



PARAPROBIÓTICOS COMO POTENCIAIS AGENTES PROMOTORES DE SAÚDE EM PRODUTOS LÁCTEOS

Cássia Pereira Barros^a, Roberto Pessanha da Silva Pires^b, Maria Carmela Kasnowski Holanda Duarte^a, Mônica Queiroz de Freitas^a, Adriano Gomes da Cruz^b

a Universidade Federal Fluminense (UFF), Faculdade de Medicina Veterinária, 24230-340, Niterói, Brasil

b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Departamento de Alimentos, 20270-021, Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO

O desenvolvimento de um produto probiótico precisa atender critérios rigorosos para que as culturas bacterianas sejam capazes de sobreviver à produção industrial em larga escala, na quantidade preconizada até o seu consumo para produzir benefícios à saúde. No entanto, o conceito de paraprobióticos surgiu para indicar que células bacterianas não viáveis poderiam fornecer benefícios à saúde semelhantes aos produzidos pelas células vivas, o que demonstra que nem todos os mecanismos e efeitos terapêuticos probióticos estão relacionados à viabilidade. Nesse contexto, a utilização de paraprobióticos como ingredientes funcionais para produtos lácteos proporciona maior facilidade e conveniência durante o manuseio industrial devido à estabilidade numa ampla faixa de temperatura e vida útil prolongada. Além de não oferecerem risco quando administrados a indivíduos imunossuprimidos. Aqui, revisamos brevemente os o conceito de paraprobióticos, os processos de inativação utilizados para sua produção, as principais vantagens da sua aplicação na indústria de laticínios em relação aos micróbios viáveis, assim como evidências científicas de seus efeitos promotores de saúde.

Palavras-chave: probióticos inativados; probióticos fantasmas; lácteos funcionais; benefícios à saúde



1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal tem sido amplamente estudado na última década devido à grande influência que a composição da microbiota intestinal exerce na fisiologia humana e animal, não somente na regulação da função intestinal, como também em diversas outras funções biológicas do corpo através da interação com os sistemas imunológico, endócrino e até mesmo nervoso autônomo pela comunicação bidirecional entre o cérebro e o intestino, denominada “eixo intestino-cérebro” (Cryan & Dinan, 2012; Sampson & Mazmanian, 2015; Yano et al., 2015).

Evidências científicas comprovam o desempenho substancial da microbiota intestinal na melhora da biodisponibilidade de nutrientes e degradação de componentes não digeríveis da dieta, remoção de compostos tóxicos, metabolismo de carboidratos e proteínas, barreira intestinal, proteção contra doenças, fortalecimento do sistema imunológico, maturação e manutenção das funções motoras e sensoriais do trato gastrintestinal (de Almada et al., 2015). Além da regulação do humor, ansiedade e depressão (Cryan & Dinan, 2012; Yano et al., 2015).

Portanto, manter o equilíbrio da microbiota intestinal é fundamental para promover a manutenção da saúde e bem-estar do hospedeiro, reduzindo o risco de doenças. Geralmente, os microrganismos autóctones e seus hospedeiros possuem uma relação de simbiose, em que o hospedeiro proporciona um ambiente rico em nutrientes, enquanto a microbiota intestinal heterogênea fornece benefícios ao hospedeiro (Lutgendorff et al., 2008). No entanto, caso esse equilíbrio seja perturbado, a relação entre hospedeiro e os microrganismos pode resultar em distúrbios e doenças, como diarreia, diabetes, alergias, doenças inflamatórias crônicas no trato gastrointestinal, entre outras (de Almada et al., 2015; Prakash et al., 2011).



Nesse sentido, têm sido procuradas técnicas para modular a composição e/ou atividade da microbiota intestinal. O tratamento com antimicrobianos é uma delas, porém, apesar de eficiente pode causar distúrbios (por exemplo, diarreia) ou provocar resistência, diminuindo a eficácia da droga (Forssten et al., 2011; Kerry et al., 2018). Outra abordagem considerada receptiva, natural e de baixo custo é a suplementação com probióticos, cujos efeitos benéficos sobre a microbiota intestinal foram extensivamente revisados (Domingos, 2017; Elangovan et al., 2019; Francavilla et al., 2020), o que contribui para o crescente nicho de alimentos funcionais que representa um mercado altamente lucrativo, pois além de saciarem a fome e suprirem a necessidade nutricional básica possuem diversas aplicações terapêuticas (Bigliardi & Galati, 2013).

Os probióticos têm sido comercializados há muito tempo como componentes naturais que auxiliam no processo de digestão e saúde, tornando-se cada vez mais populares entre os consumidores que almejam adquirir produtos industrializados mais saudáveis. Podem ser encontrados em farmácias como suplementos nutricionais ou em mercados quando incorporados em matrizes alimentares (Foligné et al., 2013), principalmente em produtos lácteos fermentados, como iogurtes e leites fermentados que correspondem a maior parte dos produtos lácteos funcionais comercializados (Colombo et al., 2018; Ozer & Kirmarci, 2010).

Os probióticos foram originalmente definidos por Fuller (1989) e recentemente foram redefinidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro humano ou animal (Hill et al., 2014). Portanto, é essencial que os microrganismos mantenham-se viáveis durante toda a validade comercial do produto até à sua ingestão e passagem



pelo trato gastrointestinal do consumidor para que os efeitos benéficos dos probióticos sejam observados (Sarkar, 2013). No entanto, pesquisas científicas têm reportado que os microrganismos probióticos não viáveis (mortos), portanto, não cultiváveis, conhecidos como paraprobióticos, também podem fornecer benefícios à saúde (de Almada et al., 2016; Piqué et al., 2019; Taverniti & Guglielmetti, 2011).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo realizar uma breve revisão sobre o conceito de paraprobióticos, os métodos de inativação utilizados para sua obtenção, as principais vantagens da sua aplicação na indústria de laticínios em relação aos micróbios viáveis / probióticos, bem como os potenciais efeitos benéficos à saúde do consumidor.

Paraprobióticos: conceito e termos relacionados

Paraprobióticos, também denominados probióticos inativados ou probióticos fantasmas são definidos como células microbianas não viáveis (intactas ou quebradas) ou frações celulares que, quando administradas em quantidades e frequência adequadas, conferem benefícios ao consumidor humano ou animal. O termo "paraprobióticos" foi proposto devido ao seu significado, o prefixo "para", traduzido do grego antigo como "lado a lado" ou "atípico", pode simultaneamente indicar semelhança e diferença da definição probiótica tradicional (Taverniti & Guglielmetti, 2011; Zendeboodi et al., 2020). De forma análoga, a nomenclatura "psicobiótico" foi cunhada para se referir as bactérias probióticas que conferem benefícios à saúde mental (Dinan et al., 2013). Posteriormente, "para-psicobióticos" foi usado para denominar paraprobióticos que possuem efeitos ansiolíticos e/ou antidepressivos contribuindo, portanto, para promoção da saúde mental (Nishida et al., 2017a).



Os paraprobióticos são microrganismos que tiveram sua viabilidade comprometida após serem submetidos a processos de inativação capazes de promover modificações nas estruturas celulares bacterianas, como por exemplo, a ruptura dos filamentos de DNA, da membrana celular e danos mecânicos ao envelope celular; ou ainda que possam causar alterações na sua atividade metabólica, como inativação enzimática e desativação da seletividade da membrana (Raz & Rachmilewitz, 2005; de Almada et al., 2016).

Processos de inativação

A inativação de probióticos resultando na produção de paraprobióticos pode ocorrer por meio de diferentes processos, tais como: tratamento térmico (pasteurização, esterilização e tindalização), raios ultra-violeta ou gama, alta-pressão, sonicação, liofilização, substâncias químicas (por exemplo, formaldeído) e ozonização. Sendo que entre os tratamentos mencionados, a aplicação de calor tem sido o mais utilizado para obtenção de cepas paraprobióticas (Piqué et al., 2019; Safari et al., 2019; Taverniti & Guglielmetti, 2011).

Porém, ainda que vários métodos de inativação tenham sido empregados, a escolha do mais adequado dependerá do microrganismo e do benefício clínico esperado, uma vez que, cada método pode atingir os componentes estruturais celulares de diferentes formas e, assim, influenciar sua atividade imunomoduladora. Dessa forma, deve ser criteriosamente adotado aquele que, além de inativar, seja capaz de preservar os efeitos benéficos inicialmente fornecidos pelos probióticos (Barros et al., 2020; Taverniti & Guglielmetti).



Metodologias para avaliação da viabilidade celular

A técnica tradicional de plaqueamento ou contagem em placas tem sido utilizada como método padrão para avaliar a viabilidade celular paraprobiótica. No entanto, ela somente quantifica o número de células capazes de se multiplicar e formar colônias visíveis em meios de cultura apropriados, não fornecendo informações sobre a integridade da membrana celular e as funções fisiológicas das células bacterianas não cultiváveis. No entanto, a citometria de fluxo é considerada um método emergente que permite uma descrição detalhada da viabilidade bacteriana com informações em relação às propriedades estruturais, metabólicas e genéticas das células bacterianas (Ananta & Knorr, 2009; Vinderola et al., 2019; Wilkinson, 2018). Essas informações são extremamente relevantes porque podem auxiliar na escolha dos melhores processos e condições de inativação considerando o grau de lesão provocado nas cepas paraprobióticas estudadas, assim como os mecanismos de ação envolvidos (Barros et al., 2020).

A metodologia consiste basicamente no uso de um instrumento automatizado que quando associado a corantes fluorescentes específicos, identificam, enumeram e caracterizam os componentes estruturais e funcionais celulares com exatidão (Arku et al., 2011; Cronin & Wilkinson, 2010). Isso ocorre porque a emissão de fluorescência das células coradas e a dispersão de luz são detectadas e convertidas em dados gráficos que transmitem simultaneamente informações sobre múltiplos parâmetros biológicos como, atividade enzimática, funcionalidade do potencial de membrana, integridade da membrana celular, potencial de acidificação ou de captação de oxigênio das células presentes na amostra em tempo real (Aebisher et al., 2017; Michelutti et al., 2020; Wilkinson, 2018).



Nesse contexto, a técnica de contagem em placas é importante para estabelecer os parâmetros de processamento em que ocorrerá a perda da culturabilidade e, portanto, a produção de paraprobióticos. Enquanto, a citometria de fluxo seleciona dentre esses parâmetros, aquele considerado ideal, com menor grau de danos à integridade da membrana celular ou às principais atividades metabólicas dos microrganismos probióticos inativados. Inclusive, a citometria de fluxo tem sido aplicada em vários estudos com intuito de quantificar e avaliar as alterações no metabolismo e componentes estruturais de células bacterianas probióticas induzidas por diferentes tratamentos e até mesmo simulação das condições gastrointestinais (Ambros et al., 2018; Ananta et al., 2009; Raymond & Champagne, 2015; Rodriguez et al., 2019; Salar-Behzadi et al., 2013; Wilkinson, 2018).

Vantagens da aplicabilidade paraprobiótica na indústria de laticínios

O desenvolvimento de um produto probiótico precisa atender exigências rigorosas quanto à viabilidade celular bacteriana para exercer os seus efeitos biológicos sobre a saúde humana, porém diversos fatores inerentes aos componentes da matriz alimentar (pH, teor de oxigênio, concentrações de gordura, proteína, açúcar, carboidratos, atividade de água), ao processo de fabricação (temperatura, taxa de inoculação, pH, acidez titulável, oxigênio molecular, potencial redox, peróxido de hidrogênio, liofilização, estresse osmótico) e ao armazenamento a longo prazo (temperatura, atividade de água, conteúdo de oxigênio, potencial redox, pH, aspectos da embalagem e bactérias competidoras) contribuem para reduzir a viabilidade probiótica (Sarkar, 2018).



Embora os laticínios sejam o principal veículo para a suplementação de probióticos, alguns aspectos tecnológicos devem ser considerados, como: necessidade de adicionar fontes de nitrogênio a matriz láctea devido à baixa atividade proteolítica das bactérias probióticas sobre a caseína (Granato et al., 2010); deve-se selecionar estirpes probióticas compatíveis com a cultura *starter* a fim de evitar competição entre as culturas, diminuindo a cinética de acidificação e conseqüentemente o rendimento do processo e qualidade do produto final (Saccaro et al., 2009); para evitar o estresse ácido durante o processamento, é necessário a exposição prévia dos probióticos a valores de pH mais baixos por um curto período de tempo para induzir tolerância ao pH ácido (Sanz, 2007); deve-se utilizar materiais e sistemas de embalagem que evitem o estresse oxidativo durante o armazenamento. Portanto, todas essas medidas precisam ser realizadas para minimizar a perda da viabilidade celular e assegurar a manutenção dos efeitos benéficos do probiótico (Granato et al., 2010).

Como parte das bactérias probióticas perde a viabilidade durante as etapas de processamento e armazenamento, os alimentos probióticos contêm uma mistura de probióticos vivos e mortos. As bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, são as mais comumente adicionadas em produtos lácteos fermentados. Entretanto, como não são formadoras de esporos, possuem maior dificuldade para enfrentar as condições desfavoráveis ao longo do período de armazenamento e, conseqüentemente, manter a viabilidade desejada. Sendo assim, não se sabe ao certo a quantidade de células mortas presente em uma preparação probiótica, que pode ser ainda maior do que a de células vivas em determinados produtos considerados substratos estressantes (Barros et al. 2020; Dash et al., 2015).



Nesse contexto, algumas pesquisas relataram que a maioria dos produtos probióticos disponíveis comercialmente não continham a concentração de células declarado no rótulo, ao contrário, possuíam níveis significativamente menores do que os alegados (Aureli et al., 2010; Begum et al., 2015; Fredua-Agyeman et al. , 2016). Nos EUA e Reino Unido somente 31% e 43% dos produtos probióticos comercializados, respectivamente, cumpriram sua alegação de rótulo (Drago et al., 2010; Fredua-Agyeman et al., 2016). Dessa forma, alguns dos benefícios adquiridos com consumo de probióticos são certamente devido à presença de metabólitos ou de células probióticas mortas no trato gastrointestinal (Sarkar, 2018; Taverniti & Guglielmetti, 2011).

Segundo Barros et al., (2020), os microrganismos paraprobióticos são mais seguros e estáveis para uso industrial, logo sua aplicação em produtos lácteos pode oferecer inúmeras vantagens tecnológicas para os fabricantes de alimentos quando comparados aos seus homólogos viáveis (Figura 1): como o microrganismo já está morto, ocorrerá menor ou nenhuma interação com outros componentes da matriz alimentar ou aditivos, o que impacta diretamente no prolongamento da vida útil do produto sob condições de armazenamento; maior facilidade de manipulação e conveniência durante o processamento, porque podem ser incluídos antes da pasteurização do leite, de forma que sua atividade metabólica permaneça ao nível necessário para obter os efeitos biológicos desejados e, conseqüentemente, minimiza as chances de contaminação microbiológica pós-processamento; maior economia durante o armazenamento e transporte, pois continuam estáveis numa ampla faixa de temperatura, e dependendo do produto, não necessitam de cadeia de frio (por

exemplo, leite em pó instantâneo e fórmulas infantis) acarretando uma grande vantagem econômica para os fabricantes de alimentos .

Além disso, do ponto de vista clínico, podem ser administrados aos consumidores com sistema imunológico debilitado, por exemplo: idosos e recém-nascidos prematuros, como uma alternativa mais segura em detrimento da administração de bactérias vivas que podem oferecer riscos de desenvolvimento de infecções oportunistas, respostas inflamatórias aumentadas, transferência horizontal de genes virulentos ou de resistência a antibióticos para outros microrganismos e translocação microbiana (Deshpande et al., 2018; Lopez et al., 2008; Oggioni et al., 1998).

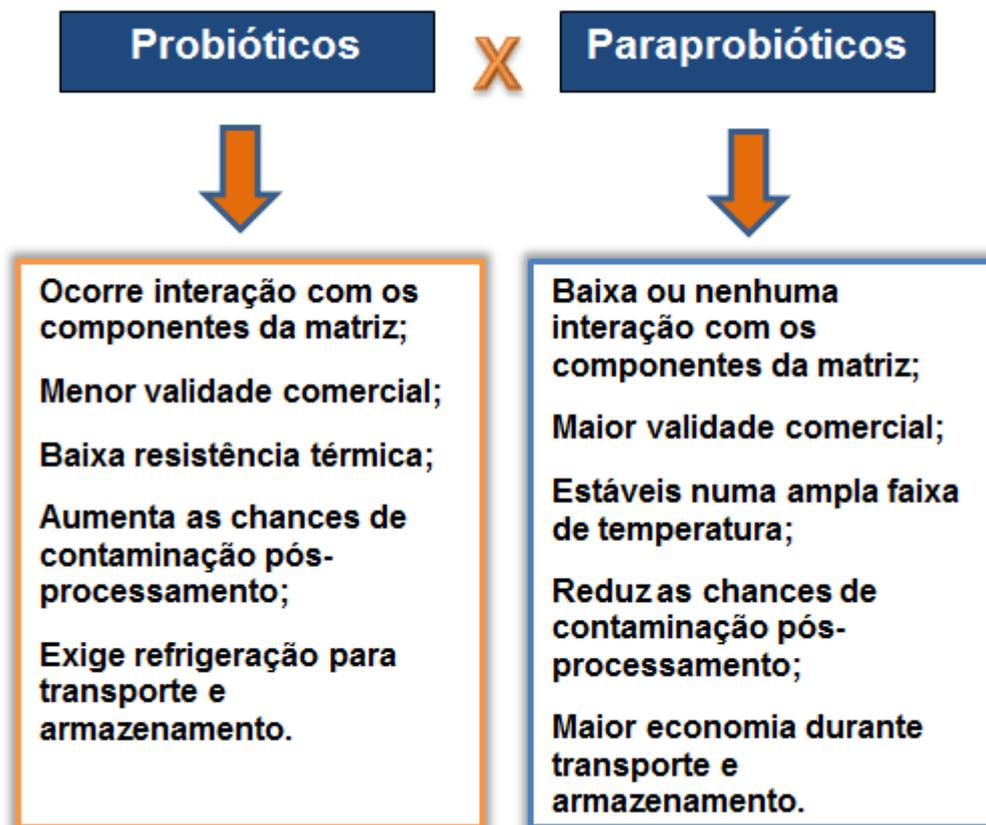


Figura 1- Principais vantagens tecnológicas do uso de paraprobióticos em relação aos probióticos na indústria de laticínios.



Produtos paraprobióticos

Atualmente, existem dois produtos farmacêuticos contendo paraprobióticos disponíveis para venda: o Nyaditum resae®, um suplemento nutricional que possui *Mycobacterium manresensis*, inativado por calor, indicado para tratamento e redução de risco do desenvolvimento da tuberculose ativa (Montané et al., 2014) e o Lacteol™, um produto terapêutico utilizado amplamente como suplemento no tratamento de diarreia aguda. Contém duas cepas de Lactobacilos, também inativadas por tratamento térmico e liofilizadas. Foi comercializado inicialmente na França e posteriormente obteve distribuição mundial (Salazar-Lindo et al., 2007).

Mecanismos de ação: probióticos X paraprobióticos

Os mecanismos de ação associados aos benefícios clínicos proporcionados pelos probióticos não são completamente esclarecidos, devido ao seu caráter multifatorial, que inclui: modificação da microbiota intestinal; fortalecimento da barreira epitelial intestinal; aumento de adesão do epitélio e mucosa intestinais, culminando na inibição da adesão e exclusão competitiva dos microrganismos comensais e/ou patogênicos por nutrientes e locais de adesão; produção de substâncias antimicrobianas (ácidos orgânicos e outras bacteriocinas) e modulação do sistema imunológico inato e adquirido pela interação entre células epiteliais intestinais e dendríticas, macrófagos e linfócitos (Bermudez-Brito et al., 2012; Fontana et al., 2013).

No entanto, há mecanismos de ação que ainda permanecem nas bactérias não viáveis, como: aumento da aderência às células intestinais provocando a inibição e eliminação dos patógenos; modulação do sistema imunológico devido a compostos



presentes na parede celular, como ácido teicóico, ácido lipoteicóico, polissacarídeos capsulares, assim como extratos citoplasmáticos e proteínas da camada superficial que são liberados quando as células são rompidas ou lisadas; e ainda, a secreção de produtos metabólicos pelas células mortas (Grzeskowiak et al. 2014; Piqué et al., 2019; Shin et al. 2010; Taverniti & Guglielmetti, 2011), o que leva a concluir que tais mecanismos e benefícios clínicos correlacionados não são dependentes da viabilidade bacteriana.

Além disso, os probióticos não são igualmente eficazes, pois seus potenciais efeitos biológicos, bem como os mecanismos de ação relacionados são "específicos da cepa", uma vez que as propriedades funcionais e fenotípicas podem variar consideravelmente entre cepas da mesma espécie, não sendo extensivo a outras do mesmo gênero ou espécie (Deshpande et al., 2018; Fontana et al., 2013; Oelschlaeger, 2010), o que torna necessário a realização de mais pesquisas que se concentrem na avaliação dos efeitos terapêuticos específicos das diversas cepas paraprobióticas com o escopo de obter uma melhor compreensão dos microrganismos não viáveis a fim de melhorar a imunidade do hospedeiro.

Estudos clínicos e pré-clínicos com paraprobióticos

Nos últimos anos, diversos ensaios clínicos e pré-clínicos em humanos e animais associados ao consumo direto de paraprobióticos comprovaram os potenciais efeitos benéficos à saúde do hospedeiro, como: modulação do sistema imune (Fujii et al., 2017; Singh et al., 2017); eficácia no tratamento de doenças hepáticas induzidas pelo álcool (Segawa et al., 2008); infecções virais (Chen et al., 2017), infecções bacterianas (Ishikawa et al., 2010; Safari et al., 2019), dermatite atópica (Kim et al., 2013), colite



(Ueno et al., 2011) doenças respiratórias (Shinkai et al., 2013); doenças metabólicas (Othman & Sakamoto, 2020); inibição de patógenos (Chen et al., 2020; Grzeskowiak et al., 2014); câncer (Orlando et al., 2012); prevenção de cáries dentárias (Tanzer et al., 2010); modulação da microbiota intestinal (Sugahara et al., 2017); manutenção da integridade intestinal (Generoso et al., 2011); redução do colesterol (Shin et al., 2010); profilaxia e tratamento de alergias respiratórias (Nakamura & Mitsunaga, 2018; Shigwedha et al., 2014), melhora a resistência aos sintomas do resfriado e mantém o humor desejável (Murata et al., 2018); melhora a aptidão física, contribuindo para atrofia muscular (Toda et al., 2020), entre outros benefícios clínicos.

Em relação à aplicação de paraprobióticos em produtos lácteos, nos últimos anos foram conduzidos alguns estudos que avaliaram os efeitos da ingestão diária de leite fermentado contendo o paraprobiótico *Lactobacillus gasseri* CP2305, isolado de fezes de um adulto saudável, inativado por tratamento térmico na saúde do consumidor. Sawada et al., (2016) investigaram o efeito da ingestão de leite fermentado contendo células paraprobióticas de *Lactobacillus gasseri* CP2305 na regulação intestinal de adultos saudáveis (n=39) com tendência a constipação ou evacuações frequentes comparado ao leite acidificado artificialmente, durante três semanas. Os resultados demonstraram que o leite fermentado com CP2305 pasteurizado funcionou melhor do que o leite acidificado artificialmente, apresentando efeito benéfico significativo na função intestinal, melhorando os hábitos de defecação e a composição da microbiota intestinal, principalmente nos indivíduos com tendência a constipação.

Sugawara et al., (2016) deu sequência ao estudo mencionado anteriormente com o objetivo de compreender melhor a contribuição da cepa paraprobiótica



Lactobacillus gasseri CP2305 na regulação das funções intestinais, também por um período de 3 semanas, porém com um número maior de participantes (n=118). A bebida paraprobiótica obteve um impacto significativo na melhora do ambiente e funções do trato intestinal em relação ao grupo placebo. Segundo os autores, tal resultado pode ser atribuído, em parte, à interação cérebro-intestino, uma vez que a atividade nervosa parassimpática do sistema nervoso autônomo foi aumentada, corrigindo assim, o equilíbrio junto à atividade nervosa simpática.

Nishida et al., (2017a) avaliaram os efeitos do paraprobiótico *Lactobacillus gasseri* CP2305 no alívio do estresse de estudantes de medicina de ambos os sexos (21 homens e 11 mulheres) a fim de verificar a possibilidade de existir diferenças sexuais com a administração diária do leite fermentado suplementado com paraprobiótico por um período de 5 semanas. Embora tenham ocorrido diferenças relacionadas ao sexo nos efeitos do paraprobiótico, visto que o controle de sintomas semelhantes à diarreia, a diminuição da latência e o aumento da duração do sono foram melhor observados nos indivíduos do sexo masculino, o tratamento com o paraprobiótico também aliviou de forma eficaz os sintomas associados ao estresse, contribuindo para promoção da saúde mental, o que torna o paraprobiótico *Lactobacillus gasseri* CP2305 um potencial "para-psicobiótico".

Posteriormente, foi efetuada uma nova investigação para ratificar os efeitos do paraprobiótico *Lactobacillus gasseri* CP2305 no alívio dos sintomas de estresse crônico, abrangendo maior número de participantes (n=69), todos estudantes de medicina (40 homens e 29 mulheres) que se preparavam para fazer o exame nacional para médicos durante 12 semanas. Concluiu-se que a ingestão do paraprobiótico melhorou significativamente a qualidade do sono no período anterior ao exame, prevenindo o



aumento da liberação basal de cortisol salivar e a expressão de microRNAs responsivos ao estresse. Além da melhora na atividade do nervo parassimpático, o paraprobiótico CP2305 também normalizou os hábitos intestinais (Nishida et al., 2017b).

Outro estudo realizado mais recentemente por Sugawara et al., (2020) avaliou o efeito da ingestão diária de bebida paraprobiótica contendo *Lactobacillus amylovorus* CP1563, inativado por calor, na microbiota intestinal de 160 indivíduos pré-obesos. De acordo com os resultados obtidos, a ingestão contínua da bebida com CP1563 reduziu a gordura corporal abdominal e afetou a comunidade microbiana intestinal dos indivíduos saudáveis pré-obesos, contribuindo para compreensão da relação entre o efeito anti-obesidade dos paraprobióticos e a microbiota intestinal.

2 CONCLUSÃO

A viabilidade dos microrganismos probióticos deixou de ser uma condição fundamental para que os benefícios à saúde sejam proporcionados ao consumidor. Dessa forma, o uso de paraprobióticos tornou-se uma oportunidade potencial para diversificação de alimentos funcionais devido a sua grande versatilidade quando comparados às células viáveis, uma vez que, oferecem diversas vantagens na produção de alimentos industrializados através de processos e formulações que seriam considerados prejudiciais aos microrganismos vivos, maior validade comercial e conveniência durante o armazenamento e transporte. Além de representar uma abordagem terapêutica mais segura para indivíduos imunocomprometidos. No entanto, pesquisas relativas à adição de paraprobióticos em matrizes lácteas ou mesmo em alimentos de um modo em geral ainda são raras, pois até o momento, a maioria das



pesquisas se concentrou no consumo direto do paraprobiótico como suspensão ou pó liofilizado. Portanto, são necessários mais estudos com o intuito de investigar a aplicação paraprobiótica em alimentos através de protocolos adequados que avaliem o impacto da sua adição e estabilidade durante a vida útil do produto.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebisher, D., Bartusik, D. & Tabarkiewicz, J. (2017). Laser flow cytometry as a tool for the advancement of clinical medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 85, 434-443.

Ambros, S., Mayer, R., Schumann, B. & Kulozik, U. (2018). Microwave-freeze drying of lactic acid bacteria: Influence of process parameters on drying behavior and viability. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 48, 90-98.

Ananta, E. & Knorr, D. (2009). Comparison of inactivation pathways of thermal or high pressure inactivated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 by flow cytometry analysis. *Food Microbiology*, 26, 542-6.

Arku, B., Fanning, S. & Jordan, K. (2011). Flow cytometry to assess biochemical pathways in heat-stressed *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*). *Journal of Applied Microbiology*, 111, 616-624.

Aureli, P., Fiore, A., Scalfaro, C., Casale, M. & Franciosa, G. (2010). National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 265-273.



Barros, C.P., Guimarães, J.T., Esmerino, E.A., Duarte, M.C.K.H., Silva, M.C., Silva, R., Ferreira, B.M., Sant'Ana, A.S., Freitas, M.Q., Cruz, A.G. 2020. Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. *Current Opinion in Food Science*. 32, 1-8.

Begum, A.A., Jakaria, D.M., Anisuzzaman, S., Islam, M. & Mahmud, S.A. (2015). Market assessment and product evaluation of probiotic containing dietary supplements available in Bangladesh market. *Journal of Pharmacology*, Article ID 763796, 2015, 5.

Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C. & Gil, A. (2012), Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 61, 160-174.

Bigliardi, B. & Galati, F. (2013). Innovation trends in food industry: the case of functional foods. *Trends Food Science and Technology*, 31, 118-129.

Chen, M.F., Huang, S.Y., Liu, Y.C., Tseng, S.N., Ojcius, D.M. & Shi, S.R. (2017). Pretreatment with a heat-killed probiotic modulates monocyte chemoattractant protein-1 and reduces the pathogenicity of influenza and enterovirus 71 infections, *Mucosal Immunology*, 10, 215-227.

Chen, Y.-T., Hsieh, P.-S., Ho, H.-H., Hsieh, S.-H., Kuo, Y.-W., Yang, S.-F. & Lin, C.-w. (2020). Antibacterial activity of viable and heat-killed probiotic strains against oral pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 70, 310-317.



Colombo, M., Todorov, S.D., Eller, M. & Nero, L.A. (2018). The potential use of probiotic and beneficial bacteria in the Brazilian dairy industry. *Journal of Dairy Research*, 85, 487–496.

Cronin, U.P. & Wilkinson, M.G. (2010). The potential of flow cytometry in the study of *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1-16.

Cryan, J.F. & Dinan, T.G. (2012). Mind-altering microorganisms: *The impact of the gut microbiota on brain and behavior*. *Nature Reviews Neuroscience*, 13, 701-712.

Dash, G., Raman, R. P., Prasad. K.P., Makesh, M., Pradeep, M.A. & Sen, S. (2015). Evaluation of paraprobiotic applicability of *Lactobacillus plantarum* in improving the immune response and disease protection in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Fish & Shellfish Immunology*, 43, 167-174.

de Almada, C.N., Almada, C.N., Martinez, R.C. & Sant'Ana, A.S. (2015). Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 4175-4199.

de Almada, C.N., Almada, C.N., Martinez, R.C.R. & Sant'ana, A.S. (2016). Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends Food Science & Technology*, 58, 96-114.



Deshpande, G., Athalye-Jape, G. & Patole, S. (2018). Para-probiotics for Preterm Neonates—The Next Frontier. *Nutrients*, 10, 871-879.

Dinan, T.G., Stanton, C. & Cryan, J.F. (2013). Psychobiotics: A novel class of psychotropic. *Biological Psychiatry*, 74, 720-726.

Domingos, J.J.S. (2017). Review of the role of probiotics in gastrointestinal diseases in adults. *Gastroenterología y Hepatología (English Edition)*, 40, 417-429.

Elangovan, A., Allrgretti, J.R., Fischer, M. 2019. Microbiota modulation-based therapy for luminal GI disorders: current applications of probiotics and fecal microbiota transplantation. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 19, 1343-1355.

Foligné, B., Daniel, C. & Pot, B. (2013). Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 16, 284-292.

Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S. & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109, 35-50.

Forssten, S.D., Sindelar, C.W. & Ouwehand, A.C. (2011). Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe*, 17, 410-413.



Fredua-Agyeman, M., Parab, S. & Gaisford, S. (2016). Evaluation of commercial probiotic products. *British Journal of Pharmacology*, 1, 84-89.

Francavilla, R., Cristofori, F., Vacca, M., Barone, M. & Angelis, M. (2020). Advances in understanding the potential therapeutic applications of gut microbiota and probiotic mediated therapies in celiac disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. Disponível em <https://doi.org/10.1080/17474124.2020.1745630>

Fujii, T., Jounai, K., Horie, A., Takahashi, H., Suzuki, H., Ohshio, K., Fujiwara, D. & Yamamoto, N. (2017). Effects of heat-killed *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM 5805 on mucosal and systemic immune parameters, and antiviral reactions to influenza virus in healthy adults; a randomized controlled double-blind study. *Journal of Functional Foods*, 35, 513-521.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.

Generoso, S. V., Viana, M.L., Santos, R.G., Arantes, R.M.E., Martins, F.S., Nicoli, J.R., Machado, J. A. N., Correia, M.I.T.D. & Cardoso, V.N. (2011). Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. *European Journal of Nutrition*, 50, 261-269.



Granato, D., Branco, G.F., Cruz, A. G., Faria, J.A.F. & Sha, N.P. (2010). Probiotic Dairy Products as Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 455-470.

Grzeskowiak, L., Collado, M.C., Beasley, S. Salminen, S. (2014). Pathogen exclusion properties of canine probiotics are influenced by the growth media and physical treatments simulating industrial processes. *Journal of Applied Microbiology*. 116, 1308-1314.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merestein, D.J., Pot, D.B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C. & Sanders, M.E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, 506–514.

Ishikawa, H., Kutsukake, E., Fukui, T., Sato, I., Shirai, T., Kurihara, T., Okada, N., Danbara, H., Toba, M., Kohda, N., Maeda, Y., Matsumoto, T. (2010). Oral Administration of Heat-Killed *Lactobacillus plantarum* Strain b240 Protected Mice against *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74, 1338–1342.

Kerry, R.G., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H-S. & Das, G. (2018) Benefaction of probiotics for human health: a review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 927–939.



Kim, J.-Y., Park, B.-K., Park, H.-J., Park, Y.-H., Kim, B.-O. & Pyo, S. (2013). Atopic dermatitis-mitigating effects of new *Lactobacillus* strain, *Lactobacillus sakei* probio 65 isolated from Kimchi. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 517–26.

Lopez, M., Li, N., Kataria, J., Russel, M. & Neu, J. (2008). Live and Ultraviolet-Inactivated *Lactobacillus rhamnosus* GG Decrease Flagellin-Induced Interleukin-8 Production in Caco-2 Cells. *The Journal of Nutrition*, 138, 2264-2268.

Lutgendorff F., Akkermans L.M.A. & Söderholm J.D. (2008). The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastrointestinal damage. *Current Molecular Medicine*, 8, 282–298.

Michelutti, L., Bulfoni, M. & Nencioni, E. (2020). A novel pharmaceutical approach for the analytical validation of probiotic bacterial count by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 170, 105834.

Montané, E., Barriocanal, A.M., Arellano, A.L., Valderrama, A., Sanz, Y. & Cardona, P. (2014). Clinical trial with the food supplement *Nyaditum resae*: a new tool to reduce the risk of developing active tuberculosis (45th World Conference on Lung Health, Barcelona) *Int. J. Tuberc. Lung Cancer*, 18, S427.

Murata, M., Kondo, J., Iwabuchi, N., Takahashi, S., Yamauchi, K., Abe, F. & Miura, K. (2018). Effects of paraprobiotic *Lactobacillus paracasei* MCC1849 supplementation on



symptoms of the common cold and mood states in healthy adults. *Beneficial Microbes*, 9, 855-864.

Nakamura, S. & Mitsunaga, F. (2018). Anti-Allergic Effect of Para-Probiotics from Non-Viable Acetic Acid Bacteria in Ovalbumin-Sensitized Mice. *Food and Nutrition Sciences*, 9, 1376-1385.

Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A.A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J. & Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1699-1706.

Nishida, K., Sawada, D., Kawai, T., Kuwano, Y., Fujiwara, S. & Rokutan, K. (2017a). Para-psychobiotic *Lactobacillus gasseri* CP2305 ameliorates stress-related symptoms and sleep quality. *Journal of Applied Microbiology*, 123, 1561-1570.

Nishida, K., Sawada, D., Kawai, T., Kuwano, Y., Tanaka, H., Sugawara, T., Aoki, Y., Fujiwara, S. & Rokutan, K. (2017b). Daily administration of paraprobiotic *Lactobacillus gasseri* CP2305 ameliorates chronic stress-associated symptoms in Japanese medical students. *Journal of Functional Foods*, 36, 112-121.

Oelchlaeger, T.A. (2010). Mechanisms of probiotic actions: A review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 57-62.



Oggioni, M. R., Pozzi, G., Valensin, P.E., Galieni, P. & Bigazzi, C. (1998). Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 325-326.

Orlando, A., Refolo, M.G., Messa, C., Aamati, L., Lavermicocca, P., Guerra, V. & Russo, F. (2012). Antiproliferative and proapoptotic effects of viable or heat-killed *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in HGC-27 gastric and DLD-1 colon cell lines. *Nutrition and Cancer*, 64, 1103-1011.

Othman, M.B. & Sakamoto. (2020). Effect of inactivated *Bifidobacterium longum* intake on obese diabetes model mice (TSOD). *Food Research International*, 129, 18792.

Ozer, B.H. & Kirmaci, H.A. (2010). Functional milks and dairy beverages. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 1-15.

Piqué, N., Berlanga, M. & Miñana-Galbis, D. (2019). Health Benefits of Heat-Killed (Tyndallized) Probiotics: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 2534.

Prakash, S., Rodes, L., Coussa-Charley, M. & Tomaro-Duchesneau, C. (2011). Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics*, 5, 71-86.

Rajilic-Stojanovic, M. (2013). Function of the microbiota. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27, 5-16.



Raymond, Y. & Champagne, C.P. (2015). The use of flow cytometry to accurately ascertain total and viable counts of *Lactobacillus rhamnosus* in chocolate. *Food Microbiology*, 46, 176-183.

Raz, E. & Rachmilewitz, D. (2005). Inactivated probiotic bacteria and methods of use thereof. Patent n.US20050180962 A1, 18 ago.

Rodriguez, V.C.C., Silva, L.G.S., Simabuco, F.M., Venema, K. & Antunes, A.E.C. (2019). Survival, metabolic status and cellular morphology of probiotics in dairy products and dietary supplement after simulated digestion. *Journal Functional Foods*, 55, 126-134.

Saccaro, D.M., Tamine, A.Y., Pilleggi, ALOPS. & Oliveira, M.N. (2009). The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4°C. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 397–404.

Safari, M.S., Keyhanfar, M. & Shafiei. (2019). Investigating the antibacterial effects of some *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *acetobacter* strains killed by different methods on *Streptococcus mutans* and *Escherichia coli*. 8, 103-111.

Sampson, T.R. & Mazmanian, S.K. (2015). Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host & Microbe*, 17, 565-576.

Salar-Behzadi, S., Wu, S., Toegel, S., Hofrichter, M., Altenburger, I., Unger, F., Wirth, M. & Viernstein H. (2013). Impact of heat treatment and spray drying on cellular



properties and culturability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12. *Food Research International*, 54, 93-101.

Salazar-Lindo, E., Figueroa-Quintanilla, D., Caciano, M.I., Reto-Valiente, V., Chauviere, G. & Colin, P. (2007). Effectiveness and safety of *Lactobacillus* LB in the treatment of mild acute diarrhea in children, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 44, 571-576.

Sanz, Y. (2007). Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selection improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, 12, 1284-1289.

Sarkar, S. (2013). Microbiological Considerations for Probiotic Supplemented Foods. *International Journal of Microbiology & Advanced Immunology*, 1, 1-7.

Sarkar, S. (2018). Whether viable and dead probiotic are equally efficacious? *Nutrition & Food Science*, 48, 285-300.

Sawada, D., Sugawara, T., Ishida, Y., Aihara, K., Aoki, Y., Takehara, I., Takano, K. & Fujiwara, S. (2016). Effect of continuous ingestion of a beverage prepared with *Lactobacillus gasseri* CP2305 inactivated by heat treatment on the regulation of intestinal function. *Food Research International*, 79, 33-39.



Sawada, D., Kuwano, Y., Tanaka, H., Hara, S., Uchiyama, Y., Sugawa, T., Fujiwara, S., Rokutan, K. & Nishida, K. (2019). Daily intake of *Lactobacillus gasseri* CP2305 relieves fatigue and stress-related symptoms in male university Ekiden runners: A double-blind, randomized, and placebo-controlled clinical trial. *Journal Functional Foods*, 57, 465-476.

Segawa, S., Wakita, Y., Hirata, H. & Watari, J. (2008). Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates alcoholic liver disease in ethanol-containing diet-fed C57BL/6N mice. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 371-377.

Shigwedha, N., Zhang, L., Sichel, L., Jia, L., Gong, P., Liu, W., Wang, S., Zhanh, S., Han, X. & Gao, W. (2014). More than a Few LAB Alleviate Common Allergies: Impact of Paraprobiotics in Comparison to Probiotical Live Cells. *Journal of Biosciences and Medicines*, 2, 56-64.

Shin, H.S., Park, S.Y., Lee, D.K., Kim, S.A., An, H.M., Kim, J.R., Kim, M.J., Cha, M.G., Lee, S.W., Kim, K.J., Lee, K.O. & Ha, N.J. (2010). Hypocholesterolemic effect of sonication-killed *Bifidobacterium longum* isolated from healthy adult Koreans in high cholesterol fed rats. *Archives of Pharmacal Research*, 33, 1425-1431.

Singh, S.T., Kamilya, D., Kheti, B., Bordoloi, B. & Parhi, J. (2017). Paraprobiotic preparation from *Bacillus amyloliquefaciens* FPTB16 modulates immune response and



immune relevant gene expression in *Catla catla* (Hamilton, 1822). *Fish & Shellfish Immunology*, 66, 35-42.

Shinkai, S., Toba, M., Saito, T., Sato, I., Tsubouchi, M., Taira, K., Kakumoto, K., Inamatsu, T., Yoshida, H., Fujiwara, Y., et al. (2013). Immunoprotective effects of oral intake of heat-killed *Lactobacillus pentosus* strain b240 in elderly adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *British Journal of Nutrition*, 109, 1856-1865.

Sugahara, H., Yao, R., Odamaki, T. & Xiao, J.Z. (2017). Differences between live and heat-killed Bifidobacteria in the regulation of immune function and the intestinal environment. *Beneficial Microbes*, 8, 463–472.

Sugawara, T., Sawada, D., Ishida, Y., Aihara, K., Aoki, Y., Takehara, I., Takano, K. & Fujiwara, S. (2016), Regulatory effect of paraprobiotic *Lactobacillus gasseri* CP2305 on gut environment and function. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 27, 30259.

Sugawara, T., Sawada, D., Yanagihara, S., Aoki, Y., Takehara, I., Sugahara, H., Hirota, T., Nakamura, Y. & Ishikawa, S. (2020). Daily Intake of Paraprobiotic *Lactobacillus amylovorus* CP1563 Improves Pre-Obese Conditions and Affects the Gut Microbial Community in Healthy Pre-Obese Subjects: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *Microorganisms*, 8, 304.



Tanzer, J. M., Thompson, A., Lang, C., Cooper, B., Hareng, L., Gamer, A., Reindl, A. & Pompejus, M. (2010). Caries inhibition by and safety of *Lactobacillus paracasei* DSMZ16671. *Journal of Dental Research*, 89, 921-926.

Taveriniti, V. & Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). *Genes & Nutrition*, 6, 261-274.

Toda, K., Yamauchi, Y., Tanaka, A., Kuhara, T., Odamaki, T., Yoshimoto, S. & Xiao, J-Z. (2020). Heat-Killed *Bifidobacterium breve* B-3 Enhances Muscle Functions: Possible Involvement of Increases in Muscle Mass and Mitochondrial Biogenesis. *Nutrients*, 12, 103390.

Vinderola, G., Reinheimer, J. & Salminen S. (2019). The enumeration of probiotic issues: from unavailable standardised culture media to a recommended procedure? *International Dairy Journal*, 96, 58-65.

Wilkinson, M.G. (2018). Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 1-10.

Yano, J.M., Yu, K., Donaldson, G.P., Shastri, G.G., Ann, P., Ma, L., Nagler, C.R., Ismagilov, R.F., Mazmanian, S.K. & Hsiao, E.Y. (2015). Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*, 161, 264-276.



Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A.M. & Cruz, A.G. Probiotic: conceptualization from a new approach. (2020). *Currente Opinion on Food Science*. In press.