



## VIABILIDADE DE PROBIÓTICO LIVRE NA SIMULAÇÃO DE DIGESTÃO *in vitro*

R. Segalla<sup>1</sup>, G. L. B. Do Nascimento<sup>2</sup>, M. Peruzollo<sup>3</sup>, R. L. Cansian<sup>4</sup>, C. Steffens<sup>5</sup>, G. T. Backes<sup>6</sup>

1- Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621 – Bairro Fátima, Erechim, 99709-910, RS/Brasil. E-mail: [raielise-galla@yahoo.com.br](mailto:raielise-galla@yahoo.com.br)

2- Graduação em Farmácia - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621 – Bairro Fátima, Erechim, 99709-910, RS/Brasil. E-mail: [gabriela.lbn@hotmail.com](mailto:gabriela.lbn@hotmail.com)

3- Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621 – Bairro Fátima, Erechim, 99709-910, RS/Brasil. E-mail: [marcipe-ruzzolo@yahoo.com.br](mailto:marcipe-ruzzolo@yahoo.com.br)

4- Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621 – Bairro Fátima, Erechim, 99709-910, RS/Brasil. E-mail: [cansian@uricer.edu.br](mailto:cansian@uricer.edu.br)

5- Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621 – Bairro Fátima, Erechim, 99709-910, RS/Brasil. E-mail: [clarices@uricer.edu.br](mailto:clarices@uricer.edu.br)

6- Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621 – Bairro Fátima, Erechim, 99709-910, RS/Brasil. E-mail: [gtoniaz-zo@uricer.edu.br](mailto:gtoniaz-zo@uricer.edu.br)

**RESUMO** – Os probióticos, quando administrados em quantidades adequadas, oferecem benefícios à saúde, mas algumas cepas não sobrevivem às condições adversas do trato gastrointestinal (TGI). Portanto, é fundamental avaliar a viabilidade dessas cepas sob condições simuladas do TGI. Este estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade do *Lactobacillus rhamnosus* livre em condições gastrointestinais *in vitro*, utilizando um modelo que simula as fases gástrica e entérica. Os resultados mostraram a taxa de sobrevivência da cepa e o impacto das condições simuladas na sua integridade e funcionalidade. Conclui-se que *L. rhamnosus* apresenta boa sobrevivência nas condições simuladas, com viabilidade para sua aplicação em produtos alimentícios funcionais.

**ABSTRACT** – Probiotics, when administered in adequate amounts, provide health benefits, but some strains do not survive the adverse conditions of the gastrointestinal tract (GIT). Therefore, it is essential to assess the viability of these strains under simulated GIT conditions. This study aimed to evaluate the viability of free *L. rhamnosus* under *in vitro* gastrointestinal conditions, using a model that simulates the gastric and enteric phases. The results showed the survival rate of the strain and the impact of the simulated conditions on its integrity and functionality. It was concluded that *L. rhamnosus* exhibits good survival under the simulated conditions, with viability for its application in functional food products.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Lactobacillus rhamnosus*; Gastrointestinal; Microbiota; Cultura Bacteriana; Alimentos Funcionais.

**KEYWORDS:** *Lactobacillus rhamnosus*; Gastrointestinal; Microbiota; Bacterial Culture; Functional Foods.

### 1. INTRODUÇÃO



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

A utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2002). Pode promover direta, ou indiretamente vários benefícios à saúde, incluindo proteção contra microrganismos patogênicos, inflamação, hipertensão, diabetes, melhoria de condições como intolerância à lactose, câncer, alergias e doenças hepáticas, atividade anticolesterolêmica, o fortalecimento da resistência a infecções, estresse oxidativo, modulação do microbioma e modulação imunológica (Novik, Savich, 2020).

O *L. rhamnosus* está presente no trato gastrointestinal de humanos e animais, desempenhando um papel fundamental na manutenção da saúde intestinal e no equilíbrio da microbiota (Petrova *et al.*, 2021; Leser, Backer, 2024). Estudos tem relatado que o *L. rhamnosus* é capaz de prevenir, tratar ou aliviar alguns sintomas associados à obesidade, depressão, doenças cardiovasculares e distúrbios gastrointestinais (Cameron *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019).

A administração oral de microrganismos resulta em uma grande perda da viabilidade, devido à passagem pelo sistema gastrointestinal, sendo injuriados pela elevada acidez do estômago e a presença de sais biliares ao alcançar o intestino. Para que o probiótico exerça a sua função e forneça os benefícios à saúde do hospedeiro, é necessário que ele sobreviva às condições gastrointestinais, como o baixo pH e a presença de enzimas digestivas (Naissinger *et al.*, 2021). Os probióticos oferecem inúmeros benefícios à saúde, mas as cepas adicionadas aos alimentos devem permanecer viáveis durante o processamento e o armazenamento. Isso garante uma ingestão adequada e um número final de microrganismos viáveis ( $10^6 - 10^7$  UFC/g) (Tripathi; Giri, 2014). No Brasil, a legislação recomenda limites mínimos de  $10^8 - 10^{10}$  UFC/100g na recomendação diária do produto pronto para consumo e por grupo populacional (BRASIL, 2020).

Para avaliar a eficácia desse microrganismo em formulações alimentícias, torna-se essencial então compreender sua viabilidade durante a passagem pelo trato digestório. Dessa forma, este estudo busca analisar a resistência de *L. rhamnosus* em condições que simulam a digestão humana.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Culturas probióticas

Para esta pesquisa foi utilizado o microrganismo probiótico *L. rhamnosus*, cedido pela empresa Sacco Brasil. A cultura permaneceu armazenada em temperatura de  $-18^\circ\text{C}$ .

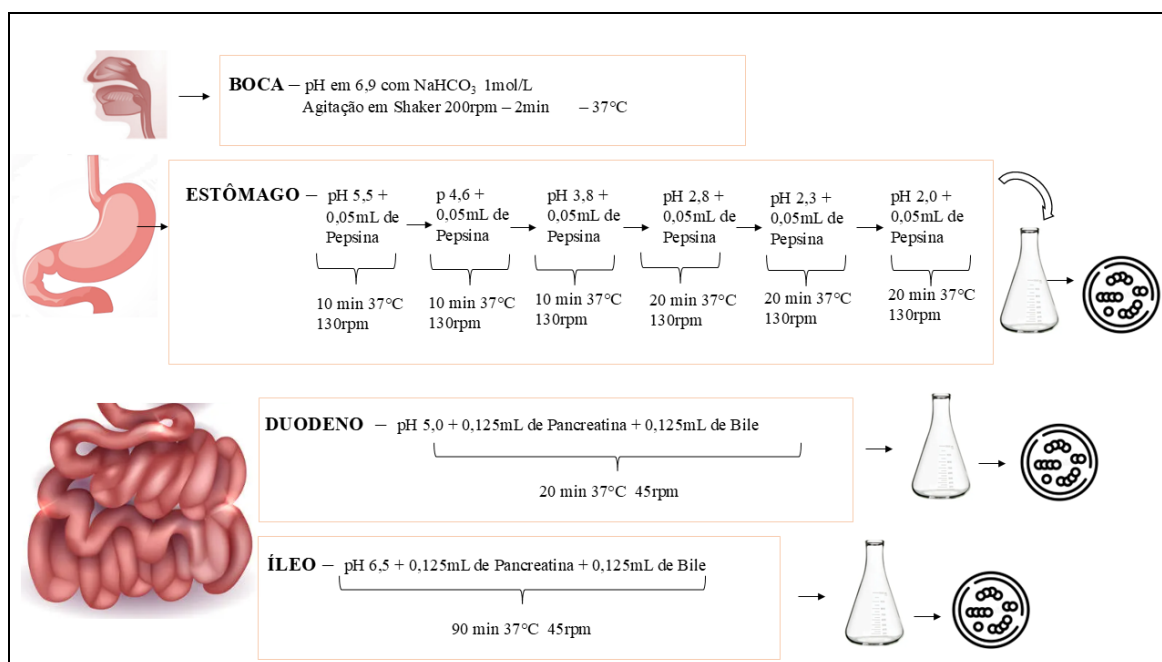


19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

## 2.2 Viabilidade do probiótico em condições gastrointestinais *in vitro*

O teste de viabilidade dos microrganismos probióticos frente a condições gastrointestinais seguiu o protocolo descrito por Madureira *et al.* (2011) e Naissinger *et al.* (2021), que simula as seções do trato gastrointestinal. As análises foram realizadas em triplicata. Para o preparo do inóculo a cultura probiótica (1 g) foi ativada em caldo MRS (100 mL) e incubada durante 15 h a 37 °C. Após, foi centrifugada (MPW – 351R) a 4670 x g por 15 min em centrífuga refrigerada (4 °C) e lavada em solução de NaCl (0,85 % m/v) por duas vezes. A análise foi conduzida em uma incubadora refrigerada tipo Shaker (Marconi, Brasil), mantida a 37 °C. Foram utilizadas alíquotas de 1 g de células probióticas adicionadas de 9 mL de água peptonada, e após submetidas às mesmas condições para simulação gastrointestinal. Previamente foram preparadas e esterilizadas em autoclave uma solução ácida (HCl 0,1 mol/L) e uma solução básica (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol/L) para ajuste do pH das amostras (Figura 1).

**Figura 1** - Estágios da simulação gastrointestinal (estômago, duodeno e íleo) do *L. rhamnosus*.



O pH inicial foi ajustado a 6,9, para simular a acidez da boca, permanecendo em shaker com rotação de 200 rpm por 2 min. Na etapa esôfago-estômago foi utilizado 25 mg/mL de pepsina (Sigma, USA) em HCl 0,1 mol/L. Esta solução foi adicionada 0,05 mL, durante toda a fase gástrica, seguindo as seguintes etapas de pH/tempo: 5,5/10 min, 4,6/10 min, 3,8/10 min, 2,8/20 min, 2,3/20 min e 2,0/20 min a 130 rpm. Na etapa referente ao duodeno foi utilizada uma concentração de 0,25 mL de uma solução de 2 g/L de pancreatina (Sigma, USA) e 12 g/L de sais biliares bovinos (Sigma, USA), preparadas em NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol/L, com pH 5,0 e permanecendo por 20 min a 50 rpm. A etapa referente ao íleo ajustou-se o pH para 6,5 com NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol/L, e adicionada 0,25 mL de



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

solução enzimática (2 g/L de pancreatina e 12 g/L de sais biliares bovinos). A amostra permaneceu por 90 min a 50 rpm. Ao final de cada etapa foi retirada a amostra e submetida à análise de contagem de células probióticas viáveis.

### 2.3 Contagem de células probióticas

Para a contagem de células probióticas seguiu-se metodologia de Naissinger *et al.* (2021), com adaptações. Para a análise foram realizadas diluições seriadas, e alíquotas de 1,0 mL foram transferidas para placas de Petri para plaqueamento por profundidade. O meio do crescimento do gênero *L. rhamnosus* foi produzido com caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Kasvi, Brasil), adicionado de 1% de Tween 80 (Synth, Brasil). Após a inoculação, as placas foram incubadas invertidas em jarra de anaerobiose, em estufa bacteriológica (Tecnal, Brasil) a 37 °C por 72 h.

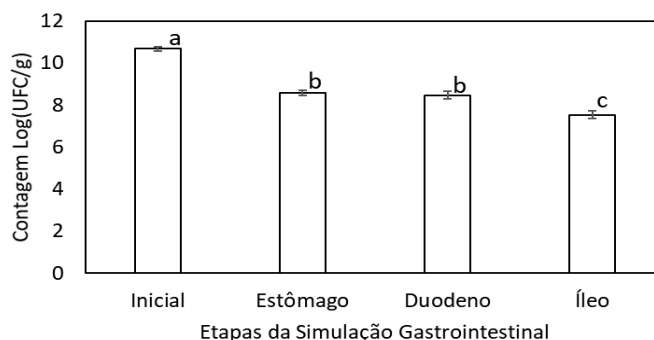
### 2.4 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados submetidos a análise de variância (ANOVA teste de Tukey, a nível de 95% de confiança) utilizando o software *Statistic 7.0*.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade da cepa *L. rhamnosus* livre foi avaliada em condições que simulam a digestão gastrointestinal humana. Conforme apresentado na Figura 2, observou-se uma redução significativa na contagem da cepa após a fase gástrica, com perda aproximada de 2 log UFC/g. No entanto, houve uma manutenção durante a fase intestinal, resultando em uma viabilidade final superior a 10<sup>6</sup> UFC/g. Esse resultado indica que uma proporção relevante das células sobreviveu ao processo digestivo simulado, com um índice de viabilidade de 68,7%.

**Figura 2** – Contagem de *L. rhamnosus* em simulação de digestão *in vitro*. Média ± Desvio Padrão. Letras iguais na barra indicam não haver diferença significativa a nível de 5% (teste de Tukey).





19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

Estudos anteriores apontam que a sobrevivência de probióticos ao trato gastrointestinal pode variar consideravelmente. Naissinger *et al.* (2021) relataram reduções entre 1 e 4 log UFC/g em diferentes cepas probióticas durante a passagem pelo sistema digestivo. Leser e Baker (2024) ressaltam que, embora os probióticos interajam com o hospedeiro ao longo de todo o trato gastrointestinal, as interações mais significativas ocorrem no intestino delgado, devido às suas características anatômicas e funcionais e à menor densidade bacteriana nessa região.

A resistência ao ambiente gástrico e às secreções biliares é uma característica essencial para que uma cepa seja considerada probiótica. O pH ácido do estômago, associado à presença de enzimas digestivas e sais biliares no intestino delgado, representa um desafio para a viabilidade microbiana (Carvalho Lima *et al.*, 2009; FAO/WHO, 2002). Estudos apontam que o tempo médio de trânsito gastrointestinal pode chegar a 6 h (Dimitrellou *et al.*, 2016), tornando fundamental a avaliação da estabilidade das cepas probióticas sob essas condições.

A adesão às células epiteliais intestinais é outro fator determinante, permitindo a colonização, a modulação da microbiota intestinal e a promoção de benefícios como a melhora da digestão, proteção contra patógenos e potenciais efeitos anticarcinogênicos (Verruck *et al.*, 2020). No entanto, para que esses efeitos sejam alcançados, é necessário que os microrganismos cheguem vivos e em quantidades adequadas ao intestino. A viabilidade observada para *L. rhamnosus* sugere um potencial promissor para sua aplicação em alimentos funcionais, garantindo que uma quantidade significativa de células viáveis atinja o intestino e possa exercer seus efeitos benéficos à saúde.

#### **4. CONCLUSÃO**

Os resultados deste estudo indicam que *L. rhamnosus* livre apresenta uma taxa de sobrevivência relevante no trânsito gastrointestinal simulado, com viabilidade final superior a  $10^6$  UFC/g. Desse modo, demonstra uma viabilidade adequada para potencial colonização intestinal. Esses achados reforçam o potencial da cepa como probiótico funcional em formulações alimentares.

#### **5. AGRADECIMENTO**

Os autores agradecem ao CNPq, FAPERGS, CAPES e URI pelo auxílio financeiro.

#### **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BRASIL. Instrução Normativa - IN Nº 76, de 05 de novembro de 2020. Dispõe sobre a atualização das listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos



# 9º SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

alimentares. Diário Oficial da União nº 215, p. 75, 11 de novembro de 2020.

CAMERON, D., HOCK, Q. S., KADIM, M., MOHAN, N., RYOO, E., SANDHU, B., YAMASHIRO, Y., JIE, C., HOEKSTRA, H., GUARINO, A. Probiotics for gastrointestinal disorders: Proposed recommendations for children of the Asia-Pacific region. **World Journal of Gastroenterology**, vol. 23, p. 7952–7964, Dec. 2017.

CARVALHO LIMA, K. G., KRUGER, M. F., BEHRENS, J., DESTRO, M. T., LANDGRAF, M., MELO FRANCO, B. D. G. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* **LWT Food Science Technology**, vol. 42, no. 2, p. 491-495, Mar. 2009.

CHEN, L., LI, H., LI, J., CHEN, Y., YANG, Y. *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment improves intestinal permeability and modulates microbiota dysbiosis in an experimental model of sepsis.

**International Journal of Molecular Medicine**, vol. 43, p. 1139–1148, Jan. 2019.

DIMITRELLOU, D., KANDYLIS, P., PETROVIC, T., DIMITRIJEVIC-BRANKOVIC, S.I., LEVIC, S., NEDOVIC, V., KOURKOUTAS, Y. Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. **LWT Food Science Technology**, vol. 71, p. 169–174, Sep. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations. Cordoba, Argentina, 2002.

LESER, T., BAKER, A. Molecular mechanisms of *Lacticaseibacillus rhamnosus*, LGG® Probiotic Function. **Microorganisms**, vol. 12, no. 4, p 794. Apr. 2024.

MADUREIRA, A. R., AMORIM, M., GOMES, A. M., PINTADO, M. E., MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, vol. 44, p. 465–470, Jan. 2011.

NAISSINGER, M., TAGLIAPIETRA, B. L., FLORES, V. do A., PEREIRA DOS SANTOS R. N. S. In vitro test to evaluate survival in the gastrointestinal tract of commercial probiotics. **Current Research in Food Science**, vol. 4, p. 320–325, 2021.

NOVIK, G., SAVICH, V. Beneficial microbiota. Probiotics and pharmaceutical products in functional nutrition and medicine. **Microbes and Infection**. vol. 22, no. 1, p. 8–18, Feb. 2020.

PETROVA, M.I., REID, G., TER HAAR, J. A. *Lacticaseibacillus rhamnosus* GR-1, a.k.a. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1: past and future perspectives, **Trends in Microbiology**, vol. 29, p. 747–761, Aug. 2021.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R., AURA, A. M., OKSMAN-CALDENTY, K. M., MYLLÄRINEN, P., SAARELA, M., MATTILA-SANHOLM, T., POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science Technology**, vol.13, p. 3-11, Jan. 2002.

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

VASILJEVIC, T., SHAH, N. P. Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, vol. 18, no. 7, p. 714-728, Jul. 2008.

VERRUCK, S., BARRETTA, C., MIOTTO, M., CANELLA, M. H. M., DE LIZ, G. R., MARAN, B. M., GARCIA, S. G., DA SILVEIRA, S. M., VIEIRA, C. R. W., DA CRUZ, A. G. Evaluation of the interaction between microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 added in goat's milk Frozen Yogurt and *Escherichia coli* in the large intestine. **Food Research International**, vol. 127, 2020.