

AVALIAÇÃO DE PROBIÓTICOS COMERCIAIS - ELES CUMPREM O QUE PROMETEM?

Isabella S.O. Silva^{1,2}, Emília M.F. Lima¹, Katia Leani¹, Svetoslav D. Todorov¹

1. ProBacLab, Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Food Research Center, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-000, Brasil; 2. Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo, SP, Brasil

isabella.somera@yahoo.com

Objetivos

Este estudo visa avaliar a qualidade e a conformidade de produtos probióticos comercializados como contendo *Limosilactobacillus reuteri*, por meio de: (1) contagem viável de microrganismos, (2) identificação das cepas presentes por métodos culturais, e (3) avaliação da segurança microbiana. Os resultados fornecerão subsídios para a implementação de padrões regulatórios mais rigorosos, garantindo a proteção do consumidor e a veracidade da rotulagem.

Métodos e Procedimentos

1. Dez produtos probióticos comerciais, rotulados como contendo exclusivamente *Lmb. reuteri*, foram adquiridos e codificados de A - L para garantir anonimato
2. Amostras foram diluídas em solução salina, plaqueadas em ágar MRS e incubadas a 37°C/24 h para contagem de UFC por cápsula/sachê.
3. Realizados coloração de Gram, teste de produção de gás (tubos de Durham) e teste de catalase conforme Fugaban et al. (2022)
4. Identificação e diferenciação de culturas microbianas estudadas: DNA extraído com kit ZR Fungal/Bacterial. Diferenciação por rep-PCR e eletroforese; identificação por

sequenciamento do gene 16S rRNA e análise BLAST.

5. Atividades hemolítica e proteolítica, gelatinase, diacetil seguiu Fugaban et al. (2022).

6. O teste de resistência aos antibióticos foi aplicado por ensaio de difusão em ágar, realizado de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo CLSI e as seleções de antibióticos ocorreram de acordo com as recomendações da EFSA.

7. Teste para produção de aminas biogênicas: Ensaio realizado conforme a metodologia descrita por Bover-Cid e Holzapfel (1999).

8. Presença ou ausência de genes de virulência: Pesquisa por PCR dos genes *vanA*, *vanB*, *vanD* (resistência); *odc*, *hdc*, *tdc* (aminas); *ace*, *hyl*, *cylA* (virulência), conforme Fugaban et al. (2021).

9. Comportamento das cepas estudadas em modelos de simulação de passagem estômago-duodeno: Sobrevivência gastrointestinal avaliada por modelo in vitro adaptado de Fugaban et al. (2022).

10. Avaliada aplicando o kit específico para a quantificação de D-lactato e L-lactato (Megazyme™, Bray, Co. Wicklow, Irlanda). O teste foi realizado de acordo com as orientações do fabricante.

11. Teste para identificação da presença de *Salmonella*: Realizado com kit MC-Media Pad (Merck), conforme instruções do fabricante.

12. Teste de curva de crescimento das cepas na presença de diferentes concentrações de pH, NaCl e ácidos biliares: Crescimento monitorado por absorbância (595 nm) em microplacas com MRS sob diferentes pH, NaCl e ácidos biliares

Resultados

Apenas 4 dos 10 produtos analisados (E-H) apresentaram contagens de UFC compatíveis com os valores declarados nos rótulos. Dois produtos (B e L) não exibiram crescimento microbiano, indicando ausência de microrganismos viáveis. Conforme esperado para *Limosilactobacillus reuteri*, todos os isolados foram bacilos Gram-positivos e catalase-negativos. A produção de gás, no entanto, variou: observada nas cepas de C-E e G, ausente em F, e com resultados variáveis em A e K – sugerindo composição mista nesses dois últimos. A análise genética confirmou a heterogeneidade dos produtos A e K. O sequenciamento do gene 16S rRNA identificou a predominância de *Lmb. reuteri* em C-E, G e H. O produto F foi identificado como *Lactiseibacillus rhamnosus*. O produto A continha uma mistura de *Lmb. reuteri*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactobacillus acidophilus*, enquanto o K alternava entre *Lmb. reuteri* e *Lbs. rhamnosus*. (Figura 1).

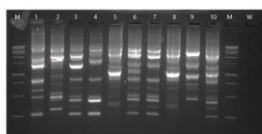


Figura 1: Diferenciação dos isolados pelo repPCR de produtos diferentes futuramente identificados pelo 16S rRNA: 1: IS01E, 2: IS01F, 3: IS01C, 4: IS01D, 5: IS01A, 6: IS05A, 7: IS06A, 8: IS07A, 9: IS12A, 10: IS015; W: (water) controle negativo.

Em relação à segurança, todas as cepas foram sensíveis aos antibióticos testados (exceto pela resistência intrínseca à vancomicina, quebrada por três isolados: IS01D, IS02K e IS06K). Não foi detectada produção de aminas biogênicas, contaminação por *Salmonella*, nem a presença dos genes de virulência *hdc*, *tdc*, *odc*, *hyl*, *cylA* e *ace*. Entretanto, detectou-se o gene *vanA*, um

achado relevante. Funcionalmente, diversas cepas exibiram atividades tecnológicas promissoras, como atividade proteolítica (e.g., *Lbs. rhamnosus* IS01F, *Lpb. plantarum* IS01A/IS07A) e produção de diacetil. A tolerância gastrointestinal e a produção de ácido lático variaram significativamente entre os isolados.

Conclusões

Este estudo revelou graves inconsistências na qualidade de probióticos comerciais. Apenas 4 de 10 produtos apresentaram contagens de UFC compatíveis com os rótulos, e dois não apresentaram crescimento algum. A caracterização das cepas identificou discrepâncias taxonômicas, como espécies não declaradas e composições mistas, em alguns produtos. Apesar do perfil geral de segurança (sensibilidade a antibióticos e ausência de genes de virulência), a detecção do gene *vanA* em algumas cepas é um achado preocupante. As cepas também exibiram funcionalidades variadas (como atividade proteolítica e tolerância gastrointestinal). Os resultados destacam falhas significativas de qualidade em parte do mercado e reforçam a necessidade crucial de caracterização rigorosa para garantir a segurança e a eficácia desses produtos.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela FAPESP, processos 2023/05394-9 e 2024/08823-0, São Paulo, SP, Brasil.

Referências

- Bover-Cid S, Holzapfel WH. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53(1):33-41. doi: 10.1016/s0168-1605(99)00152-x
- Fugaban, J.I.I., Bucheli, J.E.V., Park, Y.J., Suh, D.H., Jung, E.S., Franco, B.D.G.M., Ivanova, I.V., Holzapfel, W.H., Todorov, S.D. (2022). Antimicrobial properties of *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from silage. *Journal of Applied Microbiology*. 132. (01). 311-330. (ISSN 1364-5072). DOI:10.1111/jam.15205