00	t10	0,00	0,00	t10	0,53	0,53
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00
t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00	t24	0,00	0,00

Legenda: Recipientes (A) baixo teor de sulfato ferroso (11mg/L) + controle; (B) baixo teor de sulfato ferroso + probiótico; (C) baixo teor de sulfato ferroso + prebiótico; (D) baixo teor de sulfato ferroso + simbiótico; (E) teor normal de ferro (22mg/L) + controle; (F) teor normal de ferro + probiótico; (G) teor normal de ferro + prebiótico; (H) teor normal de ferro + simbiótico; (I) alto teor de sulfato ferroso (33mg/L) + controle; (J) alto teor de sulfato ferroso + probiótico; (K) alto teor de sulfato ferroso + prebiótico; (L) alto teor de sulfato ferroso + simbiótico; Δ = Diferença com relação ao tempo 0, da respectiva repetição.

ANEXO 7 - CROMATOGRAMAS

Data File C:\LORENA~1\HPCHEM~1\LORENA\STD3_II.D

Sample Name: Standard 3

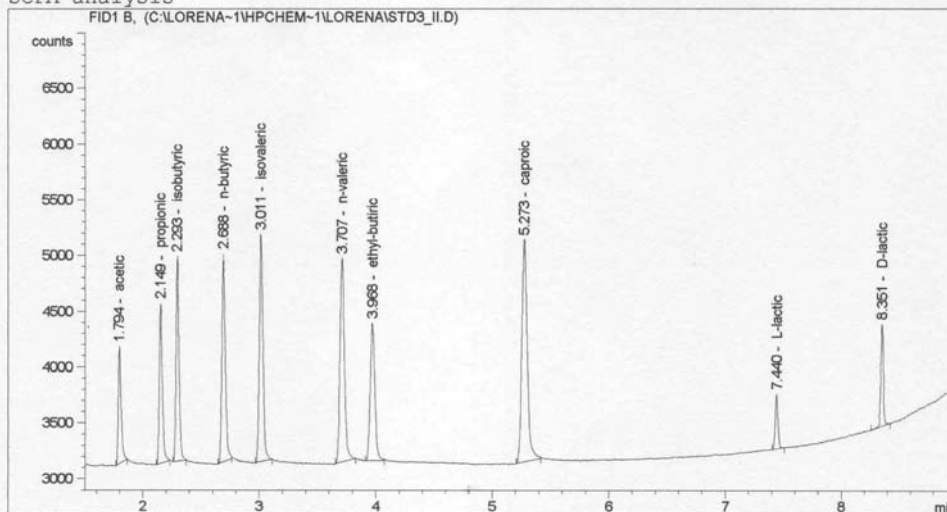
5 mM

```

=====
Injection Date : 9/4/2002 3:10:32 PM
Sample Name    : Standard 3
Acq. Operator  : LORENA
Acq. Instrument : 5890
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\ACIDS.M
Last changed   : 9/4/2002 3:24:13 PM by LORENA
                 (modified after loading)
Analysis Method : C:\LORENA~1\HPCHEM~1\METHODS\ACIDS.M
Last changed   : 10/11/2002 7:55:09 PM
SCFA analysis
    
```

Vial : 1

Inj Volume : Manually



Internal Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 10/11/2002 7:40:02 PM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
    
```

Sample ISTD Information:

ISTD #	ISTD Amount [mM]	Name
1	3.70000	ethyl-butiric

Signal 1: FID1 B,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area ratio	Amount [mM]	Grp	Name
1.794	PB	1787.56946	3.69072	7.18562		acetic
2.149	PB	2588.61890	2.54037	7.16235		propionic
2.293	BP	3263.93970	1.93075	6.86372		isobutyric
2.688	PB	3837.70435	1.52473	6.37314		n-butyric
3.011	PB	4430.96387	1.34824	6.50662		isovaleric
3.707	PB	4808.75928	1.32694	6.94985		n-valeric
3.968	PB	I 3397.12280	1.00000	3.70000		ethyl-butiric
5.273	PB	6456.81689	1.03445	7.27479		caproic
7.440	PP	796.67645	11.06866	9.60434		L-lactic
8.351	PB	1332.23535	4.84120	7.02465		D-lactic

Totals without ISTD(s) : 64.94509

Uncalibrated peaks RF : 3.70000
 ISTD for Uncal. peaks : ethyl-butiric

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area ratio	Amount [mM]	Grp	Name
1.081	BV	95.50900	3.70000	3.84890e-1		?
1.104	VP	120.28052	3.70000	4.84716e-1		?
1.150	VB	2.19272e6	3.70000	8836.41738		?
1.448	BP	56.76738	3.70000	2.28766e-1		?

Uncalib. totals : 8837.51575

Results obtained with enhanced integrator!
 1 Warnings or Errors :

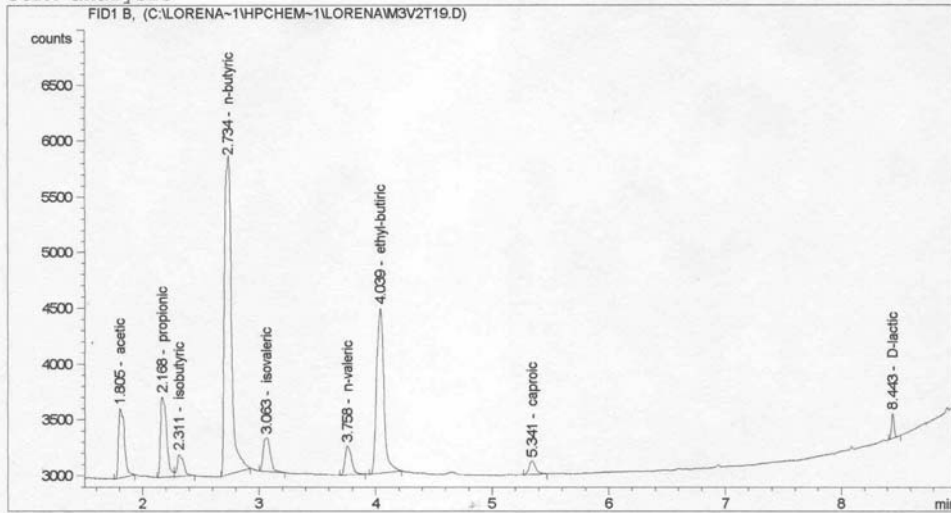
Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

=====
 *** End of Report ***

Gut model. Lorena sample. Vessel 2, day 19, LOW iron.

```

=====
Injection Date : 9/5/2002 12:06:42 PM
Sample Name    : M3V2T19
Acq. Operator  : LORENA
Acq. Instrument: 5890
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\ACIDS.M
Last changed   : 9/4/2002 3:50:19 PM by LORENA
Analysis Method: C:\LORENA~1\HPCHEM~1\METHODS\ACIDS.M
Last changed   : 10/11/2002 7:55:09 PM
SCFA analysis
    
```



Internal Standard Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 10/11/2002 7:40:02 PM
Multiplier    :      1.0000
Dilution      :      1.0000
Sample ISTD Information:
ISTD ISTD Amount Name
#      [mM]
-----|-----|-----
1      3.70000 ethyl-butyric
    
```

Signal 1: FID1 B,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area ratio	Amount [mM]	Grp	Name
1.805	PP	2191.27832	3.46950	4.39678		acetic
2.168	PV	2628.22510	2.35227	3.57537		propionic
2.311	VB	740.71942	7.76286e-1	3.32541e-1		isobutyric
2.734	PB	1.17975e4	1.59380	10.87410		n-butyric
3.063	PP	1589.43079	9.55482e-1	8.78283e-1		isovaleric
3.758	PV	1063.77576	8.75238e-1	5.38451e-1		n-valeric
4.039	PB	I 6397.81348	1.00000	3.70000		ethyl-butiric
5.341	PB	506.44666	1.09081e-1	3.19488e-2		caproic
7.288		-	-	-		L-lactic
8.443	PPA	338.67294	2.63483	5.16064e-1		D-lactic

Totals without ISTD(s) : 21.14354

Uncalibrated peaks RF : 3.70000
 ISTD for Uncal. peaks : ethyl-butiric

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area ratio	Amount [mM]	Grp	Name
1.132	VV	1.73772e4	3.70000	37.18371		?
1.166	VB	7.16082e6	3.70000	1.53227e4		?
1.238	BV	159.10515	3.70000	3.40452e-1		?
1.282	VP	139.11078	3.70000	2.97668e-1		?

Uncalib. totals : 1.53605e4

Results obtained with enhanced integrator!
 2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
 Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
 *** End of Report ***