

Avaliação da qualidade, viabilidade e caracterização das propriedades probióticas de microrganismos comercializados em cápsulas manipuladas

Pedro Alonso Ferreira Moutinho¹; 0000-0002-4390-0290

Tânia Siqueira Dutra¹; 0000-0001-6459-9727

Isabelle Rodrigues Martini¹; 0000-0003-1023-9114

Ana Kathariny Barbosa de Almeida¹; 0000-0002-1644-0575

Lucas Yoshimura e Silva¹; 0000-0001-6677-8067

Pedro Acorssi de Carvalho Nascimento¹; 0000-0002-4530-3350

Rodrigo de Carvalho Nascimento¹; 0000-0001-5394-6711

Renato da Silva Teixeira¹; 0000-0002-0962-793X

1 – UniFOA, Centro Universitário de Volta Redonda, Volta Redonda, RJ.
renato.teixeira@foa.org.br

Resumo: A demanda por alimentos e/ou suplementos alimentares que promovam a saúde e bem-estar vem aumentando a cada ano. Neste contexto, destacam-se os probióticos, que são considerados alimentos funcionais, compostos de microrganismos vivos, que quando ingeridos em doses adequadas e com frequência, trazem diversos efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Nesse contexto, presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade, viabilidade e caracterizar as propriedades probióticas de diferentes microrganismos comercializados em cápsulas manipuladas. Para as análises experimentais, foram adquiridas cápsulas contendo microrganismos junto a farmácias de manipulação, as quais foram submetidas a análises quantitativas para verificar a concentração de microrganismos através do método Pour-Plate, a análises morfológicas e bioquímicas para caracterização da espécie e a testes de resistência ao suco gástrico artificial e aos sais biliares, onde se identifica a viabilidade das cepas no organismo do hospedeiro. Todas as cápsulas analisadas continham bactérias bacilares coradas como gram-positivas e não reagentes a catalase, características essas, compatíveis com o gênero *Lactobacillus*. Em relação a contagem de colônias, observou-se que 66,66% das amostras analisadas possuíam contagens iguais ou superiores as indicadas no rótulo, entretanto, *L. gasserii* apesar de ter uma contagem inferior àquela indicada, ainda estava dentro dos parâmetros estabelecidos para um probiótico, por outro lado, *L. bulgaricus* e *L. crispatus*, tiveram contagens inferiores ao mínimo estabelecido, 10^8 UFC. No tocante a resistência ao suco gástrico, a única espécie que sofreu inibição foi a *L. reuteri*, que apresentou uma taxa de inibição igual à 4,91%, já em relação aos sais biliares, *L. acidophilus* e *L. crispatus* sofreram inibição, sendo as taxas de inibição de 31.73% e 64.74%, respectivamente. Conclui-se que algumas cápsulas não atenderam a pelo menos um dos critérios avaliados, indicando a necessidade de um controle de qualidade mais rigoroso.

Palavras-chave: Probióticos. *Lactobacillus*. Viabilidade microbiana.

Tudo é Ciência: do Big Bang ao Metaverso

1º Congresso Brasileiro de Ciência
e Saberes Multidisciplinares

INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos e/ou suplementos alimentares que promovam a saúde e bem-estar vem aumentando a cada ano. Neste contexto, destacam-se os probióticos, que são considerados alimentos funcionais, compostos de micro-organismos vivos, que quando ingeridos em doses adequadas e com frequência, trazem diversos efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. A modulação da microbiota do trato gastrointestinal e a melhoria do trânsito intestinal são os efeitos mais divulgados, entretanto, tem sido observado que o consumo de probióticos pode estar associado ao tratamento da diarreia, alívio dos sintomas de intolerância à lactose, redução do colesterol no sangue, tratamento da síndrome do intestino irritável e doença inflamatória intestinal, propriedades anticancerígenas, síntese de vitaminas e estimulação da imunidade (KERRY et al., 2018). No mercado mundial, um grande número de formulações probióticas está disponível para consumidores como medicamentos, suplementos alimentares e alimentos funcionais. As espécies microbianas contidas e sua quantidade até o vencimento do produto, as alegações dos benefícios à saúde são informações que devem estar nos rótulos dessas preparações. De acordo com Souza et al. (2018), a escolha de um alimento, por um consumidor, é baseada nos hábitos alimentares do mesmo, nas condições socioeconômicas e, por fim, nas informações presentes nos rótulos. A rotulagem, portanto, é um dos fatores que induz o consumidor a adquirir, ou não, determinado produto, devendo apresentar informações claras e precisas, de modo a garantir que o consumo seja seguro.

No Brasil, a ANVISA é órgão que determina as diretrizes dos produtos com alegação de probióticos através de suas Resoluções da Diretoria Colegiada RDC 323 de 2003; 241 e 243 de 2018 e Instrução Normativa IN 28 de 2018, que dispõem respectivamente sobre o regulamento técnico de registro de medicamentos probióticos, os requisitos sanitários dos suplementos alimentares, os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos, além de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares (BRASIL, 2018).

Tudo é Ciência: do Big Bang ao Metaverso

1º Congresso Brasileiro de Ciência
e Saberes Multidisciplinares



Segundo Mazzantini et al. (2021) enquanto as formulações comerciais mundialmente conhecidas são submetidas a rigorosos controles de qualidade, geralmente são aplicados regulamentos menos rigorosos às preparações categorizadas como suplementos alimentares, principalmente os vendidos em cápsulas manipuladas. Em estudo realizado por Silva; Bender (2021), verificou que de modo geral, as farmácias magistrais não atendem a todos os critérios descritos na legislação, como concentração, prazo de validade e excipientes utilizados.

Nesse contexto, o projeto tem como objetivo avaliar a qualidade, viabilidade e caracterizar as propriedades probióticas de diferentes microrganismos comercializados em cápsulas manipuladas.

MÉTODOS

Para as análises experimentais, foram adquiridas cápsulas contendo microrganismos junto a farmácias de manipulação da cidade de Volta Redonda-RJ. As cápsulas foram armazenadas e transportadas em frascos plásticos, rotulados com a indicação da espécie de microrganismo presente, da concentração e do prazo de validade.

Para verificação da concentração de microrganismos, o conteúdo da cápsula foi transferido individualmente para tubos contendo 9 mL de salina tamponada estéril. Após, foram realizadas diluições decimais seriadas e plaqueamento pelo método “Pour-plate” em meio Ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), onde as placas foram incubadas a 37°C durante 48 h. Posteriormente foi realizado a contagem e isolamento de colônias (TEIXEIRA, 2011).

Os isolados foram submetidos a uma observação microscópica após coloração de Gram e ao teste de catalase em lâmina, utilizando-se H₂O₂ a 30% para caracterização morfológica e bioquímica.

No intuito de se testar a viabilidade dos isolados, foram realizados testes de resistência à acidez juntamente com as enzimas digestivas e aos sais biliares. Para verificar a resistência à acidez, os isolados foram distribuídos em dois tubos, sendo que no tubo controle, 1 mL da suspensão contendo os micro-organismos foram inoculados em 9 mL de tampão fosfato salina (PBS) com pH 7,0. No tubo teste, 1 mL

Tudo é Ciência: do Big Bang ao Metaverso

1º Congresso Brasileiro de Ciência
e Saberes Multidisciplinares

da suspensão foi inoculada em 9 mL de tampão PBS com pH ajustado a 3,0 utilizando HCl 5 mol/L acrescido de pepsina a 3,2 g/L (suco gástrico artificial). Esses tubos foram mantidos a 37°C por 3 h., após este período, uma alíquota de 20 µL foi aplicada em uma microplaca contendo 200 µL de caldo MRS/poço, sendo incubada por mais 18 h. a 37°C. A absorbância dos cultivos foi determinada pela leitura de OD620 nm em espectrofotômetro e a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada a segundo a fórmula $(1-ASG/ACT) \times 100$, onde ASG significa a absorbância da amostra com o suco gástrico artificial e ACT significa a absorbância da amostra controle. (PAPAMANOLI et al., 2003). Para avaliar a tolerância aos sais biliares, 100 µL de cada cepa foi inoculada individualmente em 2 mL caldo MRS puro e em 2 mL caldo MRS contendo 0,3% (p/v) de sais biliares, posteriormente aplicou-se 200 µL/poço dos inóculos em uma microplaca ficando incubada por 18 h. a 37°C. A absorbância do cultivo também foi determinada pela leitura de OD620 nm em espectrofotômetro, bem como o porcentual de inibição de crescimento foi calculada da mesma maneira no teste de resistência a acidez (SCHIMITT et al., 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas cápsulas de 9 microrganismos, rotulados como sendo das espécies *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. jonsonni*, *L. reuteri* e *L. rhaminosus*, todos na concentração de 10^9 UFC.

Após contagem das colônias pelo método Pour-plate em Ágar MRS, observou-se que as cápsulas da espécie *L. acidophilus* continham em média $1,32 \times 10^{11}$ UFC, da *L. casei* $8,83 \times 10^{10}$ UFC, da *L. helveticus* $1,86 \times 10^9$ UFC, da *L. jonsonni* $1,6 \times 10^{10}$ UFC, $1,7 \times 10^{11}$ UFC em média estavam presentes nas cápsulas de *L. reuteri* e $4,11 \times 10^9$ UFC nas de *L. rhaminosus*. Essas contagens, representando 66,66% das amostras analisadas, são compatíveis com a indicação do rótulo, sendo iguais ou superiores. Segundo Silva; Bender (2021) a ANVISA estabelece que, um produto probiótico deve apresentar uma quantidade mínima viável da cultura e deve estar na faixa de 10^8 - 10^9 UFC no consumo diário dos microrganismos para causar o efeito desejado.

Tudo é Ciência: do Big Bang ao Metaverso

1º Congresso Brasileiro de Ciência
e Saberes Multidisciplinares



As cápsulas da espécie *L. gasseri* apresentaram contagens inferiores a quantidade estipulada pelo rótulo das cápsulas inicialmente adquiridas, $3,18 \times 10^8$ UFC, mas ainda dentro do parâmetro estabelecido.

Por outro lado, verificou-se que as cápsulas da espécie *L. bulgaricus* em média tinham $2,4 \times 10^6$ UFC e da *L. crispatus*, não apresentaram crescimento bacteriano nas diluições realizadas, cuja menor realizada foi de 10^{-5} . De acordo com Costa (2012) nessas condições os probióticos talvez não exerçam o benefício desejado no organismo ou o efeito será em uma escala menor.

No tocante a caracterização morfolotintorial e bioquímica, todos os isolados analisados, se apresentaram como bactérias Gram positivas, com formato bacilar e catalase negativa. De acordo com Andrade (2018) bactérias do gênero *Lactobacillus* apresentam morfologia bacilar, são anaeróbias, Gram positivas, não possuem flagelo e produzem energia através de fermentação. Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo indicam a presença de *Lactobacillus* spp. nas cápsulas comercializadas como informadas no rótulo.

Os microrganismos foram submetidos a testes de resistência, onde foram expostos ao suco gástrico artificial e aos sais biliares intestinais (Tabela 1). O suco gástrico possui um pH extremamente baixo que varia entre 1,5 e 2, a maioria das bactérias não consegue sobreviver nesse tipo de pH. A única espécie que sofreu inibição foi a *L. reuteri*, que apresentou uma taxa de inibição igual à 4,91%, as demais cepas apresentaram resistência ao suco gástrico. Os sais biliares intestinais também são um desafio para a maioria dos microrganismos, pois os sais possuem vários efeitos inibitórios em uma gama de bactérias. Nesse teste apenas as espécies *L. acidophilus* e *L. crispatus* sofreram inibição, *L. acidophilus* com uma taxa de inibição igual à 31.73% e *L. crispatus* com uma taxa de 64.74%. As demais espécies não apresentaram taxa de inibição, mas sim resistência aos sais biliares intestinais.

Tudo é Ciência: do Big Bang ao Metaverso

1º Congresso Brasileiro de Ciência
e Saberes Multidisciplinares

Tabela 1 – Percentuais de inibição frente ao suco gástrico e sais biliares

AMOSTRAS	SUCO GÁSTRICO	SAIS BILIARES
<i>L. acidophilus</i>	-10.88%	31.73%
<i>L. casei</i>	-7.59%	-297.15%
<i>L. crispatus</i>	-2.42%	64.74%
<i>L. gasseri</i>	-2.49%	-144.78%
<i>L. helveticus</i>	-3.40%	-174.02%
<i>L. reuteri</i>	4.91%	-104.47%
<i>L. rhaminosos</i>	-7.33%	-73.86%

Fonte: O autor

Vale ressaltar que as cepas de *L. bulgaricus* e *L. jonssoni* não cresceram após determinado período e, portanto, não foram submetidas aos testes de resistência.

De acordo com Jin et al. (1998), os microrganismos devem resistir e manter a viabilidade sob as condições adversas no organismo do hospedeiro, caso as bactérias não sobrevivam a acidez, as ações das enzimas digestivas e dos sais biliares, os efeitos benéficos dos probióticos não ocorrem.

CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos conclui-se que as cápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. crispatus*, *L. jonssoni*, *L. reuteri* não atenderam a pelo menos um dos critérios avaliados, seja no tocante a concentração indicada ou a resistência ao suco gástrico artificial e aos sais biliares. Isso indica que é necessário se ter um controle de qualidade mais rigoroso quanto a manipulação de cápsulas contendo probiótico, a fim de garantir maior qualidade ao consumidor.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Oswaldo Aranha (FOA) e ao Centro Universitário de Volta Redonda (UniFOA), pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do estudo (90221-PIC/FOA).

Tudo é Ciência: do Big Bang ao Metaverso

1º Congresso Brasileiro de Ciência
e Saberes Multidisciplinares

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. M. **Aspectos fisiológicos e genéticos da bactéria *Lactobacillus vini* em condições de estresse**. 2018. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

BRASIL. (2018). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 243 de 26.07.2018**: Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Diário Oficial da União, Brasília.

COSTA, T. S. **Seleção de bifidobactéria de origem humana para uso como probiótico em alimento funcional: avaliação do efeito protetor na infecção experimental com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium**. 2012. 135 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

JIN, L. Z. et al. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 27, p. 183-185, 1998.

KERRY, R.G. et al. Benefaction of probiotics for human health: A review. **J. Food Drug Anal.** v. 26, p. 927–939, 2018.

MAZZANTINI, D. et al. Spotlight on the compositional quality of probiotic formulations marketed worldwide. **Frontiers in microbiology.** v. 12, p. 69-73, 2021.

PAPAMANOLI, E. et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science.** v. 65, n. 2, p. 859-867, 2003.

SCHIMITT, J. A. D. et al. Evaluation of the probiotic profile of *Lactobacillus acidophilus* used in pharmaceutical and food applications. *Acta Scientiarum.* **Health Sciences.** v. 40, p. 1-9, 2018.

SILVA, E. C. S. H.; BENDER, S. Qualidade e viabilidade de probióticos comercializados em farmácias magistrais de Cascavel-PR. **Research, Society and Development.** v. 10, n. 14, 2021.



Tudo é Ciência: do Big Bang ao Metaverso

1º Congresso Brasileiro de Ciência
e Saberes Multidisciplinares

SOUZA, A. L. C. et al. Rotulagem de alimentos funcionais: análise de informações. **Higiene alimentar**. n. 32, p. 121-126, 27 fev. 2018.

TEIXEIRA, R. S. **Avaliação do efeito de micro-organismos probióticos sobre Haemonchus contortus em ovinos**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Biotecnologia. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2011.