

PROBIÓTICOS COMERCIAIS: SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL

Resumo Expandido

Maritiele Naissinger da Silva¹

Bruna Lago Tagliapietra ²

Thaiane Marques da Silva ³

Alvaro da Cruz Carpes ⁴

Vinicius do Amaral Flores ⁵

Bruna Steffler ⁶

Neila S. P. S. Richards ⁷

Resumo

A busca por alimentos funcionais aumenta constantemente, e nessa procura, também cresce a oferta das indústrias que buscam produzir e comercializar suplementos, como é o caso de probióticos comercializados livremente em farmácias e supermercados. Esses produtos costumam utilizar rotulagem apelativa e induzir o consumidor a adquirir esses probióticos, os quais, por muitas vezes, não oferecem os benefícios descritos na embalagem. Visto o grande número de alimentos com apelo probiótico e suplementos comercializados sem a necessidade de prescrição nutricional ou médica, este estudo surgiu com o intuito de avaliar a viabilidade de células de cinco probióticos comerciais, por meio de simulação gastrointestinal *in vitro*. Os resultados encontrados mostram que apenas duas amostras possuem concentração mínima de $6 \log \text{ UFC g}^{-1}$, que é a contagem mínima para alimentos probióticos para conferir os benefícios esperados. Os produtos probióticos necessitam de maior fiscalização e rigor para a produção e comercialização, visto a baixa concentração de células vivas encontradas nas amostras avaliadas.

Palavras-chave: Alimentos funcionais. Probióticos. Suplemento. Simulação gastrointestinal.

Fundamentação/Introdução

Nas últimas décadas a busca por alimentos funcionais aumentou consideravelmente, uma vez que os alimentos passaram a ser vistos não somente como uma fonte de nutrientes, mas também como um promotor de bem-estar e saúde, devido à redução do risco de doenças (ROUXINOL-DIAS et al., 2016). Com isso, existe o interesse no desenvolvimento de suplementos alimentares que promovam benefícios a saúde (OZOGUL; HAMED, 2016).

O consumo de suplementos probióticos vem ganhando destaque nos últimos anos, sendo comercializados no formato de cápsulas ou em pó (sachês) em farmácias. A administração oral desses microrganismos resulta em uma grande perda da viabilidade, devido à passagem pelo sistema gastrointestinal, sendo injuriados pela

¹ Mestre, UFSM, maritielens@gmail.com

² Nutricionista, UFSM, bruna_tagliapietra@hotmail.com

³ Mestre, UFSM, thaianemsilva@hotmail.com

⁴ Acadêmico de Medicina Veterinária, UFSM, alvaro_svs@hotmail.com

⁵ Mestre, UFSM, viniciusamaralf@gmail.com

⁶ Acadêmica do curso de Nutrição, UFSM, brunasteffler50@gmail.com

⁷ Doutora, UFSM, neilarichardprof@gmail.com

elevada acidez do estômago e a presença de sais biliares ao alcançar o intestino (COOK et al., 2012).

O benefício à saúde associado ao uso do probiótico deve estar claramente identificado e refletir da forma mais adequada o conjunto de evidências apresentadas. Nos produtos adicionados de probióticos, o benefício deve ser comunicado por meio da alegação de propriedade funcional ou de saúde aprovada para a linhagem, exceto quando houver disposição em contrário em regulamento técnico específico. O benefício alegado pode ter caráter geral ou específico, levando em consideração a totalidade e o nível das evidências disponíveis (BRASIL, 2018; BRASIL, 2019).

São considerados alimentos funcionais os alimentos que além do seu valor nutritivo, inerente à sua composição química, possam afetar benéficamente determinadas funções do organismo, contribuindo, para a manutenção do bem-estar e da saúde (ZHANG et al., 2019). A Resolução nº 2 de 07 de janeiro de 2002, da ANVISA, descreve alimento funcional como “todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido na dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica” (BRASIL, 2002). Os prebióticos e os probióticos são atualmente os principais aditivos alimentares que compõem esses alimentos funcionais.

Inúmeros benefícios à saúde têm sido atribuídos à ingestão de probióticos, porém, é importante ressaltar que tais benefícios somente ocorrem se os mesmos estiverem totalmente viáveis nos produtos onde serão incluídos, ou seja, que sobrevivam durante seu processamento e condições de armazenamento, sendo assim ingeridos em quantidades adequadas, alcançando um número viável de microrganismos ($10^6 - 10^7$ UFC g^{-1}) (SOHAIL et al., 2011; TRIPATHI; GIRI, 2014). No Brasil, a legislação recomenda $10^8 - 10^9$ UFC/100g na recomendação diária do produto pronto para consumo (BRASIL, 2008).

Com a intenção de conhecer o potencial probiótico de produtos comercializados com o apelo probiótico e a viabilidade durante a passagem pelo trato gastrointestinal, buscou-se realizar um estudo com suplementos probiótico comercializados em farmácias.

Objetivos

O objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade probiótica, por meio de simulação gastrointestinal *in vitro*, de probióticos comercializados como compostos funcionais, na forma de suplementação.

Delineamento e Métodos

Foram avaliados cinco probióticos comerciais adquiridos em farmácias. A contagem de células probióticas viáveis foi realizada antes da simulação da digestão dos produtos, ou seja, no momento em que as embalagens eram abertas; e em cada etapa da passagem pelo trato gastrointestinal do experimento *in vitro*.

Para proceder a análise, foram transferidas alíquotas de 1.0 g em diluições adequadas, em triplicata, para placas de Petri descartáveis. Para as espécies *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus* realizou-se plaqueamento por profundidade em ágar MRS (Kasvi®), e para determinar a concentração de *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium animalis* foi adicionado 0.5% de solução A (dicloxacilina na concentração de 0.01%), 1% de solução B (cloreto de lítio a 11%) e

0.5% de solução C (cloreto de cisteína a 10%) em ágar MRS (Kasvi[®]) e realizado plaqueamento por profundidade. Após a inoculação, as placas foram incubadas invertidas em jarra de anaerobiose, em estufa bacteriológica a 37 °C por 72 h.

A viabilidade dos probióticos comerciais frente às condições gastrointestinais foram avaliadas conforme descrito por Madureira et al. (2011). A viabilidade foi avaliada sequencialmente em meios que simulam as diferentes seções do trato gastrointestinal (esôfago/estômago, duodeno e íleo). Foram utilizadas alíquotas de 1 g de amostra adicionadas de 9 mL de água peptonada, sendo preparadas igualmente em três em erlenmeyers e todos submetidos às mesmas condições para simulação gastrointestinal.

Previamente foram preparadas e autoclavadas uma solução ácida (HCl 0.1 N) e uma solução básica (NaHCO₃ 0.1 M) para ajuste do pH das amostras ao longo da simulação gastrointestinal. Inicialmente, o pH foi ajustado a 6.9, para simular a acidez da boca, permanecendo por dois minutos nessa condição e partindo para próxima etapa.

Na etapa esôfago-estômago utilizou-se 25 mg mL⁻¹ de pepsina (Sigma[®]), preparada em HCl 0,1 N, esta solução foi adicionada, em alíquotas iguais, durante toda a fase gástrica, a uma quantidade de 0.05 mL mL⁻¹, seguindo as seguintes etapas de pH/tempo (minutos): 5.5/10', 4.6/10', 3.8/10', 2.8/20', 2.3/20' e 2.0/20' em uma rotação de 130 rpm, adicionando a pepsina (0.05 mL mL⁻¹) e sendo o pH ajustado utilizando HCl 0.1 N em cada etapa. Ao final desta fase, era retirado um dos erlenmeyers e submetido imediatamente as análises de contagem de células probióticas viáveis correspondentes ao estômago.

Na etapa referente ao duodeno utilizou-se, a uma concentração de 0.25 mL mL⁻¹, uma solução contendo 2 g L⁻¹ de pancreatina (Sigma[®]) e 12 g L⁻¹ de sais biliares bovinos (Sigma[®]), preparada em NaHCO₃ 0.1 M, sendo o pH ajustado para 5.0 com a adição da solução de enzimas pancreatina e bile (0.25 mL mL⁻¹) e permanecendo por 20' a 45 rpm, ao final, era retirada o segundo erlenmeyer que correspondia a etapa do duodeno e também submetido imediatamente as análises de contagem de células probióticas viáveis.

A etapa referente ao íleo foi realizada por um aumento do pH para 6.5, utilizando uma solução de NaHCO₃ 0.1 M, permanecendo por 90' em rotação de 45 rpm, e ao final era submetido as análises para contagem de células probióticas viáveis.

Todas as soluções foram preparadas imediatamente no momento da utilização e esterilizadas com membrana de poro 0.22 µm (Minisart, Sartorius Stedim Biotech, Alemanha), as enzimas eram armazenadas em temperaturas de – 18 °C.

A análise foi conduzida em uma incubadora refrigerada tipo Shaker (TE-421, Tecnal, Brasil) mantida a 37 °C, com o intuito de simular a temperatura do corpo humano e a agitação mecânica foi utilizada em paralelo para simular os movimentos peristálticos intestinais, com intensidades semelhantes às alcançadas na seção do trato digestivo. Ao final de cada etapa, foram retiradas alíquotas para a contagem das células probióticas viáveis, conforme descrito anteriormente.

Os dados obtidos em planilhas do Microsoft Office Excel[®], foram analisados conforme delineamento inteiramente casualizado, aplicando análise descritiva, análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias, em um nível de significância de 5% (p<0.05). O programa estatístico utilizado foi o SPSS[®] versão 15.0.

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 são apresentados os probióticos comerciais utilizados para os testes *in vitro*.

Tabela 1 – Probióticos comerciais utilizados para a avaliação da viabilidade durante a simulação gastrointestinal.

Amostra	Composição*	Apresentação*	Indicação de armazenamento*
A1	<i>L. acidophilus</i> LA-14	Liofilizado	Refrigeração
A2	<i>L. acidophilus</i> LA 14	Cápsula	Temperatura ambiente
A3	Frutooligossacarídeo <i>L. acidophilus</i> SD 5221 <i>L. rhamnosus</i> SD 5217 <i>B. bifidum</i> SD 6576	Liofilizado	Temperatura ambiente
A4	<i>B. animalis</i> CNCM I-2494	Líquido	1 – 10 °C
A5	<i>B. bifidum</i> LA-14	Liofilizado	Refrigeração

* Informação conforme descrito na embalagem do produto.

As amostras A1 e A5 não eram acompanhadas de modo de consumo, apenas sendo informado que deveriam ser utilizadas junto à alimentos e bebidas. A amostra A2 era indicada o consumo de 1 a 2 cápsulas por dia. A amostra A3 é um simbiótico, composto por probióticos e prebióticos, sendo indicado no rótulo o consumo de 1 a 2 sachês de 7 g por dia. A amostra A4 é indicada o consumo de 200 mL por dia, sendo dois frascos de 100 mL. Todas as cinco amostras foram armazenadas e submetidas às condições gastrointestinais simuladas conforme seriam consumidas.

Na Tabela 2, são expostos os resultados obtidos pelas análises de simulação gastrointestinal.

Tabela 2 – Viabilidade probiótica dos microrganismos comerciais antes e após a simulação gastrointestinal. Análise realizada em 1g de amostra. Resultados expresso em log UFC g⁻¹.

Amostra	<i>Lactobacillus</i> sp.			
	Inicial	Estômago	Duodeno	Íleo
A1	4.8±0.2 ^a	3.6±0.1 ^b	3.3±0.1 ^b	3.2±0.1 ^b
A2	9.9±0.1 ^a	7.1±0.1 ^b	7.1±0.3 ^b	7.0±0.1 ^b
A3	6.5±0.2 ^a	4.4±0.2 ^b	3.3±0.1 ^b	2.9±0.1 ^c
Amostra	<i>Bifidobacterium</i> sp.			
	Inicial	Estômago	Duodeno	Íleo
A3	7.7±0.1 ^a	3.3±0.1 ^b	3.6±0.1 ^b	3.5±0.1 ^b
A4	8.0±0.1 ^a	6.7±0.2 ^b	6.9±0.1 ^b	6.9±0.2 ^b
A5	4.3±0.1 ^a	3.5±0.1 ^b	3.3±0.2 ^b	3.3±0.1 ^b

Médias da experimentação em triplicata seguidas ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha representam que houve diferença estatística significativa entre os resultados (p<0,05).

Os resultados mostram que apenas as amostras A2 e A4 chegaram ao intestino com concentração viável para ser considerado probióticos e contribuir com os benefícios para flora intestinal. Todas as amostras mostraram redução significativa da

concentração probiótica inicial e após a passagem pela simulação gastrointestinal, o que comprova que os ácidos gastrointestinais agem sobre os microrganismos ocasionando em redução na concentração, prejudicando sua viabilidade.

Além disso, as amostras A1, A3 e A5, comercializadas como probióticos não apresentam a concentração mínima de 8 log UFC g⁻¹, que é a recomendação mínima para comercialização com o apelo probiótico. Todas as amostras indicam no rótulo conter uma concentração de 9 log UFC g⁻¹, porém somente a amostra A2 apresentou a concentração indicada na embalagem, e após a simulação *in vitro*, houve redução de 2,9 log UFC g⁻¹. A amostra A3, que é um simbiótico, foi a que mostrou a maior redução na concentração de microrganismos vivos ao final da simulação gastrointestinal.

Para conferir os benefícios probióticos, os microrganismos devem chegar ao intestino com uma concentração de células viáveis mínimas de 6 log UFC g⁻¹, estando em acordo somente as amostras A2 e A4. Shinde et al. (2019) analisando a eficácia funcional de probióticos as condições gástricas simuladas encontraram diminuição significativa na contagem de *L. acidophilus* no final da fase gástrica, com queda significativa na contagem de células de 1.03 log UFC/mL no final da fase intestinal, pois os ácidos que participam da digestão contribuem para a redução de células probióticas.

São diversos os suplementos e alimentos comercializados com potencial probiótico, tanto em supermercados como em farmácias. Entretanto, muitos fatores interferem na vida desses microrganismos, como a temperatura de armazenamento e o contato com calor. Além disso, a concentração inicial de microrganismos precisa ser elevada, acima de 9 log UFC g⁻¹, para poder aumentar a expectativa de vida de prateleira desses produtos, que já possuem um tempo útil menor, pela difícil manutenção em manter vivas as células probióticas e para sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal. Muitos desses produtos não contém a concentração exigida pela legislação, o que requer maior fiscalização e controle para a comercialização, como os achados nesse estudo. A ANVISA, que é responsável pela inspeção e comercialização desses alimentos, exigem a comprovação probiótica por meio de análises (BRASIL, 2018) para comercialização como produtos probióticos, porém, evidencia-se a necessidade de maior rigor nas exigências para a produção e comercialização de produtos com o apelo probiótico, principalmente os suplementos.

Conclusões/Considerações Finais

Das cinco amostras avaliadas, três não possuem potencial probiótico ao chegar no intestino. Fica evidente que os probióticos comercializados em farmácias podem não apresentar potencial probiótico, nem se consumidos em uma porção de, por exemplo, 20 g/dia.

Referências

BRASIL. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 09 de janeiro de 2002, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas para alimentos com alegações de propriedades funcionais e / ou de saúde, novos alimentos / ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília, 2008.

BRASIL. Guia nº 21/2019. Guia para instrução processual de petição para avaliação de probióticos para uso em alimentos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, versão 1, 2019.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 241, DE 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União** nº 144, de 27 de julho de 2018, 2018.

COOK, M. T., TZORTZIS, G., CHARALAMPOPOULOS, D., KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 56-67, 2012.

MADUREIRA, A. R. et al. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465–470, 2011.

OZOGUL, F.; HAMED, I. Lactic acid bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. **Reference Module in Food Science**, 2016.

ROUXINOL-DIAS, A. L. et al. Probiotics for the control of obesity – Its effect on weight change. **Porto Biomedical Journal**, v. 1, n. 1, p.12-24, 2016.

SHINDEA, T.; VEMURIB, R.; SHASTRIB, M. D.; PERERAB, A. P.; TRISTRAMB, S.; STANLEYA, R.; ERIB, R. Probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 spores exhibit excellent in-vitro functional efficacy in simulated gastric survival, mucosal adhesion and immunomodulation. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 100–108, 2019.

SOHAIL, A. et al. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, n.1, p. 162- 168, 2011.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n, p. 225-241., 2014.

ZHANG, Z., WU, X., ZHANG, G., MA, X., HE, D. Functional food development: Insights from TRP channels. **Journal of Functional Foods**, v. 56, p. 384-394, 2019.