

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DO PREBIÓTICO
GALACTOLIGOSSACARÍDEO COMO ALIMENTO FUNCIONAL:
ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO*.**

Rosângela dos Santos

Mestre em Ciência de Alimentos

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutora em Ciência de Alimentos.

Campinas
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Santos, Rosângela dos
Sa59p Produção e aplicação do prebiótico galactoligossacarídeo como
alimento funcional: estudos *in vitro e in vivo* / Rosângela dos Santos. --
Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos

1. *Scopulariopsis*. 2. Beta-galactosidase. 3. Prebióticos. 4.
Galactooligossacarídeo. 5. Alimentos funcionais. I. Pastore,
Gláucia Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Production and application of prebiotic Galactooligosaccharide as functional
foods: studies *in vitro and in vivo*

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Scopulariopsis*, β -galactosidase, prebiotics,
Galactooligosaccharide, Functional foods

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gláucia Maria Pastore

Mário Roberto Maróstica Junior

Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Izildinha Moreno

Janaina Nicanuzia dos Prazeres

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida em ___/___/___ por
Rosângela dos Santos aprovado pela comissão julgadora em ___/___/___.

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Orientadora

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior
Universidade Estadual de Campinas
Membro Titular

Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz
Universidade Estadual de Campinas
Membro Titular

Dra. Izildinha Moreno
Instituto de Tecnologia de Alimentos
Membro Titular

Dra. Janaina Nicanuzia dos Prazeres
Universidade de São Paulo
Membro Titular

Prof. Dr. Yong Kun Park
Universidade Estadual de Campinas
Membro Suplente

Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas
Universidade Federal de São João Del-Rei
Membro Suplente

Dra. Claudia Cardoso Netto
Fundação Oswaldo Cruz
Membro Suplente

A DEUS, que me amou primeiro e pelo seu filho amado JESUS não desistiu de mim, por mais erros que eu cometesse...

A Profa. Gláucia por ter acreditado em mim, me ensinado tanto com seu exemplo, determinação e força. Por sempre me tirar da zona de conforto para que eu possa seguir em frente... OBRIGADA!

A minha filha Amanda, que pelo fato de existir já é o um grande incentivo para eu não desistir nos momentos difíceis.

dedico este trabalho.

“Rogo-vos, pois, irmãos, pelas misericórdias de Deus, que apresenteis o vosso corpo por sacrifício vivo, santo e agradável a Deus, que é o vosso culto racional. E não vos conformeis com este século, mas transformai-vos pela renovação da vossa mente, para que experimenteis qual seja a boa, agradável e perfeita vontade de Deus.”

Romanos 12:1-2

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por ter colocado tantas pessoas legais na minha vida (não foram poucos os amigos que fiz aqui!) que me ajudaram na execução deste trabalho: MUITO OBRIGADA!

Aos professores e amigos, pelo profissionalismo, ajuda neste trabalho, correções e sugestões apresentadas:

Prof. Dr. Yong Kun Park, Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior, Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas, Profa. Dra. Ana Lúcia T. G. Ruiz, Profa. Dra. Izildinha Moreno, Dra. Claudia Cardoso Netto, Dra. Janaina Nicanuzia dos Prazeres.

Aos funcionários e amigos da FEA, obrigada pelo apoio, profissionalismo e carinho de vocês:

Silvana (Sil), Cícera, Reginaldo, Nadeje, Carlos Eduardo (CAE), Nilson, Oscar, Zezé, Juliana, Cosme, Marcão, Jardete, Marquinhos, Nice, Susana, D. Ilda, Beatriz (Bia), Priscila (Pri), Ricardo, Marçal, Samuel e todo pessoal do CI, Bruninha, o mais recente amigo Pedro.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioaromas obrigada pelo apoio.

Nadir (Cabeção), Iramaia (Angélica), Dora (Dorinha), Ana Paula (Xispita), Adriane, Cedenir (CD), Daniele, Fábio, Gustavo (Molina), Ana Paula Simiqueli, Cristiano, Mariana, Tokie, Ana Elizabeth (Bete), Juliana, Junio.

Aos pinpolhos que me ajudaram com as suas iniciações e estágios:

Suzane, Laís, Laís Romanengui, Tiago, Camila, Naiara, Renata.

À minha família querida, obrigada pelo amor, apoio e dedicação:

Meus pais: Floriano e Regina, meus irmãos, Regiane, Rose, Roseli e Reinaldo, meus cunhados: Fábio, Rodrigo e Alex, meus sobrinhos que fizeram dos meus dias mais alegres: Ana Paula, Lucas e Gustavo.

Meus tios e primos (e não são poucos!) que sempre torceram por mim, obrigada!

À minha família na fé, obrigada a todos que intercederam a Deus pela minha vida e meu trabalho:

Pr. Nilson e todo o pessoal da IPI/Muzambinho! Obrigada por tudo!

Pr. João Carlos, Pr. Marchal e todos da IBPC/Paulínia! Obrigada por ter nos acolhido tão bem!

A minha amiga Janai, D. Maria (Mainha) e João Felipe, pela acolhida, amizade e oração, no meu trabalho e na minha vida.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela oportunidade de realizar este sonho e pela bolsa concedida na moradia estudantil por dois anos.

A Coordenação Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro.

ÍNDICE GERAL

APRESENTAÇÃO

RESUMO GERAL.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
OBJETIVOS.....	xvii

CAPÍTULO I

ÍNDICE DE PROSPECÇÃO:

PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEO POR β -GALACTOSIDASE MICROBIANA

Resumo	1
Abstract.....	3
1. Introdução	5
1.1. Aspectos Tecnológicos.....	5
2. Escopo.....	12
2. 1. Patentes por base de dados.....	12
2.2. Evolução Anual de Depósitos de Patentes.....	13
2.3. Patentes Depositadas por País.....	14
2.4. Número de Patentes por Inventores.....	15
3. Conclusão.....	16
4. Agradecimentos.....	18
5. Referências Bibliográficas.....	19

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEO EM SISTEMA DE IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *SCOPULARIOPSIS* SP E *ASPERGILLUS NIGER*, EM RESINA DE DEAE-CELULOSE UTILIZANDO LACTOSE COMO SUBSTRATO

Resumo	25
Abstract.....	27
1. Introdução	29
2. Materiais e Métodos.....	36
2.1.1 Micro-organismos utilizados.....	36
2.1.2 Produção do inóculo.....	36
2.1.3 Preparo do extrato enzimático.....	36
2.2 Enzima livre.....	37
2.2.1 Atividade enzimática.....	37
2.2.2 Produção de Galactooligossacarídeo.....	37
2.3 Imobilização enzimática.....	37
2.3.1 Preparo da resina DEAE-celulose.....	37
2.3.2 Atividade enzimática da resina DEAE-celulose.....	38
2.3.3 Determinação de proteínas totais.....	38
2.4 Produção de Galactooligossacarídeo.....	38
2.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	39
3. Resultados e Discussão.....	40
3.1 Crescimento dos Micro-organismos.....	40
3.2. Enzima Livre.....	40
3.2.1. Atividade enzimática.....	40
3.3. Imobilização Enzimática.....	41
3.3.1 Atividade enzimática.....	41
3.3.2 Determinação de proteínas totais pelo Método de Bradford.....	42
3.4 Produção de Galactooligossacarídeo por Enzima Imobilizada.....	42
3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	42

4. Conclusão.....	47
5. Agradecimentos.....	48
6. Referências Bibliográficas.....	49

CAPÍTULO III

EFEITO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEO SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CITOCINAS E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS *IN VITRO*.

Resumo	55
Abstract.....	57
1. Introdução	59
2. Materiais e Métodos.....	64
2.1 Produção da Enzima β -galactosidase.....	64
2.1.1. Micro-organismo utilizado.....	64
2.1.2. Produção do inóculo.....	64
2.1.3. Preparo do extrato enzimático.....	64
2.2. Produção do Galactooligossacarídeo.....	64
2.3. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	65
2.4. Atividade Anticâncer: Estudos <i>in vitro</i>	65
2.5. Medida da Produção de Citocinas por ELISA.....	67
2.6. Cálculo das Células Tumorais.....	68
3. Resultados e Discussão.....	69
3.1. Produção do Galactooligossacarídeo.....	69
3.2. Ensaios <i>in vitro</i>	71
3.3. Medida da Produção de Citocinas por ELISA.....	75
4. Conclusão.....	77
5. Agradecimentos.....	78
6. Referências Bibliográficas.....	79

CAPÍTULO IV

EFEITO DE GALACTOOLIGOSACARÍDEO PRODUZIDO A PARTIR DE SCOPULARIOPSIS SP NO CRESCIMENTO DAS LINHAGENS PROBIÓTICAS E O EFEITO DESSES METABÓLITOS EM CÉLULAS TUMORAIS, SOB CONDIÇÕES *IN VITRO*.

Resumo	87
Abstract.....	89
1. Introdução	91
2. Materiais e Métodos.....	96
2.1. Produção de galactooligossacarídeos.....	96
2.2. Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE).....	96
2.3. Avaliação da Atividade Bifidogênica.....	96
2.4. Avaliação do pH.....	97
2.5. Efeito Antiproliferativo de Células Tumorais.....	97
2.6. Cálculo do crescimento de celular.....	99
3. Resultados e Discussão.....	100
3.1 Produção de Galactooligossacarídeos.....	100
3.2. Influência dos prebióticos no crescimento das linhagens	100
3.3. Influência dos prebióticos na acidificação do pH nas linhagens LA05 E Bb 12.....	102
3.4 Efeito antiproliferativo.....	103
4. Conclusão.....	107
5. Agradecimentos.....	108
6. Referências Bibliográficas.....	109

CAPÍTULO V

AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PREBIÓTICOS GALACTOOLIGOSSACARÍDEO (GOS) E FRUCTOOLIGOSSACARÍDEO (FOS) NA MORFOLOGIA INTESTINAL DE RATAS WISTAR ADULTAS

Resumo	115
Abstract.....	117
1. Introdução	119
2. Materiais e Métodos.....	123
2.1. Animais e dietas.....	123
2.2. Determinação do pH.....	125
2.3. Histomorfometria do ceco.....	125
2.4. Tratamento Estatístico.....	126
3. Resultados e Discussão.....	127
3.1. Consumo de ração e peso corporal dos animais.....	127
3.2. pH fecal (ceco).....	128
3.3. Histomorfometria do ceco dos animais.....	130
4. Conclusão.....	136
5. Agradecimentos.....	137
6. Referências Bibliográficas.....	138
ANEXO I.....	143
CONCLUSÃO GERAL.....	144

RESUMO GERAL

A maioria dos estudos que envolvem prebióticos têm sido realizados com frutooligossacarídeos (FOS) e galactooligossacarídeos (GOS) devido a segurança, estabilidade, propriedades sensoriais, resistência à digestão na parte superior do intestino e fermentabilidade no cólon, bem como suas capacidades em promover o crescimento das bactérias benéficas no trato gastrintestinal. Assim, esta pesquisa teve como objetivo estudar a produção e aplicação do prebiótico galactooligossacarídeo (GOS) em estudos *in vitro* e *in vivo*. A produção de GOS foi realizada utilizando a enzima β -galactosidase, extraída de *Scopulariopsis* sp., na forma livre e imobilizada no suporte orgânico DEAE-celulose. Por meio do estudo *in vitro* avaliou-se o efeito do GOS sobre a produção de citocinas em culturas de células tumorais, utilizando *interferon gama* (INF- γ) como marcador. Verificou-se também o efeito bifidogênico do GOS, utilizando as culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus* (LA05) e *Bifidobacterium animalis* (Bb12), bem como a ação dos metabolitos, resultantes da fermentação por estes micro-organismos probióticos, em relação à atividade antiproliferativa em modelos de células tumorais. Foi realizado ainda o estudo *in vivo* com ratas adultas, com o objetivo de avaliar o impacto fisiológico dos prebióticos FOS e GOS no intestino (ceco) dos animais, através das análises de pH fecal e técnicas de morfometria intestinal. O rendimento da produção de GOS foi de 30% em 12 horas e 24% em 15 dias para a enzima livre e imobilizada, respectivamente. Nos estudos *in vitro*, a ação direta do GOS apresentou indícios de atividade antiproliferativa na linhagem HT-29 (adenocarcinoma de cólon), todavia, não foi capaz de reduzir em pelo menos 50% o crescimento das células tumorais. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as células tumorais estudadas em relação à concentração de IFN- γ . O efeito bifidogênico do GOS foi demonstrado pelas diferenças observadas entre as contagens iniciais e finais ($\Delta \log\text{UFC.mL}^{-1}$) utilizando o meio MRS+GOS, que foram de 3,98 $\log\text{UFC.mL}^{-1}$ para LA05 e de 4,6 $\log\text{UFC.mL}^{-1}$ para Bb12. Os metabolitos resultantes da fermentação da linhagem LA05 foram testados quanto à atividade antiproliferativa em linhagens tumorais humanas. Verificou-se que o meio sem dextrose (MRS-mínimo) apresentou atividade antiproliferativa para as linhagens UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário), 786-0 (renal), NCI-H460 (pulmão) e HT-29 (cólon). O meio de cultura acrescido com GOS, por sua vez, apresentou efeito

citostático apenas para duas linhagens (UACC-62 e HT-29). Os resultados obtidos sugerem que os metabólitos bacterianos provenientes da LA05 cultivada em meio sem GOS exercem efeito antiproliferativo e que o GOS reduz a produção desses compostos resultando em diminuição da atividade antiproliferativa. Quanto aos estudos *in vivo*, os animais que consumiram ração com os prebióticos tiveram um discreto aumento de peso, sem aumento no consumo de ração; além disso, não foi observado decréscimo relevante em relação ao pH do ceco. Os animais alimentados com FOS ou com GOS apresentaram aumento na altura das vilosidades intestinais em relação ao grupo controle ($p < 0.05$). Foi verificado que apenas as vilosidades intestinais dos animais que consumiram FOS apresentavam-se mais largas, quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, quanto à altura dos enterócitos, as ratas que consumiram GOS apresentaram média maior que o grupo padrão, enquanto as alimentadas com FOS não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Embora os mecanismos envolvidos em relação à atividade metabólica do GOS não estejam totalmente esclarecidos, sugere-se que este oligossacarídeo tenha potencial de modulação no epitélio intestinal das células. Não é possível, no entanto, excluir o efeito mediado pelos ácidos graxos de cadeia curta, estimulados a partir da ingestão dos prebióticos, em relação à nutrição dos enterócitos.

ABSTRACT

Most studies involving prebiotic have been performed with fructooligosaccharides (FOS) and galactooligosaccharides (GOS), due to security, stability, sensory properties, resistance to digestion in the upper bowel and fermentability in the colon as well as their ability to promote beneficial bacteria growth in the gastrointestinal tract. Thus, the aim of this research was to study the prebiotic galactooligosaccharide (GOS) production and application *in vitro* and *in vivo*. GOS production was performed using β -galactosidase enzyme extracted from *Scopulariopsis* sp. in free form and immobilized on an organic DEAE-cellulose. The *in vitro* study GOS effect on cytokine production was evaluated on human cancer cell lines, using interferon gamma (INF- γ) as a marker. GOS bifidogenic effect was determined using probiotic cultures *Lactobacillus acidophilus* (LA05) and *Bifidobacterium animalis* (Bb12) and the antiproliferative activity of metabolites resulting from these probiotics microorganisms fermentation was studied in human cancer cell lines. An *in vivo* study was also performed with adult female rats in order to evaluate the physiological impact of prebiotics FOS and GOS in the cecum of animals by analyzing fecal pH and intestinal morphology was done. The yield of GOS production was 30% at 12 hours and 24% at 15 days for free and immobilized enzyme, respectively. The direct action of GOS *in vitro* showed evidence of antiproliferative activity in HT-29 line (colon adenocarcinoma), however, it was not able to reduce at least 50% growth of tumor cells. There was no significant difference ($p > 0.05$) between tumor cells studied in IFN- γ concentration. GOS bifidogenic effect was demonstrated by differences between initial and final scores ($\Delta \log\text{UFC.mL}^{-1}$) when MRS + GOS was used. The difference was 3,98 $\log\text{UFC.mL}^{-1}$ for LA05 and 4,6 $\log\text{UFC.mL}^{-1}$ for Bb12. The metabolites resulting from LA05 fermentation were tested for antiproliferative activity on human cancer cell lines. The medium without dextrose (MRS-minimum) showed antiproliferative activity for the cell lines UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast), NCI-ADR/RES (ovary), 786-0 (renal) NCI-H460 (lung) and HT-29 (colon). The culture medium supplemented with GOS, in turn, showed only a cytostatic effect for two cell lines (UACC-62 and HT-29). The results suggest that bacterial metabolites from LA05 grown in medium without GOS exert antiproliferative effect while GOS supplementation probably reduced the active metabolites concentration. Animals fed with diet supplemented by prebiotics showed slight weight gain with no changes in fed intake and no

significant decrease on cecal pH. Animals fed with FOS or GOS showed an increase in villus height in comparison with control group ($p < 0.05$). It was found that only the villi of the animals fed with FOS were wider when compared with control group. Moreover, the enterocytes height was larger in rats that consumed GOS in comparison of control group, while those fed with FOS did not differ significantly ($p < 0.05$). Although the mechanisms involved in GOS metabolic activity are not entirely clear, our results suggested that this oligosaccharide has a potential as intestinal epithelial cells modulator. It is not possible, however, to exclude the effect mediated by short-chain fatty acids, stimulated by prebiotics ingestion in enterocytes nutrition.

OBJETIVOS

- Avaliar o estado da arte na área de produção biotecnológica de galactooligossacarídeos (GOS).
- Analisar a eficiência do processo de produção de GOS por enzima imobilizada, utilizando a resina DEAE-Celulose, comparando-o com a produção por enzima livre.
- Investigar se os GOS, obtidos de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp, apresentam atividade antiproliferativa em células tumorais e se poderiam influenciar diretamente o sistema imune através da produção de citocinas utilizando *interferon gama* (IFN- γ) como marcador e linhagens de células tumorais.
- Investigar se os GOS possuem efeito bifidogênico sobre culturas de *Lactobacillus acidophilus* (LA05) e de *Bifidobacterium animalis* (Bb12) e avaliar a atividade antiproliferativa, em cultura de células tumorais humanas, dos metabólitos produzidos por essas bactérias na presença e ausência de GOS.
- Avaliar os efeitos da ingestão de GOS sobre a morfologia intestinal de ratas fêmeas wistar adultas.

CAPÍTULO I

PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEO POR β -GALACTOSIDASE MICROBIANA

RESUMO

Galactooligossacarídeos (GOS) são oligossacarídeos não digeríveis (NDOs), resistentes às enzimas digestivas do intestino, capazes de promover o crescimento de bifidobactérias no cólon. Esses prebióticos são formados a partir da lactose pela atividade da β -galactosidase de diferentes micro-organismos. A maioria dos processos envolvendo a produção de GOS relaciona uma mistura de GOS, contendo tri e tetrassacarídeos, o dissacarídeo lactose (maior proporção) e os monossacarídeos glicose e galactose, respectivamente. Alguns processos envolvem o uso da enzima β -galactosidase obtida de diferentes fontes microbianas, por exemplo, *Aspergillus oryzae*, *Bullera singularis*, *Candida* sp., *Kluyveromyces* sp., *Bacillus circulans*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Scopulariopsis* sp, utilizando lactose como substrato. A mistura de GOS pode ser incorporada em numerosos produtos alimentícios ou rações para animais com o objetivo de melhorar a saúde intestinal, promovendo o crescimento de bifidobactérias no intestino e reprimindo o crescimento da microflora patogênica. Eles são encontrados nos mais diversos produtos na indústria de alimentos como compostos prebióticos, podendo ser utilizados em produtos lácteos como leites em geral, leite em pó, suplemento infantil, sorvetes, iogurte, queijo, produtos lácteos fermentados, cereais, pães, biscoitos, doces, suplementos alimentares, dietéticos, rações ou mesmo outros alimentos ou bebidas. O GOS já é reconhecido como GRAS (Generally recognized as safe) no Japão desde 1989 e recentemente, em 2008, a FAO (Food and Agriculture Organization) licenciou seu uso nos Estados Unidos, para aplicação em fórmulas infantis e em diversos produtos. Devido sua ampla aplicação na indústria de alimentos, observa-se nos últimos anos, um crescimento

nos estudos visando o aprimoramento dos processos envolvidos na produção de GOS. Assim, o objetivo deste trabalho foi de avaliar o estado da arte na área de produção biotecnológica de galactooligossacarídeos.

Palavras-chave: Produção, Galactooligossacarídeo, Síntese enzimática

ABSTRACT

Galactooligosaccharides (GOS) are non-digestible oligosaccharides (NDOS), resistant to digestive enzymes in promote the growth of bifidobacteria in the colon. These prebiotics are produced from lactose by β -galactosidase activity of different micro-organisms. Most processes involving GOS production lists a mixture of GOS containing tri- and tetrasaccharide, the disaccharide lactose (highest ratio) and the monosaccharides glucose and galactose, respectively. Some processes involve the use of β -galactosidase, an enzyme obtained from different microbial sources, such as, *Aspergillus oryzae*, *Bullera singularis*, *Candida* sp., *Kluyveromyces* sp., *Bacillus circulans*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* and *Scopulariopsis* sp., using lactose as substrate. The mixture of GOS can be incorporated into numerous food products or animal feed in order to improve intestinal health by promoting bifidobacteria growth in the gut, and repressing pathogenic microflora growth. They are found in various products in the food industry as prebiotic compounds and can be used in dairy products like milk in general, milk powder, children's supplement, ice cream, yogurt, cheese, fermented dairy products, cereals, breads, cookies, food supplements, dietary, feed or any other food or drink. The GOS are already recognized as GRAS (Generally recognized as safe) in Japan since 1989 and recently, in 2008, the FAO (Food and Agriculture Organization) has licensed its use in the United States in infant formula and in various products. Because of its wide application in food industry, it is observed in recent years, an increase in studies aimed at improving the processes involved in the production of GOS. The objective of this study was to assess the state-of-the-art in biotechnological production of galactooligosaccharide.

Key words: Production, Galactooligosaccharide, Enzymatic synthesis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Tecnológicos

Os oligossacarídeos são carboidratos encontrados naturalmente em muitos alimentos, alguns, por apresentarem atividade fisiológica além da função nutricional ou de adoçante são considerados prebióticos.

Dentre estes, destacam-se os galactooligossacarídeos (GOS) que são oligossacarídeos não digeríveis (NDOs) que promovem benefícios ao hospedeiro por estimularem seletivamente o crescimento e/ou atividade das bactérias “benéficas”, resistentes no cólon intestinal. Além disso, apresentam efeito antagônico, diminuindo os compostos tóxicos dos micro-organismos indesejáveis (CHOCKCHAIWASDEE *et al.*, 2005).

GOS são açúcares naturais compostos de lactose e unidades de galactose. São substâncias semelhantes às fibras hidrossolúveis em sua maioria e são produzidos a partir da lactose por ação da β -galactosidase por atividade de transgalactosilação (Figura 1) (SANTOS, 2006).

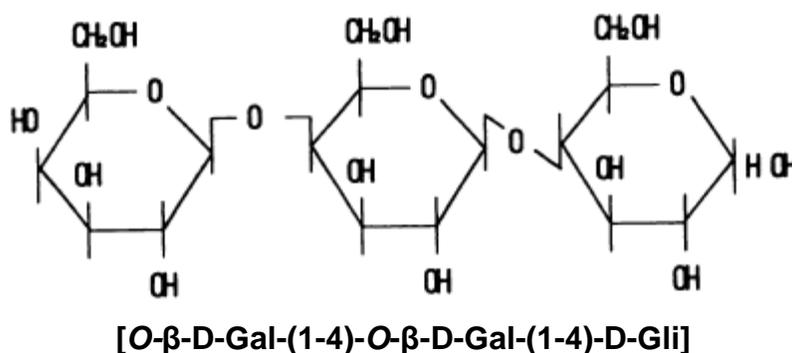


Figura 1. Estrutura química do galactooligossacarídeo
Fonte: Hayashi *et al.* 1991

Esta enzima β -galactosidase (EC 3.2.23), comumente chamada de lactase, tem a função de catalisar a hidrólise de β -galactopiranosídeos, tais como a lactose e pode ser obtida de diferentes fontes microbianas, por exemplo, *Aspergillus*

oryzae (SANTOS, 2006), *Bullera singularis* (CHO, SHIN & BUCKE, 2003), *Bacillus circulans* (AVALAKKI, MAHESWARAN & SARAVANAN, 2009), *Lactobacillus bulgaricus* (KEISUKE, YOICHI & TATSUHIKO, 1990), *Streptococcus thermophilus* (AKIYAMA *et al.*, 2001), *Bifidobacterium bifidum* (JORGENSEN, HANSEN & STOUGAARD, 2001; TZORTZIS *et al.*, 2005; TZORTZIS, GOULAS & GOULAS, 2009) e *Scopulariopsis* sp. (ALMEIDA & PASTORE, 2001; SANTOS, SIMIQUELI & PASTORE 2009).

As vantagens tecnológicas advindas desta atividade são diversas, dentre as quais, eliminação dos problemas relacionados com o descarte de soro, cristalização de lactose em certos alimentos congelados e o consumo de leite por indivíduos com intolerância a lactose podem ser aliviados (ALMEIDA & PASTORE, 2001).

Os GOS não são digeridos nem absorvidos no intestino porque apresentam configuração beta, e as enzimas digestivas gastrintestinais humanas são principalmente específicas para ligações alfa. No cólon, os GOS são fermentados promovendo um aumento das bifidobactérias (MODLER, 1994) que são consideradas as bactérias mais importantes a saúde humana, dentre as quais destacam-se os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, aliada a uma diminuição das bactérias deterioradoras, causando benefícios à saúde humana com a redução de metabólitos tóxicos. Além disso, os GOS estimulam a absorção de cálcio, aumentando a mineralização óssea e a resistência contra fraturas (SAKO, MATSUMOTO & TANAKA, 1999).

Como não são metabolizados pela microflora bucal, são açúcares de baixa cariogenicidade (MACFARLANE, STEED & MACFARLANE, 2008). Também foram eficazes em aumentar a ocorrência de defecação em homens e mulheres com problemas de constipação (SAAD, 2006). Os GOS são preconizados como GRAS (Generally Recognized as Safe), alimento seguro, por serem componentes do leite humano, além de serem naturalmente encontrados na soja. Não apresentam toxicidade e somente a diarreia é conhecida como efeito adverso quando os GOS são consumidos em excesso, sendo a dose estimada em

0,3-0,4 g/Kg de peso corpóreo. Mas esse sintoma desaparece em poucos dias, pois o número de bactérias intestinais é aumentado (SAKO, MATSUMOTO & TANAKA, 1999; SANTOS, 2006).

O mercado de oligossacarídeos surgiu no Japão, na década de 1970 e logo se expandiu na Ásia e Europa. A procura de novos oligossacarídeos, assim como de GOS, foi impulsionada pela consciência do consumidor à saúde e a nova demanda de alguns países como resultado das mudanças regulatórias. Recentemente houve uma mudança na regulação nos Estados Unidos, Austrália e Nova Zelândia, onde o produto Vivinal GOS, da empresa americana Friesland Foods Domo, foi reconhecido como GRAS para aplicação em fórmulas infantis e em diversos produtos, devido sua ampla aplicação (GALACTO-OLIGOSACCHARIDE, 2010).

Há, portanto, uma expectativa para um futuro importante no uso do GOS e esta tendência está representada em perspectiva até 2018, como mostrado pelo gráfico (Figura 2).

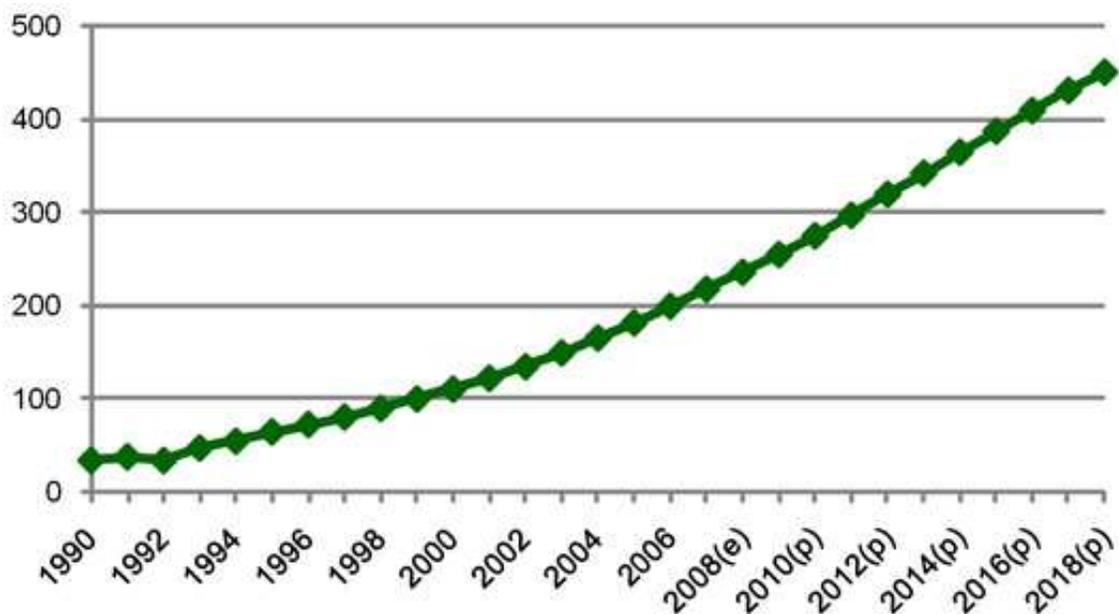


Figura 2. Tendência anual global da produção de oligossacarídeos (estimados `000 mt 1990 – 2018). Fonte: GALACTO-OLIGOSACCHARIDE, 2010.

(e) estimativa
(p) perspectiva

Uma revisão da Empresa Frost & Sullivan, empresa internacional de consultoria e inteligência de mercado que apóia o desenvolvimento de novas estratégias há mais de 40 anos, relatou que o mercado europeu de prebióticos era de aproximadamente 87 milhões de Euros em 2008 e a perspectiva atual é de 179,7 milhões de Euros, em 2010 (FROST & SULLIVAN, 2010).

Os principais fatores que impulsionam esta tendência são:

- A possibilidade dos GOS na Europa e Ásia – principalmente em fórmulas infantis, fórmula *follow-on* (6 meses a 1ano de vida) e fórmula *growing up* (após 1ano de vida), além de expandir a demanda de mercado, após conhecerem os benefícios do seu uso e diferentes aplicações.
- As alterações da regulamentação em favor do uso;
- As conclusões da 5ª Conferência Internacional de soro (5th International Whey Conference – IWC, realizada em Paris 2008) apontaram o GOS como produto comercial do futuro no aproveitamento de resíduos agroindustriais, como soro e permeado de soro, na tecnologia de novos produtos;
- O grande volume de soro e permeado de soro resultado da produção de leite por UF – Ultra Filtração, MPC – concentrado protéico de leite, queijo e caseína – com grupos expandindo nestas categorias, a pressão para remanejar o futuro de resíduos agroindustriais;
- Novas aplicações emergentes baseadas nas características bioativas e físico-químicas;
- Novas invenções da ciência e tecnologia de alimentos em novos campos de aplicação, métodos de extração e produção para melhora do rendimento e oferecendo produtos com materiais de baixo custo (GALACTO-OLIGOSACCHARIDE, 2010).

As inovações relacionadas com a produção e uso de GOS usando lactase obtida de micro-organismos, vem sendo citadas há muito tempo na literatura.

Pastore & Park (1979), estudaram a imobilização da β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. isolado de solo brasileiro. Este micro-organismo em

fermentação semi-sólida produziu uma alta concentração da enzima com alta capacidade de hidrolisar a lactose.

Os trabalhos continuaram e este micro-organismo veio a ser utilizado para a produção de GOS (ALMEIDA, 2003). Neste estudo foi avaliado a influência da temperatura, efeito do pH, concentração da enzima e síntese de GOS. Os maiores rendimentos demonstraram ser a concentração de lactose a 40% (p/v) em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4.5 a 45°C, incubada com 6U/mL de β -galactosidase, a enzima converteu 30% da lactose em oligossacarídeos (224,92 mg/mL de 4'galactosil lactose).

O mesmo grupo de pesquisa continuou trabalhando com a produção, quando Santos (2006) estudou a enzima β -galactosidase a partir do micro-organismo *Scopulariopsis* sp. (extrato bruto) e *Aspergillus oryzae* (enzima comercial) para produção de GOS, utilizando lactose. A enzima obtida a partir de *Scopulariopsis* sp. converteu 20% de lactose em oligossacarídeos (80,8 mg/mL de 4'galactosyl-lactose), comparando com a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, que converteu 6% de lactose em oligossacarídeos (25,6 mg/mL de 4'galactosyl-lactose).

Pesquisas vêm sendo desenvolvidas chegando a relatos de aplicação com o estudo bifidogênico do GOS, como mostrado no estudo apresentado por Santos *et al.* (2009) que avaliaram o efeito do prebiótico GOS produzido a partir de *Scopulariopsis* sp. no crescimento das linhagens probióticas *Lactobacillus acidophilus* – LA 05 e *Bifidobacterium animalis* – Bb12, sob condições *in vitro*. O efeito bifidogênico do GOS foi demonstrado pelas diferenças observadas entre as contagens iniciais e finais (Δ LogUFC.mL⁻¹), que foram mais elevadas nos meios MRS+GOS (Bb12=4,58 e LA5=4,21) e MRS+FOS (Frutooligossacarídeo) (Bb12=4,19 e LA5=3,78) em relação aos meios que não continham nenhuma fonte de carbono (MRS). Verificou-se que o pH do meio das duas linhagens teve pouca variação. Concluiu-se que o GOS produzido por *Scopulariopsis* sp. apresenta potencial tecnológico para aplicação como prebiótico.

Osamu, Kotaro & Nobuko (1987) obteve um alto rendimento na produção de GOS utilizando solução de lactose como substrato e β -galactosidase de *Cryptococcus*. A produção foi realizada por batelada com a solução de lactose e da enzima obtendo-se o tetrassacarídeo 4'galactosyl-lactose.

Ikumasa & Kenzo (1990) desenvolveram em sua pesquisa uma alta produção de GOS, utilizando solução de lactose ou material contendo lactose. Os micro-organismos utilizados *Rhodotorula*, *Sterigmatomyces* ou *Sirobasidium*, os quais foram capazes de produzir uma mistura de GOS contendo resíduos de galactose, glicose e oligossacarídeos com n (unidade de galactose) de 1-3. Neste estudo não foi detalhado se a produção de GOS foi realizada diretamente pela ação do micro-organismo ou pela ação enzimática da β -galactosidase.

Keisuke, Yoichi & Tatsuhiko (1990), com o objetivo de obter um alto rendimento e pureza na produção de GOS, utilizaram duas reações enzimáticas. A primeira enzima β -galactosidase foi produzida por *Bullera singularis* ou *Bacillus circulans*, e uma segunda reação pela ação da β -galactosidase de *Streptococcus thermophilus* ou *Lactobacillus bulgarius*, utilizando uma solução de lactose entre 10-90% (p/v). O resultado foi a produção de uma mistura de GOS que continha resíduos de galactose, glicose e oligossacarídeos com n de 1-4.

O trabalho desenvolvido por Blareau *et al.* (1996) mostra uma aplicação de um simbiótico (prebiótico + probiótico). Desta forma, os autores puderam preparar um leite fermentado enriquecido com GOS a partir de β -galactosidase de *Streptococcus termophilus*.

Hideji (1996) em sua pesquisa verificou uma alta produção de GOS, utilizando solução de lactose e sacarose e uma levedura do gênero *Rhodotorula*, que foi capaz de realizar a reação de transgalactosilação (reação inversa que une o grupo galactosil aos dissacarídeos lactose e sacarose). A mistura de GOS foi centrifugada para remoção das células da levedura, o sobrenadante foi submetido a um processo de cromatografia por camada delgada de carvão ativado. A sacarose e lactose foram eluídos com água e etanol 10%. A fração contendo os

oligossacarídeos foi eluída com etanol (20-25%) que foi evaporado e posteriormente liofilizado, obtendo assim um produto mais puro.

Gibson *et al.* (2007) utilizaram *Bifidobacterium bifidum* que produziu β -galactosidase com atividade para produção de GOS associada com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para posterior fermentação dos monossacarídeos. A mistura de oligossacarídeo resultante compreendia 20 a 35% de dissacarídeos (Gal (α 1-6) Gal), 20 a 35% de trissacarídeos de diferentes ligações (Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc e Gal (β 1-3)-Gal (β 1-4)-Glc), 15 a 25% de tetrassacarídeos (Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc) e 10 a 25% de pentassacarídeos (Gal (β 1-6)-Gal (β 1-6)-Gal (β 1-4)-Glc). Neste processo, o micro-organismo utilizado foi removido por centrifugação. O processamento final utilizou *spray-drier* para dar ao GOS a forma em pó.

Tzortzis, Goulas & Goulas (2009), em sua invenção descobriram uma nova β -galactosidase com atividade de transgalactosilação, a partir de *Bifidobacterium bifidum*. Esta enzima foi capaz de converter a lactose em uma mistura de GOS através de ligações β pela hidrólise das ligações α da lactose. A mistura pôde ser incorporada em numerosos produtos alimentícios ou alimentos para animais, melhorando a saúde intestinal, promovendo o crescimento de bifidobactérias no intestino, e reprimindo o crescimento da microflora patogênica.

Esse estudo analisou a importância dos GOS na indústria de laticínios e de oligossacarídeos e demonstrou o forte crescimento que os GOS vêm conquistando. Os resultados de estudos relacionados com desenvolvimento de novos processos, uso da biotecnologia e investimentos gerou uma expectativa para um futuro promissor no uso dos GOS. Cada vez mais há um número expressivo pela busca de novas tecnologias e processos envolvendo sua produção.

Assim, o objetivo deste trabalho foi de avaliar o estado da arte na área de produção biotecnológica de galactooligossacarídeos.

2. ESCOPO

Para pesquisa nos banco de dados foram utilizadas as palavras listadas na Tabela 1. Foram analisados banco de dados do INPI (Insituto Nacional de Propriedade Industrial), do USPTO (United States Patent and Trademark Office), Derwent, do EP (Espacenet) e do Japan Patent.

Foram encontradas mais de cem patentes, porém somente foi analisado um total de 37 patentes até janeiro de 2010, pois algumas patentes foram encontradas em mais de uma base de dados ou não eram relacionados com o nosso objetivo.

Tabela1. Pesquisa por palavra-chave

	Japan Patent	Derwent	USPTO	INPI	Espacenet
Galacto*	5	-	1	1	-
Galactooligo*	2	-	-	1	3
Galacto* and produc*	0	7	-	0	9
Galacto*and ferment* and oligos*	0	2	-	0	0
galactooligosaccharide ou galacto-oligosaccharide	7	-	3	1	2

2. 1. Patentes por base de dados

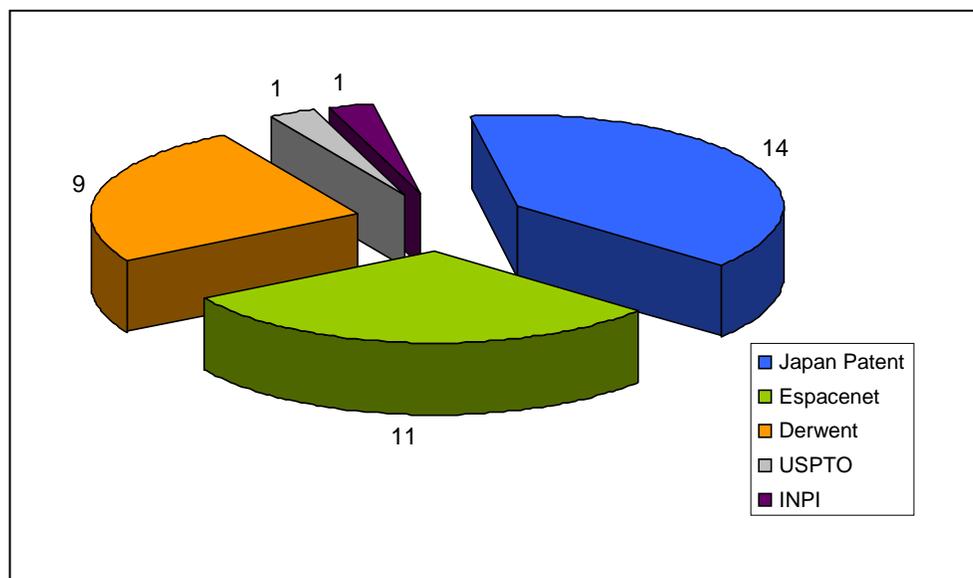


Figura 3. Número de Patente por Base de dados

Foram encontradas mais de cem patentes nas bases de dados utilizadas, com exceção do INPI, no qual só foi encontrada uma patente pertencente ao Reino Unido. A maioria das patentes foi encontrada nas bases Japan Patent, Derwent e Espacenet.

As patentes encontradas (Figura 3) têm como classificação internacional C12P ou C12N, ou seja, processos de fermentação ou processos que utilizam enzimas para sintetizar uma composição ou composto químico desejado ou para separar isômeros óticos de uma mistura racêmica, ou micro-organismos ou enzimas, respectivamente, encontradas na seção de química.

2.2. Evolução Anual de Depósitos de Patentes

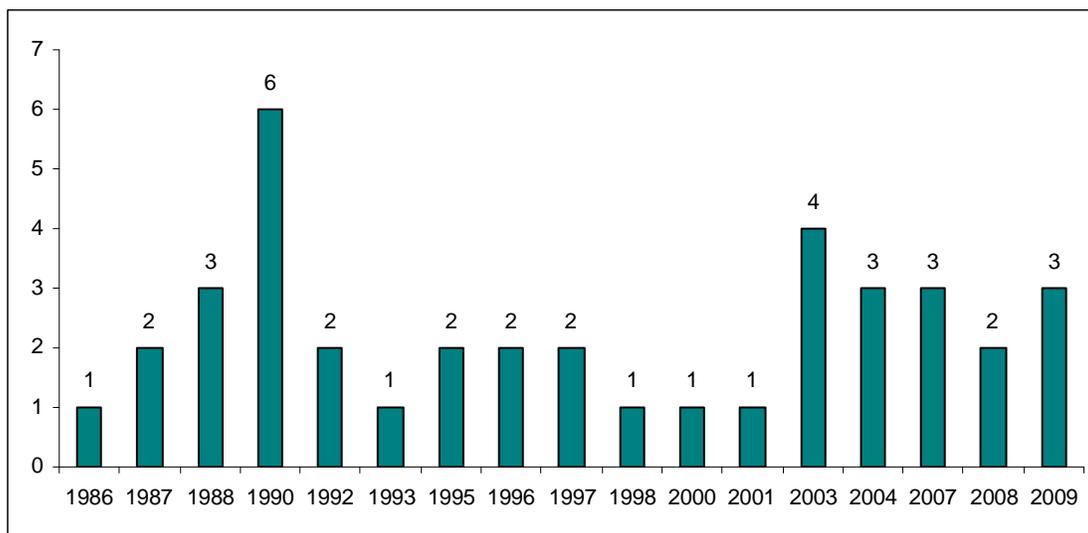


Figura 4. Evolução anual do depósito de patentes.

Pode-se observar na Figura 4 que o maior número de patentes depositadas foi em 1990. Não foi encontrada nenhuma patente antes de 1986 que seja relacionada com a produção de GOS utilizando micro-organismos, mas desde então o depósito de patentes têm sido constante, ocorrendo um novo aumento em 2003. Isso se deve ao fato da maior aplicação de engenharia genética nas pesquisas relacionadas com micro-organismos e produção de metabólitos. Espera-se um aumento desse número a partir dos próximos anos devido a estas

mudanças que ocorreram na regulação recentemente. Isto se faz tanto devido aos estudos *in vitro* e *in vivo* como confirmação dos efeitos do GOS, quanto pelo volume de patentes a serem analisadas pelos órgãos responsáveis, além dos critérios rígidos que se fazem necessários para o desenvolvimento de um produto seguro para os consumidores.

2.3. Patentes Depositadas por País

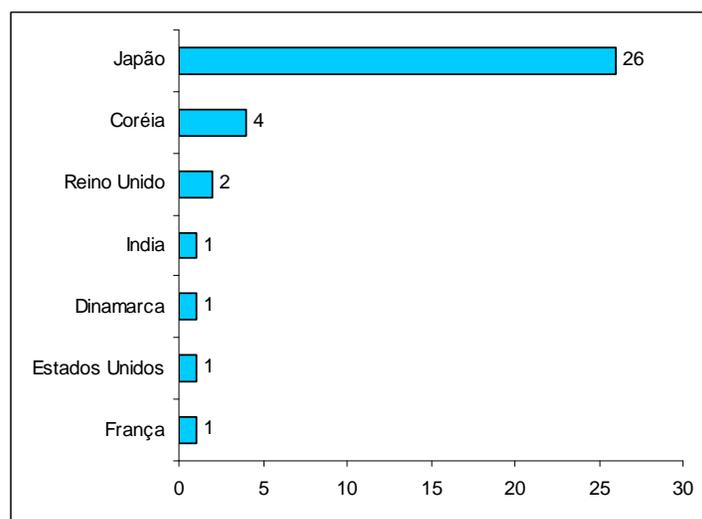


Figura 5. Patentes depositadas por país.

Dentre os países depositantes é visível que o Japão é o maior retentor de patentes relacionadas com GOS, com 26 patentes, seguido da Coréia. As pesquisas do Japão foram pioneiras nesta área, e atualmente se encontram mais desenvolvidas e com aplicações tecnológicas de mercado (Figura 5).

2.4. Número de Patentes por Inventores

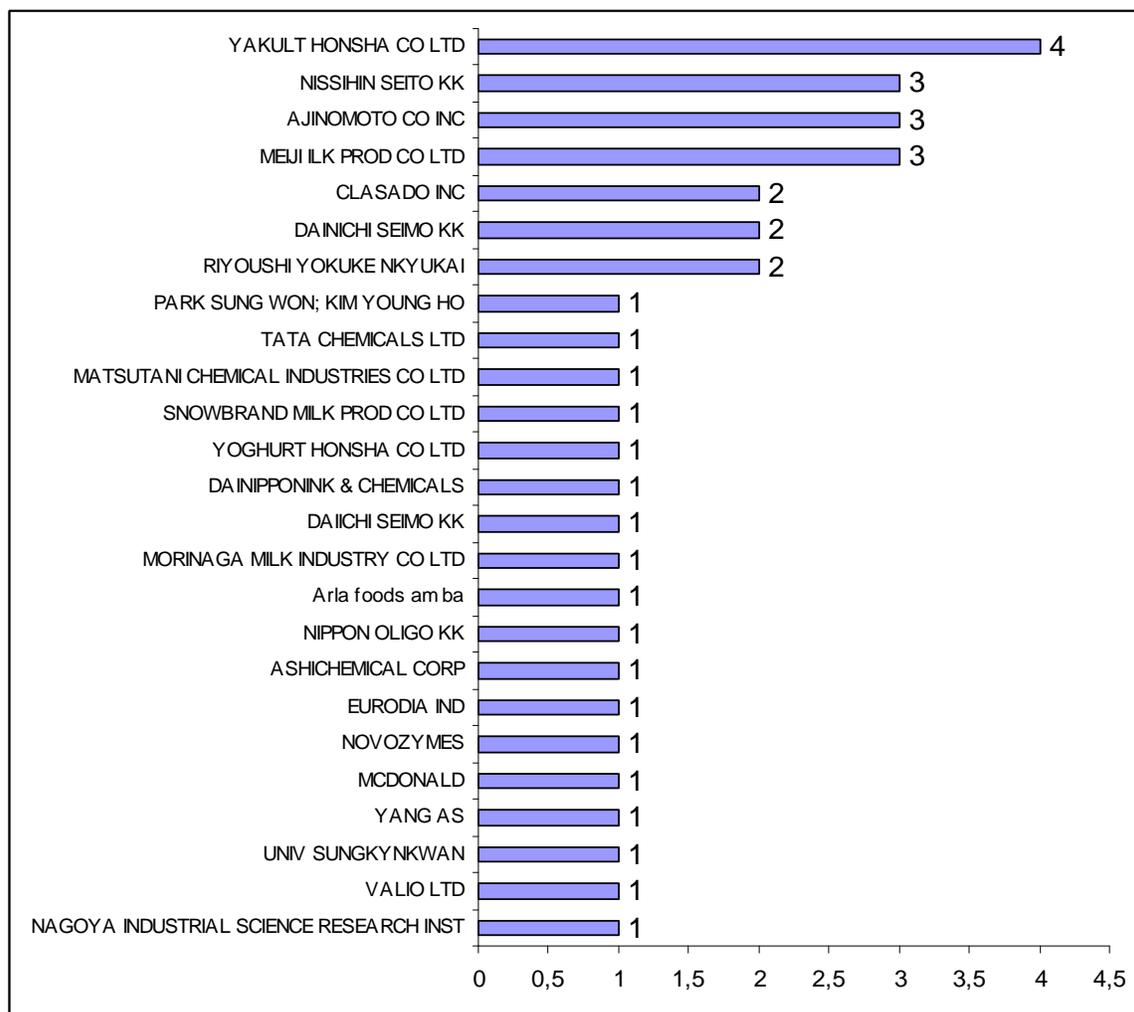


Figura 6. Número de patentes relacionadas por inventores.

Das patentes encontradas, somente 3 (8,1%) não foram depositadas por indústrias, mas por institutos de pesquisa ou universidade.

Como os GOS têm como grande foco a indústria alimentícia, a grande maioria das patentes registradas foram depositadas, principalmente, por indústrias de leite e derivados que utilizam fermentação em seus processos industriais. As empresas mais importantes do mercado japonês retêm as patentes na área de produção de GOS. Entre elas, a Yakult Ind. Ltda foi a empresa mais representativa, apresentando um total de 4 patentes (Figura 6).

3. CONCLUSÃO

O início de registro de patentes relacionados com GOS ocorreu em meados da década de 80, no Japão, devido o maior número de pesquisas na área de nutracêuticos neste país. Apesar de pesquisas serem relatadas desde 1970, o Ministério da Educação do Japão lançou, em 1984, o projeto “Análises Sistemáticas de Funções dos Alimentos” que foi o primeiro projeto mundial relacionado aos efeitos dos alimentos no corpo humano como “funcional”, ou seja, para prevenir enfermidades relacionadas com o estilo de vida. Em 1991, o termo Food for Specified Health Uses (FOSHU) foi estabelecido, estando os GOS - e os FOS na categoria FOSHU (Standardized), segundo a política de Alimentos com alegações funcionais – Food with Function Claims (SUMI, 2008). Por conseguinte, o Japão é o principal detentor de patentes para produção de GOS microbiano e as principais empresas detentoras de patentes também são japonesas. Já os Estados Unidos não têm muita produção científica nessa área até o momento, situação que provavelmente deverão se alterar após a mudança na legislação, licenciando os GOS como GRAS para ser aplicado em fórmulas infantis.

A partir de 2003 foi observado um novo aumento no número de patentes até mesmo por empresas não-japonesas devido aos avanços e a utilização da engenharia genética, em pesquisas relacionadas com micro-organismos e a produção de metabólitos. Vê-se também que a grande maioria das patentes foi depositada por empresas privadas (91%).

Recentemente houve uma mudança na regulação em países como os Estados Unidos, Austrália e Nova Zelândia, sendo o produto comercial Vivinal GOS, da empresa americana Friesland Foods Domo, reconhecido como GRAS para aplicação em fórmulas infantis e em diversos produtos. Devido à sua ampla aplicação, este fato gerou uma expectativa para um futuro promissor no uso do GOS e esta tendência continua numa demanda global com perspectivas até 2018, como mostrado neste estudo. Juntamente com o desenvolvimento de novos processos, uso da biotecnologia e investimentos, a demanda por GOS tendem a

continuar. Cada vez mais há um número expressivo de trabalhos visando novas tecnologias e processos envolvendo sua produção.

4. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento concedido através do processo N° 140599/2007-0.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. M. *Síntese de Galactooligossacarídeos por β -galactosidase de *Scopulariopsis sp* a partir de lactose*. 2003. 145f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2003.

ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. Galactooligossacarídeos: Produção e Efeitos benéficos, *Boletim SBCTA*, v. 35, n. 1/2, p. 12-19, 2001.

AKIYAMA, K.; TAKASE, M.; HORIKOSHI, K.; SHIGEO, O. Production of Galactooligosaccharides from Lactose Using a β -glucosidase from *Thermus sp.* Z-1. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 65, n. 2, p. 438-441, 2001.

AVALAKKI, U.K.; MAHESWARAN, P.; SARAVANAN, R. Process for the production of galactooligosaccharides by free cells. Int 502/MUM/2008. WO 2009/113030. 12 mar. 2008, 17 set. 2009. International Application Published Under The Patent Cooperation Treaty. World Intellectual Property Organization, International Bureau. New Delphi.

BLAREAU, J-P.; LECROIX, F.; MAERTEN, B.; PRONNIER, P. Preparation of galacto-oligosaccharide and β -galactosidase enriched products fermented using *Streptococcus thermophilus*. PCT Int Appl WO9606924. Applicant(s): Compagnie Gervais Danone. 31 ago. 1994, 7 mar. 1996. Demande Internationale Publiee em Vertu Du Trat. França.

CHO, Y. J.; SHIN, H. J.; BUCKE, C. Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing β -galactosidase from *Bullera singularis*. *Biotechnology Letters*, v. 25, p. 2107-2111, 2003.

CHOCKCHAIWASDEE, S.; ATHANASOPOULOS, V. I.; NIRANJAN, K.; RASTALL, R. A. Synthesis of Galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on Membrane-Fitted Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 89, n. 4, p. 434-443, 2005.

DERWENT. Disponível em:

<<http://portal.isiknowledge.com/portal.cgi?Init=Yes&SID=4BiHFNi57bl7Mjde7G>>

Acesso em: set. 2009.

ESP@CENET. Disponível em: <<http://ep.espacenet.com/>> Acesso em: set. 2009.

FROST & SULLIVAN, empresa internacional de consultoria e inteligência de mercado. Disponível em <<http://www.frost.com/prod/servlet/frost-home.pag>>, Acesso em: jan. 2010.

GALACTO-OLIGOSACCHARIDES. Disponível em:

<<http://www.dairymark.com/gos.html>>, Acesso em: 5 jan. 2010.

GIBSON, G.; SLUPINSKI, J. W.; TZORTZIS, G.; WYNNE, A. G. Novel galactooligosaccharide composition and the preparation thereof. Int.Cl.A61K 35/74(2006.01), Int.Cl.A61P 1/14(2006.01) US 2007/0274955. 29 nov. 2007. Patent Application Publication, United States.

HAYASHI, M.; TAKI, S.; UEDA, F.; SHIMAZAKI, Y.; ITO, O.; KAMATA, S.; KAKIICHI, N.; SHITARA, A. 4'-Galactooligosaccharide Affects Sodium and Potassium Metabolism in Rats. *The Journal of Nutrition*, v. 121, n. 10, p. 1606-1612, 1991.

HIDEJI, N.; Production of Galactooligosaccharide. JP8168393 (A). Applicant(s): Dainippon INK & Chem INC 02 jul. 1996. Japan Patent, Japão.

IKUMASA, O.; KENZO Y. Production of Galacto-Oligosaccharide. JP 2072890 (A). Applicant(s): Ajinomoto KK; Ajinomoto CO INC. 13 mar. 1990. Japan Patent, Japão.

INPI. Disponível em: < <http://www.inpi.gov.br>> Acesso em: set. 2009.

JAPAN PATENT OFFICE. <<http://www.jpo.go.jp>> Acesso em: set. 2009.

JORGENSEN, F.; HANSEN, O. C.; STOUGAARD, P. High-efficiency synthesis of oligosaccharides with a truncated β -galactosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, p. 647-652, 2001.

KEISUKE, M.; YOICHI, K.; TATSUHIKO, S. Production of Galactooligosaccharide. JP2215392 (A). Applicant(s): Yakult Honsha CO LTD. 28 ago. 1990. Japan Patent, Japão.

MACFARLANE, G.T.; STEED H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104 p. 305-344, 2008.

MODLER, H.W. Bifidogenicfactors-Sources, metabolism and applications. *International Dairy Journal*, v. 4, p. 383-407, 1994.

OSAMU, O.; KOTARO, O.; NOBUKO, T.; Production of Galactooligo saccharide. JP 62130695 (A). Applicant(s): Nisshin Seito KK.; Nissin Sugar MFG. 21 jun. 1987. Japan Patent, Japão.

PASTORE, G. M., PARK, Y. K. Screening of high β -galactosidase producing fungi and characterizing the hydrolysis properties of a selected strain, *Journal Food Science*, v. 44, n. 6, p. 1577-1579, 1979.

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

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*, v. 9, p. 69-80, 1999.

SANTOS, R. *Produção de Galactooligosacarídeo por lactase fúngica*. 2006. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.

SANTOS, R.; SIMIQUELI, A. P. R.; PASTORE, G. M. Produção de galactooligosacarídeo por *Scopulariopsis* sp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, p. 682-689, 2009.

SANTOS, R.; MORENO, Y. M. F.; MENEZES, C. R.; MORENO, I.; PASTORE, G. M. Efeito do prebiótico GOS produzido a partir de *Scopulariopsis* sp no crescimento das linhagens probióticas *Lactobacillus acidophilus* – La 05 e *Bifidobacterium animalis* – Bb12, sob condições *in vitro*. In: 8º SLACA – Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, n.1, 2009.

SUMI, Y. Research and Technology Trends of Nutraceuticals. *Science & Technology Trends*, 2008. Disponível em <<http://www.nistep.go.jp>, acessado em Dezembro>, Acesso em: ago. 2008.

TZORTZIS, G.; GOULAS, A. K. GEE, J. M.; GIBSON, G. R. A Novel Galactooligosaccharide Mixture Increases the Bifidobacterial Population Numbers in a Continuous In Vitro Fermentation System and in the Proximal Colonic Contents of Pigs *In Vivo*. *The Journal of Nutrition*, v. 135, p. 1726-1731, 2005.

TZORTZIS G.; GOULAS, A. K.; GOULAS, T. Beta-Galactosidase with Transgalactosylating Activity. Int CIA61K35/74. US 2009/0117080. jan. 2006, 7 may. 2009. Patent Application Publication, United States.

USPTO. Disponível em: < <http://www.uspto.gov/>> Acesso em: set. 2009.

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEO EM SISTEMA DE IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE DE *SCOPULARIOPSIS* SP E *ASPERGILLUS NIGER*, EM RESINA DE DEAE-CELULOSE

RESUMO

Devido à grande importância dos prebióticos na saúde, tem se intensificado a produção e aplicação desses em alimentos nos últimos anos. Os prebióticos são substâncias naturais ou sintéticas que nutrem o crescimento dos probióticos, ou seja, das bactérias intestinais benéficas como as dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Os galactooligossacarídeos (GOS) são prebióticos produzidos por transglicosilação enzimática pela ação da β -galactosidase. Há grande interesse na imobilização dessa enzima em função de seu custo elevado, pois os processos em que é mantida imobilizada podem ser executados continuamente e oferecem a possibilidade de reutilização da mesma. Por isso, este trabalho teve como objetivo analisar a eficiência do processo de produção de GOS por enzima livre e por enzima imobilizada. A enzima β -galactosidase foi preparada em tampão acetato 0,1 M, pH 5,0, foi adicionada à DEAE-celulose ativada, a qual foi previamente equilibrada com tampão acetato 0,05 M, pH 5,0. A resina foi empacotada em uma coluna de vidro encamisada e mantida a 60°C. GOS foi produzido a partir de uma solução com concentração inicial de 40% de lactose. A técnica utilizada para quantificar os compostos formados foi Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Utilizou-se β -galactosidasas produzida por *Scopulariopsis* sp. e *Aspergillus niger*. Os maiores rendimentos de produção de GOS foram obtidos da β -galactosidase do *Scopulariopsis* sp, sendo esses de 24% para enzima imobilizada e 30% para enzima livre. Portanto, pode-se concluir que nas condições utilizadas, a produção de GOS por enzima livre foi mais eficiente em relação a enzima imobilizada, devido ao maior rendimento em menos tempo.

Outros fatores, tais como diferentes tipos de resinas e temperaturas precisam ser estudados para se confirmar se o reaproveitamento da enzima β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. e *Aspergillus niger* utilizando técnicas de imobilização auxilia na economia de resíduos industriais visando a viabilidade econômica assim como o aumento da escala do laboratório para escala industrial.

Palavras-chave: β -galactosidase, imobilização, galactooligossacarídeo

ABSTRACT

Due to the importance of prebiotics in health, production and use of these foods has been intensified in recent years. Prebiotics are natural or synthetic substances that nourish the growth of probiotics that are beneficial intestinal bacteria such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genus. The galactooligosaccharides (GOS) are prebiotics obtained by enzymatic transglycosylation usually the action of β -galactosidase. As this enzyme have a high cost, there is a great interest in study processes in which it is kept immobilized allowing a continuous use. Therefore, this study aimed to analyze the efficiency of GOS production by free enzyme and immobilized enzyme. The enzyme β -galactosidase, which was prepared in 0.1 M acetate buffer, pH 5.0, was added to activated DEAE-cellulose, which was previously equilibrated with 0.05 M acetate buffer, pH 5.0. The resin was packed into a glass column jacketed and maintained at 60°C. GOS was produced from a lactose solution of with initial concentration of 40%. The technique used to quantify the compounds was High Performance Liquid Chromatography (HPLC). We used β -galactosidase from *Aspergillus niger* and *Scopulariopsis* sp. The highest yields of GOS production were obtained from β -galactosidase from *Scopulariopsis* sp., and these 24% for immobilized enzyme and 30% for free enzyme. Therefore, it can be concluded that under the used conditions, GOS production using free enzyme was more efficient than the immobilized enzyme due to the higher yield in less time. Other factors such as different types of resins and temperatures must be studied to confirm whether the recycling of the enzyme β -galactosidase from *Scopulariopsis* sp. and *Aspergillus niger* using immobilization techniques helps the economy of industrial waste in order to economic feasibility and viability of a industrial scale.

Key words: β -galactosidase, immobilization, galactooligosaccharide

1. INTRODUÇÃO

O soro de leite é o principal subproduto da indústria de laticínio. Devido ao seu elevado poder poluente e a dificuldade de sua eliminação, as empresas estão buscando alternativas para o reaproveitamento dos componentes do soro, principalmente das proteínas e da lactose, sendo que estas representam 0,7% e 70%, respectivamente, dos sólidos totais do soro de leite (CARMINATI, 2001)

Embora a lactose seja o dissacarídeo mais abundante encontrado no soro, este é pouco utilizado na indústria alimentícia devido ao seu baixo poder adoçante e baixa solubilidade. Além disso, uma parcela da população sofre de intolerância à lactose, o que diminui a sua absorção pelo organismo, causando enjôos e mal estar. Esse fato é mais evidente em algumas raças como a negra (até 80% dos adultos têm deficiência) e menos comum em outras, como a branca (20% dos adultos) (BRANDÃO, 1994; TÉO, 2002).

O uso da biotecnologia através de processos enzimáticos pode resolver esses problemas assim a lactose pode ser hidrolisada em glicose e galactose, que são açúcares com melhores propriedades físicas, químicas e nutricionais.

Neste processo enzimático envolvendo a ação da β -galactosidase são também formadas quantidades consideráveis de oligossacarídeos, como os galactooligossacarídeos (GOS) que atuam como prebióticos (SANTOS, SIMIQUELI & PASTORE, 2009).

Os prebióticos são ingredientes seletivamente fermentados por micro-organismos prebióticos que promovem alterações específicas, tanto na composição e/ou na atividade da microbiota intestinal, conferindo benefícios para a saúde e bem estar do hospedeiro (BHATIA & RANI, 2007).

Os critérios necessários para classificar um ingrediente como prebiótico são, a saber, resistência à acidez gástrica, à hidrólise enzimática e à absorção no trato digestório alto; fermentação pela microbiota intestinal, estímulo seletivo do crescimento e atividade das bactérias que contribuem para a saúde e bem estar; deve melhorar as condições associadas à constipação e à diarreia (BHATIA & RANI, 2007, ROBERFROID, 2007). Atualmente, existem dois ingredientes

alimentares, que seguem esses critérios analisados *in vitro* e *in vivo*, são a inulina e seus derivados (frutooligossacarídeos) e os galactooligossacarídeos (GOS) (ROBERFROID, 2007).

Os GOS são produzidos comercialmente a partir de uma reação de transgalactosilação da β -galactosidase a partir da lactose, que está em equilíbrio com uma reação de hidrólise produzindo glicose e galactose. Devido à concorrência dessas duas reações, o rendimento do GOS é inferior a 50% (AVALAKKI, MAHESWARAN & SARAVANAN, 2009).

Os GOS são oligossacarídeos compostos por moléculas de galactose e molécula de glicose ligada através de ligações glicosídicas, sendo formados por tri- a hexassacarídeos com 2-5 unidades de galactose. Os GOS são preconizados como GRAS (Generally Recognized as Safe) por serem componentes do leite materno, naturalmente encontrados na soja e não apresentarem toxicidade (SANTOS, 2006). Eles são classificados como não-digeríveis, e são fibras dietéticas amplamente utilizadas no mercado devido aos seus feitos nutricionais benéficos na saúde (PRUKSASRI, 2007).

Os potenciais benefícios do GOS para a saúde, além de promoverem o crescimento de Bifidobacterias, incluem (a) Proteção contra infecção intestinal por inibir bactérias putrefativas, tais como *Citrobacter* spp. e *Krebsiella* spp., (b) Inibição de *C. perfringens* na microbiota intestinal e redução de seus subprodutos, tais como amônia, aminas e indol; (c) prevenção de patogenicidade e diarreia; (d) maior absorção de cálcio, magnésio e fósforo; (e) redução dos níveis de colesterol sérico; (f) redução da pressão arterial; (g) um aumento da imunidade celular e de propriedades anticarcinogênicas; (h) a produção de vitaminas B1, B2, B6, B12, ácido nicotínico e ácido fólico (BAKKEN, HILL Jr. & AMUNDSON, 1989; URGELL & ORLEANS, 2001; CONESA, LOPEZ & ROS, 2007; PRUKSASRI, 2007; SANTOS, SIMIQUELI & PASTORE 2009).

As β -galactosidases, popularmente conhecidas como lactases e classificadas como hidrolases, são responsáveis por catalisar o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose (Gal β 1-4Glc) para formar glicose e galactose. As β -

galactosidases podem ser encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais (particularmente em amêndoas, pêssego, damasco, maçã), em órgãos de animais (como intestino, cérebro, testículos, placenta) e também são produzidas por grande quantidade de micro-organismos, tais como fungos filamentosos, bactérias e leveduras, sendo as leveduras e fungos as fontes preferidas desta enzima para aplicações comerciais. Esta enzima tem sido usada preferencialmente na forma livre nas indústrias de laticínios em todo o mundo. Em função de seu custo relativamente elevado, tem havido grande interesse na imobilização de β -galactosidase, porém, até o momento não se obteve um catalisador com todas as propriedades desejadas para uso industrial. Uma outra alternativa para a redução do custo de produção de GOS é a utilização de meios de cultura mais baratos, tais como o soro de queijo. A maioria da lactose utilizada na indústria de alimentos é proveniente de técnicas de concentração e secagem do soro de queijo (BASSETTI, 1995; SANTIAGO *et al.*, 2004; ROBERFROID, 2007).

Na hidrólise enzimática, a enzima pode ser utilizada de três maneiras: em batelada, recuperada por membrana ou imobilizada. No processo em batelada, a enzima é mantida na forma livre, podendo ser bruta ou previamente purificada. No processo de imobilização, a enzima é mantida na forma imobilizada em um suporte sólido. Portanto, nesse último, a enzima é utilizada por um período maior de tempo (AVALAKKI, MAHESWARAN & SARAVANAN, 2009).

A imobilização enzimática é a técnica que confina uma enzima com atividade catalítica de interesse em um sistema, prevenindo assim sua migração para o meio, ou fase móvel, onde se encontram o substrato e produto. Este sistema, denominado biorreator, consiste da enzima física ou quimicamente associada a um suporte (ROSEVEAR, 1984).

Os processos que envolvem células ou enzimas imobilizadas oferecem certas vantagens sobre a enzima livre: (1) poder catalítico é estável (2) as matrizes imobilizadas podem ser recicladas, o que reduz o custo e (3) os produtos podem ser isolados de forma simples. No entanto, a utilização de enzimas imobilizadas depende da relação custo-benefício e dos fatores de viabilidade

técnica. Em alguns processos, a extração e a purificação da enzima são etapas de alto custo e, em alguns casos, a enzima desnatura após a extração. Sob tais condições, o uso de células imobilizadas ou co-imobilizadas tem vantagens adicionais sobre as enzimas imobilizadas (AVALAKKI, MAHESWARAN & SARAVANAN, 2009, VALERO, 2009).

Entretanto, o uso de células imobilizadas tem as seguintes desvantagens:

1. A matriz e o agente ligante deve respeitar a aprovação regulatória para o uso em alimentos.
2. Estabilidade química das células imobilizadas em material poroso como o vidro.
3. Restrições à difusão de substratos e produtos e, conseqüentemente, a eficiência da bioconversão pode ser menor que em células livres.
4. Devido à baixa eficiência de conversão, separar os produtos que não se ligaram com o substrato e as impurezas é uma tarefa desafiadora.

Estudos relacionados ao uso de células e enzimas imobilizadas para produção de GOS tem tido destaque, principalmente devido à viabilidade econômica. Para isto, alguns procedimentos devem ser estudados, tais como interação iônica, ligação covalente e oclusão em géis hidrofílicos tais como Sephadex, DEAE celulose (grupo funcional DiEtilAminoEtilo), AE celulose e policrilamida, bem como materiais hidrofóbicos como nylon, resinas fenolíticas, sílica porosa e vidro poroso (SHIN & YANG, 1998; AKIYAMA *et al.*, 2001; JORGENSEN, HANSEN & STOUGAARD, 2001; RABIU *et al.*, 2001; TZORTIZ *et al.*, 2005).

Pastore (1982) selecionaram uma linhagem de *Scopulariopsis* sp., a partir de amostras de solo brasileiro, que foi capaz de produzir elevada quantidade de β -galactosidase, que foi posteriormente purificada e imobilizada em coluna de DEAE-celulose (PASTORE & PARK, 1980).

Pereira (1999) utilizou leitos de resina de troca de íons aniônica para a concentração e purificação dessa mesma enzima. As análises foram submetidas primeiramente às operações de adsorção, recuperação em leito fixo, e uma etapa

final de purificação através de filtração em gel. Um fator de purificação de 3,3 vezes para a enzima foi obtido no ensaios de adsorção em coluna. Programas computacionais matemáticos permitiram o cálculo de parâmetros de transferência de massa, com base nos dados experimentais de adsorção em batelada e coluna cromatográfica.

Sawatzki (2003) desenvolveu um trabalho com objetivo de estudar a preparação contínua de uma fração concentrada de GOS a partir de lactose por reação da β -galactosidase utilizando técnicas de ultrafiltração e imobilização por resina de troca iônica. Este processo passou por várias etapas: 1) foi utilizado um reator com a solução de lactose e β -galactosidase formando uma mistura de monossacarídeos (Gal e Gli) e oligossacarídeos, entre eles o GOS; 2) o reator era alimentado continuamente com solução de lactose; 3) uma membrana de ultrafiltração era utilizada em circulação contínua, resultando uma fração contendo lactose, monossacarídeos e oligossacarídeos, dividida em duas partes, a primeira contendo os oligossacarídeos, que era separado, e a outra contendo a enzima e principalmente lactose; 4) este residual era transferido para o reator de batelada, no processo inicial; 5) a outra fração era jogada numa coluna contendo resina de troca iônica, que separava em três frações: a primeira era composta por principalmente lactose, a segunda, principalmente GOS e a terceira de monossacarídeos. 6) o GOS era passado por um sistema independente para ser concentrado.

Gaur *et al.* (2006) estudaram a síntese de GOS por imobilização da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. Foram comparadas as três principais técnicas de imobilização (adsorção, acoplamento covalente de quitosana e agregado de enzima em ligação cruzada – CLEA). Foram comparadas em termos de rendimento da preparação do imobilizado, característica enzimática, estabilidade e eficiência na síntese de oligossacarídeos. Usando como substrato uma solução a 20% de lactose (p/v), a enzima imobilizada em quitosana obteve rendimento máximo de oligossacarídeos (17,3% de açúcar total) quando comparado da enzima livre (10%) em 2h a 40°C. CLEA foi escolhido pela

eficiência da hidrólise de lactose, resultando em 78% de monossacarídeos em 12h. Este sistema garantiu um processo contínuo de grande interesse industrial, pois o aproveitamento da enzima é viável ao processo, além de reduzir os índices de contaminação.

Valero (2009) investigou a produção de GOS a partir de lactose utilizando β -galactosidase de *Bacillus circulans*, imobilizada em resina de algodão. A enzima foi imobilizada por adsorção com PEI (polietilenoimina) e glutaraldeído (GA) como agente fixador. A concentração da solução inicial de lactose foi de 40% (p/v) e uma grande quantidade de enzima (250 mg/g de suporte) foi utilizada, resultando em 35% de rendimento. A produção máxima de GOS foi 60% de conversão de lactose, com 400 g/L de lactose em pH 6,0 e 45°C. A enzima imobilizada mostrou a mesma cinética em relação a enzima livre na produção de GOS, indicando que não houve limitação de difusão na resina de algodão. Neste trabalho, o pH da solução afetou a taxa de reação da produção de GOS, sendo fixado em pH 6,0 a produção ótima. A meia-vida da enzima imobilizada em resina de algodão foi 693 h a 45°C.

Este mesmo pesquisador (VALERO, 2009) realizou outro estudo de imobilização da β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e *Bacillus circulans* para produção de GOS, que consistiu em dois reatores seqüenciais encamisados para controle de temperatura, sobre resina de algodão. O processo contínuo foi estudado por 10 dias com inicial de lactose 400g/L, obtendo-se uma produção de GOS máximo de 25% (p/v) e 40% (p/v) e β -galactosidase de *A. oryzae* e *B. circulans*, respectivamente. A produtividade do reator foi 4.300 g/L/h para lactase de *A.oryzae* e 180 g/L/h para lactase de *B. circulans* na carga enzimática de 250 mg/g de resina. Esta produtividade de GOS foi verificada pelo processo de imobilização das enzimas de *A. oryzae* e *B. circulans* em seqüência.

Atualmente, numa indústria, além da qualidade, os aspectos econômicos são de extrema importância, tanto por razões econômicas quanto por razões éticas e ambientais. Portanto, a busca por condições ideais de produção de GOS

se faz muito importante e necessária para o constante crescimento do mercado de ingredientes funcionais, como o de prebióticos, entre eles, o GOS.

Em vista disso, esse trabalho teve como objetivo analisar a eficiência do processo de produção de GOS por enzima livre e por enzima imobilizada em DEAE-celulose, utilizando β -galactosidases de *Scopulariopsis* sp. e *Aspergillus niger*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1. Micro-organismos utilizados

Foram utilizados como fonte da enzima β -galactosidase os micro-organismos *Scopulariopsis* sp. e *Aspergillus niger*, linhagens pertencentes ao Laboratório de Bioaromas da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP (Pastore, 1982).

2.1.2. Produção do inóculo

Os micro-organismos foram cultivados em tubo com Agar PDA inclinado por 7 dias a 30°C. Após o período de incubação, foram adicionados a cada um dos tubos de cultivo 10 mL de água estéril. A superfície do meio de cultura foi levemente raspada com alça de platina estéril, para a liberação dos esporos, que posteriormente foi transferido para o meio da fermentação semi-sólida.

2.1.3. Preparo do extrato enzimático

Os micro-organismos foram cultivados em fermentação semi-sólida em meio contendo farelo de trigo e água na proporção de 1:1 (p/v). Um mL da suspensão de esporos foi adicionada em frasco Erlenmeyer de 500 mL, contendo 20g de substrato previamente esterilizado a 121°C por 20 minutos. Após a incubação a 30°C por 7 dias, foi adicionado 100 mL de água destilada. O meio foi triturado com bastão de vidro para a liberação das enzimas. Após a filtração desse material, foi obtido o extrato enzimático bruto.

Para a obtenção da β -galactosidase, adicionou-se ao filtrado etanol 70% resfriado a 8°C. Esse extrato alcoólico permaneceu em repouso a 5°C overnight. Posteriormente foi retirado o sobrenadante e o precipitado foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm, utilizando o precipitado e desprezando o sobrenadante. As enzimas foram liofilizadas, acondicionadas em frascos adequados e congeladas.

2.2. Enzima livre

2.2.1. Atividade enzimática

A atividade enzimática bruta da β -galactosidase foi determinada pela incubação da mistura de 0,2 mL da solução enzimática (1mg/mL) e 0,8 mL de 0,25% de *o*-nitrofenol β -D-galactopiranosídeo (ONPG) em tampão acetato 0.1M, pH 5.0 a 60°C por 15 minutos. A reação foi paralisada com 1 mL de carbonato de sódio a 10%. O produto da reação enzimática é o cromóforo *o*-nitrofenol (ONP) que tem cor amarela e foi medido espectrofotometricamente a 420 nm. Uma unidade de atividade de β -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de *o*-nitrofenol por minuto, segundo metodologia adaptada de Santos (2006).

2.2.2. Produção de Galactooligossacarídeo

A produção de galactooligossacarídeos foi realizada sob agitação constante, utilizando uma solução enzimática, com concentração de 10 U/mL em solução de lactose a 40% (p/v), preparada em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Essa mistura foi incubada a 45°C por 24 horas. A reação foi paralisada em banho fervente, por 10 minutos e as amostras foram analisadas quantitativamente por CLAE (item 2.4.1.2).

2.3. Imobilização enzimática

2.3.1. Preparo da resina DEAE-celulose

Foi utilizada DEAE-celulose poro 30-60, obtida da Sigma, código D-8382. Quatorze gramas de DEAE-celulose foram lavados, ativados e equilibrados com tampão acetato 0,05 M, pH 5.0. Dois gramas de β -galactosidase foi diluído em 100 ml de tampão acetato, pH 5.0 e centrifugada para remoção dos materiais insolúveis, para a primeira imobilização e três gramas foi utilizada na segunda. O aumento da enzima teve como objetivo avaliar se a quantidade de enzima utilizada era diretamente proporcional ao rendimento na produção de GOS. A quantidade de proteína foi medida pelo Método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A solução de enzima foi adicionada a DEAE-celulose ativada e essa mistura permaneceu *overnight* a 4°C. A DEAE-celulose com a enzima imobilizada foi cuidadosamente lavada com tampão acetato. Como agente fixador, foi utilizado glutaraldeído (concentração final de 2,5%), com agitação ocasional a cada 2 horas (PASTORE & PARK, 1980).

2.3.2. Atividade enzimática da resina DEAE-celulose

A atividade enzimática da β -galactosidase foi determinada pela incubação da mistura de 1 g de enzima bruta imobilizada ativada em 4 mL de 0,25% de *o*-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) em tampão acetato 0.1M, pH 5.0 a 60°C por 15 minutos. Uma unidade de atividade de β -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ONP por minuto sob estas condições.

2.3.3. Determinação de proteínas totais

A determinação de proteínas totais contidas na resina com a enzima imobilizada foi realizada de acordo com Bradford (1976). Este método foi estipulado para estabelecer a quantidade equivalente de β -galactosidase imobilizada na resina de DEAE-celulose, dando maior segurança no resultado quanto a reação de transgalactosilação e conseqüentemente a produção de GOS.

2.4. Produção de Galactooligossacarídeo

A resina com a enzima imobilizada foi empacotada em uma coluna de vidro encamisada (30 cm de comprimento por 3 cm de diâmetro). A solução de lactose 40% foi colocada na coluna a um baixo fluxo. Esse sistema foi mantido a uma temperatura controlada de 60°C. Um mililitro da amostra foi colhido a cada passagem da lactose para posterior análise quantitativa, calculado pelo volume da coluna.

Foi avaliado o tempo de atividade ótima da enzima para a produção de GOS e a quantidade de vezes que a mesma solução foi passada continuamente até a produção ótima de GOS.

2.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os produtos obtidos pela síntese da enzima foram analisados por CLAE, utilizando um cromatógrafo líquido Waters, coluna KS 801 (300 X 7,8mm), detector Differential Refractometer Waters 410. Nesta análise foi utilizada água ultra pura como solvente a um fluxo de 0,5 mL/min a 70°C e aplicados 20 µL das amostras e das soluções padrões, preparadas a 10 % (p/v). Os carboidratos foram detectados pelo índice de refração e identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões de glicose, galactose, lactose e 4'galactosil-lactose (tetrassacarídeo), segundo metodologia adaptada descrita por Santos (2006).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Crescimento dos micro-organismos

As linhagens de *Scopulariopsis* sp. e *Aspergillus niger* tiveram um bom crescimento no meio semi-sólido composto de farelo de trigo e água na proporção de 1:1 (p/v). Sendo este meio considerado um substrato de grande interesse para cultivo de fungos por ser um subproduto da indústria de alimentos, com baixo valor agregado. A quantidade de β -galactosidase produzida foi de aproximadamente de 2g e 1g, para cada 200g de substrato semi-sólido para *Scopulariopsis* sp. e *Aspergillus niger*, respectivamente.

3.2. Enzima Livre

3.2.1. Atividade enzimática

Os valores da atividade enzimática das β -galactosidases obtidas pelos micro-organismos estão citados na Tabela 1. Foram feitas medidas das atividades enzimáticas das duas linhagens de cada micro-organismo, as quais foram determinadas como descrito no item 2.2.1, utilizando o substrato ONP em diferentes concentrações como curva padrão.

Tabela 1: Atividade da Enzima β -galactosidase bruta

Amostra	Atividade enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg ONP}$)	
	1ª Imobilização*	2ª Imobilização**
<i>Aspergillus niger</i>	6,1	2,9
<i>Scopulariopsis</i> sp.	28,23	151,62

*Atividade enzimática inicial antes da 1ª imobilização;
**Atividade enzimática inicial antes da 2ª imobilização.

Verificamos, por meio dos dados apresentados na Tabela 1, que a atividade enzimática inicial de cada micro-organismo, são bem diferentes. É visível que a atividade da β -galactosidase a partir do *Scopulariopsis* sp. é maior em relação ao *Aspergillus niger*, tanto na primeira quanto na segunda imobilização. Esses dados foram relevantes para calcular o rendimento na produção de GOS,

comparativamente entre as duas enzimas, bem como, avaliar a estabilidade de cada uma na resina de DEAE-celulose e a capacidade de imobilização.

3.3. Imobilização Enzimática

3.3.1. Atividade enzimática

Na Tabela 2 encontram-se os valores da atividade enzimática da resina imobilizada por β -galactosidases obtidas pelos micro-organismos *Scopulariopsis* sp. e *Aspergillus niger*. A atividade enzimática foi medida antes e depois do processo de imobilização.

Tabela 2: Atividade Enzimática da resina imobilizada com β -galactosidase, no processo inicial e final da imobilização

Amostra	Atividade enzimática inicial ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg ONP}$)	Atividade enzimática final ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg ONP}$)
<i>Scopulariopsis</i> sp	127,5	60,7
<i>Aspergillus niger</i>	8,3	0,9

Foram adicionadas à resina 2 e 3 gramas de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. e *Aspergillus niger*, respectivamente. Baseamos na pesquisa desenvolvida por Pastore & Park (1980), que utilizaram duas gramas desta mesma enzima. Com o objetivo de avaliar o rendimento de GOS, foi realizada uma segunda imobilização, aumentando a quantidade de enzima.

Da Tabela 2, pode se concluir que mesmo a 60°C, no final do processo de imobilização, a β -galactosidases de *Scopulariopsis* sp. perdeu apenas 50% da sua atividade enzimática e seu poder de transgalactosilação, enquanto que, a enzima do *Aspergillus niger* perdeu quase toda atividade enzimática. Portanto, o processo de imobilização poderia continuar, mas este teve que ser interrompido devido à formação de rachaduras e bolhas e perdas de amostra durante o processo, o que impossibilitou a manutenção de um fluxo constante e viável em todas as imobilizações. A atividade da enzima imobilizada na resina DEAE-celulose foi medida a cada 5 corridas ao longo do processo de imobilização e verificou-se que,

para a β -galactosidases de *Scopulariopsis* sp., a perda foi pequena ao longo dos 15 dias de produção e só foi interrompida devido a formação de caminhos (rachaduras), que interferiram na produção de GOS. O que poderia ter sido evitado num processo contínuo, unindo várias colunas. Porém estes testes são inéditos para os micro-organismos utilizados e outros parâmetros precisam ser avaliados futuramente.

3.3.2. Determinação de proteínas totais pelo Método de Bradford

A equação utilizada para a determinação de proteínas totais foi $Abs = 0,0151 + 0,0101$, com $R^2 = 0,9066$ e absorbância medida no comprimento de onda 595 nm. Na Tabela 3 encontra-se a quantidade de proteínas totais por ml de resina.

Tabela 3: Quantidade de proteínas totais

Amostra	$\mu\text{g/proteína/ml de resina}$
<i>Scopulariopsis</i> sp	171,98
<i>Aspergillus niger</i>	200,98

Logo, pode-se concluir a partir da tabela 3, que o processo de fixação da enzima na resina foi realizado com sucesso, pois grande quantidade de proteína detectada na resina pelo método de Bradford eram as enzimas estudadas, β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp e *Aspergillus niger*, de acordo com a curva padrão de cada enzima.

3.4. Produção de Galactooligossacarídeo por enzima imobilizada

Foi utilizado o dobro do volume da solução de lactose 40% em relação ao volume da coluna contendo a resina imobilizada, cerca de 150 mL, segundo cálculo do diâmetro da coluna. Isto foi realizado para garantir a continuidade da imobilização, evitando a secagem da resina imobilizada, que poderia interferir nos resultados.

A concentração inicial de lactose é um dos fatores mais importante, além da quantidade e fonte da enzima, que afeta a formação de GOS. Em baixas concentrações de lactose, a reação de hidrólise é dominante, enquanto a formação de GOS predomina em altas concentrações de lactose (ALBAYRAK & YANG, 2002).

Com o intuito de verificar se a quantidade de enzima utilizada era diretamente proporcional ao rendimento de produção de GOS no processo de imobilização, optou-se por aumentar a quantidade de enzima utilizada no segundo experimento de imobilização, sendo que na primeira imobilização foi adicionado à resina 2 gramas de enzima, e na segunda imobilização foi adicionado à resina 3 gramas de enzima.

3.5. Análise dos produtos formados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A quantidade de galactooligossacarídeos presente na amostra foi calculada exclusivamente pela hidrólise da lactose, considerando a amostra inicial (40% p/v). A coluna utilizada para essa metodologia (item 2.4.1.2) tem como princípio a separação dos carboidratos por peso molecular. As amostras que foram positivas para a produção de GOS continham 5 picos cromatográficos, 3 foram identificados e quantificados pelos padrões lactose, galactose e glicose, e os outros dois foram considerados tri- e tetrassacarídeo (4'galactosil-lactose) devido ao peso molecular e ao tempo de retenção, comparado com o padrão.

Foi considerada aproximadamente zero a quantidade de carboidratos que não apresentaram pico de tamanho considerável, porém, isso não significa que não havia monossacarídeos e GOS na amostra, mas pode ser que a quantidade não foi suficiente para ser detectada pelo detector Differential Refractometer Waters 410, não gerando, portanto, picos de tamanhos relevantes. O detector utilizado detecta os diferentes compostos através de alterações no índice de refração da fase móvel e separação pela coluna, sendo, portanto, menos sensível

que o detector de diodo. Os picos considerados nos cálculos eram no mínimo 3 vezes maior que o ruído da linha de base.

As Tabelas 4 e 5 mostram a taxa de conversão da lactose e o rendimento de GOS, em porcentagem, por ação da enzima livre e por enzima imobilizada, respectivamente, a partir da solução de lactose 40% (p/v).

Os cálculos da taxa de conversão da lactose e do rendimento da produção de oligossacarídeos foram feito de acordo com Jung & Lee (2008), segundo as equações 1 e 2, respectivamente.

$$\text{Taxa de conversão da lactose (\%)} = \frac{(\text{Área da lactose inicial} - \text{Área da lactose final}) * 100}{\text{Área da lactose inicial}} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{Rendimento da produção de GOS (\%)} = \frac{\text{Área dos oligossacarídeos}}{\text{Área da lactose inicial}} * 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Tabela 4: Produção de GOS pela enzima livre

Amostra	Taxa de conversão da lactose (%)	Rendimento (GOS) (%)
<i>Aspergillus niger</i> (1 ^a) ¹	26,69	20,62
<i>Aspergillus niger</i> (2 ^a) ²	13,16	4,17
<i>Scopulariopsis</i> sp. (1 ^a) ³	47,37	29,98
<i>Scopulariopsis</i> sp. (2 ^a) ⁴	38,29	28,65

^{1,2}Dados da primeira e segunda imobilização pelo micro-organismo *Aspergillus niger*. ^{3,4}Dados da primeira e segunda imobilização pelo micro-organismo *Scopulariopsis* sp.

A enzima produzida pelo micro-organismo *Scopulariopsis* sp. teve maior poder de transgalactosilação e produção de GOS quando comparada com a enzima produzida por *Aspergillus niger* (Tabela 4), como esperado pela determinação da atividade (Tabela 1).

A produção de GOS, em geral, foi crescente com relação ao número de ciclos que a amostra passou sobre a resina com enzima imobilizada na coluna,

como ilustrado na Figura 1. A Figura 2 mostra os cromatogramas das alíquotas coletadas ao longo do processo de conversão de lactose em GOS e apresentam a redução na concentração de lactose e o aumento na concentração de GOS, acompanhando o tempo, que ilustra esta ação.

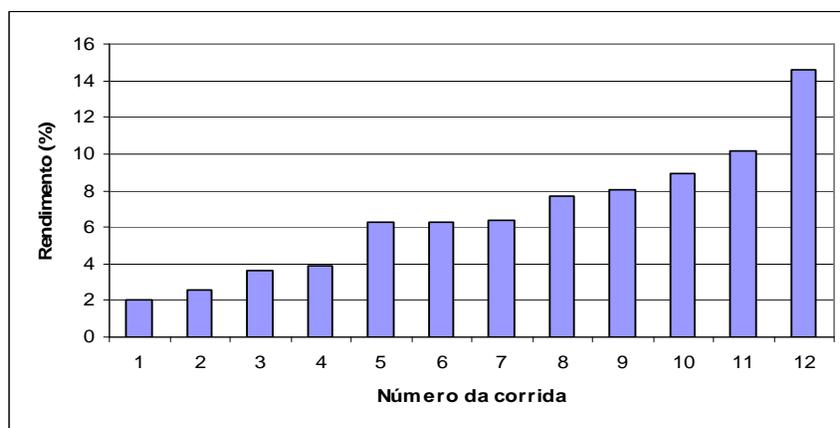
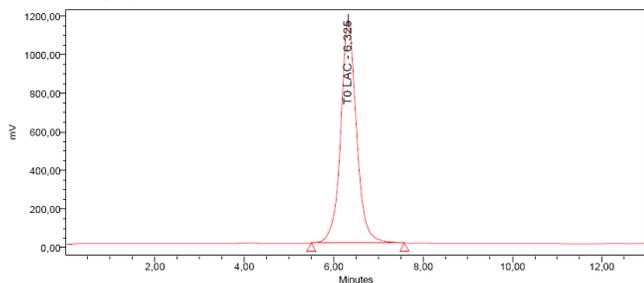
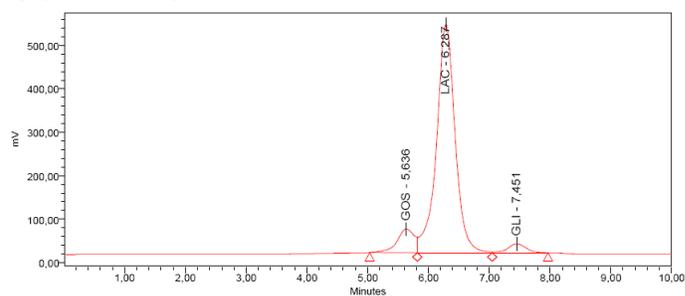


FIGURA 1: Rendimento da imobilização

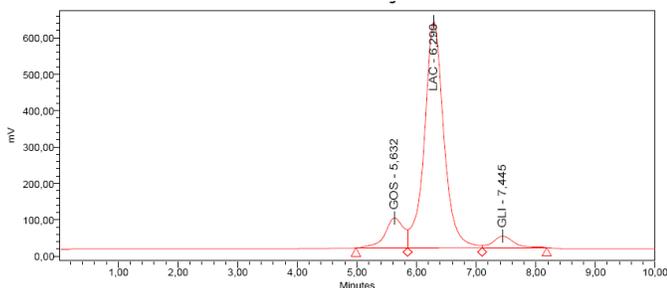
TEMPO 0



CORRIDA 3



CORRIDA 7



CORRIDA 12

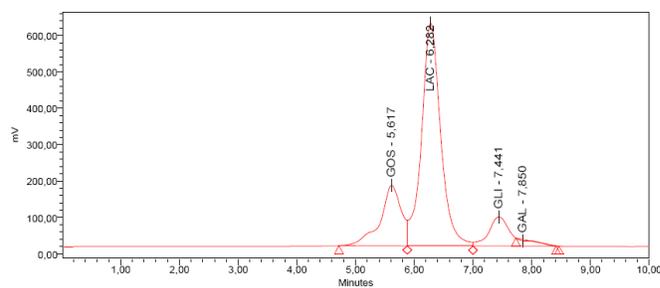


Figura 2: Cromatogramas obtidos por CLAE de amostras da 1^o imobilização da enzima do *Scopulariopsis* sp em diferentes tempos.

Como a técnica de imobilização de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. foi pouco testada para a produção de GOS por enzima imobilizada, optou-se neste estudo pela passagem de fluxo por gravidade. Dessa forma, o substrato ficou em contato com a enzima imobilizada por mais tempo a fim de favorecer a reação de transgalactosilação, em função do contato do substrato com a enzima β -galactosidase por mais tempo. Por isso, a variável fluxo não foi parâmetro analisado na eficiência do processo de produção de GOS por enzima imobilizada.

Como foi verificado na cinética de produção de GOS por Santos (2006), percebe-se que a formação de GOS ocorre no início da reação, o que pode ser verificado através da diminuição do teor da lactose inicial.

Com a reação contínua, a quantidade de glicose e galactose aumenta e a quantidade de GOS estabiliza-se ou diminui. Por isso, há um incentivo para utilização da imobilização associada a um método concomitante de purificação, seja através da nanofiltração ou ultrafiltração para a retirada dos monossacarídeos. (VALERO, 2009)

Há controvérsias sobre até que ponto isso seja importante, pois mesmo a lactose estando presente em maior quantidade juntamente com a glicose e galactose, os produtos industrialmente disponíveis são amplamente utilizados, havendo apenas algumas restrições em relação aos intolerantes a lactose. Como exemplos disso, podemos destacar produtos disponíveis no mercado tais como oligomate 55, com estrutura α -Glu-(1 \rightarrow 4)-[β -Gal-(1 \rightarrow 6)]₂₋₄ contém 55% GOS e glicose, galactose e lactose, que compõem 45% do restante (RABIU et al.; 2001), vivinal GOS comercial (Vivinal; Barculo Domo, Zwolle, Holanda), contendo aproximadamente 45% GOS, 15% lactose e 14% glicose (ANTHONY, MERRIMAN & HEIMBACH, 2006). O GOS produzido no laboratório de Bioaromas utilizando β -galactosidase dos fungos *Scopulariopsis* sp. e *Aspergillus niger*, tem uma composição similar aos produtos comerciais, conferindo em média: 28% de tri e tetrassacarídeos, e o restante de lactose, glicose e galactose.

4. CONCLUSÃO

Comparando-se a produção de GOS por enzima livre e por enzima imobilizada, pode-se concluir que a produção de GOS por enzima livre, nas condições utilizadas foi mais eficiente, por ter obtido um rendimento maior em menos tempo, devemos levar em consideração também a estabilidade da enzima, embora a produção tenha sido menor na imobilização, a estabilidade da enzima permaneceu sem afetar consideravelmente a atividade enzimática.

O maior rendimento de produção de GOS por enzima livre foi obtido através da β -galactosidase do *Scopulariopsis* sp, atingindo rendimento cerca de 30%, em 12h.

O maior rendimento de produção de GOS por enzima imobilizada foi obtido com a enzima β -galactosidase do *Scopulariopsis* sp, sendo esse no máximo de 24%, em 15 dias de produção.

Sugere-se que a imobilização seja feita com no mínimo duas colunas em sequência para que o processo seja contínuo; desta forma poderia evitar perdas de amostra e aumentar o rendimento da imobilização da enzima β -galactosidase.

Devido ao fato desta pesquisa ser inédita com os micro-organismos utilizados, a influência de alguns parâmetros, tais como diferentes tipos de resinas, tamanho da coluna, diferentes temperaturas, entre outros precisam ser estudados mais detalhadamente. Isso se faz necessário para confirmar a hipótese de que o reaproveitamento da enzima ajuda na economia de resíduos e no aumento da escala do laboratório para escala industrial.

O uso da imobilização, mesmo em escala industrial, pode significar economia, pois a quantidade de enzima usada é menor, e o rendimento, em condições adequadas, pode ser maior. Mas, para que isso se realize, há necessidade de investimento em pesquisa e desenvolvimento nesse setor.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento concedido através do processo N° 140599/2007-0.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIYAMA, K.; TAKASE, M.; HORIKOSHI, K.; SHIGEO, O. Production of Galactooligosaccharides from Lactose Using a β -glucosidase from *Thermus* sp. Z-1. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 65, n. 2, p. 438-441, 2001.

ALBAYRAK, N., YANG, S. T. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 77, n. 1, p. 8-19, 2002.

ANTHONY, J. C.; MERRIMAN, T. N.; HEIMBACH, J. T. 90-Day oral (gavage) study in rats with galactooligosaccharides syrup. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, p. 819-826, 2006.

AVALAKKI, U.K.; MAHESWARAN, P.; SARAVANAN, R. Process for the production of galactooligosaccharides by free cells. Int 502/MUM/2008. WO 2009/113030. 12 mar. 2008, 17 set. 2009. International Application Published Under The Patent Cooperation Treaty. World Intellectual Property Organization, International Bureau. New Delphi.

BAKKEN, A.P.; HILL Jr., C.G.; AMUNDSON, C.H. Hydrolysis of Lactose in Skim Milk by Immobilized Beta-Galactosidase in a Spiral Flow Reactor. *Biotechnology Bioengineering*, v. 33, n. 10, p. 1249-1257, 1989.

BASSETTI, F.J. *Caracterização da Invertase Imobilizada em Sílica de Porosidade Controlada e sua Aplicação em Reator de Leito Fixo e Fluidizado*. 1995. 188f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos e Medicamentos). - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 1995.

BHATIA, A.; RANI, U. Prebiotics and Health: Clinical Implications. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 1, n. 6, p. 546-554, 2007.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRANDÃO, S. C. C. Soro: Um desafio para as fábricas de Queijo. *Leite e Derivados*, v. 15, p. 13-20, 1994.

CARMINATI, C. A. *Ensaio de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reator a Membrana Utilizando Beta-galactosidase de Kluyveromyces lactis*. 2001. 79f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CONESA, D. P., LOPEZ, G.; ROS, G. Effects of probiotic, prebiotic and symbiotic follow-up infant formulas on large intestine morphology and bone mineralisation in rats. *Journal Science Food Agriculture*, v. 87, p. 1059-1068, 2007.

GAUR, R., PANT, H., JAIN, R., KHARE, S. K. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry*, v. 97, n. 3, p. 426-430, 2006.

JORGENSEN, F.; HANSEN, O. C.; STOUGAARD, P. High-efficiency synthesis of oligosaccharides with a truncated β -galactosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, p. 647-652, 2001.

JUNG, S. J.; LEE, B. H. Production and application of galacto-oligosaccharides from lactose by a recombinant β -galactosidase of *Bifidobacterium infantis*

overproduced by *Pichia pastoris*. *Food Science and Biotechnology*, v. 17, n. 33, p. 514-518, 2008.

PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Purification and Characterization of β -Galactosidase from *Scopulariopsis* sp. *Process Biochemistry*, v. 58, n. 1, p. 79-81, 1980.

PASTORE, G. M. *Produção, purificação, estudos das propriedades e aplicação da β -galactosidase de Scopulariopsis sp.* Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1982.

PEREIRA, J. A. M. *Adsorção de Beta-galactosidase de Scopulariopsis sp. em Resina Trocadora de Íons Objetivando a Purificação e a Ampliação de Escala.* 1999. 149f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campina. Campinas, 1999.

PRUKSASRI, M. S. S. *Production and Separation of Galactooligosaccharides from Lactose by β -galactosidase Immobilized on Nanofiltration Membranes.* 2007. 181f Tese (Doctor in Chemical Engineering) - School of The Ohio State University, Ohio. 2007.

RABIU, B. A.; JAY, A. J.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Synthesis and Fermentation Properties of Novel Galacto-Oligosaccharides by β -Galactosidases from *Bifidobacterium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 6, p. 2526-2530, 2001.

ROBERFROID M. Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*, v. 137, n. 3S, p. 830S-837S, 2007.

ROSEVEAR, A. Immobilized biocatalysts-A critical review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 34, n. 3, p. 127-150, 1984.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da Produção de β -galactosidase por Fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

SANTOS, R. *Produção de Galactooligossacarídeo por lactase fúngica*. 2006. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.

SANTOS, R.; SIMIQUELI, A. P. R.; PASTORE, G. M. Produção de galactooligossacarídeo por *Scopulariopsis* sp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, p. 682-689, 2009.

SAWATZKI, G. DEMANDE DE BREVET EUROPEEN. Procède de production em continu de galacto-oligosaccharides. EP 1352967-1, 09 Apr. 2003, 10 Apr. 2002. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/EP1352967.pdf>> Acesso em: 08 dez. 2009.

SHIN, H.J.; YANG, J-W. Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis* β -galactosidase immobilized in chitosan beads. *Process Biochemistry*, v. 33, p. 787-792, 1998.

TÉO, C. R. P. A. Intolerância à Lactose: Uma Breve Revisão para o Cuidado Nutricional. *Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar*, v. 6, n. 3, p. 135-140, 2002.

TZORTZIS, G.; GOULAS, A. K. GEE, J. M.; GIBSON, G. R. A Novel Galactooligosaccharide Mixture Increases the Bifidobacterial Population Numbers

in a Continuous In Vitro Fermentation System and in the Proximal Colonic Contents of Pigs *In Vivo*. *The Journal of Nutrition*, v. 135, p. 1726-1731, 2005.

URGELL, R. M.; ORLEANS, S. A. Oligosaccharides: Application in infant food. *Early Human Development*, v. 66, p. s43-s52, 2001.

VALERO, J. I. S. *Production of Galacto-oligosaccharides from Lactose by Immobilized β -Galactosidase and Posterior Chromatographic Separation*. 2009. 270f. Tese (Doctor in Chemical and Biomolecular Engineering). The Ohio State University, Ohio, 2009.

CAPÍTULO III

EFEITO DO GALACTOOLIGOSSACARÍDEO SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CITOCINAS E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS *IN VITRO*.

RESUMO

A microbiota intestinal desempenha um importante papel na saúde humana e sua associação com o sistema imune representa uma primeira linha de defesa contra vários patógenos potenciais. Estudos revelam que prebióticos, como os galactoligosacarídeos (GOS) são benéficos por agirem na microbiota intestinal aumentando as bifidobactérias e diminuindo os metabólitos tóxicos gerados por bactérias deterioradoras. O objetivo desse estudo foi investigar se os GOS, obtidos de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp., poderiam influenciar diretamente no sistema imune na produção de citocinas em linhagens de células tumorais e avaliar sua atividade antiproliferativa. Para isso, foi realizado ensaio de atividade antiproliferativa com concentrações distintas de GOS (0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$) em nove linhagens de células tumorais humanas. Como controles positivos foram utilizados fitohemaglutinina (PHA, estimulante da produção de citocinas, 3,75 $\mu\text{g/mL}$) e Doxorubicina (quimioterápico, atividade antiproliferativa, 0,025; 0,25; 2,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$). Após 48h, a produção da citocina IFN- γ foi avaliada no sobrenadante e o crescimento celular foi avaliado pela dosagem de proteínas com sulforrodamina B. Os resultados obtidos indicam que GOS e a mistura GOS+PHA não apresentam atividade antiproliferativa, não interferindo no crescimento celular, exceto para a linhagem HT-29 (adenocarcinoma de cólon). Para esta linhagem, tanto GOS quanto a mistura GOS+PHA promoveram uma ligeira redução no crescimento celular, concentração dependente, porém não foram capazes de reduzir em pelo menos 50% esse crescimento. Em relação à produção de citocina, observamos que a concentração de IFN- γ não se alterou em nenhuma das linhagens testadas, indicando que não houve estímulo à produção

dessa citocina. Portanto, os resultados obtidos indicam que GOS não apresenta atividade antiproliferativa e não interfere na produção de IFN- γ sugerindo que os efeitos benéficos destes prebióticos seguem outros mecanismos de ação.

Palavras-chave: Atividade antiproliferativa, Galactooligossacarídeo, *Scopulariopsis* sp., Citocinas

ABSTRACT

Intestinal microbiota plays an important role in human health and its association with native immune system represents a first line of defense against several potential pathogens. Studies have shown that prebiotics, such as galactooligosaccharides (GOS), are beneficial for acting in intestinal microbiota by increasing bifidobacteria and decreasing toxic metabolites generated by spoilage bacteria. The aim of this study was to investigate whether the GOS obtained from β -galactosidase from *Scopulariopsis* sp. could directly influence the immune system through cytokines production in cancer cell lines and evaluate their antiproliferative activity. For this trial activity antiproliferative was evaluated with different concentrations of GOS (0.25, 2.5, 25 and 250 $\mu\text{g/mL}$) in nine human tumor cell lines. As positive controls were used phytohemagglutinin (PHA, stimulating cytokine production, 3.75 $\mu\text{g/mL}$) and doxorubicin (chemotherapeutic, antiproliferative activity, 0.025, 0.25, 2.5 and 25 $\mu\text{g/mL}$). After 48 hours, the production of the cytokine IFN- γ was evaluated in supernatants and cell growth was assessed by measuring levels of proteins with sulphorhodamine B. The results indicate that GOS and GOS + PHA mixture does not exhibit antiproliferative activity, except for line HT-29 (colon adenocarcinoma). For this cell line, both GOS and GOS + PHA mixture promoted a slight reduction in cell growth, in a concentration dependent manner, but were not able to reduce at least 50% growth. Regarding cytokine production, we observed that the concentration of IFN- γ was not altered in any of the tested cell line, indicating that there was no stimulation of cytokines production. Therefore, the results indicate that GOS does not exhibit antiproliferative activity and does not interfere with the production of IFN- γ suggesting that beneficial effects of this prebiotic follow other mechanisms of action.

Key words: Galactooligosaccharide, *Scopulariopsis* sp., Cytokine

1. INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal, por exercer importantes funções metabólicas, como fermentação de fibras não digeríveis, produção de vitamina K e estímulo ao desenvolvimento do sistema imune, desempenha um importante papel na saúde humana contribuindo para a nutrição do hospedeiro e para a formação de uma barreira contra a colonização de patógenos (PENDERS *et al.*, 2006; SHADID *et al.*, 2007).

Uma microbiota intestinal saudável e o sistema imune associado à mucosa intestinal (GALT, gut-associated lymphoid tissue) representam a primeira linha de defesa do organismo contra vários patógenos potenciais. A microbiota é responsável pela ativação da imunidade inespecífica e da resposta imune humoral, além de modular as reações de hipersensibilidade. No GALT ocorrem o reconhecimento e a apresentação do antígeno para a construção de uma resposta imune, seja para desenvolver proteção, tolerância ou doença (GIBSON, 1999, FANARO, SACCOMANDI & VIGI, 2003).

As pesquisas tornaram clara a importância da microbiota intestinal na saúde humana desde o nascimento. Distúrbios ocorridos precedem o desenvolvimento de algumas doenças como as alergias, distúrbios gastrointestinais e cólicas em recém nascidos. Além disso, logo após o nascimento, a microbiota desempenha importante papel no desenvolvimento do sistema imune que refletirá ao longo de toda a vida. Alguns alimentos, como os prebióticos e probióticos, contribuem para o estabelecimento desta microbiota. Os probióticos, por exemplo, são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (TZORTZIS *et al.*, 2005). Esses micro-organismos desempenham função imunológica ativando os macrófagos e linfócitos (SANCHES, 2004). Além disso, Menten (2001) relatou que a utilização de probióticos, principalmente dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, induz o aumento da produção de anticorpos, a proliferação de células T e a produção de citocinas como *Interferons*. Segundo

Sanches (2004), *Bacillus* sp. também podem aumentar a ativação de macrófagos e células T e induzir aumento dos níveis séricos de *Interferons*. Utiyama (2004) e Silva (2006) citaram que *Bacillus subtilis*, quando utilizado em humanos e animais, promove aumento da secreção de imunoglobulina A.

Quanto aos prebióticos, estes oligossacarídeos são não digeríveis que beneficiam o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade das bactérias residentes no cólon intestinal (CRITTENDEN & PLAYNE, 1996; ROBERFROID, 2007). Ao estimular o crescimento das bactérias probióticas produtoras de ácido láctico, os prebióticos estão indiretamente atuando de forma benéfica sobre o sistema imune do hospedeiro. Pois estas populações bacterianas produzem substâncias (lipopolissacarídeos, peptidoglicanas e ácidos lipoteicóicos) que estimulam o sistema imune a produzir citocinas, proliferação de células mononucleares e indução da síntese de grandes quantidades de imunoglobulinas (Igs), principalmente IgA pela mucosa intestinal, fazendo com que os agentes patogênicos se tornem vulneráveis (CLOSE, 2000; SILVA & NÖRNBERG, 2003; BARROS, 2007).

Citocina é um termo genérico empregado para designar um extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Constituem um grupo de fatores extracelulares que podem ser produzidos por diversas células, como monócitos, macrófagos, linfócitos entre outras. Todas as citocinas são pequenas proteínas ou peptídeos, algumas contendo moléculas de açúcares (glicoproteínas). As diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias a saber, *Interferons* (IFN), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF α e TNF β), e fator de transformação de crescimento (TGF β) (CALICH & VAZ, 2003).

Atualmente, os prebióticos mais utilizados pelas indústrias de alimentos e estudos *in vitro* e *in vivo* são os frutanos do tipo inulina, seus derivados e galactooligossacarídeo (GOS), que possuem manufatura relativamente de baixo custo, podem ser extraídos de plantas (inulina) e, além disso, são valiosos

ingredientes funcionais com o potencial de melhorar as propriedades sensoriais dos alimentos. (MACFARLANE, MACFARLANE & CUMMINGS, 2006).

Os GOS consistem essencialmente por unidades de galactose ligadas à lactose, por meio de ligações glicosídicas de configuração β , as quais não são digeridas pelas enzimas digestivas gastrointestinais humanas que são principalmente específicas para as ligações α . Assim os GOS são resistentes à digestão e absorção no intestino atingindo o cólon, onde são fermentados, promovendo um aumento das bifidobactérias e redução das bactérias deterioradoras, ocasionando uma redução de metabólitos tóxicos (MODLER, 1994; TOMOMATSU, 1994; SAKO, MATSUMOTO & TANAKA, 1999).

Os GOS são formados a partir de lactose por uma reação de transgalactosilação da β -galactosidase. Esta enzima é alvo de muitos estudos, é encontrada em plantas e órgãos de animais, além de ser produzida por uma grande quantidade de micro-organismos, como o fungo *Scopulariopsis* sp. Este fungo foi isolado de solo brasileiro e selecionado como maior produtor de β -galactosidase entre os 1067 micro-organismos estudados por Pastore & Park (1979).

Os GOS já são amplamente produzidos em no Japão e, em países desenvolvidos como Estados Unidos e União Européia, a sua adição em produtos destinados à alimentação infantil, visando suas propriedades funcionais, é política pública. Além disso, dietas alimentares especiais contendo prebióticos, têm sido propostas como um tratamento alternativo ou complementar ao tratamento convencional de câncer a partir de evidências que muitos nutrientes parecem ter uma atividade antitumoral, inibindo o desenvolvimento de câncer invasivo por prevenir o início da carcinogênese ou por parar ou reverter o processo de progressão do tumor. Como mostram estudos *in vivo*, a suplementação diária de inulina enriquecida com oligofrutose, em ratos, resultou em modificações na carcinogênese e no estímulo ao GALT pelo aumento na concentração de IgA-s e da produção de IL-10 e IFN- γ nas placas de Peyer. Esses resultados sugerem que

os prebióticos e seus metabólitos estimulam o GALT (JYONOUCHI *et al.*, 2000; ROLLER, RECHKEMMER & WATZL, 2004).

Existe também uma grande procura por parte dos pacientes portadores de tumores malignos por tratamentos alternativos ou complementares visto que o tratamento convencional nem sempre é tão eficaz quanto esperado. Além disso, opções terapêuticas convencionais geralmente estão associadas a efeitos colaterais significativos, baixas a moderadas chances de sobrevida a longo prazo e controle da doença. Estudos epidemiológicos de tratamentos alternativos em doentes oncológicos relatam que até 50% dos entrevistados fazem uso de terapias não convencionais e as dietas especiais estão entre as mais freqüentemente usadas (YOUNES, 2003).

A fim de avaliar se uma substância ou mistura de, interfere na proliferação celular, uma estratégia a ser empregada é a triagem *in vitro* em cultura de células. Isso por causa de sua rapidez, simplicidade e custo relativamente baixo com boas perspectivas de atividade clínica (SCHWARTSMANN, WINOGRAD & PINEDO, 1988; VASCONCELLOS, 2008).

Como exemplos, pode-se citar a avaliação de atividade antiproliferativa de extratos ricos em violaceína, obtidos a partir de cultura de *Chromobacterium violaceum*, e que apresentaram seletividade para as linhagens de ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES) e melanoma (UACC-62) (MENDES, 2002). Outro exemplo interessante foi a identificação dos compostos responsáveis pela atividade antiproliferativa *Potomorphe umbelata* (SACOMAN *et al.*, 2008). Neste estudo, os autores identificaram que uma fração rica em derivados do ácido oxálico seria responsável pela indução de morte celular por apoptose nas linhagens UACC-62 (melanoma), OVCAR-3 (ovário) e NCI-ADR/RES (ovário resistente) enquanto a fração rica em esteróides e triterpenos era responsável pela indução de apoptose nas linhagens UACC-62 (melanoma), OVCAR-3 (ovário) e 786-0 (rim) (SACOMAN, 2007).

Quanto ao uso de prebióticos, Gibson *et al.* (2007) avaliou em estudo *in vitro*, a aderência das linhagens *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*

nutridas com GOS, na célula HT 29 (adenocarcinoma de cólon), concluindo-se que esta mistura de oligossacarídeo (GOS) não é tóxica para as células HT29.

Porém, por enquanto, pouco se sabe sobre os efeitos dos galactooligossacarídeos na produção, ativação e maturação de citocinas em linhagens de células tumorais. Com isso, esse trabalho teve como objetivo avaliar se os GOS podem influenciar diretamente a proliferação de células tumorais, assim como a produção de *Interferon gamma* (IFN- γ).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Produção da Enzima β -galactosidase

2.1.1. Micro-organismo utilizado

Como fonte da enzima β -galactosidase, foi utilizado o fungo *Scopulariopsis* sp. isolado por Pastore & Park (1979), depositado na American Type Culture Collection (ATCC) - Estados Unidos, sob o número 44206.

2.1.2. Produção do inóculo

Os micro-organismos foram cultivados em tubo com Agar PDA inclinado por 7 dias a 30°C. Após a incubação, foram adicionados a cada tubo de cultivo 10mL de água destilada e estéril. A superfície do meio de cultura foi levemente raspada com alça de platina estéril, para liberação dos esporos, até obtenção de uma suspensão de densidade celular igual a 10^8 esporos/mL (PASTORE, 1982).

2.1.3. Preparo do extrato enzimático

O fungo foi cultivado em fermentação semi-sólida em meio contendo farelo de trigo e água na proporção de 1:1 (p/v), um mL da suspensão de esporos foi adicionada em frasco Erlenmeyer de 500mL contendo 20g de substrato e esterilizado à 121°C por 20 minutos. Após incubação a 30°C por 7 dias foram adicionados 100 mL de água destilada. O meio foi triturado com bastão de vidro para liberação da enzima e mantido em repouso por 1 hora. A extração enzimática foi realizada utilizando álcool 70% em banho de gelo. Após a filtração desse material, foi obtido o extrato enzimático bruto (PASTORE, 1982).

2.2. Produção do Galactooligossacarídeo

A produção de galactooligossacarídeos foi realizada sob agitação constante, utilizando uma solução enzimática, com concentração de 10 U/mL, a partir do extrato bruto, em solução de lactose a 40% (p/v), preparada em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Essa mistura foi incubada a 45°C por 12 horas. A

reação foi paralisada em banho fervente por 10 minutos e as amostras foram analisadas quantitativamente por CLAE (SANTOS, 2006).

2.3. Análise dos produtos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os produtos obtidos pela síntese da enzima foram analisados por CLAE, utilizando um cromatógrafo líquido Waters, coluna KS 801 (300 X 7,8mm), detector Differential Refractometer Waters 410. Nesta análise foi utilizada água ultra pura como solvente a um fluxo de 0,5 mL/min a 70°C e aplicados 20 µL das amostras e das soluções padrões: lactose, galactose e glicose, preparadas a 0,5% (p/v). O cálculo da taxa de conversão da lactose e do rendimento da produção de oligossacarídeos foi feito de acordo com Jung & Lee (2008), segundo as equações 1 e 2, respectivamente.

$$\text{Taxa de conversão da lactose (\%)} = \frac{(\text{Área da lactose inicial} - \text{Área da lactose final}) * 100}{\text{Área da lactose inicial}} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{Rendimento da produção de GOS (\%)} = \frac{\text{Área dos oligossacarídeos} * 100}{\text{Área da lactose inicial}} \quad (\text{Equação 2})$$

2.4. Atividade Anticâncer: Estudos *in vitro*

Linhagens celulares de diferentes origens histológicas e embrionárias humanas foram utilizadas neste estudo: K562 (leucemia); NCI-H460 (pulmão), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário), com fenótipo de resistência zero, UACC-62 (melanoma), 786-O (renal), HT-29 (côlon), OVCAR-3 (ovário) e PC-3 (próstata). As linhagens celulares utilizadas foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) dos EUA, e os testes realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP.

Para o ensaio de atividade antiproliferativa 100µL/compartimento de célula foram inoculadas em placas de 96 poços de uma suspensão com densidade de inoculação entre 3×10^4 e $6,5 \times 10^4$ cel/µL em meio RPMI 1640, acrescido de 5% de

soro fetal bovino (SFB) e penicilina: estreptomicina (1000mg/mL:1000 U/mL, 1mL/L). Foi preparada também uma placa, denominada T₀, onde cada linhagem celular foi inoculada em apenas seis poços (100µL/compartimento). Após 24h de incubação, a 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂, os GOS foram adicionados às culturas em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL). Com a finalidade de estimular a produção de citocinas, a fitohemaglutinina (PHA) foi adicionada na concentração de 3,75µg/mL (Tabela 1). Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina nas concentrações de 0,025 a 25 µg/mL.

Tabela 1. Condições experimentais realizadas para avaliar o efeito do GOS sobre linhagens celulares.

Condição experimental	Descrição
Controle Negativo	Linhagens celulares ¹ + meio de cultura
GOS ²	Linhagens celulares + GOS (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL)
PHA ³	Linhagens celulares + PHA
PHA + GOS	Linhagens celulares + PHA + GOS (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL)

¹Linhagens celulares: K562 (Leucemia); NCI-H460 (Pulmão), MCF-7 (Mama), NCI-ADR/RES (Ovário), UACC-62 (Melanoma), 786-O (Renal), HT-29 (Cólon), OVCAR-3 (Ovário) e PC-3 (Próstata);

²GOS: galactooligossacarídeo;

³ PHA: fitohemaglutinina;

Imediatamente após inocular as amostras nas placas teste, a placa T₀ foi fixada com 50µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% e mantida por 1h a 4°C. Em seguida, a mesma foi lavada quatro vezes com água e deixada para secar a temperatura ambiente.

Ao final de 48h de incubação, o sobrenadante (100 µL/compartimento) das culturas foram coletados, e posteriormente, as células foram fixadas com 50µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% e as placas teste incubadas por 1h, a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de completamente secas, à temperatura ambiente, todas as células foram coradas com 50µL/compartimento de

sulforrodamina B (SRB) 0,4% (p/v, em ácido acético 1%) e mantidas por 30 min, a 4°C. Em seguida, foram lavadas, quatro vezes, com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma®, 10mM, pH 10.5) e a leitura espectrofotométrica da absorbância foi feita em leitor de microplacas a 540nm. O sobrenadante das culturas foram armazenados em freezer -80°C até a determinação das citocinas, por ELISA (MONKS *et al.* 1991).

2.5. Cálculo do Crescimento Celular

Com os valores médios de absorbância para cada concentração das amostras, a porcentagem de crescimento foi calculada segundo as seguintes fórmulas:

Se $T > T_1 \rightarrow$ estímulo de crescimento celular

Se $T \geq T_0 < T_1 \rightarrow$ atividade citostática: $\%C = 100 \times [(T-T_0)/(T_1-T_0)]$

Se $T < T_0 \rightarrow$ atividade citocida: $\%C = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$

Onde:

T = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula

T_1 = absorbância do branco de células.

T_0 = absorbância do controle de células na placa T_0 .

Foram gerados gráficos de porcentagem de crescimento versus concentração para cada uma das linhagens testadas, e a concentração efetiva denominada TGI (do inglês *total growth inhibition*, concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento celular). Foi calculada por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin 7.5. (MONKS *et al.*, 1991).

2.6. Medida da produção de Citocinas por ELISA

Para as dosagens de *Interferon gamma* (IFN- γ) foram utilizados kits comerciais (DuoSet, RD Systems, EUA). Os ensaios foram realizados em placas MultiSorp (Nunc, Dinamarca) conforme os protocolos do fabricante. As placas foram incubadas com anticorpos de captura e, após bloqueio, submetidas à incubação com amostras e diluições do padrão recombinante do kit. Em seguida, estas foram incubadas com anticorpos de detecção conjugados à biotina. A incubação seguinte ocorreu com uma solução de streptoavidina conjugada à peroxidase. A revelação da reação foi feita com peróxido de hidrogênio e 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB) e a interrupção ocorreu com a adição de H₂SO₄ 2N. A leitura foi realizada em 450 nm (MORENO, 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção do Galactooligossacarídeo

O perfil cromatográfico obtido por CLAE está apresentado na Figura 2. A coluna cromatográfica (Waters KS801) utilizada na CLAE separa os compostos pelo peso molecular. Observa-se que os GOS são eluídos antes dos monossacarídeos e da lactose. O oligossacarídeo denominado de GOS 2 presente nos cromatogramas das reações, eluiu em 5,629 minutos, foi identificado como 4'galactosil-lactose, de acordo com padrão autêntico, tendo o mesmo tempo de retenção e também comparado por cocromatografia. Nas condições de lactose 40% (p/v), 10U/mL de β -galactosidase e 12 horas de reação em tampão acetato pH 5,0, a 45°C, obteve-se uma mistura contendo aproximadamente 28% de tri e tetrassacarídeos (GOS), 50% de lactose, 15% de glicose e 7% de galactose.

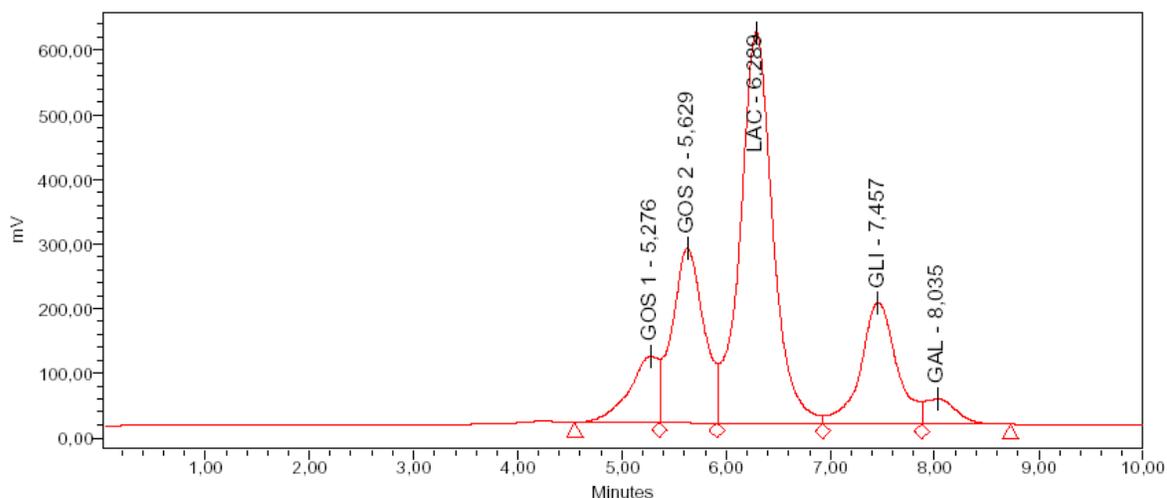


Figura 2. Perfil cromatográfico da mistura de carboidrato por CLAE.

Os resultados obtidos correspondem ao obtido por Almeida (2003), que estudou a produção de GOS por β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. Neste estudo foi avaliada a influência da temperatura, do pH e da concentração da enzima na síntese de galactooligossacarídeo, a partir de uma solução de lactose 40% (p/v), em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,5. Assim, os melhores resultados foram obtidos a 45°C, com 6U/mL de β -galactosidase, com taxa de

conversão de 30% da lactose em oligossacarídeos (224,92 mg/mL de 4'galactosil lactose).

Gaur *et al.* (2006) estudaram a síntese de GOS por imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*. Foram comparadas três técnicas (adsorção, acoplamento covalente de quitosana e agregado de enzima com ligação cruzada – CLEA). Estas técnicas foram comparadas em termos de rendimento da preparação do imobilizado, característica enzimática, estabilidade e eficiência na síntese de oligossacarídeos. Usando 20% (p/v) de lactose, a enzima imobilizada em quitosana obteve rendimento máximo de oligossacarídeos (17,3% de açúcar total) quando comparado da enzima livre (10%) em 2h a 40°C. CLEA foi escolhido pela eficiência da hidrólise de lactose que obteve 78% de monossacarídeos em 12h.

Santos (2006) estudou a enzima β -galactosidase a partir do micro-organismo *Scopulariopsis* sp. (extrato bruto) e *Aspergillus oryzae* (enzima comercial) para produção de GOS, utilizando lactose. A enzima obtida a partir de *Scopulariopsis* sp. converteu 20% de lactose em oligossacarídeos (80,8mg/mL de 4'galactosyl-lactose), comparando com a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, que converteu 6% de lactose em oligossacarídeos (25,6mg/mL de 4'galactosyl-lactose).

Gibson *et al.* (2007), utilizaram *Bifidobacterium bifidum*, que foi capaz de produzir β -galactosidase para produção de GOS, os autores também utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para posterior fermentação dos monossacarídeos. Essa mistura de oligossacarídeo compreendia de: 20–35% de dissacarídeos, 20–35% de trissacarídeos, 15–25% de tetrassacarídeos e 10–25% de pentassacarídeos. Neste processo o micro-organismo utilizado foi removido por centrifugação. O processamento final utilizou *spray-drier* para dar ao GOS a forma em pó.

Apesar do último trabalho citado ter utilizado técnicas de fermentação dos monossacarídeos para torná-los mais puros, a maioria dos GOS comerciais não são puros, são compreendidos de uma mistura. O produto comercial oligomate 55,

por exemplo, apresenta estrutura: $\alpha\text{-Glu-(1}\rightarrow\text{4)-}[\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{6)}]_{2-4}$ contém 55% GOS com glicose, galactose e lactose, que compõem 45% do restante (RABIU *et al.*, 2001), vivinal GOS comercial (Vivinal; Barculo Domo, Zwolle, Holanda), contendo aproximadamente 45% GOS, 15% lactose e 14% glicose (ANTHONY, MERRIMAN & HEIMBACH, 2006) e os GOS produzidos pelo fungo *Scopulariopsis* sp., ATCC n°44206, tem uma composição similar aos produtos comerciais, sendo em média: 28% de tri e tetrassacarídeos, 50% de lactose, 15% de glicose e 7% de galactose.

3.2. Ensaio *in vitro*

A doxorubicina (Europharma, Brasil), utilizada como controle positivo, demonstrou potencialidade elevada e seletividade, com inibição de crescimento para todas as linhagens de células tumorais humanas testadas (Figura 3). A sulforrodamina B é um corante protéico que se liga aos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação, por isso, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade citotóxica da amostra em teste.

As concentrações de GOS foram avaliadas quanto a sua atividade antiproliferativa em painel de células tumorais humanas (Tabela 1).

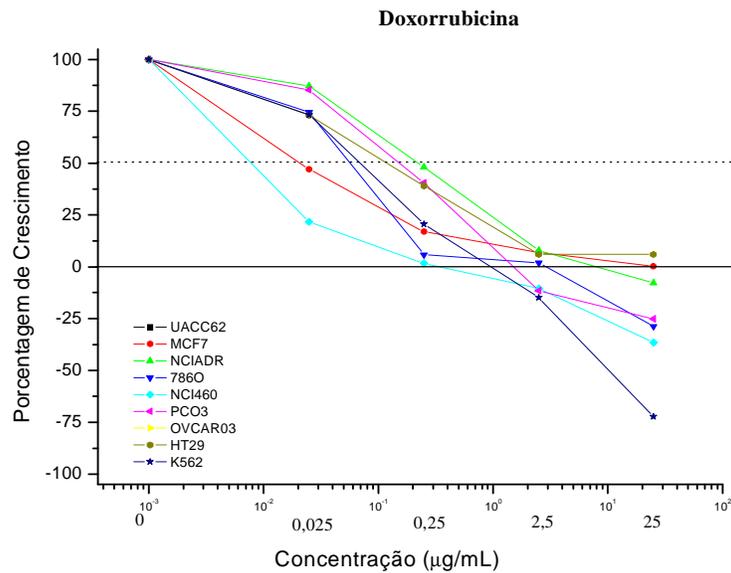


Figura 3. Porcentagem de crescimento das linhagens de células tumorais na presença de doxorubicina, nas concentrações de 0,025 a 25µ/mL.

GOS na presença e ausência de fitohemaglutinina, foi avaliado quanto a atividade antiproliferativa em nove linhagens de células tumorais humanas. Os resultados obtidos (Figuras 4 e 5) demonstram que GOS não interferem na proliferação celular.

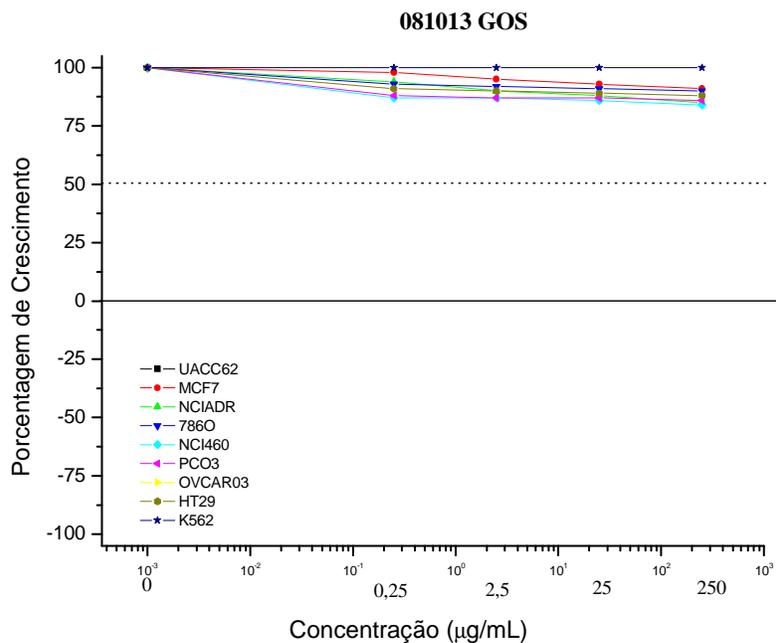


Figura 4. Porcentagem de crescimento das linhagens de células tumorais na presença de GOS, nas concentrações de 0,25 a 250µ/mL..

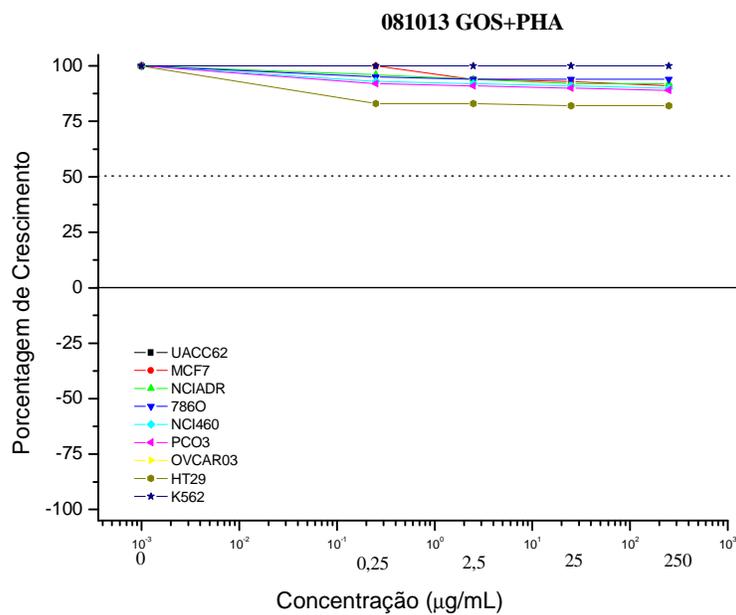


Figura 5. Porcentagem de crescimento das linhagens de células tumorais na presença de GOS nas concentrações de 0,25 a 250µ/mL.e fitohemaglutinina (3,75 µg/mL).

Para a linhagem HT-29 (adenocarcinoma de cólon), tanto GOS quanto a mistura GOS com fitohemaglutinina promoveram uma ligeira redução no crescimento celular, concentração dependente, porém não foram capazes de reduzir em pelo menos 50% esse crescimento (Figura 6).

O trabalho desenvolvido por Gibson *et al.* (2007) utilizou uma mistura de oligossacarídeos com objetivo de avaliar a aderência das linhagens *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* na célula HT 29 (adenocarcinoma de cólon). Neste trabalho, os autores demonstraram também, que a mistura de oligossacarídeos (GOS) não é tóxica para as células HT 29.

Esses resultados sugerem que os GOS produzido a partir de *Scopulariopsis* sp., nestas concentrações de oligossacarídeo, não tem ação direta na proliferação de células tumorais testadas, sugerindo outros mecanismos de ação para os efeitos benéficos do uso de GOS por pacientes com câncer.

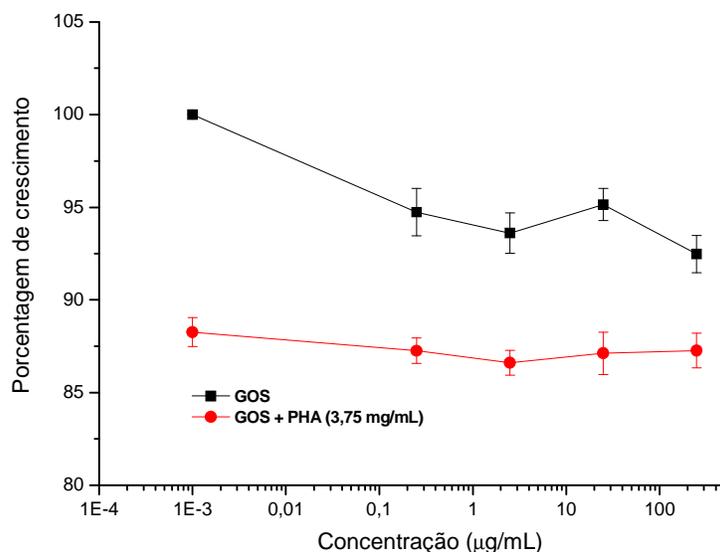


Figura 6. Porcentagem de crescimento da linhagem HT-29, na presença de GOS (0,25 a 250 µg/ml) na presença ou ausência de fitohemaglutinina (3,75 µg/mL).

3.3. Medida da Produção de Citocinas por ELISA

A função clássica descrita para IFN- γ é ativar genes MHC (complexo principal de histocompatibilidade) e macrófagos, agindo sobre células B, células endoteliais e sobre os próprios macrófagos. Em adição, tem sido atribuída a capacidade de inibir o crescimento celular, induzir apoptose e ser um importante fator antiviral. Sua potente ação antiproliferativa em tumores epiteliais é bastante estudada. Sua ação tem sido atribuída tanto por efeito direto como de forma indireta por imunomodulação. Estudos *in vitro* e *in vivo* em câncer de ovário confirmam a atividade antiproliferativa direta do IFN- γ (BOEHM *et al.*, 1997; KALVAKOLANU, 2000; ALBERTS *et al.*, 2002; WALL *et al.*, 2003). Com base nos dados de literatura, foi realizado o teste de ELISA para IFN- γ a fim de investigar se houve produção dessa citocina com atividade antiproliferativa tão importante. A Figura 8 mostra o que ocorreu com todas as linhagens estudadas e que não houve diferença estatística significativa entre as condições experimentais estudadas em relação a concentração de IFN- γ , indicando não ter ocorrido estimulação da produção dessa citocina. Porém, o fato de não haver estímulo a produção de IFN- γ não indica que não houve produção de citocinas, mas sugere que o IFN- γ não seja o marcador mais indicado para as linhagens utilizadas. Assim, em experimentos futuros poderiam ser testadas outras citocinas, como as interleucinas, para verificar se o GOS interfere na produção desses compostos.

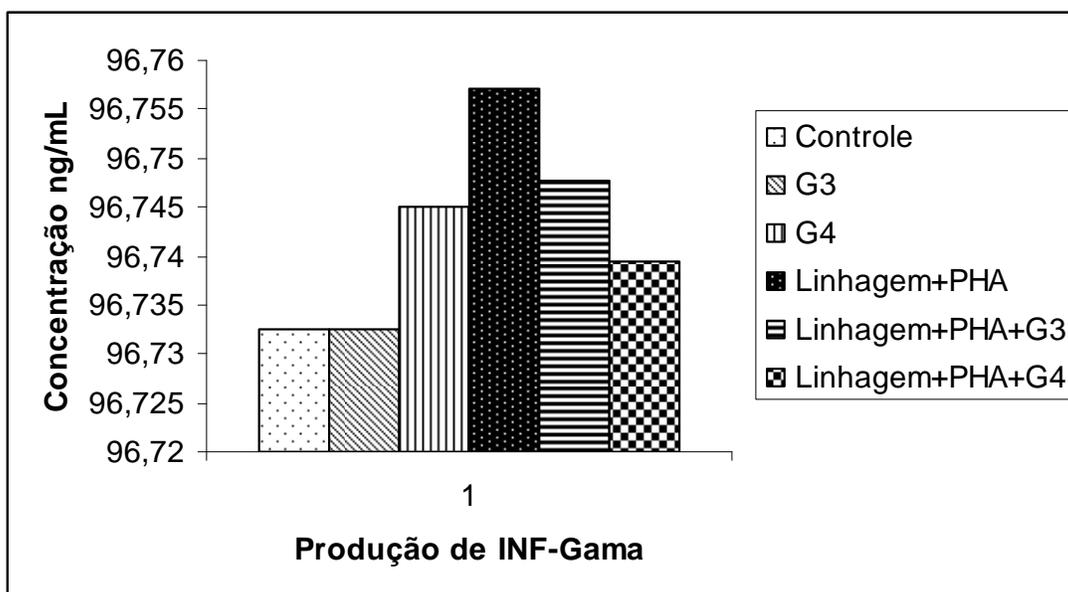


Figura 8. Produção de IFN- γ por células da linhagem K562 (Leucemia).

G3 e G4: maiores concentrações utilizadas.

G3: concentração de 25 μ g/mL de GOS

G4: concentração de 250 μ g/mL de GOS

4. CONCLUSÃO

Foi possível observar neste trabalho que a linhagem de *Scopulariopsis* sp. teve bom crescimento no meio semi-sólido e que o farelo de trigo usado é de grande interesse para cultivo do *Scopulariopsis* sp. por ser um subproduto da indústria de alimentos, com baixo valor agregado.

Observou-se ainda que somente a linhagem HT-29 (adenocarcinoma de cólon) apresentou indícios de sensibilidade ao GOS principalmente na presença de fitohemaglutinina, mas ainda assim, esse prebiótico não foi capaz de reduzir em pelo menos 50% o crescimento das células tumorais. Além disso não houve diferença significativa entre as linhagens estudadas em relação a concentração de IFN- γ , sugerindo que os efeitos benéficos destes prebióticos seguem outros mecanismos de ação.

Novos estudos se fazem necessários a fim de investigar quais são os mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos benéficos dos GOS, mostrando que esta linha de pesquisa é bastante promissora e está em plena expansão.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA/UNICAMP e ao Centro de investigação em pediatria – CIPED pela colaboração.

Ao CNPq pelo financiamento concedido através do processo N.º 140599/2007-0.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.;
Molecular Biology of the Cell. Fourth Edition. New York: *Taylor & Francis Group*,
2002.

ALMEIDA, M. M. *Síntese de Galactooligossacarídeos por β -galactosidase de Scopulariopsis sp a partir de lactose*. 2003. 145f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2003.

ANTHONY, J. C.; MERRIMAN, T. N.; HEIMBACH, J. T. 90-Day oral (gavage) study in rats with galactooligosaccharides syrup. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, p. 819-826, 2006.

BARROS, D. S. *Probiótico e prebiótico na ração de matrizes suínas e seu efeito sobre a leitegada e intervalo desmama estro*. 2007. 66f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Mato Grosso. Cuiabá, 2007.

BOEHM, U.; KLAMP T.; GROOT, M.; HOWARD, J. C. Cellular responses to *interferon-gamma*. *Annual Review of Immunology*, v. 15, p. 749-795, 1997.

CALICH, V.; VAZ, C. *Imunologia*. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Reninter Ltda, 2003.

CLOSE, W. H. Producing Pigs without Antibiotic Growth Promoters. *Advances in Pork Production*, Barkham, UK, v.11, p. 47, 2000.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, v. 7, n. 11, p. 353-361, 1996.

FANARO, S. R.; SACCOMANDI, D.; VIGI, V. Advances in the modulation of the microbial ecology of the gut in early infancy. *Acta Paediatrica*, v. 441, p. 56-63, 2003.

GAUR, R., PANT, H., JAIN, R., KHARE, S. K. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry*, v. 97, n. 3, p. 426-430, 2006.

GIBSON, G. R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *Journal of Nutrition*, v. 129, p. 1438S-1441S, 1999.

GIBSON, G.; SLUPINSKI, J. W.; TZORTZIS, G.; WYNNE, A. G. Novel galactooligosaccharide composition and the preparation thereof. Int.Cl.A61K 35/74(2006.01), Int.Cl.A61P 1/14(2006.01) US 2007/0274955. 29 nov. 2007. Patent Application Publication, United States.

JUNG, S. J.; LEE, B. H. Production and application of galacto-oligosaccharides from lactose by a recombinant β -galactosidase of *Bifidobacterium infantis* overproduced by *Pichia pastoris*. *Food Science and Biotechnology*, v. 17, n. 33, p. 514-518, 2008.

JYONOUCHI H.; SUN S.; IJIMA K.; GROSS, M. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutrition and Cancer*, v. 36, n. 1, p. 59-65, 2000.

KALVAKOLANU D. V. Interferons and cell growth control. *Histology and Histopathology*, v. 15, n. 2, p. 523 -537, 2000.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T.; CUMMINGS, J.H. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, v. 24, p. 701-714, 2006.

MENTEN, J. F. M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 38, 2001. Piracicaba, CD-ROM p.141-157, 2001.

MENDES, A. S. *Otimização, Isolamento, Identificação e Atividade Antiproliferativa da Violaceína obtida por Processo Fermentativo*. 2002. 153f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.

MODLER, H. W. Bifidogenic factors – Sources,metabolism and applications. *International Dairy Journal*, v. 4, p. 383-407, 1994.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

MORENO, Y. M. F. Proliferação Celular e Citocinas BCG específicos em crianças com AIDS: efeito de suplementos nutricionais. 205f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

PASTORE, G.M.; PARK, Y. K. Screening of high β -galactosidase producing fungi and characterizing the hydrolysis properties of a selected strain. *Journal Food Science*, v.4, n. 6, p. 1577-1579, 1979.

PASTORE, G. M. *Produção, purificação, estudos das propriedades e aplicação da β -galactosidase de Scopulariopsis sp.* Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1982.

PENDERS, J.; THIJIS, C.; VINK, C.; STELMA, F.F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I.; BRANDT, P.A.; STOBBERINGH, E.E. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Pediatrics*, v. 118, p. 511-521, 2006.

RABIU, B. A.; JAY, A. J.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Synthesis and Fermentation Properties of Novel Galacto-Oligosaccharides by β -Galactosidases from Bifidobacterium Species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 6, p. 2526-2530, 2001.

ROBERFROID M. Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*, v. 137, n. 3S, p. 830S-837S, 2007.

ROLLER, M.; RECHKEMMER, G.; WATZL, B. Prebiotic Inulin Enriched with Oligofructose in Combination with the Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* Modulates Intestinal Immune Functions in Rats. *Journal of Nutrition*, v. 134, p. 153-6, 2004.

SACOMAN, J. L. *Atividade Anticâncer e mecanismo de morte celular dos extratos brutos e frações de Anacardium humile St. Hil. (ANACARDIACEAE) e Pothomorphe umbellata (L.) Miquel (PIPERACEAE).* 2007. 124f. Dissertação

(Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.

SACOMAN, J. L.; MONTEIRO, K. M.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA, G. M.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J.E. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 41, p. 411-415, 2008.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*, v. 9, p. 69-80, 1999.

SANCHES, A. L. *Probiótico, Prebiótico e Simbiótico em rações de leitões ao desmame*. 2004. 63f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

SANTOS, R. Produção de galactooligossacarídeo por lactase fúngica. 2006. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.

SCHWARTSMANN, G.; WINOGRAD B.; PINEDO, H. M. The main steps in the development of anticancer agents. *Radiotherapy and Oncology*, v. 12, p. 301-313, 1988.

SILVA, A. B. A. *Influência do jejum alimentar, probióticos e antibióticos na população de enterobactérias, bactérias ácido lácticas, Bacillus e Salmonella sp. em cecos e papos de frangos de corte*. 2006. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP, Piracicaba. 2006.

SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na alimentação de não ruminantes. *Ciência Rural*, v. 33, n. 5, p. 983-990, 2003.

SHADID, R.; HAARMAN, M.; KNOL, J.; THEIS, W.; BEERMANN, C.; RJOSKDENDORFER, D.; SCHENDEL, D. J.; KOLETZKO, B. V.; KRAUSSETSCHMANN, S. Effects of galactooligosaccharide and long-chain fructooligosaccharide supplementation during pregnancy on maternal and neonatal microbiota and immunity—a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 86, p. 1426-37, 2007.

TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. *Food Technology*, v. 48, n. 10, p. 61-65, 1994.

TZORTZIS, G.; GOULAS, A. K.; GEE, J. M.; GIBSON, G. R. A Novel Galactooligosaccharide Mixture Increases the Bifidobacterial Population Numbers in a Continuous *In vitro* Fermentation System and in the Proximal Colonic Contents of Pigs *In vivo*. *The Journal of Nutrition*, v. 135, p. 1726-1731, 2005.

UTIYAMA, C. E. Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extratos vegetais como promotores de crescimento de leitões desmamados. 2004. 110f. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP, Piracicaba. 2004.

VASCONCELLOS, M. C. B. L. M. *Atividade antitumoral, isolamento e identificação dos princípios ativos da Kielmeyera coriácea Mart & Zucc.* 2008. 100f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2008.

YOUNES, R. N. Tratamentos alternativos e complementares em câncer. In: Bases da Oncologia/Brentani M.M. *et al.* 2ª ed. São Paulo: Lemar Livraria; Editora Marina e Tecmedd Editora, 2003.

WALL, L.; BURKE, F.; SMYTH, J. F.; BALKWILL, F. The Antiproliferative Activity of *Interferon-gamma* on Ovarian Cancer: *In vitro* and *In vivo*. *Gynecologic Oncology*, v. 88, p. 149-151, 2003.

CAPÍTULO IV

EFEITO DE GALACTOOLIGOSACARÍDEO PRODUZIDO A PARTIR DE *SCOPULARIOPSIS* SP. NO CRESCIMENTO DAS LINHAGENS PROBIÓTICAS E O EFEITO DESSES METABÓLITOS EM CÉLULAS TUMORAIS, SOB CONDIÇÕES *IN VITRO*.

RESUMO

Os prebióticos influenciam a composição da microbiota intestinal exercendo efeitos benéficos sobre a saúde, como atividade anticarcinogênica, que pode ser pela ação direta dos prebióticos, ação das linhagens bacterianas estimuladas ou ainda, decorrente dos produtos da fermentação bacteriana. O objetivo desse estudo foi investigar se os galactooligosacarídeos (GOS) obtidos de β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. possuem efeito prebiótico sobre *Lactobacillus acidophilus* (LA05) e *Bifidobacterium animalis* (Bb12) e avaliar a atividade antiproliferativa desses metabólitos em cultura de células tumorais humanas. O meio MRS (Man, Rogosa & Shape) foi modificado pela supressão da fonte de carbono (MRS mínimo), pela suplementação com frutooligosacarídeos (MRS+FOS) (utilizados como controles) ou com GOS (7%) (MRS+GOS). Os meios controle e teste foram inoculados com $9,2 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹, encubados à 37°C por 12 horas. A enumeração de células viáveis foi realizada em Ágar MRS, seguido de incubação anaeróbica a 37°C por 24 h. Após análise da atividade bifidogênica, os meios MRS-mínimo e MRS+GOS foram avaliados *in vitro* frente às células tumorais humanas [melanoma (UACC-62), mama (MCF-7), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), cólon (HT-29), rim (786-0), ovário (OVCAR-03) ovário resistente a fármacos (NCIADR/RES) e leucemia (K562)], em concentrações entre 0,25 e 250 μ g/mL, utilizando-se a doxorrubicina como controle positivo. Os resultados obtidos mostram que o GOS possui atividade prebiótica sobre cultura de LA05 e, esta atividade é comparável à atividade

prebiótica do FOS. O GOS não possui atividade antiproliferativa direta, capacidade de reduzir em pelo menos 50% o crescimento das linhagens celulares. O MRS-mínimo apresentou atividade antiproliferativa com efeito citocida para as seguintes linhagens (UACC-62, MCF-7, NCI-ADR/RES, 786-0, NCIH460 e HT-29) enquanto que o meio de cultura acrescido com GOS apresentou efeito citocida apenas para duas células tumorais avaliadas (UACC-62 e HT-29). Os resultados obtidos sugerem que os metabólitos bacterianos provenientes da linhagem LA05 cultivado em meio sem fonte de carboidrato exercem efeito anticarcinogênico e, que o prebiótico GOS provavelmente reduz a produção desses compostos.

Palavras-chave: galactooligossacarídeo, *efeito bifidogênico*, *Lactobacillus acidophilus* *Bifidobacterium animalis*

ABSTRACT

The prebiotics influence the composition of intestinal microbiota exerting beneficial effects on health as anticarcinogenic activity, which may be a direct action of prebiotics, an action of specific bacterial strains or resulting by products of bacterial fermentation. The aim of this study was to investigate if the galactooligosaccharides (GOS) obtained from β -galactosidase from *Scopulariopsis* sp. have prebiotic effect on *Lactobacillus acidophilus* (LA05) and *Bifidobacterium animalis* (Bb12) and evaluate the antiproliferative activity in cultured human tumor cells. The MRS medium (Man, prayers & Shape) was modified by removing the carbon source (MRS minimum). Testing groups received a supplementation with fructooligosaccharides (FOS + MRS) (used as controls) or GOS (7%) (MRS + GOS). The medium test and control were inoculated with LA05 or Bb12 9.2×10^6 UFC.mL⁻¹, incubated at 37°C, for 12 hours. The medium of viable cells was performed on MRS agar, followed by anaerobic incubation at 37°C for 24 hours. After examination of the prebiotic activity, samples of minimum-MRS and MRS + GOS were evaluated *in vitro* against 9 human tumor cell lines [melanoma (UACC-62), breast (MCF-7), lung (NCI-H460), prostate (PC-3), colon (HT-29), kidney (786-0), ovarian (OVCAR-03) ovarian cancer resistant to drugs (NCIADR / RES) and leukemia (K562)] at concentrations between 2.5 and 25000 μ g/mL, using doxorubicin as positive control. The results show that the GOS has prebiotic activity on LA05 and this activity is comparable to that observed for prebiotic FOS. The GOS has no direct antiproliferative activity, ability to reduce by at least 50% growth of cell lines. The minimum-MRS showed antiproliferative activity with cytotoxic activity for the lines UACC-62, MCF-7, NCI-ADR/RES, 786-0, NCIH460 and HT-29, while the culture medium supplemented with GOS showed cytotoxic activity only for two tumor cell evaluated (UACC-62 and HT-29). The results suggest that bacterial metabolites from LA05 cultured in minimum medium exert anticarcinogenic effect and the prebiotic GOS supplementation probably reduced their production.

Key words: galactooligosaccharide, bifidogenic *effect*, *Lactobacillus acidophilus*
Bifidobacterium animalis

1. INTRODUÇÃO

Um bom equilíbrio da microbiota intestinal se faz necessário para a saúde digestiva e para estímulo ao desenvolvimento do sistema imune, enquanto que o mau desempenho, a susceptibilidade a infecções e diminuição do ritmo de crescimento da flora intestinal podem ser sinais de uma microbiota em desequilíbrio. Estratégias alimentares para estabelecer e manter um melhor equilíbrio da microbiota inclui prebióticos (oligossacarídeos não digeríveis utilizado para estimular a atividade e/ou crescimento dos probióticos) e probióticos (micro-organismos benéficos capazes de modular algumas características da fisiologia digestiva quando administrado em quantidades adequadas). Estudos mostram que os benefícios do consumo de prebióticos e probióticos incluem a prevenção da diarreia, diminuição da mortalidade, o estabelecimento de um equilíbrio de uma microbiota saudável e função imunológica melhorada (PENDERS *et al.*, 2006; SHADID *et al.*, 2007; CZARNECKI-MAULDEN, 2008).

O crescimento de bactérias benéficas no intestino grosso desempenha um papel importante na resistência à colonização de bactérias patogênicas. Este crescimento pode ser definido como mecanismos pelos quais a microbiota colônica se protege contra a invasão de micro-organismos patógenos, desempenhando assim um papel importante na homeostase. Pouco se conhece sobre este fenômeno, mas é provável que muitas espécies diferentes, incluindo os lactobacilos e bifidobactérias estejam envolvidas (LIÉVIN *et al.*, 2000).

Atualmente, há um grande interesse em compreender como a microbiota do cólon pode ser modulada, principalmente através da dieta e, cada vez mais, o uso de prebióticos tem se destacado, seja através do consumo *in natura* de frutas, verduras e raízes ou prebióticos comerciais.

Os alimentos capazes de atingir grupos específicos de micro-organismos no intestino grosso estão sendo destacados como sendo de valor significativo para a saúde. Os fatores especialmente importantes neste contexto, são a taxa na qual um organismo pode crescer em uma fonte de carbono especial, pois isso irá

influenciar sua capacidade de competir com outras bactérias no cólon, e a medida que o substrato é convertido em massa celular, pois o tamanho da população de células irá afetar o grau de atividade tanto dos prebióticos como dos probióticos (MACFARLANE, STEED & MACFARLANE, 2008).

Roberfroid (2007) sugere alguns critérios analisados *in vitro* e *in vivo* para definição de um prebiótico. São eles a resistência à acidez gástrica, hidrólise enzimática e absorção gastrointestinal; fermentação pela microbiota intestinal e o estímulo seletivo ao crescimento e/ou atividade dessas bactérias intestinais. Segundo esses critérios somente dois tipos de oligossacarídeos são considerados atualmente como prebióticos, os fructooligossacarídeos (FOS) e os galactooligossacarídeos (GOS).

Os GOS são sintetizados enzimaticamente pela ação da β -galactosidase sobre a lactose. Esta enzima age como uma enzima hidrolítica e também como uma enzima de condensação (reação de transgalactosilação) e o produto final pode ser formado por di-, tri-, tetra- ou de pentassacarídeos, constituídos principalmente de unidades de galactose ligadas à lactose (TOMOMATSU, 1994; SANTOS, SIMIQUELI & PASTORE, 2009).

Evidências sugerem que *B. adolescentis* e *B. longum* predominam na maior parte dos adultos, enquanto *B. breve* e *B. infantis* são as principais espécies colonizadoras do intestino infantil (MITSUOKA, 1984; SCARDOVI, 1986). Bifidobactérias, juntamente com algumas espécies de lactobacilos, desempenham um importante papel na microbiota colônica. Estes organismos têm sido associados ao aumento da resistência a infecções e doenças diarréicas (YAMAZAKI *et al.*, 1985; GORBACH *et al.*, 1987; TOJO *et al.*, 1987; SAAVEDRA *et al.*, 1994), estimulação da atividade do sistema imune (SEKINE *et al.*, 1985; KIRJAVAINEN *et al.*, 2002), bem como proteção contra o câncer (SEKINE *et al.*, 1994; MACFARLANE, STEED & MACFARLANE, 2008).

Estudos envolvendo alimentação com voluntários humanos demonstram claramente que o número de bifidobactérias no cólon pode ser aumentado por fructooligossacarídeos (FOS) e GOS (ITO *et al.*, 1990; GIBSON & ROBERFROID,

1995). Rycroft *et al.* (2001) realizaram um estudo comparando os efeitos bifidogênicos, através das propriedades de fermentação *in vitro* de oligossacarídeos comerciais, tais como, FOS, inulina, GOS, isomaltooligossacarídeos (IMO), xilooligossacarídeos (XOS), lactulose e oligossacarídeos de soja (SOS). Estes autores avaliaram populações de bactérias predominantes do intestino, monitoradas por 24h através da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (ISH), produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e gás. Todos os prebióticos aumentaram o número de bifidobactéria e diminuíram os clostrídios. Os XOS e lactulose promoveram efeito positivo no crescimento celular das bifidobactérias enquanto os FOS estimularam a produção de lactobacilos. O GOS resultou em maiores quedas no número de clostrídios. A produção de AGCC foi maior quando utilizado lactulose e GOS. A produção de gás foi menor em IMO e maior com inulina. Estes resultados indicam que, os prebióticos diferenciaram em suas características de fermentação, com destaque para os prebióticos IMO e GOS que foram eficazes no aumento do número de bifidobactéria e geração de lactato.

Biagi *et al.* (2007), realizaram um estudo que avaliou o efeito *in vitro* e *in vivo*, de *Lactobacillus animalis* LA4 (isoladas das fezes de cão adulto saudável) sobre a composição e metabolismo da microflora intestinal de cães. Estes verificaram que as contagens de *Enterococos* diminuíram, os *Lactobacillus* aumentaram, e as de *C. perfringens* foram significativamente reduzidos em 24 h. Após 8 h de incubação, *L. animalis* reduziu a amônia e aumentou as concentrações de ácido láctico. Para o estudo *in vivo*, nove cães adultos receberam o liofilizado de *L. animalis* por 10 dias. No décimo primeiro dia, os *Lactobacillus* fecais foram superiores ao início do ensaio (6,99 logUFC/g versus 3,35 logUFC/g de fezes) e os *enterococos* fecais mostraram uma tendência de redução ($p=0,08$). *L. animalis* foi recuperada em todas as amostras fecais coletadas do décimo primeiro até o décimo quinto dia. Os resultados mostram que LA4 conseguiu sobreviver à passagem gastrointestinal e transitoriamente colonizar o intestino dos cães e, com base nos resultados *in vitro*, influenciar positivamente

a composição e metabolismo da microbiota intestinal. Estes resultados sugerem que *L. animalis* - LA4 pode ser considerada uma linhagem com potencial probiótico para cães.

Kajiwara, Gandhi & Ustunol (2002) testaram cinco tipos de bifidobactérias intestinais do ser humano, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. bifidum*, e *B. infantis*, os quais foram cultivados no meio clostridial reforçado (controle) e no meio clostridial reforçado suplementado com 5% (p/v) de mel, ou FOS, ou GOS ou inulina. As amostras inoculadas foram incubadas anaerobicamente a 37°C por 48h. Os níveis de produtos de fermentação de tais como, ácidos láctico e acético, foram medidos por cromatografia líquida de alta eficiência. O mel, o FOS, o GOS e a inulina foram eficazes ($p < 0,05$) em sustentar o crescimento destas culturas, após 24h de incubação, em comparação ao tratamento controle. Estes dados indicam que a escolha das substâncias prebióticas para utilização em produtos alimentares deve ser feitas com o objetivo final de maximizar os benefícios potenciais para a saúde, minimizando os efeitos colaterais indesejáveis.

Em relação aos agentes hoje conhecidos com ação sobre o câncer estão classificados em dois grupos. O primeiro é constituído por drogas que inibem a iniciação do processo carcinogênico e o segundo, por drogas que inibem a proliferação celular durante as fases de promoção e progressão do câncer (CARVALHO, 2006). Muitos agentes do primeiro grupo estão relacionados com os alimentos funcionais, dentre eles os prebióticos.

Os GOS são metabolizados no trato gastrintestinal, por espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* com a conseqüente liberação dos AGCC, que em proporções apropriadas exercem um efeito positivo na prevenção de câncer de colon.

O aprimoramento da metodologia de triagem de compostos com atividade antiproliferativa se fez a partir da necessidade de se desenvolver estudos relacionados com células originárias de câncer humano. Com isso, o Instituto Nacional do Câncer, dos Estados Unidos, desenvolveu um painel de células cancerígenas que, atualmente, conta com 60 linhagens oriundas de oito tipos de

tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário, cérebro) e do sistema hematopoiético (leucemia). Os testes de citotoxicidade *in vitro*, os quais direcionam a pesquisa para moléculas com potencial de matar células neoplásicas em cultura são os mais amplamente utilizados (HOLBECK, 2004). Esse tipo de análise, por ter condições de avaliar grande número de substâncias em pouco tempo, aumenta a possibilidade para descoberta de novas drogas anticâncerígenas. Além disso, é uma técnica relativamente simples, barata, reproduzível e, ainda, providencia um provável mecanismo de ação da droga (CARVALHO, 2006; MARCHETTI, 2008).

Gibson *et al.* (2007), utilizaram *Bifidobacterium bifidum*, que foi utilizada para produção de GOS. Os autores ainda utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para posterior fermentação dos monossacarídeos. A mistura de oligossacarídeo resultante compreendia 20–35% de dissacarídeos, 20–35% de trissacarídeos, 15–25% de tetrassacarídeos e 10–25% de pentassacarídeos. Neste trabalho também foi avaliada *in vitro*, a aderência das linhagens *Echerichia coli* e *Salmonella typhimurium* na célula HT29 (adenocarcinoma de cólon), concluiu-se com este ensaio, que esta mistura de oligossacarídeo (GOS) não é tóxica para as células HT29.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial do galactooligossacarídeo (GOS) produzido por *Scopulariopsis* sp. no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* LA05 e *Bifidobacterium animalis* Bb12, ambas linhagens fornecidas pela Christian Hansen, e o efeito dos metabólitos produzidos por LA05 na presença e ausência de GOS em células tumorais humanas *in vitro*. O GOS utilizado neste trabalho foi obtido no Laboratório de Bioaromas da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, através de processo fermentativo, sendo composto de 28% de tretrassacarídeos, conforme descrito por Santos (2006).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Produção de Galactooligossacarídeo

A produção de galactooligossacarídeos foi realizada sob agitação constante, utilizando a β -galactosidase a partir do extrato bruto de *Scopulariopsis* sp., com concentração de 10U.mL⁻¹ em solução de lactose a 40% (p/v), preparada em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0. Essa mistura foi incubada a 45°C por 9 h. A reação foi paralisada em banho fervente, a 100°C, por 10 minutos. As amostras foram analisadas quantitativamente por CLAE.

Visando ter um produto livre de impurezas e compostos coloridos, foi adicionado 2mg de carvão ativado para cada 100mL de solução de GOS. A solução foi mantida em um recipiente livre de luz e em seguida, filtrada com papel Whatman nº 1, utilizando um sistema à vácuo. A solução de GOS foi concentrada, até 55° Brix em Evaporador rotativo (Tecnal), à temperatura de 70°C. Essa concentração facilitou sua manipulação e aplicação industrial, por ter viscosidade adequada e inibir o crescimento bacteriano. (PASTORE, 1982; SANTOS, 2006)

2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os produtos obtidos a partir da fermentação da lactose pela β -galactosidase foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando um Cromatógrafo Líquido Waters, coluna KS 801 (300 X 7,8mm), detector Differential Refractometer Waters 410 e água ultra pura como solvente, e um fluxo de 0,5 mL/min a 70°C. Foram aplicados 20 μ L das amostras e das soluções padrões, preparadas a 10 % (p/v). Os carboidratos foram detectados pelo índice de refração e identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões de glicose, galactose, lactose e 4'galactosil-lactose (tetrassacarídeo), segundo metodologia modificada descrita por Santos (2006).

2.3. Avaliação da Atividade Bifidogênica

Foram avaliadas as bactérias probióticas *Lactobacillus acidophilus* – LA05 e *Bifidobacterium bifidum* – Bb12. Estas linhagens comerciais foram gentilmente

cedidas pela empresa Christian Hansen Ind. e Com. Ltda. Para a determinação da taxa de crescimento dos probióticos foi utilizado 2mL de cada cultura probiótica (em concentração que foram pré-determinadas) em 20 mL de meio mineral. Em seguida, as culturas foram incubadas em estufa específica a 37°C durante 12 h, sob condições anaeróbicas. O meio ágar MRS (Man, Rogosa & Shape) foi utilizado para o crescimento e quantificação das linhagens. As amostras foram acrescentadas em sucessivas diluições e incubadas em condições anaeróbicas por 12 h. Foi formulado o meio MRS sem fonte de carbono como controle e o padrão utilizado foi frutooligossacarídeo comercial (controle positivo). A quantificação foi realizada através da contagem total, entre 30 e 300 colônias, e o resultado foi obtido através das médias das triplicatas de cada amostra. Foram realizadas contagens nos períodos de 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h. O trabalho foi realizado em parceria com o Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios – TECNOLAT, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, Campinas, SP).

2.4. Avaliação do pH

As culturas probióticas foram acompanhadas por 12 h, e o pH foi medido a cada 4 h, utilizando potenciômetro (MICRONAL B474, Brasil), seguindo algumas adaptações conforme a metodologia descrita por Menezes (2007).

2.5. Efeito antiproliferativo de células tumorais

Após análise da atividade prebiótica, os meios MRS-mínimo e MRS+GOS foram avaliados *in vitro* frente linhagens tumorais humanas. O ensaio de atividade antiproliferativa consistiu em inocular 100µmL/compartimento, em placas de 96 poços (Nunc®), de uma suspensão celular com densidade celular entre 3×10^4 e $6,5 \times 10^4$ cel/mL meio RPMI 1640, acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina: estreptomicina (1000mg/mL:1000 U/mL, 1mL/L). Foi preparada também uma placa, denominada T₀, onde cada linhagem celular foi inoculada em apenas seis poços (100µL/compartimento), o que permitiu colocar todas as linhagens testadas em uma única placa. Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida

com 5% de CO₂, os meios MRS-mínimo e MRS+GOS foram adicionados às culturas em quatro concentrações distintas (0.25; 2.5; 25 e 250 µg/mL). Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina nas mesmas concentrações dos GOS.

Tabela 1. Painel das condições experimentais realizadas para avaliar o efeito do GOS sobre linhagens celulares.

Condição experimental	Descrição
Controle Negativo	Linhagens celulares ¹ + meio de cultura
MRS-mínimo ²	Linhagens celulares + GOS (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL)
MRS + GOS ³	Linhagens celulares + PHA + GOS (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL)

¹Linhagens celulares utilizadas foram: K562 (Leucemia); NCI-H460 (Pulmão), MCF-7 (Mama), NCI-ADR/RES (Ovário), UACC-62 (Melanoma), 786-O (Renal), HT-29 (Cólon), OVCAR-3 (Ovário) e PC-3 (Próstata);

²MRS-mínimo: Meio de cultura MRS sem dextrose

³GOS: galactooligossacarídeo;

Imediatamente após inocular as amostras nas placas teste, a placa T₀ foi fixada com 50µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% e mantida por 1h a 4°C; em seguida, ela foi lavada quatro vezes com água e deixada para secar a temperatura ambiente. Esta placa indicou a quantidade de células presentes nas placas teste no momento da inoculação das amostras. Ao final de 48h de incubação, os sobrenadantes das culturas foram coletados e após, as células foram fixadas com 50µL/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% e as placas teste foram incubadas por 1h a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários.

Depois de completamente secas, à temperatura ambiente, todas as placas foram coradas com 50µL/compartimento de SRB 0,4% (p/v, em ácido acético 1%) e mantidas por 60 min a 4°C. Em seguida, foram lavadas, quatro vezes, com ácido acético 1% e secas a temperatura ambiente. Finalmente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma®, 10mM, pH 10,5). A

leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540nm em leitor de microplacas (MONKS *et al.*, 1991).

2.6. Cálculo do crescimento celular

Com os valores médios de absorbância para cada concentração das amostras, a porcentagem de crescimento foi calculada segundo as seguintes fórmulas:

Se $T > T_1 \rightarrow$ estímulo de crescimento celular

Se $T \geq T_0 < T_1 \rightarrow$ atividade citostática: $\%C = 100 \times [(T-T_0)/(T_1-T_0)]$

Se $T < T_0 \rightarrow$ atividade citocida: $\%C = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$

Onde:

T = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula

T_1 = absorbância do branco de células.

T_0 = absorbância do controle de células na placa T_0 .

Foram gerados gráficos de porcentagem de crescimento versus concentração para cada uma das linhagens testadas, e a concentração efetiva denominada TGI (do inglês *total growth inhibition*, concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento celular). Foi calculada por regressão não linear, tipo sigmoideal, utilizando-se software Origin 7.5. (MONKS *et al.*, 1991).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção de Galactooligossacarídeo

Para a produção de GOS foram utilizados 40%(w/v) de solução de lactose (em 0,1M de tampão acetato de sódio), a concentração de enzima para a síntese de GOS foi de 10U/mL, seguindo as condições ótimas de produção de enzima para o *Scopulariopsis* sp., a temperatura de atividade de galactosiltransferase foi de 45°C, pH 5.0. O GOS era composto de composto de 28% de tetrassacarídeos, 50% de lactose, 15% de glicose e 7% de galactose.

3.2. Influência dos prebióticos no crescimento das linhagens

Como observado na Figura 1, o efeito bifidogênico do GOS para a linhagem LA05 foi demonstrado pelas diferenças observadas entre as contagens iniciais e finais (Δ LogUFC.mL⁻¹). A contagem inicial e final de MRS+GOS atingiu 6,9 log e 10,88 log UFC, respectivamente, e para MRS+FOS 11,10 log UFC. Já no meio controle as contagens mantiveram-se estáveis por todo o período de 12h.

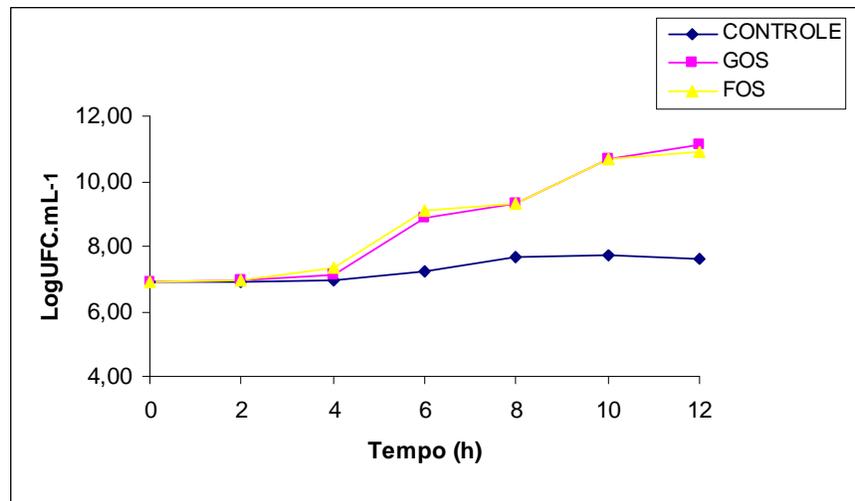


Figura 1: Curva de crescimento para *Lactobacillus acidophilus* (LA05), nos meios controle, GOS e FOS.
CONTROLE: MRS mínimo (sem fonte de dextrose); GOS: galactooligossacarídeo e FOS: frutooligossacarídeo.

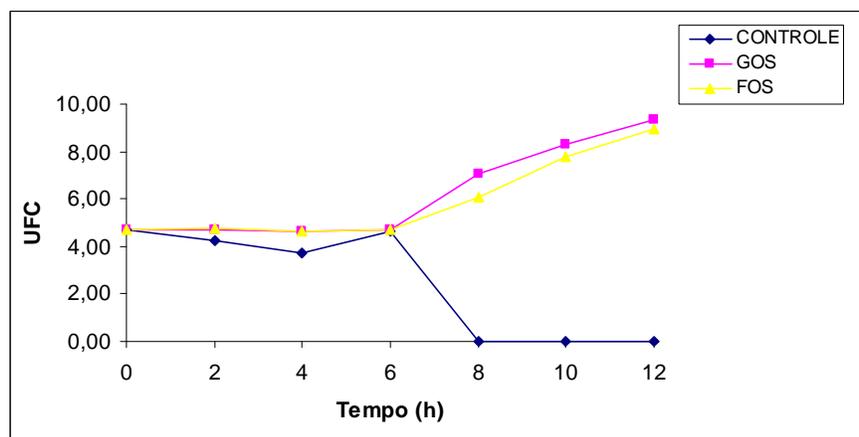


Figura 2: Curva de crescimento *Bifidobacterium animalis* (Bb12), para o controle, GOS e FOS, sendo CONTROLE: MRS sem fonte de dextrose; GOS: galactooligossacarídeo; FOS: frutooligossacarídeo.

Para a linhagem Bb12 inicial foi de 4,72 log sendo que a final de MRS+GOS atingiu 9,32 log UFC e 8,93 log UFC para MRS+FOS. Já no meio controle, sem nenhuma fonte de carbono (MRS), não houve níveis detectáveis (autólise celular) após 6h (Figura 2) o que não ocorreu com a linhagem LA05.

Estudos com fermentação *in vitro* utilizando culturas mistas de bactérias fecais cultivadas em inulina e GOS (oligomate 55) demonstraram que o GOS inibiu o crescimento e a produção de toxinas pelo *Clostridium difficile* (HOPKINS & MACFARLANE, 2003). O GOS mostrou influência no efeito bifidogênico, estimulando o crescimento de *B. adolescentis*, *B. angulatum* e *B. bifidum*, porém estes organismos não foram responsáveis pela supressão de patógenos, indicando que outras espécies na microbiota foram protetoras (MACFARLANE, STEED & MACFARLANE, 2008).

Já testes com humanos demonstram claramente que o efeito direto no aumento do número de bifidobactérias no cólon se dá pela ingestão de GOS e FOS (ITO *et al*, 1993, GIBSON & ROBERFROID, 1995). Há relatos que estes prebióticos estimulam o crescimento de *Lactobacillus* (McBAIN & MACFARLANE, 2001; RYCROFT *et al.*, 2001; SANTOS, SIMIQUELI & PASTORE, 2009), mas geralmente bifidobactérias competem melhor com esses substratos. A capacidade de atingir grupos específicos de organismos no intestino grosso através de meios

alimentares é cada vez mais visto como sendo de valor significativo para a saúde. Dois fatores são especialmente importantes neste contexto, a saber, a velocidade de crescimento na qual o micro-organismo pode crescer em uma fonte de carbono específica, pois isso irá influenciar na sua capacidade de competir com outras bactérias no cólon, e o segundo é a razão em que o substrato é convertido em massa celular bacteriana, pois o tamanho da população de células irá afetar o grau de atividade tanto de prebióticos quanto de probióticos.

3.3. Influência dos prebióticos na acidificação do pH nas linhagens LA05 e Bb 12

A Tabela 2 demonstra o valor de pH de *Lactobacillus acidophilus* – LA05, durante o período de 0 a 12 h de incubação, analisando o efeito do GOS em comparação com o FOS e MRS sem dextrose, utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Para o grupo suplementado com GOS, pH 5,95 no início do experimento, para 4,29 no final; variação esta semelhante ao grupo com meio enriquecido por FOS. Já no meio sem dextrose a variação de pH foi de apenas 0,29.

Tabela 2. pH da cultura probiótica: *Lactobacillus acidophilus* – LA05

Condição experimental	0 hs	4 hs	8 hs	12 hs	Δ pH
CONTROLE	6,00	5,55	5,87	5,71	0,29
GOS	5,95	5,52	4,78	4,29	1,66
FOS	5,86	5,65	4,85	4,38	1,48

A Tabela 3 demonstram o valor de pH de *Bifidobacterium animalis* – BB12, durante o período de 0 a 12 h. Observou-se a mesma tendência de acidificação do meio quando este é suplementado com GOS (Δ pH 0,58) ou FOS (Δ pH 0,46) porém bem menos intenso do que o observado para cultura de LA05 (GOS: Δ pH 1,66; FOS: Δ pH 1,48). Já o meio sem fonte de carboidrato com Bb12 não apresentou variância significativa de pH como também foi observado para o cultivo

de LA05; porém é importante lembrar que após 6 h de cultivo, a linhagem Bb12 não resistiu a carência de fonte de dextroses (Figura 2).

Tabela 3. pH da cultura probiótica: *Bifidobacterium animalis* – BB12

Condição experimental	0 hs	4 hs	8 hs	12 hs	ΔpH
CONTROLE	6,39	6,39	6,40	6,42	0
GOS	6,43	6,29	6,28	5,85	0,58
FOS	6,31	6,43	6,40	5,85	0,46

Como relatado por Macfarlane, Macfarlane & Gibson (1995), o consumo dos substratos por micro-organismos probióticos, geralmente vem acompanhado da queda do pH, através da formação de ácidos graxos de cadeia curta, como ácido propiônico, butírico, acético e láctico, que podem ocasionar uma leve inibição do crescimento da cultura.

Porém esta queda não é muito favorável em se tratando de linhagens *Bifidobacterium*, como relatado por Lourens-Hauttingh & Viljoen (2001), que mostraram em seu estudo que pH à partir de 3,6 há inibição do crescimento das bifidobactérias, sendo que o seu crescimento já é comprometido a partir de pH 5,0, com a faixa ótima de sobrevivência das bifidobactérias situa-se entre os valores de pH 5,5 - 6,0.

Assim os resultados obtidos mostram que a suplementação do meio sem fonte de dextrose, com FOS ou GOS garantiu um pH na faixa ótima para o crescimento de Bb12, (Tabela 3) e garantiu a sobrevivência das mesmas (Figura 2).

Os resultados obtidos mostram que o GOS possui atividade prebiótica sobre *L. acidophilus* – LA05 e, esta atividade é comparável a atividade prebiótica do FOS.

3.4. Efeito antiproliferativo

A doxorubicina (Eurofarma,Brasil), utilizadas como controle positivo, demonstrou potencialidade elevada e seletividade, com inibição de crescimento para todas as linhagens de células tumorais humanas (Figura 5).

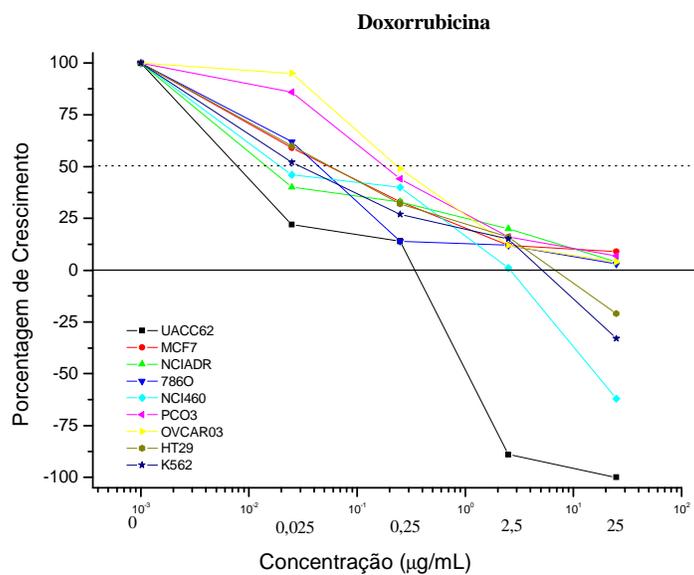


Figura 5: Porcentagem de crescimento das linhagens de células tumorais com uso de doxorrubina: Grupo Controle

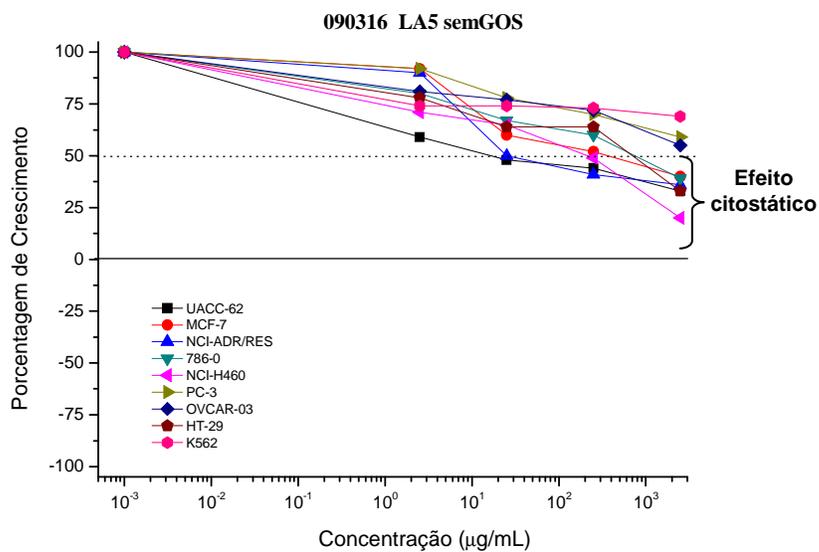


Figura 6: Porcentagem de crescimento das linhagens de células tumorais com LA05

Como apresentados na Figura 6, o MRS-mínimo (sem GOS) esta linhagem apresentou atividade antiproliferativa com efeito citostático para as linhagens testadas [UACC-62(Melanoma), MCF-7(Mama), NCI-ADR/RES(Ovário), 786-0(Renal), NCI-H460(Pulmão) e HT-29(Cólon)].

Enquanto que no meio de cultura acrescido com GOS, nesta concentração de tetrassacarídeos, a linhagem LA05 apresentou efeito citostático apenas para duas linhagens testadas (UACC-62 e HT-29) (Figura 7 e Tabela 4). Os resultados obtidos sugerem que os metabólitos bacterianos provenientes da LA05 inibem o crescimento celular (efeito citostático). A adição de GOS no meio MRS-mínimo provavelmente reduziu a concentração dessas substâncias o que resultou na redução do efeito citostático (maiores valores de GI_{50} , Tabela 4).

Assim, pode-se supor que para sobreviver no meio sem fonte de dextrose (MRS-mínimo), o *L. acidophilus* – LA05 passou a secretar metabólitos com ação citostática, para num mecanismo de feedback negativo reduzir o metabolismo bacteriano e assim garantir a sobrevivência, como demonstrado nos resultados apresentados na Figura 1. Quando o meio foi suplementado com GOS, supriu-se a carência de carboidratos e o LA05 diminuiu a produção de substâncias citostáticas.

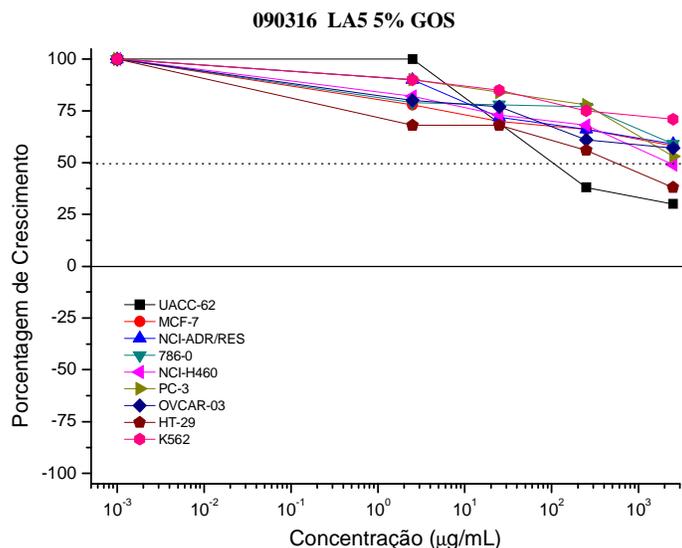


Figura 7: Porcentagem de crescimento das linhagens de células tumorais com LA05+GOS

Tabela 4. Taxa de Crescimento: GI₅₀ (µg/mL)

	u	m	A	7	4	p	O	H	k
Doxorrubicina	0,011	0,067	0,037	0,042	0,038	0,21	0,26	0,063	0,039
LA + 5% GOS	174,4	>2500	>2500	>2500	2500	>2500	>2500	393,8	>2500
LA sem 5% GOS	47,4	378,1	126,5	586,2	108,3	>2500	>2500	433,6	>2500

u = UACC-62; m = MCF-7; a = NCI-ADR/RES; 7 = 786-0; 4 = NCI-H460; p = PC-3; o = OVCAR-03; h = HT-29; k = K562

GI₅₀ = concentração necessária para que ocorra 50% de crescimento celular (efeito citostático).

Estes resultados estimulam a continuidade de avaliações relacionadas aos metabólitos de fermentação do GOS e de probióticos com o objetivo de identificar os mecanismos de ação anticâncer e comprovar sua atividade em modelos experimentais de câncer *in vivo*.

4. CONCLUSÃO

O efeito bifidogênico do GOS, para as linhagens LA05 e Bb12 foram demonstrados pelas diferenças observadas entre as contagens iniciais e finais (Δ LogUFC.mL⁻¹), com uma diferença de 3,88 log para LA05 cultivado em MRS+GOS e de 4,60 log para Bb12 cultivado em MRS+GOS. Quando a linhagem Bb12 foi cultivada em MRS-mínimo não houve níveis detectáveis (autólise celular) após 6h, ao contrário da linhagem LA05, que manteve-se os níveis de log estáveis por 12 h.

Em relação ao pH, as duas linhagens apresentaram ligeira queda, porém não demonstraram diferença significativa.

O MRS-mínimo após cultivo de LA05 (sem GOS) apresentou atividade antiproliferativa com efeito citostático fraco para as linhagens UACC-62(Melanoma), MCF-7(Mama), NCI-ADR/RES(Ovário), 786-0(Renal), NCI-H460(Pulmão) e HT-29(Cólon). Enquanto que o meio de cultura acrescido com GOS (MRS+GOS), após 12h de cultivo com LA05, apresentou efeito citostático fraco apenas para duas linhagens testadas, UACC-62 e HT-29. Os resultados obtidos sugerem que os metabólitos bacterianos provenientes da LA05, cultivado em meio sem fonte de dextrose, exercem efeito antiproliferativo e, que o prebiótico GOS diminui a produção dessas substâncias.

Estes resultados estimulam a continuidade de estudos relacionados com os metabólitos de fermentação do GOS, com o objetivo de identificar os mecanismos de ação anticâncer e comprovar sua atividade em modelos experimentais de câncer *in vivo*.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios – TECNOLAT, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, Campinas, SP) e ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA/UNICAMP pela colaboração.

Ao CNPq pelo financiamento concedido através do processo N.º 140599/2007-0.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIAGI, G.; CIPOLLINI, I.; POMPEI, A.; ZAGHINI, G.; MATTEUZZI, D.; Effect of a *Lactobacillus animalis* strain on composition and metabolism of the intestinal microflora in adult dogs. *Veterinary Microbiology*, v. 20, n. 124(1-2), p. 160-5, 2007.

CARVALHO, J. E. Atividade Antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese. *MultiCiência: Construindo a História dos Produtos Naturais*, v. 7, p. 1-18, 2006.

CZARNECKI-MAULDEN, G. Effect of dietary modulation of intestinal microbiota on reproduction and early growth. *Theriogenology*, v. 70, n. 3, p. 286-290, 2008.

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

GIBSON, G.; SLUPINSKI, J. W.; TZORTZIS, G.; WYNNE, A. G. Novel galactooligosaccharide composition and the preparation thereof. Int.Cl.A61K 35/74(2006.01), Int.Cl.A61P 1/14(2006.01) US 2007/0274955. 29 nov. 2007. Patent Application Publication, United States.

GORBACH, S.L.; CHANG, T.; GOLDIN, B. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *Lancet*, v. 26, n. 2, n. 8574, 1519, 1987.

HOLBECK S. L. Update on NCI *in vitro* drug screen utilities. *European Journal of Cancer*, v. 40, p. 785-793, 2004.

HOPKINS, M.J.; MACFARLANE, G. T. Nondigestible Oligosaccharides Enhance Bacterial Colonization Resistance against *Clostridium difficile* *In vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 4, p. 1920-1927, 2003.

ITO, M.; DEGUCHI, Y.; MATSUMOTO, K.; KIMURA, M.; ONODERA, N.; YAJIMA, T. Influence of galactooligosaccharides on the human fecal flora. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 39, p. 635-640, 1993.

ITO, M.; DEGUCHI, Y.; MIYAMORI, A.; MATSUMOTO, K.; KIKUCHI, H.; MATSUMOTO, K.; KOBAYASHI, Y.; YAJIMA, T.; KAN, T. Effects of Administration of Galactooligosaccharides on the Human Faecal Microflora, Stool Weight and Abdominal Sensation. *Microbial Ecology in Health and Disease*, v. 3, n. 6, p. 285-292, 1990.

KAJIWARA, S.; GANDHI, H.; USTUNOL, Z. Research Note: Effect of Honey on the Growth of and Acid Production by Human Intestinal *Bifidobacterium* spp.: An *In vitro* Comparison with Commercial Oligosaccharides and Inulin. *Journal of Food Protection*, v. 65, n. 1, p. 214-218, 2002.

KIRJAVAINEN, P.V.; ARVOLA, T.; SALMINEN, S.J. AND ISOLAURIE, E. Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut*, v. 51, p. 51-55, 2002.

LIÉVIN, V.; PEIFFER, I.; HUDAULT, S.; ROCHAT, F.; BRASSART, D.; NEESER, J-R.; SERVIN, A.L. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gastrointestinal infection*, v. 47, p. 646-652, 2000.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, v. 11, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

MACFARLANE G T; MACFARLANE S; GIBSON G R. Co-culture of *Bifidobacterium adolescentis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* in arabinogalactan-limited chemostats: effects of dilution rate and pH. *Anaerobe*, v.1, p. 275-281, 1995.

MACFARLANE, G.T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, p. 305-344, 2008.

MARCHETTI, G. M. *Atividade Anticâncer do Extrato Bruto e das frações das Folhas de Calea pinnatifida Banks*. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas; Campinas. 2008.

McBAIN, A. J.; MACFARLANE, G. T. Modulation of genotoxic enzyme activities by non-digestible oligosaccharide metabolism in in-vitro human gut bacterial ecosystems. *Journal of Medical Microbiology*, v. 50, p. 832-841, 2001.

MENEZES, C. R. *Estudo da atividade prebiótica de hidrolisados lignocelulósicos*. 2007. 167f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; Campinas. 2007.

MITSUOKA, T. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora*, v. 3, p. 11-28, 1984.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human

Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

PASTORE, G. M. *Produção, purificação, estudos das propriedades e aplicação da β -galactosidase de Scopulariopsis sp.* 1986. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; Campinas. 1982.

PENDERS, J.; THIJS, C.; VINK, C.; STELMA, F. F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I.; BRANDT, P. A.; STOBBERINGH, E. E. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Pediatrics*, v. 118, p. 511-521, 2006.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*, v. 137, n. 3S, p. 830S-837S, 2007.

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

SANTOS, R. *Produção de Galactooligossacarídeo por lactase fúngica.* 2006. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.

SANTOS, R.; SIMIQUELI, A. P. R.; PASTORE, G. M. Produção de galactooligossacarídeo por *Scopulariopsis* sp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 29, n. 3, p. 682-689, 2009.

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 diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet*, v. 344, p. 1046-1049, 1994.

SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacterium*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v. 2, p. 1418-1434, 1986.

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

SEKINE, K.; WATANABE-SEKINE, E.; OHTA, J.; TOIDA, T.; TATSUKI, T.; KAWASHIMA, T. Induction and activation of tumoricidal cells *in vitro* and *in vivo* by the bacterial cell wall of *Bifidobacterium infantis*. *Bifidobacteria and microflora*, v. 13, p. 65-77, 1994.

SHADID, R.; HAARMAN, M.; KNOL, J.; THEIS, W.; BEERMANN, C.; RJOSKDENDORFER, D.; SCHENDEL, D. J.; KOLETZKO, B. V.; KRAUSSETSCHMANN, S. Effects of galactooligosaccharide and long-chain fructooligosaccharide supplementation during pregnancy on maternal and neonatal microbiota and immunity-a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 86, n. 5, p. 1426-37, 2007.

TOJO, M.; OIKAWA, T.; MORIKAWA, Y.; YAMASHITA, N.; IWATA, S.; SATOH, Y. The effects of *Bifidobacterium breve* administration on *Campylobacter* enteritis. *Acta paediatrica Japonica*, v. 29, p. 160-167, 1987.

TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. *Food Technology*, v. 48, n. 10, p. 61-65, 1994.

YAMAZAKI, S.; MACHII, K.; TSUYUKI, S.; MOMOSE, H.; KAWASHIMA, T.; UEDA, K. Immunological responses to monoassociated *Bifidobacterium longum* and their relation to prevention of bacterial invasion. *Immunology*, v. 56, p. 43–50, 1985.

CAPÍTULO V

AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PREBIÓTICOS GALACTOOLIGOSSACARÍDEO (GOS) E FRUCTOOLIGOSSACARÍDEO (FOS) NA MORFOLOGIA INTESTINAL DE RATAS WISTAR ADULTAS

RESUMO

Oligossacarídeos são ingredientes comuns em suplementos nutricionais e tem sido utilizado no manejo clínico de algumas doenças, porém, ainda não foram amplamente testados em relação aos benefícios da morfologia intestinal. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos galactooligossacarídeos (GOS) sobre a morfologia intestinal de ratas fêmeas adultas. Trinta ratas Wistar (300-320g) de 10 meses de idade foram divididas aleatoriamente em três grupos de dieta (n = 10), com base na dieta AIN-93M *ad libitum* durante 3 meses, sendo os grupos controle (10% de sacarose), GOS (5% GOS e 5% de sacarose), FOS (5% FOS e 5% de sacarose). Foram alojados cinco animais por caixa a temperatura (21-23°C) e umidade (55%) controladas com ciclo de claro/escuro de 12:12 h. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimental Animal da Universidade de Campinas. Ao final do tratamento, porções do ceco intestinal foram submetidos a procedimentos histológicos e corados usando a técnica hematoxilina e eosina, em cortes de 5mm. As imagens foram digitalizadas por uma câmera digital acoplada a um microscópio de luz e analisados pelo software de imagens ImageJ. Os parâmetros analisados foram altura das vilosidades (Hv) (ampliação de 10 X), a largura do vilo perto da cripta (Wv) (ampliação de 20 X), a altura do enterócito (He) e altura do seu núcleo (Hn) (ampliação 40 X). Os dados foram analisados pelo teste Tukey ($p < 0,05$), utilizando GraphPad Prism versão 6.0. O grupo GOS mostrou altura das vilosidades (30%) e altura do enterócito (33%) maiores ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. No entanto, a largura da vilosidade e altura do núcleo do enterócito não foram diferentes ($p < 0,05$) entre os grupos. O grupo FOS mostrou altura (32%) e largura do vilo (29%) maior em relação ao grupo controle. No entanto, a altura do enterócito, e a altura do núcleo

não foram diferentes ($p < 0,05$) entre os grupos. Estes dados apontam que o consumo de GOS ou FOS preserva as vilosidades intestinais de ratas fêmeas adultas. No entanto, mais pesquisas são necessárias para estabelecer mecanismos de ação.

Palavras-chave: Galactooligossacarídeo, frutooligossacarídeo, morfologia intestinal.

ABSTRACT

Oligosaccharides are common ingredients in nutritional supplements designed for clinical management of disease states but it have not been clearly prove their benefits to intestinal morphology. The aim of this work was to evaluate the effects of galactooligosaccharides (GOS) on intestinal morphology of adult female rats. Thirty 10-month old female Wistar rats (300–320g) were randomly assigned to three diet groups (n=10) based in AIN-93M formulation *ad libitum* for 3 months. Control group (10% sucrose); GOS group (5% GOS and 5% sucrose), FOS group (5% FOS and 5% sucrose). Were housed animals five per cage in temperature (21–23°C) and humidity (55 %) controlled room with a light:dark cycle of 12:12 h. The protocol was approved by the Animal Experimental Ethics Committee of the University of Campinas. At the end of the experiment, intestinal cecum portions were submitted to histological procedures for tissues analysis using haematoxylin and eosin technique. Stained sections of 5mm images were taken with a digital camera coupled to a light microscope and analyzed by image processing software ImageJ. The parameters analyzed were height of the villus (Hv) (magnification X 10), the width of the villus near the crypt (Wv) (magnification X 20), the height of the enterocyte (He) and height of its nucleus (Hn) (magnification × 40). Data were analyzed by Student t-test ($p < 0,05$) using GraphPad Prism 6.0 version. The GOS group showed height of the villus (30%) and height of the enterocyte (33%) greater ($p < 0.05$) than control group. However the width of the villus and height of the enterocyte nucleus were not different ($p < 0.05$) between the groups. The FOS group showed height (32%) and width (29%) of the villus greater ($p < 0.05$). However, the height of the enterocyte, and the height of its nucleus were not different ($p < 0.05$) between the groups. Consumption of GOS and FOS preserves intestinal loss of adult female rats, however further research is required to establish mechanisms of action.

Key words: Galactooligosaccharides, fructooligosaccharide, intestinal morphology,

1. INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal desempenha importante papel na saúde humana pela contribuição à nutrição do hospedeiro e pela formação de uma barreira para a colonização de patógenos por exercer importantes funções metabólicas de fermentação de prebióticos (SHADID *et al.*, 2007).

Os prebióticos são oligossacarídeos não digeríveis (ONDs), seletivamente fermentados pelas bactérias intestinais que agem como agentes bifidogênicos, uma vez que promovem mudanças específicas na composição e/ou na atividade dessas bactérias, conferindo efeitos de bem estar e saúde ao hospedeiro (ROBERFROID, 2007).

Apesar dos prebióticos serem considerados ONDs, Roberfroid (2007) sugere critérios a serem analisados *in vitro* e *in vivo*, para caracterizar um prebiótico. Os critérios incluem a resistência à acidez gástrica, hidrólise enzimática e absorção gastrointestinal, a fermentação pela microflora intestinal, e o estímulo seletivo ao crescimento e/ou atividade dessas bactérias intestinais. Segundo esses critérios, somente dois tipos de oligossacarídeos são considerados atualmente como prebióticos, os frutanos do tipo inulina (FOS) e GOS.

Além de apresentarem as características que os classificam efetivamente como prebióticos, os FOS e os GOS também possuem manufatura relativamente de baixo custo e são valiosos ingredientes funcionais na indústria alimentícia com o potencial de melhorar as propriedades sensoriais dos alimentos (MACFARLANE, MACFARLANE & CUMMINGS, 2006).

Os FOS são oligômeros de frutose que são compostos de 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil nistose (GF4), em que as unidades de frutose (F) são ligadas na posição β -2,1 da sacarose, o que os distingue de outros 3 oligômeros (YUN, 1996). São oligossacarídeos de ocorrência natural principalmente de origem vegetal e também podem ser obtidos por ação de enzimas microbianas (HARTEMINK, VANLAERE & ROMBOUTS, 1997; NETTO, 2005).

Os GOS são sintetizados enzimaticamente pela ação da β -galactosidase sobre a lactose. Esta enzima age como uma enzima hidrolítica e também como uma enzima de condensação, neste caso denominada reação de transgalactosilação. Os GOS podem ser compreendidos de di-, tri-, tetra- ou de pentassacarídeos, constituídos principalmente por unidades de galactose ligadas à lactose (SANTOS, SIMIQUELI & PASTORE, 2009).

Quanto aos benefícios fisiológicos durante a fermentação dos FOS e dos GOS o pH é reduzido (7,0-7,5 para 6,0-6,5) devido à produção de ácidos graxos de cadeia curta, tais como, acetato, propionato e butirato, dentre outros (ROBERFROID; GIBSON & DELZENNE, 1993; MÁRQUEZ, 1999). Esses ácidos graxos são parcialmente utilizados como fonte de energia pelos enterócitos e o restante é absorvido, promovendo efeitos metabólicos na prevenção ou mesmo controle de doenças sistêmicas, conforme descrito por Wong *et al.* (2006). A nutrição dos enterócitos, favorecida pelos probióticos e prebióticos aumenta o tamanho dos vilos em profundidade, reduzindo a produção de amônia e aminas biogênicas e estimulando o sistema imunológico (BARROS, 2007; LEFORESTIER *et al.*, 2009).

A integridade física da mucosa provavelmente representa a principal linha de defesa dessa barreira intestinal, sendo auxiliada pelos componentes do sistema imune celular (enterócitos, macrófagos e linfócitos T) e humoral (IgG, IgM e IgA secretória) (TRAMONTE *et al.* 2004).

Estudos que relacionam a flora intestinal associada com a ingestão de prebióticos e probióticos têm sido realizados com o objetivo de avaliar sua eficiência na prevenção do câncer. Neste sentido, Rowland *et al.* (1998), analisou o número de criptas aberrantes em ratos alimentados com inulina e a *B. longum*, linhagem 25, e submetidos a indução de câncer com o carcinógeno azoximetano (OMA). Os tratamentos foram iniciados após 1 semana da administração da dose do agente cancerígeno, e os resultados sugerem que *B. longum* e inulina podem ter afetado a fase de promoção precoce das células cancerígenas. O consumo de rações contendo *B. longum*, inulina ou ambos também promoveram uma redução

da atividade da β -glucuronidase, da concentração de amônia no conteúdo cecal e uma diminuição do pH cecal. Os resultados também indicaram que a combinação dos dois agentes foi mais eficaz na redução de lesões do cólon, verificando-se que houve sinergia em comparação com os tratamentos individuais dos prebióticos e probióticos.

Resultados similares em relação a redução do risco de câncer em modelos animais também foram encontrados por Gallaher & Khil (1999), que administraram um simbiótico composto por oligofrutose e *B. longum*, em ratos tratados com o carcinógeno 1,2-dimethylhydrazine (DMH). Em outro estudo, a incidência do tumor foi menor nos ratos tratados com OMA e alimentados com um simbiótico composto de prebiótico Raftilose e *L. rhamnosus* e *B. lactis* BB-12 em comparação com ratos não alimentados. Estes efeitos parecem ser mediados pela modulação intestinal, associada ao tecido linfóide, através de placas de Peyer (ROLLER, RECHKEMMER & WATZL, 2004). Também já foi demonstrado recentemente que esta formulação reduziu os fatores de risco de câncer de cólon em humanos (MUSSATTO & MANSILHA, 2007).

O mecanismo através do qual os probióticos e prebióticos podem inibir o desenvolvimento de câncer de cólon ainda são desconhecidos. Entretanto, vários mecanismos de atuação são sugeridos, incluindo o estímulo da resposta imune do hospedeiro, a ligação e a degradação de compostos com potencial carcinogênico e alterações na microbiota intestinal envolvidas na produção de carcinógenos, favorecendo as bifidobactérias que colonizam o cólon em detrimento de enteropatógenos, podem ligar-se ao carcinógeno final, promovendo sua remoção através das fezes (KAUR & GUPTA, 2002). Além disso, prebióticos e probióticos podem estimular a produção de compostos antimutagênicos no cólon, alteração da atividade metabólica da microbiota intestinal, alteração das condições físicoquímicas do cólon e efeitos sobre a fisiologia do hospedeiro (HIRAYAMA & RAFTER, 2000).

Visto que as funções benéficas associadas ao consumo de prebióticos estão diretamente relacionadas às alterações tanto na composição quanto na

atividade das bactérias intestinais em consequência ao processo de fermentação e produção de ácidos graxos de cadeia curta, este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto da presença dos prebióticos FOS e GOS no intestino (ceco) dos animais através das análises de pH fecal e alterações histológicas deste tecido, bem como comparar a eficiência destes prebióticos FOS e GOS quanto à histologia intestinal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais e dietas

Ratas da linhagem Wistar, com 10 meses de idade (\pm 300g de peso corporal), foram obtidas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas (São Paulo – Brasil). Estas foram distribuídas aleatoriamente em 3 (três) diferentes tratamentos (n= 10) (Figura 1) e alimentadas *ad libitum* por 3 meses. As dietas fornecidas para os animais foram isocalóricas, baseadas na AIN-93M (REEVES, NIELSEN & FAHEY JR, 1993) e modificadas de acordo com os tratamentos propostos (Tabela 1). O GOS utilizado foi obtido no Laboratório de Bioaromas da Universidade Estadual de Campinas através de processo fermentativo, sendo composto de 28% de tetrassacarídeos, 50% de lactose, 15% de glicose e 7% de galactose, conforme descrito por Santos (2006); e o FOS, cedido pela Corn Products International, composto por 14% de tetrassacarídeos, 56% de trissacarídeos e 41% de frutose. Durante todo o experimento, as ratas foram mantidas em caixas plásticas (cinco animais por caixa) à temperatura (21-24°C) e umidade (55%) controlada, ciclo de luz 12h/dia e 12h/noite. O peso e o consumo de ração dos animais foram monitorados uma e duas vezes por semana, respectivamente. No final do experimento, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas, e posteriormente, decapitados para coleta das fezes e ceco para análise de pH e morfo-histológica, respectivamente. Este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual de Campinas – protocolo nº1561-1 (Anexo I).

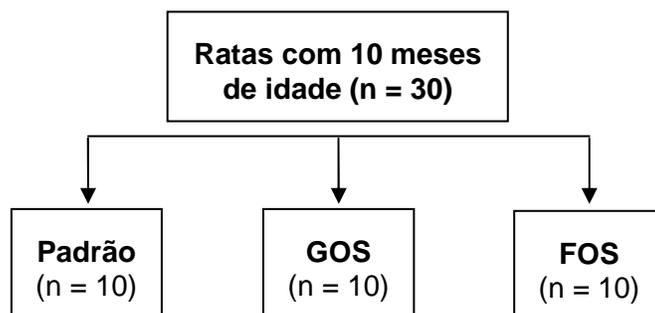


Figura 1. Esquema de delineamento experimental do ensaio biológico.

Tabela 1. Composição das dietas fornecidas para os animais baseadas na AIN-93M (REEVES, NIELSEN & FAHEY JR, 1993) e modificadas de acordo com os tratamentos propostos.

Ingredientes	Dieta padrão (g/Kg de dieta)	Dieta c/ GOS (g/Kg de dieta)	Dieta c/ FOS (g/Kg de dieta)
Amido de milho	465,692	465,692	465,692
Caseína (≥85% proteína)	140,000	140,000	140,000
Amido de milho dextrinizado (90-94%)	155,000	155,000	155,000
Sacarose	100,000	50,000	50,000
GOS	-	50,000	-
FOS	-	-	50,000
Óleo de soja	40,000	40,000	40,000
Celulose	50,000	50,000	50,000
Mix mineral (AIN-93M-MX)	35,000	35,000	35,000
Mix vitamínico (AIN-93-VX)	10,000	10,000	10,000
L-Cistina	1,800	1,800	1,800
Bitartrato colina (41,1% colina)	2,500	2,500	2,500
Butilhidroquinona	0,008	0,008	0,008

2.2. Determinação do pH

Amostras de fezes do conteúdo cecal ($\pm 1g$) foram coletadas no momento do sacrifício dos animais, imediatamente homogeneizadas em água deionizada e o pH medido com potenciômetro MICRONAL B474, Brasil. (ASVARUJANON, ISHIZUKA & HARA, 2005).

2.3. Histomorfometria do ceco

O ceco foi lavado com água destilada até a retirada total dos resíduos de fezes. Após a lavagem, o tecido foi fixado em solução de formol a 5%, por 48 horas, desidratado com soluções de etanol e xilol, diafanizado, incluída em parafina 58-62 Merck®, fundida em estufa a 60°C e colocado em forma de alumínio à temperatura ambiente para obtenção dos blocos. Esses blocos foram seccionados (5 μm), utilizando aparelho MICROTOMO LEIKA RM 2145® (Germany) e os cortes foram montados em lâminas, corados com HE (hematoxilina e eosina) e submetidas a procedimento histológico padrão para esta técnica. As imagens foram obtidas através de uma câmera digital (COHU 2700 - Cohu Inc. Electronics Division, California, Unites States) acoplada a um microscópio de luz (Nikon Eclipse H550S – Nikon Corporation, Tokyo, Japan) (aumento de 10 X 10) e analisadas usando-se *software* para processamento de imagens (ImageJ 1.37v, National Institute of Health, Bethesda, EUA) (BJORNVAD *et al.*, 2005; LEMOS, 2008).

Os parâmetros histológicos analisados foram altura das vilosidades (Hv) (aumento de 10X), largura das vilosidades próxima às criptas (Wv) (aumento de 20X), altura dos enterócitos (He) e altura dos núcleos (Hn) (aumento de 40X) (Figura 2).

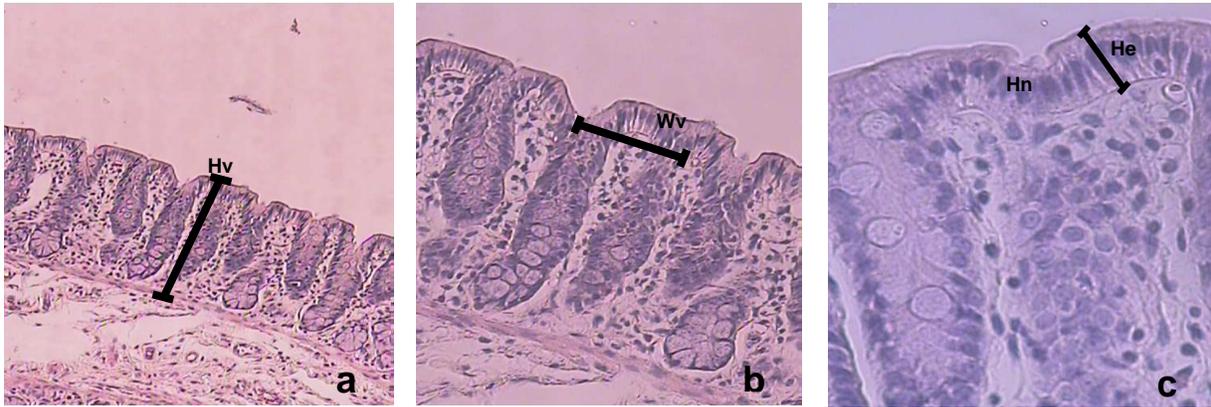


Figura 2. Cortes histológicos do ceco de ratas corado com hematoxilina e eosina e demonstração de parâmetros histomorfométricos. (a) aumento X 10; (b) aumento X 20; (c) aumento X 40.

Hv = altura das vilosidades; Wv = largura das vilosidades próxima às criptas; He = altura dos enterócitos; Hn = altura dos núcleos.

2.4. Tratamento Estatístico

Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA seguido de teste de Tukey, sendo que o *software* utilizado foi GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA) considerando $p < 0.05$. Os resultados estão expressos pela média de cada grupo ($n=10$) e erro padrão da média (EPM).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Consumo de ração e peso corporal dos animais

Os animais dos grupos FOS e GOS não apresentaram diferença significativa ($p>0.05$) de peso corporal entre si no final do experimento, porém, quando comparados aos animais do grupo padrão, estes apresentaram maior peso corporal (Padrão = $302,3 \pm 3,4g$; FOS = $317,4 \pm 2,5g$; GOS = $316,3 \pm 2,0g$) (Figura 3).

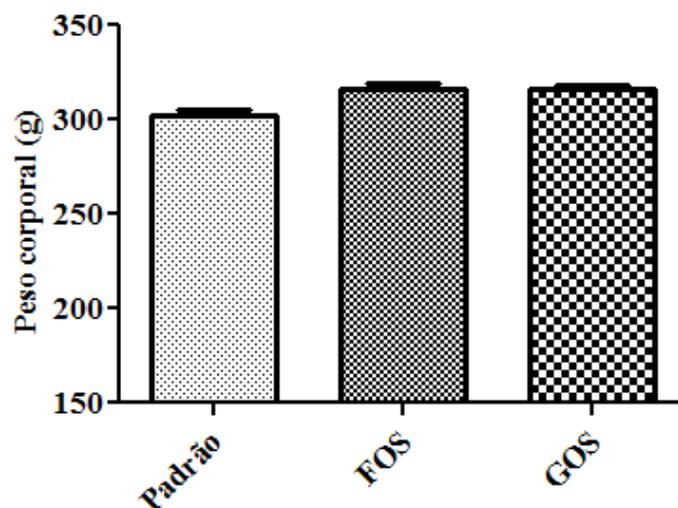


Figura 3. Peso corporal dos animais em gramas.

Apesar da diferença em relação ao ganho de peso corporal entre os grupos experimentais e o grupo padrão, os mesmos não apresentaram diferença ($p>0.05$) no consumo de ração por dia (Padrão = $11,8 \pm 0,7g$; FOS = $13,1 \pm 0,8g$; GOS = $12,7 \pm 0,5g$) (Figura 4). As ratas que receberam ração enriquecida com GOS ou com FOS aproveitaram melhor os nutrientes do que as ratas que consumiram a dieta padrão, uma vez que todas as ratas consumiram quantidades equivalentes de ração, porém as dos grupos GOS e FOS apresentaram pequeno aumento do peso corporal.

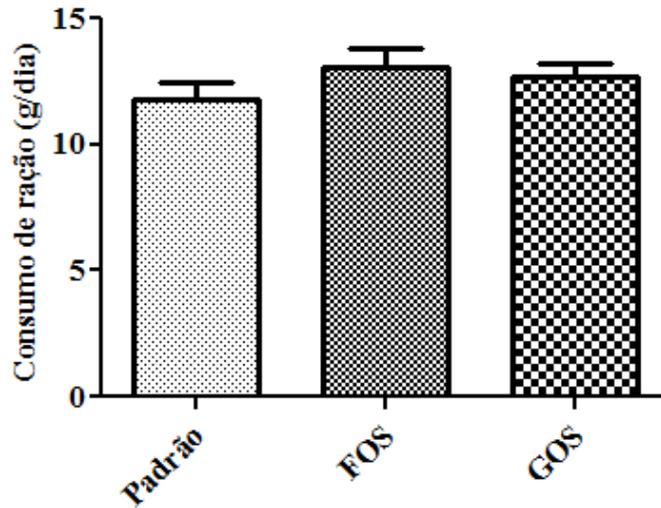


Figura 4. Consumo de ração dos animais (g/dia).

3.2. pH fecal (ceco)

Os animais não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao pH do conteúdo cecal (Padrão = $7,37 \pm 0,08$; FOS = $7,38 \pm 0,17$; GOS = $7,34 \pm 0,08$) (Figura 5).

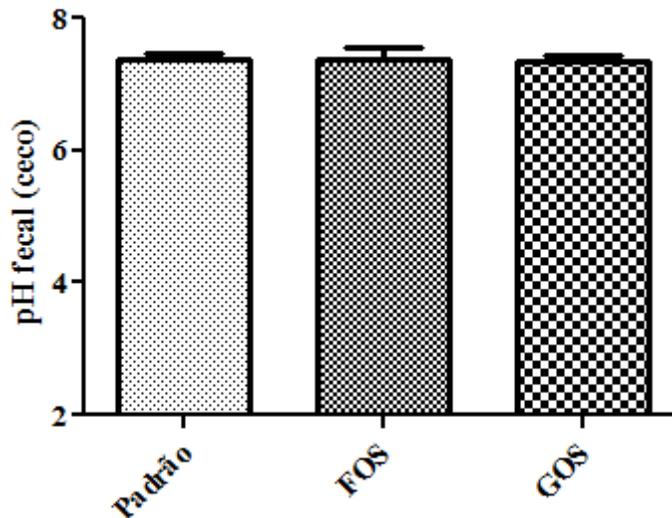


Figura 5. pH fecal (ceco).

Howard *et al.* (1995) realizou dois experimentos com leitões neonatos para determinar os efeitos da alimentação com FOS na microbiota cecal e do cólon, na proliferação da mucosa cecal e epitelial do cólon e nas concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no ceco. No primeiro experimento, foi avaliado o consumo de 3g/L de FOS em 15 dias e, ao final do experimento foram examinadas as mudanças na microbiota do ceco e do cólon, na morfologia cecal proximal e distal, na mucosa do cólon epitelial, no pH cecal e na concentração de ácidos graxos de cadeia curta. A suplementação com FOS não alterou a contagem de células viáveis de bifidobactérias e da microbiota total anaeróbia, o pH cecal, e as concentrações de ácidos graxos de cadeia curta. Porém na mucosa cecal foi verificado um aumento por meio da densidade celular do muco. A altura das críptas proximal e distal da mucosa do cólon, as células de ponta e células marcadas, chamada zona de proliferação também aumentaram com o consumo de FOS. Na autópsia e histopatologia nenhuma lesão significativa foi encontrada. No segundo experimento foi avaliado o consumo de 3g/L de FOS em 6 dias. Amostras de fezes foram coletadas no 1º, 3º e 6º dia, após o início da alimentação. Nos dias 1 e 3, as concentrações de bifidobactérias foram semelhantes, porém após 6 dias consumindo FOS, houve uma tendência a um aumento ($p=0,08$). Estes dados sugerem que o consumo de FOS reforçou o número de bifidobactérias e preveniu a atrofia da mucosa do cólon epitelial em leitões recém-nascidos.

Estudos *in vivo*, realizados por Bakker-Zierikzee *et al.* (2005), compararam o efeito de uma fórmula infantil contendo FOS e GOS e um probiótico *Bifidobacterium animalis* (Bb-12), na composição e na atividade metabólica da microflora intestinal de bebês. As análises foram realizadas através da coleta das fezes de bebês com idade de 4, 8, 12 e 16 semanas. Comparando-se as fórmulas com a padrão, houve um aumento de lactato e pH mais baixo em todos os tempos. Apesar de não haver uma diferença estatística significativa, o grupo que recebeu a fórmula infantil com FOS e GOS apresentou resultado similar para atividade metabólica da flora intestinal de bebês amamentados. Estes resultados

reforçam a hipótese da associação entre o aumento da proporção dos ácidos graxos de cadeia curta e a redução do pH do cólon.

Nossos dados indicam que não houve diferença significativa nos pH do ceco associados as dietas propostas que podem ser explicados pelo jejum de 12h a que as ratas foram submetidas, o que pode ter interferido na volatilização dos ácidos graxos de cadeia curta.

3.3. Histomorfometria do ceco dos animais

Como pode ser observado na Figura 6, os animais dos grupos alimentados com FOS e GOS apresentaram aumento na altura das vilosidades intestinais em relação ao grupo controle ($p < 0.05$) dessas vilosidades (Padrão = 3.44 ± 0.08 mm; FOS = 4.50 ± 0.16 mm; GOS = $4,46 \pm 0.14$ mm). Quando os grupos FOS e GOS foram comparados entre si, não apresentaram diferença significativa ($p > 0.05$) na altura das vilosidades.

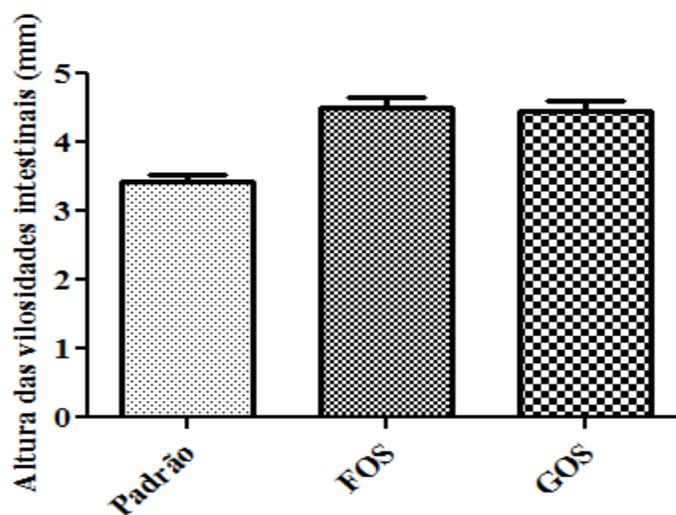


Figura 6. Altura das vilosidades intestinais (ceco).

Os resultados estão de acordo com Budiño *et al.* (2005) que avaliaram o aumento na densidade celular e no número de células, na mucosa intestinal de leitões recém-desmamados alimentados com dieta basal e dieta basal + probiótico, prebiótico (FOS) e simbiótico. Os autores observaram maior densidade

de vilos na porção duodenal e do jejuno dos leitões alimentados com o prebiótico quando comparados aos que consumiram probiótico. Já os animais alimentados com simbiótico apresentaram maior altura de microvilos no duodeno em relação aos que consumiram a dieta basal. Nos leitões suplementados com probiótico houve melhor recuperação na densidade dos microvilos.

Macari & Maiorka (2000), relataram os efeitos da adição de probióticos (*S. cerevisiae*) e prebióticos (mananoligossacarídeos-MOS), na mucosa intestinal de frangos. Os resultados mostram que a adição de MOS na ração teve efeito sobre o desenvolvimento das vilosidades intestinais, com aumento significativo ($p < 0,05$) da altura do vilo, nos 03 segmentos do intestino delgado, sendo mais acentuado na primeira semana de vida do frango. Verificaram também que as aves tratadas com *S. cerevisiae* apresentavam um ganho de peso significativamente maior.

No presente trabalho, os animais suplementados com FOS ou com GOS apresentaram largura das vilosidades e altura dos enterócitos significativamente ($p > 0,05$) iguais. Quando comparados ao grupo padrão, o FOS mostrou vilosidades mais largas ($p < 0,05$) enquanto o GOS não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) (Padrão = $2,20 \pm 0,10$ mm; FOS = $2,85 \pm 0,18$ mm; GOS = $2,44 \pm 0,14$ mm) (Figura 7).

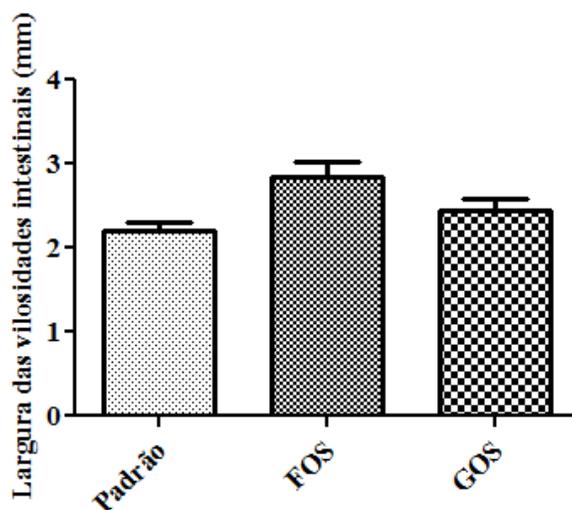


Figura 7. Largura das vilosidades intestinais próximas às criptas (ceco).

Quanto à altura dos enterócitos, o GOS apresentou média maior ($p < 0,05$) que o grupo padrão, enquanto o FOS não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) (Padrão = 1.61 ± 0.09 mm; FOS = 1.92 ± 0.12 mm; GOS = $2,14 \pm 0.10$ mm) (Figura 8).

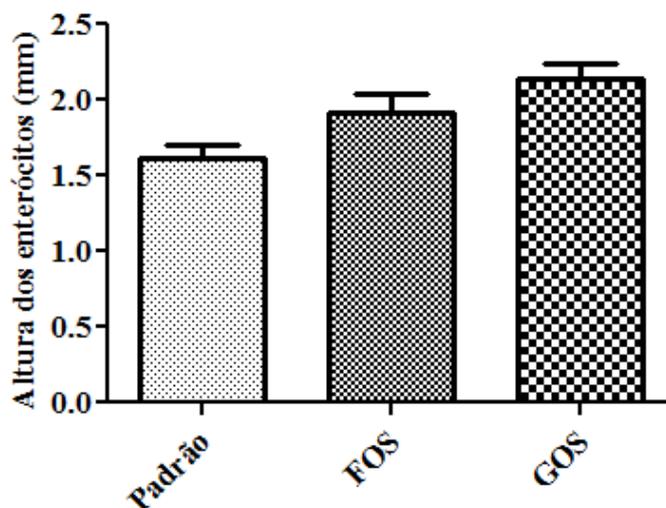


Figura 8. Altura dos enterócitos (ceco).

Os enterócitos são as principais células no processo de digestão e absorção e estão distribuídas em toda a superfície do vilo. Na superfície luminal dos enterócitos projetam-se as microvilosidades, estruturas cilíndricas que aumentam a superfície de contato da célula. Na superfície das microvilosidades encontram-se as enzimas responsáveis pela digestão final dos nutrientes, tais como dissacaridases, oligopeptidases, etc. Os enterócitos migram através das vilosidades, a partir da base em direção ao ápice. Este processo de migração tem duração média de 48 a 96 horas e é muito importante pelo fato de que, durante o percurso, estas células principais tornam-se mais ativas, principalmente na metade superior do vilo. (TURK, 1982)

DIBNER *et al.* (1996) demonstraram que aves alimentadas com dietas contendo gordura oxidada apresentaram redução no comprimento e área de superfície dos vilos, bem como uma diminuição na relação vilosidade/crípta, afetando negativamente a secreção enzimática e a capacidade absorptiva dos enterócitos.

Provavelmente, esses resultados estejam relacionados com o fato dessas gorduras oxidadas serem incorporadas nas membranas celulares, reduzindo a quantidade de tocoferol presente nas membranas subcelulares, determinando, assim, um aumento de radicais livres que podem levar à morte celular programada (apoptose). A digestão e absorção das gorduras requerem alguns fatores, como a presença de sais biliares, lipase pancreática, colipase, e proteína ligadora de lipídios. Aparentemente, esta proteína está envolvida com o transporte dos ácidos graxos através da membrana dos enterócitos e depende do substrato (ácidos graxos) para aumentar sua concentração.

O desenvolvimento da mucosa intestinal é decorrente de dois eventos citológicos primários associados: renovação celular, caracterizado por proliferação e diferenciação, resultante das divisões mitóticas sofridas por células localizadas na cripta e perdas por descamação, que ocorrem naturalmente no ápice das vilosidades. O equilíbrio entre esses dois processos é determinado por uma taxa de renovação constante. Outro fator muito relevante para a absorção dos nutrientes na membrana luminal é a quantidade de microvilos existentes nos enterócitos. O número de microvilos atua como um amplificador de áreas para a absorção dos nutrientes (PELICANO *et al.*, 2003).

Os grupos experimentais não apresentaram diferença estatística ($p > 0.05$) em relação à altura do núcleo dos enterócitos (Padrão = $0.52 \pm 0.04\text{mm}$; FOS = $0.60 \pm 0.03\text{mm}$; GOS = $0.61 \pm 0.02\text{mm}$) (Figura 9).

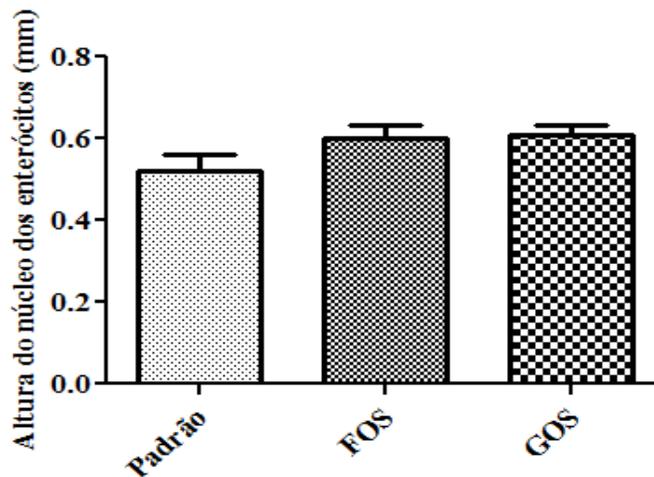


Figura 9. Altura do núcleo dos enterócitos (ceco).

Outros mecanismos de ação dos GOS podem ser explicados através de resultados encontrados por Leforestier *et al.* (2009) que avaliou as consequências de ingestão GOS, fermentado por *Streptococcus thermophilus* linhagem 065, composto por 30% de GOS e lactose 5% (p/v) na mucosa do intestino delgado por morfologia, análise das atividades enzimáticas de sacarase, lactase e fosfatase alcalina além da determinação do conteúdo de mucina da mucosa, bem como expressão do gene MUC através do mRNAs de MUC-2 e MUC-4, por RT-PCR, em ratos jovens. Os resultados mostraram que GOS não teve efeito detectável sobre a altura das vilosidades do intestino, mas aumentaram o teor total de proteína da mucosa e mucina do intestino delgado, sem modificar a expressão de mRNAs por MUC-2 e MUC-4. Os ratos que consumiram GOS apresentaram uma maior atividade de sacarase associada à mucosa intestinal, mas as atividades de lactase e fosfatase alcalina foram similares as do grupo controle, indicando que a dieta enriquecida com GOS exerceu um efeito específico sobre células epiteliais da mucosa. Curiosamente, GOS também foi capaz de aumentar a atividade de sacarase em cultura de células do cólon (Caco-2), sem alterar a proliferação celular sugerindo que os GOS provavelmente agem diretamente sobre estas

células, ou seja GOS pode exercer efeitos sobre enterócitos que não são mediados pela microflora.

Houve aumento ligado a glicoproteínas associado à mucosa intestinal. Por último, a expressão do mRNA de TNF- α também não foi modificado após a ingestão de GOS. Estes resultados sugerem que, em camundongos BALB/c, que 4 semanas de ingestão de GOS é capaz de aumentar o conteúdo de mucina e enterócitos da mucosa do intestino delgado associados a atividade da sacarase sem modificar a altura das vilosidades.

4. CONCLUSÃO

O estudo mostra que GOS são capazes de modificar algumas características da mucosa intestinal em ratas Wistar com 10 meses de idade, que equivale à entrada na menopausa.

Os animais que consumiram ração com os prebióticos tiveram um ligeiro aumento de peso em relação ao grupo padrão, sem que o consumo de ração por dia sofresse alterações entre os três grupos.

Nossos dados indicam que não houve diferença significativa nos pH do ceco associados as dietas propostas que podem ser explicados devido ao fato das ratas terem permanecido em jejum de 12 horas, o que pode ter interferido na volatilização dos ácidos graxos de cadeia curta.

Os animais alimentados com FOS e GOS apresentaram aumento na altura das vilosidades intestinais em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

Em relação à largura das vilosidades e altura dos enterócitos não houve diferença significativa, porém quando comparados ao grupo padrão, o FOS mostrou vilosidades mais largas ($p < 0.05$) enquanto o GOS não apresentou diferença significativa ($p > 0.05$).

Quanto à altura dos enterócitos, o GOS apresentou média maior ($p < 0,05$) que o grupo padrão, enquanto o FOS não apresentou diferença significativa ($p > 0.05$), o mesmo não foi observado na altura dos núcleos dos enterócitos que não apresentou diferença significativa.

Embora os mecanismos envolvidos no efeito GOS permaneçam desconhecidos, propomos que GOS pode atuar pelo menos em parte, pelo efeito direto no epitélio intestinal células.

Não é possível, no entanto, excluir o efeito mediado pelos ácidos graxos de cadeia curta em relação a nutrição dos enterócitos, devido a concentrações serem significativas no intestino grosso.

Mais trabalhos são necessários para decifrar os mecanismos envolvidos no efeito dos prebióticos GOS e FOS.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento concedido através do processo N° 140599/2007-0.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASVARUJANON, P; ISHIZUKA, S.; HARA, H. Promotive effects of non-digestible disaccharides on rat mineral absorption depend on the type of saccharide. *Nutrition*, v. 21, n. 10, p. 1025-1035, 2005.

BAKKER-ZIERIKZEEA, A. M.; ALLESA, M. S.; KNOLA, J.; KOKA, F. J.; TOLBOOMA J. J. M.; BINDELSA, J. G. Effects of infant formula containing a mixture of galacto- and fructo-oligosaccharides or viable *Bifidobacterium animalis* on the intestinal microflora during the first 4 months of life. *British Journal of Nutrition*, v. 94, p. 783-790, 2005.

BJORNVAD, C. R.; SCHMIDT, M.; PETERSEN, Y. M.; JENSEN, S. K.; OFFENBERG, H.; ELNIF, J.; SANGILD, P. T. Preterm birth makes the immature intestine sensitive to feeding-induced intestinal atrophy. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative, and Comparative Physiology*, v. 289, n. 4, p. R1212–R1222, 2005.

BARROS, D. S. Probiótico e prebiótico na ração de matrizes suínas e seu efeito sobre a leitegada e intervalo desmama estro. 2007. 66f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Mato Grosso. Cuiabá, 2007.

BUDIÑO, F. E. L.; THOMAZ, M. C.; KRONKA, R. N.; NAKAGHI, L. S. O.; TUCCI, F. M.; FRAGA, A. L.; SCANDOLERA, A. J.; HUAYNATE, R. A. R. Effect of Probiotic and Prebiotic Inclusion in Weaned Piglet Diets on Structure and Ultrastructure of Small Intestine. *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal*, v.48, n. 6: p. 921-929, 2005

DIBNER, J. Nutritional Requirements of young poultry. In: MEETING OF ARKANSAS NUTRITION CONFERENCE, 1996, Fayetteville. Fayetteville: Arkansas Poultry Federation, 1996. p. 15-27.

GALLAHER, D. D.; KHIL, J. The Effect of Synbiotics on Colon Carcinogenesis in Rats. *The Journal of Nutrition*, v. 129, p. 1483S-1487S, 1999.

HARTEMINK, R.; VANLAERE, K. M. J.; ROMBOUTS, F. M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, v. 83, n. 3, p. 367-74, 1997.

HIRAYAMA, K.; RAFTER, J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection*, Paris, v.2, p.681-686, 2000.

HOWARD, M. D.; GORDON, D. T.; PACE, L. W.; GARLEB, K. A.; KERLEY, M. S. Effect of Dietary Supplementation with Fructooligosaccharides on Colonic Microbiota Populations and Epithelial Cell Proliferation in Neonatal Pigs. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 21, p. 297-303, 1995.

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

LEFORESTIER, G; BLAIS, A; BLACHIER, F; MARSSET-BAGLIERI, A; DAVILA-GAY, A. M.; PERRIN E.; TOMÉ, D. Effects of galacto-oligosaccharide ingestion on the mucosa-associated mucins and sucrase activity in the small intestine of mice. *European Journal of Nutrition*, v. 48, n. 8, p. 457-464, 2009.

LEMOS, A.C.G. Efeito da suplementação de fructooligosacarídeos (FOS) sobre o sistema Imunológico: estudo em ratos. 2008. 107f. Dissertação (Mestrado em

Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2008.

MACARI, M.; MAIORKA, A. Estudo sobre uso de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* sobre desenvolvimento das vilosidades intestinais. Anais da Conferencia APINCO 2000 de Ciência e Tecnologia. p. 170, 2000.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 24, p. 701-14, 2006.

MÁRQUEZ, L.R. A fibra terapêutica. São Paulo: Americana de Publicações, 132p., 1999.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 68, n. 3, p. 587-597, 2007.

NETTO, C.C. *Avaliação da biopotência dos frutooligossacarídeos (FOS) e da terapia de reposição hormonal (TRH) no metabolismo de cálcio de ratas ovariectomizadas*. 2005. 97f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; OBA A; NORKUS E. A; KODAWARA, L. M.; Lima T. M. A. Effect of different probiotics on broiler carcass and meat quality. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.5, n.3, p.207-214, 2003.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY JR, 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. *The Journal of Nutrition*, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*, v. 137, n. 2 (Suppl 2), p. 830-837, 2007.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; DELZENNE, N. The Biochemistry of Oligofructose, a Nondigestible Fiber: An Approach to Calculate Its Caloric Value. *Nutrition Reviews*, v. 51, n. 5, p. 137-146, 1993.

ROLLER, M.; RECHKEMMER, G.; WATZL, B. Prebiotic Inulin Enriched with Oligofructose in Combination with the Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* Modulates Intestinal Immune Functions in Rats. *The Journal of Nutrition*, v. 134, n. 2, p. 153-156, 2004.

ROWLAND, I.R.; RUMNEY, C.J.; COUTTS, J.T.; LIEVENSE, L.C. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, v. 19 n. 2 p. 281-285, 1998.

SANTOS, R.; SIMIQUELI, A. P. R.; PASTORE, G. M. Produção de galactooligossacarídeo por *Scopulariopsis* sp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, p. 682-689, 2009.

SHADID, R.; HAARMAN, M.; KNOL, J.; THEIS, W.; BEERMANN, C.; RJOSKDENDORFER, D.; SCHENDEL, D.J.; KOLETZKO, B. V.; KRAUSSETSCHMANN, S. Effects of galactooligosaccharide and long-chain fructooligosaccharide supplementation during pregnancy on maternal and neonatal microbiota and immunity—a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 86, n. 5, p. 1426-37, 2007.

TRAMONTE, R; CARVALHO, O. M; FARIAS, D.C. SERAFIM, J.D.M; ORTELLADO, D.K; ACAMPORA, A.J. Alterações da mucosa Intestinal em ratos: estudo morfométrico em três diferentes tratamentos após indução experimental de sepse abdominal aguda. *Acta cirúrgica brasileira*, v. 19, n. 2, 2004.

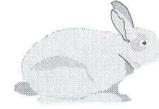
TURK, D. E. Symposium: The avian gastrointestinal tract and digestion. *Poultry Science*, v. 64, p. 1225-1244, 1982.

WONG, J. M. W.; SOUZA, R.; KENDALL, C. W. C.; EMAM, A.; JENKINS, D. J. A. Colonic Health: Fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 40, n. 3, p. 235-43, 2006.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, n. 2, p. 107-17, 1996.



Anexo I



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

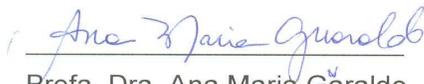
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1561-1, sobre "Influência do galactooligossacarídeo (GOS) e do fructooligossacarídeo (FOS) no sistema imune e nos mecanismos moleculares e estruturais do metabolismo ósseo de ratas idosas", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore / Claudia Cardoso Netto / Rosângela dos Santos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 30 de junho de 2008.

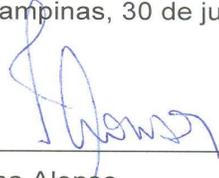
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1561-1, entitled "Influence of the GOS and FOS in immunology system and the molecular structural mechanisms of the bone metabolism in aged rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on June 30, 2008.

Campinas, 30 de junho de 2008.



Profa. Dra. Ana Maria Geraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

CONCLUSÃO GERAL

Foram encontradas mais de cem patentes no levantamento bibliográfico, mas somente 37 foram analisadas por estarem relacionadas com o nosso objetivo.

Em 1990, foi observado o maior número de depósitos de patente e a partir de 2003 foi observado um aumento, devido ao desenvolvimento da engenharia genética.

A maioria das patentes foram depositadas por empresas privadas (91%) e o Japão é o maior retentor de patentes relacionadas com GOS e somente 8,1% foram depositadas por institutos de pesquisa.

O rendimento da produção de GOS a partir da enzima β -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. foi de 30%/12horas e 24%/15 dias para a enzima livre e imobilizada, respectivamente, sendo necessários estudos complementares para avaliar a estabilidade da enzima imobilizada.

Nos estudos *in vitro*, a ação direta do GOS apresentou indícios de atividade antiproliferativa na linhagem HT-29 (adenocarcinoma de cólon), todavia, não foi capaz de reduzir em pelo menos 50% o crescimento das células tumorais.

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as células tumorais estudadas em relação à concentração de IFN- γ , sugerindo não ser esta citocina um bom marcador.

O efeito bifidogênico do GOS, para as linhagens LA05 e Bb12 foram demonstrados pelas diferenças observadas entre as contagens iniciais e finais (Δ LogUFC.mL⁻¹), com uma diferença de 3,88 log para LA05 cultivado em MRS+GOS e de 4,60 log para Bb12 cultivado em MRS+GOS. Quando a linhagem Bb12 foi cultivada em MRS-mínimo não houve níveis detectáveis (autólise celular) após 6h, ao contrário da linhagem LA05, que manteve-se os níveis de log estáveis por 12 h.

Verificou-se que o meio de cultura sem dextrose (MRS-mínimo) apresentou atividade antiproliferativa para as linhagens UACC-62 (melanoma), MCF-7

(mama), NCI-ADR/RES (ovário), 786-0 (renal), NCIH460 (pulmão) e HT-29 (cólon).

O meio de cultura acrescido com GOS, por sua vez, apresentou efeito citostático da apenas para duas linhagens (UACC-62 e HT-29).

Os resultados obtidos sugerem que os metabólitos bacterianos provenientes da LA05 em meio sem dextrose exercem efeito antiproliferativo e, que o GOS provavelmente reduz a produção desses compostos.

Nos estudos *in vivo*, os animais que consumiram ração com os prebióticos tiveram um discreto aumento de peso e em relação ao pH do ceco não se observou decréscimo relevante.

Os animais alimentados com FOS e GOS apresentaram aumento na altura das vilosidades intestinais em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

Foi verificado que as vilosidades intestinais dos animais que consumiram FOS se apresentavam mais largas, quando comparado com o grupo controle.

Quanto à altura dos enterócitos, as ratas que consumiram GOS apresentaram média maior que o grupo padrão, enquanto as alimentadas com FOS não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$).

Embora os mecanismos envolvidos em relação à atividade metabólica do GOS não estejam totalmente esclarecidos, sugere-se que este oligossacarídeo tenha potencial de modulação no epitélio intestinal das células. Não é possível, no entanto, excluir o efeito mediado pelos ácidos graxos de cadeia curta em relação à nutrição dos enterócitos.

Mais trabalhos são necessários para decifrar os mecanismos envolvidos no efeito dos prebióticos GOS e FOS.