UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Fabiana Cristina Rosa Mitelmão

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES E ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO RANDOMIZADO COM PROBIÓTICOS PARA O TRATAMENTO DE CONSTIPAÇÃO INTESTINAL

Sorocaba/SP
2021

Fabiana Cristina Rosa Mitelmão

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES E ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO RANDOMIZADO COM PROBIÓTICOS PARA O TRATAMENTO DE CONSTIPAÇÃO INTESTINAL

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila
Coorientadora: Profa. Dra. Cristiane de Cassia Bergamaschi

Sorocaba/SP
2021

Ficha Catalográfica

Mitelmão, Fabiana Cristina Rosa

M668d Desenvolvimento de formulações e ensaio clínico controlado, randomizado com probióticos para o tratamento de constipação intestinal / Fabiana Cristina Rosa Mitelmão – 2021.

142 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila

Coorientadora: Profa. Dra. Cristiane de Cassia Bergamaschi

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2021.

1. Probióticos. 2. Constipação intestinal - Tratamento. 3. *Lactobacillus acidophilus*. 4. *Bifidobacterium bifidum*. 5. *Lactobacillus rhamnosus*. 6. *Lactobacillus paracasei*. I. Vila, Marta Maria Duarte Carvalho, orient. II. Bergamaschi, Cristiane de Cassia, coorient. III. Universidade de Sorocaba. IV. Título.

Elaborada por Regina Célia Ferreira Boaventura – CRB-8/6179

Fabiana Cristina Rosa Mitelmão

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES E ENSAIO CLÍNICO CONTROLADO RANDOMIZADO COM PROBIÓTICOS PARA O TRATAMENTO DE CONSTIPAÇÃO INTESTINAL

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

BANCA EXAMINADORA:

_____

Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila
Universidade de Sorocaba

_____

Profa. Dra. Edilma Maria Albuquerque de Vasconcelos
Universidade de Sorocaba

_____

Profa. Dra. Elaine Berges da Silva
Universidade de Sorocaba

_____

Prof. Dr. Victor Manuel Figueiredo Cardoso Balcão
Universidade de Sorocaba

_____

Profa. Dra. Fabiane Raquel Motter
Universidade de Sorocaba

Dedico esta tese aos meus filhos Beatriz e Felipe e ao meu amado esposo Allan, que tiveram que compreender minha ausência, para que este trabalho fosse realizado.

Á minha querida mãe Alice, ao meu pai Serapião in memoriam.

À minha irmã Erica, ao meu cunhado Sérgio e às sobrinhas queridas Gabriela e Rafaela. Todos me ajudaram muito neste período de intenso estudo, dando suporte emocional e motivacional em todos os momentos.

Agradeço também a Deus e todos aqueles que me ajudaram espiritualmente para que o meu propósito fosse alcançado.

AGRADECIMENTOS

Esta tese de doutorado foi possível ser realizada graças à amabilidade e disponibilidade de várias pessoas, as quais manifesto os meus sinceros e reconhecidos agradecimentos.

Agradeço à Universidade de Sorocaba pela concessão de financiamento na forma de bolsa de estudo em especial ao Pró- Reitor Prof. Dr. José Martins de Oliveira Junior e a Capes pela concessão da taxa Prosuc-Capes.

De modo particular agradeço a Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila, a quem devo a orientação da mesma, a Profa. Dra. Marli Gerenutti a qual me orientou no início do doutorado; a Profa. Dra. Cristiane de Cassia Bergamaschi Motta pela coorientação e ao Prof. Dr. Marcus Tolentino da Silva pela ajuda com as análises estatísticas.

À Dra. Raquel Häckel pelo seu trabalho na seleção dos participantes da pesquisa.

Agradeço à profa. Dra. Denise Grotto pela permissão de uso do Laboratório Lapetox, e a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, os quais contribuíram para o meu desenvolvimento acadêmico.

Aos profissionais e a empresa Roberg Alimentos e Medicamentos da Natureza Ltda pela colaboração na produção dos sachês, em especial a Jerusa, Cristiane, Júlio, Thayna, Beto, Diego, Junio, Vania, Carlos, Ingrid, Henrique, Silvana e Isabely.

A todos os meus amigos que me ajudaram com a divulgação da pesquisa visando a busca dos participantes, em especial a minha amiga querida Fabiana Cristina Zambeti Bataglin.

Aos participantes que realizaram esta pesquisa.

A todos meu muito obrigada!

“O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo – numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior.”

Albert Einstein

RESUMO

Os distúrbios de evacuação e as fezes duras são comuns nos países industrializados, presente em uma média de 12% a 17% da população saudável adulta em qualquer idade. A suplementação funcional com microrganismos probióticos pode ser útil na redução do transtorno. O objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar a estabilidade de duas formulações com probióticos para uso como suplemento alimentar, bem como, por meio de ensaio clínico, avaliar a eficácia e a segurança destes suplementos nos distúrbios de evacuação e na qualidade das fezes, em adultos saudáveis com constipação funcional. Foram desenvolvidas duas formulações com probióticos sendo uma com *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus rhamnosus* (3 bilhões de Unidades Formadoras de Colônias - UFC) com prebióticos; e outra com *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus paracasei, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium lactis, Lactobacillus casei, Bifidobacterium animallis* (8 bilhões de UFC) com prebióticos. Os suplementos foram avaliados quando a sua estabilidade e prazo de validade em estudos de estabilidade acelerada e de longa duração. Foram considerados: características de cor, odor e sabor, pH, presença de contaminantes microbiológicos e a quantificação de UFC/unidade de formulação, quando submetidos ao suco gástrico e intestinal nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses. A seguir foi realizado um ensaio clínico controlado, randomizado e duplo-cego e para avaliar a eficácia das misturas probióticas na constipação intestinal em comparação com uma formulação que continha prebióticos. Os desfechos aferidos foram: frequência semanal das evacuações e qualidade das fezes. As formulações de 3 bilhões de UFC/sachê e de 8 bilhões de UFC/sachê atenderam os requisitos de qualidade e se mostraram estáveis em todo o período do estudo. Os suplementos alimentares mostraram-se estáveis nas condições de armazenamento (30ºC ± 2ºC / umidade relativa (UR) 75% ± 5% e 40ºC ± 2ºC / UR 75% ± 5%). O ensaio clínico demonstrou não haver diferença estatística entre os produtos na melhora da qualidade das fezes e na frequência semanal de evacuações ao tratamento em relação com o grupo comparador. Houve relato de reação adversa apenas em um participante que relatou cólicas e flatulência. Conclui-se que todas as formulações foram eficazes em diminuir a constipação intestinal, sendo também consideradas seguras.

Palavras-chave: *Lactobacillus acidophilus. Bifidobacterium bifidum. Lactobacillus rhamnosus. Lactobacillus paracasei.* Constipação intestinal. Probióticos.

ABSTRACT

Evacuation disorders and hard stools are common in industrialized countries, present in an average of 12% to 17% of the healthy adult population at any age. Functional supplementation with probiotic microorganisms may be helpful in reducing the disorder. The objective of this study was to develop and evaluate the stability of two formulations with probiotics for use as a food supplement, as well as, through a clinical trial, to evaluate the efficacy and safety of these supplements in evacuation disorders and in the quality of stools in adults healthy with functional constipation. Two formulations were developed with probiotics, one with *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus rhamnosus* (3 billion Colony Forming Units - CFU) with prebiotics; and another with *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus paracasei, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium lactis, Lactobacillus casei, Bifidobacterium animallis* (8 billion CFU) with prebiotics. Supplements were evaluated for their stability and shelf life in accelerated and long-term stability studies. The following were considered: characteristics of color, odor and taste, pH, presence of microbiological contaminants and the quantification of CFU/formulation unit, when subjected to gastric and intestinal juice at times 0, 3, 6, 9, 12, 18 and 24 months . A randomized, double blind, controlled clinical trial was then carried out to evaluate the effectiveness of probiotic mixtures in constipation compared to a formulation that contained prebiotics. The outcomes measured were weekly frequency of bowel movements and stool quality. The 3 billion UFC/sachet and 8 billion UFC/sachet formulations met the quality requirements and were stable throughout the study period. The food supplements were stable under storage conditions (30ºC ± 2ºC and relative humidity (RH) 75% ± 5% and 40ºC ± 2ºC and RH 75% ± 5%). The clinical trial showed no statistical difference between the products in improving stool quality and weekly frequency of bowel movements when compared to the comparator group. There was a report of adverse reaction only in one participant who reported colic and flatulence. It is conclued that all formulations were effective in reducing constipation, being also considered safe.

Key words: *Lactobacillus acidophilus. Bifidobacterium bifidum. Lactobacillus rhamnosus. Lactobacillus paracasei.* Constipation. Probiotics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Localização da microbiota humana 25
Figura 2 - Fatores que alteram a microbiota intestinal 26
Figura 3 - Mecanismos de interação entre microbiota, probióticos e hospedeiro 28
Figura 4 - Representação esquemática da produção de probióticos para suplementos dietéticos e /ou para uso em produtos lácteos..... 31
Figura 5 - Fatores de influência na estabilidade dos probióticos nas etapas de processamento e uso..... 32
Figura 6 - Critérios de seleção de cepa probiótica..... 33
Figura 7 - Diagrama esquemático simplificado da produção dos suplementos alimentares 41
Figura 8 - Esquema simplificado do controle de qualidade dos suplementos alimentares 43
Figura 9 - Esquema dos ensaios realizados nos testes de estabilidade acelerada (a) e de longa duração (b)..... 44
Figura 10 - Esquema ilustrativo da técnica de tubos múltiplos utilizada para a determinação de coliformes a 45ºC..... 50
Figura 11 - Escala de Bristol Modificada 54
Figura 12 - Diagrama esquemático da seleção e acompanhamento dos participantes da pesquisa..... 58
Figura 13 - Fotografia de sachê de probiótico desenvolvido (frente e verso) 61
Figura 14 - Representação gráfica dos resultados do índice de sobrevivência e valor de UFC/sachê das bactérias viáveis da formulação de 3 bilhões de UFC/sachê no estudo a longo prazo..... 69
Figura 15 - Representação gráfica dos resultados do índice de sobrevivência e valor de UFC/sachê das bactérias viáveis da formulação de 8 bilhões de UFC / sachê no estudo de estabilidade a longo prazo..... 71
Figura 16 - Disposição de participantes e características demográficas nos três grupos 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Laxantes utilizados no tratamento da constipação intestinal.....21
Tabela 2 - Principais cepas de probióticos disponíveis comercialmente.....24
Tabela 3 - Cepas na forma de pó liofilizado empregadas no preparo das formulações probióticas 36
Tabela 4 - Componentes utilizados na formulação dos suplementos alimentares 37
Tabela 5 - Formulação do suplemento alimentar com 3 bilhões de UFC por unidade de produto/sachê.....38
Tabela 6 - Formulação do suplemento alimentar com 8 bilhões de UFC por unidade de produto /sachê.....38
Tabela 7 - Formulação do suplemento alimentar utilizada como comparador controle (sem probióticos) por unidade de produto/sachê.....39
Tabela 8 - Padrões microbiológicos para suplementos alimentares conforme Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos da RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).....48
Tabela 9 - Análises microbiológicas nos produtos no tempo zero (24 horas) e após 24 meses de armazenamento a temperatura 30ºC ± 2ºC e umidade relativa (UR) de 75% ± 5% (n=3)..62
Tabela 10 - Valor do pH dos suplementos armazenados nos tempos 0 (24 horas), 3 e 6 meses a temperatura 40ºC ± 2ºC e umidade relativa (UR) de 75% ± 5% no estudo de estabilidade acelerada (n=3) 64
Tabela 11 - Valor do pH dos suplementos armazenados nos tempos 0 (24 horas), 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses a temperatura 30ºC ± 2ºC e umidade relativa (UR) de 75% ± 5% no estudo de estabilidade de longa duração (n=3).....64
Tabela 12 - Teor de umidade dos suplementos armazenados nos tempos 0 (24 horas), 3 e 6 meses a temperatura 40ºC ± 2ºC e umidade relativa (UR) de 75% ± 5% no estudo de estabilidade acelerada (n=3) 64
Tabela 13 - Teor de umidade dos suplementos armazenados nos tempos 0 (24 horas), 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses a temperatura 30ºC ± 2ºC e umidade relativa (UR) de 75% ± 5% no estudo de estabilidade de longa duração (n=3) 65
Tabela 14 - Estabilidade da formulação de 3 bilhões de UFC / sachê 66
Tabela 15 - Estabilidade da formulação de 8 bilhões de UFC/sachê 67
Tabela 16 - Índice de sobrevivência e valor de UFC/sachê das bactérias viáveis da formulação de 3 bilhões de UFC/sachê no estudo de estabilidade a longo prazo e no estudo de estabilidade acelerado.....68
Tabela 17 - Índice de sobrevivência e valor de UFC/sachê das bactérias viáveis da formulação de 8 bilhões de UFC / sachê no estudo de estabilidade a longo prazo e no estudo de estabilidade acelerado.....70
Tabela 18 - Valores de R^2 e equação da reta para as amostras de probióticos submetidas ao estudo de estabilidade acelerada e a longo prazo 73
Tabela 19 - Quantidade de meses estimados considerando viabilidade de 45% das cepas.....74
Tabela 20 - Características dos participantes no início do estudo.....76
Tabela 21 - Frequência semanal de evacuações e da qualidade das fezes segundo Escala de Bristol* 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

m- Inclinação da reta

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSFS - *Bristol Stool Form Scale*

ºC - Grau Celsius

CEP-Uniso - Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade de Sorocaba

CLBVB - Caldo Lactose Bile Verde Brilhante

COP – Coeficiente de Fricção

CONSORT - *Consolidated Standards of Reporting Trials*

DP - Desvio Padrão

EC - *Escherichia coli*

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

ISAPP - *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*

k - Velocidade de reação

LST- Caldo Lauril Triptose

MRS - Ágar De Man, Rogosa e Sharpe

n - Número de amostras

N - Número de participantes

NMP - Número Mais Provável

OMS - Organização Mundial da Saúde

PA - Pró-Análise

PET - Politereftalato de etileno

PEBD - Polietileno de baixa densidade

Q10 – Fator de Aceleração da Temperatura

Qsp - Quantidade suficiente para

RDC - Resolução de Diretora Colegiada

R^2 - Coeficiente de determinação

TCLE - Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TGI - Trato gastrointestinal

TLR - *Toll-Like Receptors*

UFC - Unidades formadoras de colônias

UR - Umidade relativa

WGO - World Gastroenterology Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18

2.1 Constipação intestinal 18
2.2 Probióticos e prebióticos 22
2.3 Microbiota humana 25
2.4 Mecanismo de ação dos probióticos 28
2.5 Produtos probióticos 30

3 OBJETIVOS 35

3.1 Objetivo geral 35
3.2 Objetivos específicos 35

4 MATERIAL E MÉTODOS 36

4.1 Material 36
4.1.1 Componentes das formulações probióticas 36
4.1.2 Soluções e reagentes 39
4.1.3 Equipamentos industriais e analíticos 39
4.2 Métodos 41
4.2.1 Preparo dos suplementos alimentares com probióticos 41
4.2.2 Controle de qualidade dos suplementos alimentares 42
4.2.3 Ensaios de estabilidade acelerada e de longa duração 43
4.2.4 Prazo de validade 47
4.2.5 Análise microbiológica 48
4.2.6 Ensaio clínico 51

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 60

5.1 Desenvolvimento e avaliação das formulações 60
5.2. Estudos de estabilidade 63
5.2.1 Avaliação da resistência às condições do trato gastrointestinal (TGI) 68
5.3. Determinação do prazo de validade 72
5.4 Ensaio clínico 74
5.4.1 Participantes 74
5.4.2 Justificativa para diminuição do número de participantes 76
5.4.3 Avaliação da frequência semanal de evacuações e da qualidade das fezes 77
5.4.4 Limitações e pontos fortes deste estudo 79

5.4.5 Implicações para a prática clínica e para a pesquisa 80

6 CONCLUSÃO 81

REFERÊNCIAS 82

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido 92

APÊNDICE B - Questionário para realização da pesquisa 93

APÊNDICE C - Lista para assinatura de retirada do "kit" de probióticos 97

APÊNDICE D – Randomização pra retirada dos "kits" de probióticos 98

APÊNDICE E - Gráficos para determinação concentração *versus* tempo; do log da concentração *versus* tempo e do inverso da concentração *versus* tempo 99

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade de Sorocaba (Cep-Uniso) 104

ANEXO B – Publicação da Participação do I Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciências e Tecnologia 107

ANEXO C – Certificado do V Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas 108

ANEXO D - Certificado de Participação do International Workshop on Rational Use of Medicines / III Worknowledge Of Evidence-Informed Policy / III Symposium Ispe Brazint Rig / I Symposium of Ispe Brazilian Student Chapters 109

ANEXO E – Artigo Publicado - The Effect of Probiotics on Functional Constipation in Adults: Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study 110

ANEXO F - Artigo em fase de submissão - The effect of probiotics on functional constipation in adults: a randomized, double-blind and placebo-controlled study 122

APRESENTAÇÃO

O trabalho de pesquisa que originou esta tese de doutorado intitulado **"**Desenvolvimento de formulações e ensaio clínico com probiótico para o tratamento de constipação intestinal" foi desenvolvido dentro da linha de pesquisa "Avaliação de Substâncias Bioativas e Sistemas de Liberação de Fármacos (DASB)" do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Uniso (CEP-Uniso) (ANEXO A)

A ideia do tema central da tese surgiu a partir da experiência profissional da aluna Fabiana C. R. Mitelmão que observou que a criação e lançamento de um suplemento alimentar no comercio não é algo simples. O cerne da questão estava na comprovação do efeito benéfico dos probióticos, o que somente seria possível através de um ensaio clínico. O desafio do lançamento de um produto probiótico a fez retornar aos "bancos da escola" para o enfrentamento de muitos obstáculos. A pesquisa foi então desenvolvida em duas etapas, sendo a primeira focada no desenvolvimento do produto e sua caraterização e, num segundo momento, em um ensaio clínico para comprovação de eficácia e segurança do produto para o tratamento da constipação intestinal crônica.

Os resultados obtidos durante a realização desta tese foram apresentados oralmente nos seguintes Congressos: i) I Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciências e Tecnologia (I CoBICET), evento online ocorrido em 31 de agosto a 4 de setembro de 2020. O trabalho apresentado intitulado "Desenvolvimento de formulações probióticas para o tratamento da constipação intestinal" teve como autores Fabiana Rosa Mitelmão, Cristiane de Cassia Bergamaschi, Marli Gerenutti, Karin Häckel, Victor Manuel Balcão e Marta Maria Duarte Carvalho Vila (ANEXO B) ; ii) V Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas (V ABCF) evento online, em outubro de 2020 com a pesquisa intitulada "Formulações probióticas para o tratamento da constipação intestinal: desenvolvimento e avaliação" dos autores Fabiana Rosa Mitelmão, Cristiane de Cassia Bergamaschi, Marli Gerenutti, Karin Häckel, Victor Manuel Balcão e Marta Maria Duarte Carvalho Vila (ANEXO C); e iii) International Workshop on Rational Use of Medicines / III Worknowledge of Evidence-Informed Policy / III Symposium ISPE BrazInt RIG / I Symposium of ISPE Brazilian Student Chapters, evento online ocorrido em março de 2021 (ANEXO D). A pesquisa "Probiotic formulations for the treatment of intestinal constipation: development and evaluation", teve como autores Fabiana Cristina Rosa Mitelmão, Cristiane de Cassia

Bergamaschi, Marcus T Silva, Marli Gerenutti, Karin Häckel, Victor M. Balcão e Marta Maria Duarte Carvalho Vila. O protocolo do ensaio clínico foi publicado na revista Medicine com o título "The effect of probiotics on functional constipation in adults: Double-blind, randomized, placebo-controlled study tendo como autores Fabiana Cristina Rosa Mitelmão, Cristiane de Cassia Bergamaschi, Marli Gerenutti, Karin Häckel, Marcus Tolentino Silva, Victor M. Balcão, e Marta Maria Duarte Carvalho Vila (Medicine v.100, n.10, p 1-4, 2021) (ANEXO E). Os resultados referentes ao desfecho do ensaio clínico estão apresentados em artigo científico **"**The effect of probiotics on functional constipation in adults: a randomized, double-blind and placebo-controlled study" em fase de submissão (ANEXO F).

1 INTRODUÇÃO

A palavra "probiótico" é derivada do significado grego "para a vida" e teve vários significados diferentes ao longo dos anos. Foi usada pela primeira vez por Lilley e Stillwell em 1965 para descrever substâncias segregadas por um microrganismo que estimulava o crescimento de outro (MCKENZIE; KUENEMAN; HARRIS, 2018).

Atualmente, os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. As espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais usadas, mas também *Saccharomyces boulardii* e algumas espécies de *E. coli* e *Bacillu*s são empregadas como probióticos (WGO, 2017).

O uso de microrganismos benéficos para melhorar as condições fisiológicas do hospedeiro, tem sido cada vez mais aplicado para a proteção contra microrganismos nocivos e também para fortalecer o sistema imunológico do hospedeiro. O uso de probióticos está em ascensão e estão sendo, cada vez mais, utilizados para prevenir doenças aumentando a imunidade do indivíduo (MCKENZIE; KUENEMAN; HARRIS, 2018; SOCCOL *et al*., 2010).

Os efeitos benéficos mais importantes que têm sido citados incluem a prevenção de diarreias, redução da constipação intestinal, atividade contra microrganismos patogênicos e efeitos anti-inflamatórios. Os probióticos também demonstraram efeitos inerentes no alívio de sintomas de alergias; e em novos sistemas de entrega de drogas para o tratamento do câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), infecções respiratórias e do trato urinário devido à sua natureza antimicrobiana. Existem ainda relatos dispersos sobre seus efeitos benéficos no envelhecimento, fadiga, autismo, osteoporose, obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2 (PANDEY; NAIK; VAKI, 2015).

O uso de probióticos para tratamento e prevenção de doenças intestinais é diverso e engloba as doenças inflamatórias intestinais (pouchite, colite ulcerativa e doença de Crohn), erradicação do *Helicobacter pylori*, síndrome do intestino irritável, má absorção da lactose, enterocolite necrosante e doença hepática gordurosa não alcoólica (OLIVEIRA; ALMEIDA; BOMFIM, 2017; WGO, 2017). Há um novo enfoque sobre a função do intestino humano, que deixou de ser visto apenas como um tubo digestivo para ser reconhecido como o principal alvo das respostas imunitárias. Neste sentido, o consumo regular de produtos que contenham linhagens microbianas reconhecidamente probióticas tem gerado benefícios no tratamento de

vários distúrbios intestinais, dentre os distúrbios intestinais mais frequentes destaca-se a constipação intestinal funcional (ANTUNES *et al.*, 2007).

A constipação intestinal é uma manifestação clínica comum, acometendo cerca de 15 a 20% da população mundial sendo considerada um problema de saúde pública. Vários tratamentos como combinação de intervenções dietéticas (ingestão adequada de fibras e líquidos), uso de laxantes, entre outros são utilizados. No entanto, para certa parcela dos pacientes, o tratamento convencional não proporciona melhora satisfatória, o que leva ao interesse em outras estratégias terapêuticas, como o uso de probióticos (GOMES; MORAIS, 2019).

Existem diversos mecanismos que podem explicar a ação de cepas probióticas no tratamento da constipação intestinal funcional. Os probióticos afetam as bactérias intestinais aumentando o número de bactérias anaeróbias benéficas e diminuindo a população de microrganismos potencialmente patogênicos. Estes agentes também promovem o aumento da produção de lactato e ácidos graxos de cadeia curta, reduzindo o pH luminal, que poderia melhorar o peristaltismo colônico e diminuir o tempo de trânsito intestinal. Neste sentido, é crescente o interesse em empregar probióticos para o tratamento da constipação intestinal funcional (GANJBAKHSH; REZAEE, 2017; GOMES; MORAIS, 2019).

A maior conscientização e o conhecimento dos benefícios potenciais dos probióticos resultaram no crescimento exponencial de produtos comerciais. Também estão chegando ao mercado em uma ampla gama de formas diferentes e estão sendo comercializados como suplementos alimentares embalados em cápsulas, pílulas, suspensões, sachês de pó, *sprays* e granulados. Por serem classificados como suplementos alimentares, os produtos probióticos obedecem a critérios menos rigorosos do que os medicamentos. Isto, algumas vezes implica em produtos com problemas de qualidade com cepas identificadas e/ou classificadas incorretamente, cepas não viáveis e/ou com baixo número de colônias (HOJSAK *et al*., 2018).

Nesta perspectiva, justifica-se o trabalho de pesquisa aqui apresentado que propõem o desenvolvimento de duas formulações com cepas probióticas visando o tratamento da constipação intestinal funcional e um estudo clínico para comprovação de eficácia dos sachês desenvolvidos. Não existem recomendações posológicas uniformes para a ingestão de probióticos, uma vez que, a concentração ideal pode depender do desfecho clínico esperado, do sexo, espécie ou cepa (GARCIA; DIAB; PASC, 2016). Neste sentido, sempre que se deseja lançar suplemento alimentos contendo probiótico, é recomendável a realização de ensaio clínico para a comprovação da eficácia e segurança do produto para a finalidade proposta.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Constipação intestinal

A saúde é considerada como consequência do estilo de vida, que é orientado no sentido do bem-estar. A condição de saúde abrange diversos aspectos da vida, como a relação com o meio ambiente, o lazer, a alimentação, as condições de trabalho, moradia e renda. O estilo de vida representa um dos principais fatores associados ao aparecimento de doenças, chamadas de "doenças da civilização", sendo a constipação intestinal parte deste grupo (GARCIA *et al*., 2016).

A constipação intestinal é também conhecida por obstipação intestinal e, mais popularmente, como "intestino preso" e "prisão de ventre", sendo considerada um problema comum nos dias de hoje, levando desconforto e outros transtornos ao paciente com impacto negativo considerável na qualidade de vida das pessoas com este transtorno (SBCP, 2009). Além disto, representa uma carga financeira substancial aos indivíduos acometidos, devido aos custos associados de diagnóstico e tratamento (WERTH, 2019).

A prisão de ventre é uma condição multifatorial, sendo que, na maioria das vezes, é decorrente da ingestão inadequada de fibras e água (GALVÃO-ALVES, 2013). Além disto, são fatores desencadeantes e agravantes: depressão; inatividade; baixa ingestão calórica; baixa renda e baixo nível educativo; quantidade de medicação recebida (independentemente dos perfis de efeitos colaterais) e abuso físico e sexual (WGO, 2010).

Este distúrbio intestinal também pode ser definido como um transtorno caracterizado por uma dificuldade persistente para evacuar ou uma sensação de evacuação incompleta e/ou movimentos intestinais infrequentes. A evacuação pode ocorrer a cada 3-4 dias ou com menor frequência ainda (WGO, 2010). Atualmente, a prisão de ventre encontra-se entre as doenças funcionais do intestino, acometendo cerca de 15 a 20% da população mundial ou mais, sendo mais comum nas mulheres e nos idosos. Em idosos acima de 60 anos a constipação intestinal pode estar presente em 33% da população (GALVÃO-ALVES, 2013; SOBRADO *et al*., 2018). Em idosos, constitui um problema sanitário importante, mostrando-se como uma doença na qual a prevalência se torna maior que uma série de outras afecções crônicas comuns, como a hipertensão, obesidade e diabetes *mellitus* (KLAUS *et al*., 2015). Segundo Del'Arco, Magalhães e Quilici (2017) a instalação do intestino preso está diretamente relacionado ao estilo de vida, atividade física insuficiente e alimentação inadequada. O emocional e o estresse são

fatores que compõem o estilo de vida e, também estão intimamente relacionados aos sintomas dos distúrbios gastrointestinais. Neste sentido, as mulheres parecem ser mais afetadas emocionalmente e têm sua qualidade de vida mais afetada por eles do que os homens apresentando maior probabilidade de serem acometidas pela constipação intestinal funcional.

O diagnóstico de constipação intestinal é definido de acordo com critérios estabelecidos por especialistas, sendo o atual, denominado Consenso Roma IV (MISZPUTEN, 2019). Até 1980, a constipação era definida com base no número de evacuações semanais ou no auto relato (COLLETE; ARAÚJO; MADRUGA, 2010). O Consenso de Roma IV define constipação intestinal funcional como uma disfunção onde observa-se uma evacuação dificultosa, pouco frequente e incompleta. Esta alteração deve ter sido iniciada a pelo menos a 6 meses, com presença mais frequente nos últimos 3 meses, com inclusão de duas ou mais características, em ao menos 25% das evacuações como: esforço ao evacuar, fezes endurecidas ou fragmentadas, sensação de eliminação incompleta, sensação de obstrução anorretal, manobras digitais para facilitar a saída do conteúdo fecal. Além disto, a constipação é caracteriza-se com menos de 3 evacuações espontâneas por semana (LACY; PATEL, 2017; MISZPUTEN, 2019; PINHEIRO *et al*., 2019).

Embora a constipação seja caracterizada por sintomas intestinais que requerem um alto nível de atenção médica, na maioria dos casos, não é fatal ou debilitante para o paciente. No entanto, tem um efeito significativo na qualidade da vida, particularmente em casos crônicos (SOBRADO *et al*., 2018).

Este distúrbio intestinal pode ser classificado em diferentes tipos, subdividindo-se em primário e secundário. A constipação primária tem origem funcional, já a secundária possui causa definida, como doenças endócrinas e neurológicas ou uso inadvertido de substâncias obstipantes, como medicamentos (antiácidos com cálcio e alumínio, drogas opióides, anticolinérgicos, diuréticos, antidepressivos, AINEs, benzodiazepinas, suplementos de ferro e cálcio). Em relação aos aspectos fisiopatológicos, a constipação é classificada em três categorias, sendo constipação de trânsito normal; constipação de trânsito lento; e doenças do ato evacuatório. A constipação de trânsito normal, também denominada de funcional, é a forma mais comum de manifestação da constipação intestinal. Neste caso, os sintomas são fezes endurecidas ou insatisfação com a evacuação, embora o tempo de passagem pelo cólon seja normal (GARCIA *et al.*, 2016).

O diagnóstico deste distúrbio intestinal requer uma análise cuidadosa da história clínica e do exame físico, incluindo avaliações proctológicas e investigação diagnóstica adicional em

casos com sintomas persistentes e refratariedade ao tratamento inicial (dieta, mudanças no estilo de vida e medicamentos à base de fibra). Outros distúrbios anatômicos que podem alterar o trânsito intestinal devem ser excluídos, principalmente em casos de constipação recente ou inexplicável, constipação com sangramento anal e/ou perda de peso inexplicada e hábitos intestinais alterados na população idosa (SOBRADO *et al*., 2018).

O tratamento e prevenção deste transtorno devem ser particularizados, pois não há regras definidas para uma prescrição uniformizada para todos os casos. Deve-se considerar os hábitos e estilo de vida de cada pessoa (GARCIA *et al.*, 2016). Os tratamentos incluem as terapias não farmacológicas e os agentes farmacológicos, como laxantes. As terapias não farmacológicas envolvem mudanças na dieta, aumento da atividade física, ingestão de mais líquidos, reeducação intestinal e o maior consumo de fibras vegetais (PINHEIRO *et al.*, 2018). A modificação da dieta, com aumento do consumo de fibras (25 g de fibras/dia) e suplementos de líquidos (até 1,5 a 2,0 L/dia) podem melhorar a frequência das fezes e diminuir a necessidade de laxantes (WGO, 2010). No entanto, a fibra alimentar parece ser eficaz no alívio da constipação leve a moderada, mas não grave (SHIN *et al*., 2016).

O tratamento farmacológico pode ser feito com a utilização de laxantes, medicamentos que facilitam a defecação e objetivam transportar o líquido para o lúmen intestinal, elevar volume, causar amolecimento do bolo fecal e promover o peristaltismo intestinal. Os laxantes disponíveis comercialmente, são de eficácia confirmada, e geralmente, bem tolerados. Contudo, o uso crônico pode causar colite medicamentosa, diarreia com perda intensa de eletrólitos e água, especialmente potássio, provocando astenia e fraqueza muscular, além de outros efeitos colaterais (PINHEIRO *et al*., 2018). O uso abusivo de laxantes sem uma orientação médica é extremamente prejudicial ao paciente portador de constipação crônica. O uso de laxantes deve ser feito sob prescrição médica e com constante monitoramento (SBCP, 2009). Estão disponíveis no mercado vários tipos de laxantes, com diferentes mecanismos de ação como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1 - Laxantes utilizados no tratamento da constipação intestinal

Tipo de laxante	Exemplos	Modo de ação	Limitações
Incrementadores do bolo fecal	Policarbofila cálcica Metilcelulose Psyllium Ágar-ágar Farelo de trigo	Aumento do volume fecal com estimulo fisiológico a evacuação.	Flatulência e distensão abdominal. Não recomendado para pacientes imobilizados
Osmóticos	Polietilenoglicol Lactulose Sorbitol Hidróxido de magnésio Citrato de magnésio Sulfato de magnésio	Fluidificação das fezes. Substâncias "roubam" água do organismo humano através da mucosa digestiva.	Flatulência, inchaço
Irritativos	Sene Cáscara sagrada Óleo de rícino Bisacodil Fenolftaleína Picossulfato de sódio	Aumento da contração da musculatura lisa intestinal por meio de estímulo ao plexo mioentérico	Cólicas e desconforto abdominal. uso crônico pode provocar lesão no plexo mioentérico com dismotilidade colônica
Amaciantes	Docusato de sódio Óleo mineral	Agentes emolientes que facilitam o deslizamento das fezes.	Diminuição da absorção das vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), em médio prazo.

Fonte: Elaboração própria adaptado de Galvão-Alves (2013) e Tack *et al.* (2011).

Os laxantes, contudo, são prescritos não só como constituinte das fórmulas para emagrecimento, mas também para promover desintoxicação com o objetivo de proteção do indivíduo contra os efeitos nocivos dos ingredientes fecais, bem como para o tratamento da constipação. A recomendação não discrimina a idade e, inúmeras vezes, é feita sem critérios e de forma abusiva, o que muitas vezes só pioram a constipação (SANTOS JÚNIOR, 2005). O uso de laxativos, e outras medicações na constipação funcional, devem ser avaliados e considerados como terapêutica complementar em associação a mudanças na dieta e no comportamento. Isoladamente, os laxativos não possuem efeito curativo (SBCP, 2009).

Neste sentido, o uso de alimentos funcionais e suplementos alimentares, como os probióticos e prebióticos, podem ajudar no tratamento e prevenção da constipação, uma vez que estudos clínicos têm apontado efeito positivo dos probióticos e prebióticos em doenças

gastrointestinais, como a constipação intestinal funcional (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017).

A descoberta, nas últimas décadas, de que a microbiota intestinal e os componentes dietéticos exercem funções importantes no sistema imune trouxe várias informações sobre as doenças humanas e, sobre novas alternativas terapêuticas baseadas na manipulação desses componentes (SBI, 2019).

O sistema imunológico da mucosa, como primeira linha de defesa do nosso organismo, é fundamental para a proteção contra invasores de patógenos. E além disto, 70 % do nosso sistema imune está localizado no sistema gastrointestinal (DWIVEDI, 2018). O sistema imunológico da mucosa consiste em físico (muco), componentes moleculares (proteínas antimicrobianas) e celulares que agem sinergicamente para evitar que os microrganismos invadam o corpo. Assim, a desregulação ou comprometimento do sistema imunológico da mucosa implica em uma série de doenças inflamatórias, como colite ulcerativa e doença celíaca, bem como aumento da suscetibilidade ao câncer e infecções (WEST *et al.*, 2009). Neste sentido, a disbiose intestinal é apontada como uma possível causa de vários distúrbios gastrointestinais, como a constipação intestinal. Embora a microbiota humana seja composta por mais de 400 espécies bacterianas, esta colonização não é permanente. Alterações na microbiota podem gerar distúrbios, como se observa em adultos com prisão de ventre que apresentam diminuição na população de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (PINHEIRO *et al.*, 2019). Assim o uso de probióticos para o tratamento da constipação ou outras patologias do sistema gastrointestinal pode ser uma alternativa viável.

2.2 Probióticos e prebióticos

Os probióticos são microbianos vivos que atuam beneficamente no hospedeiro (humano ou animal) melhorando seu equilíbrio intestinal. Os probióticos podem ser incluídos na preparação de uma ampla gama de produtos, desde alimentos e suplementos dietéticos até em medicamentos (FAO, 2002; VIJAYARAM; KANNAN, 2018). Já os prebióticos são substâncias alimentares que nutrem um grupo seleto de microrganismos que habitam o intestino. Estas substâncias colaboram mais na multiplicação das bactérias benéficas do que das prejudiciais. Frutas, vegetais, cereais e algumas plantas comestíveis são fontes de carboidratos que podem constituir em potenciais prebióticos, tais como tomates, alcachofras, bananas, aspargos, frutas vermelhas, alho, cebola, chicória, vegetais verdes, legumes, também como

aveia, linhaça, cevada e trigo. Os prebióticos mais conhecidos são: oligofrutose, inulina, galactooligossacarídeos, lactulose e oligossacarídeos do leite humano (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017).

O termo probióticos é derivado de uma palavra grega que significa “para a vida”, sendo usado para definir organismos vivos não patogênicos e seus efeitos benéficos nos hospedeiros. O termo “probióticos” foi introduzido pela primeira vez por Ferdinand Vergin, em 1954, quando ele estava estudando os efeitos prejudiciais dos antibióticos e outras substâncias microbianas na população microbiana intestinal. Ele observou que alguns “probióticos” eram favoráveis à microbiota intestinal. A expressão probiótico foi então redefinida por Lilly e Stillwell, em 1965 como “microrganismos que estimulam o desenvolvimento de outros microrganismos”. Posteriormente, o termo foi ainda definido como “microrganismos não patogênicos que, quando ingeridos, exercem uma influência positiva na saúde ou fisiologia do hospedeiro” por Fuller em 1989. Em 1998, Guarner e Schaafsma, apontaram para a importância do uso de uma dose apropriada dos probióticos, para que pudesse ser alcançado o efeito desejado (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017; PANDEY; NAIK; VAKI, 2015).

Já a expressão “simbióticos” indica produtos que contêm tanto probióticos como prebióticos e que conferem benefícios à saúde. Os simbióticos são combinações apropriadas de prebióticos e probióticos, exercendo um efeito tanto prebiótico como probiótico (WGO, 2017).

Atualmente, os probióticos são definidos como “microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde humana”. Esta definição foi estabelecida em 2002 pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (FAO/WHO, 2002), sendo revista, em 2013. Até os dias atuais esta definição é mantida pela Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (do inglês *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* - ISAPP) (HILL *et al*., 2014; MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017).

Segundo a Anvisa probióticos são definidos como “microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo” (BRASIL, 2002). Já a definição de probióticos expressa pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 241, de 26 de julho de 2018 (BRASIL, 2018a) é “micro-organismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere um benefício à saúde do indivíduo”.

Para um organismo ser considerado um probiótico deve atender como exigências mínimas (i) identidade da cepa (sexo, espécie e nível da cepa); (ii) atender a testes *in vitro* para

resistência à acidez gástrica, ao ácido biliar e às enzimas digestivas e atividade antimicrobiana em relação a bactérias possivelmente patogênicas; (iii) determinação da segurança com indicação que a cepa probiótica é segura na forma de administração e (iv) apresentar estudos *in vivo* para comprovação dos efeitos sobre a saúde no hospedeiro-alvo (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

As espécies mais predominantes utilizadas como bactérias probióticas estão resumidas na Tabela 2. No entanto, as bactérias probióticas também podem ser derivadas da microbiota intestinal de seres humanos saudáveis; cepas não humanas usadas na fermentação de produtos lácteos ou de espécies de sexos como *Streptococcus*, *Bacillus* e *Enterococcus*. No entanto, devido a alguns sexos de *Streptococcus*, *Bacillus* e *Enterococcus* conterem muitas espécies patogênicas, existem algumas preocupações quanto à segurança de tais probióticos. Leveduras, especialmente *Saccharomyces*, também têm sido usadas como probióticos há muitos anos (GOUDARZI; GOUDARZI; RASHIDAN, 2014).

Tabela 2 - Principais cepas de probióticos disponíveis comercialmente

***Lactobacillus* espécies**	***Bifidobacterium* espécies**	**Outras espécies**
L. acidophilus	*B. bifidum*	*Bacillus cereus*
L. johnsonii	*B. longum*	*Escherichia coli*
L. bulgaricus	*B. breve*	*Saccharomyces cerevisiae*
L. plantarum	*B. infantis*	*Enterococcus faecalis*
L. reuteri	*B. lactis*	
L. lactis	*B. adolescentis*	

Fonte: GOUDARZI; GOUDARZI; RASHIDAN, 2014.

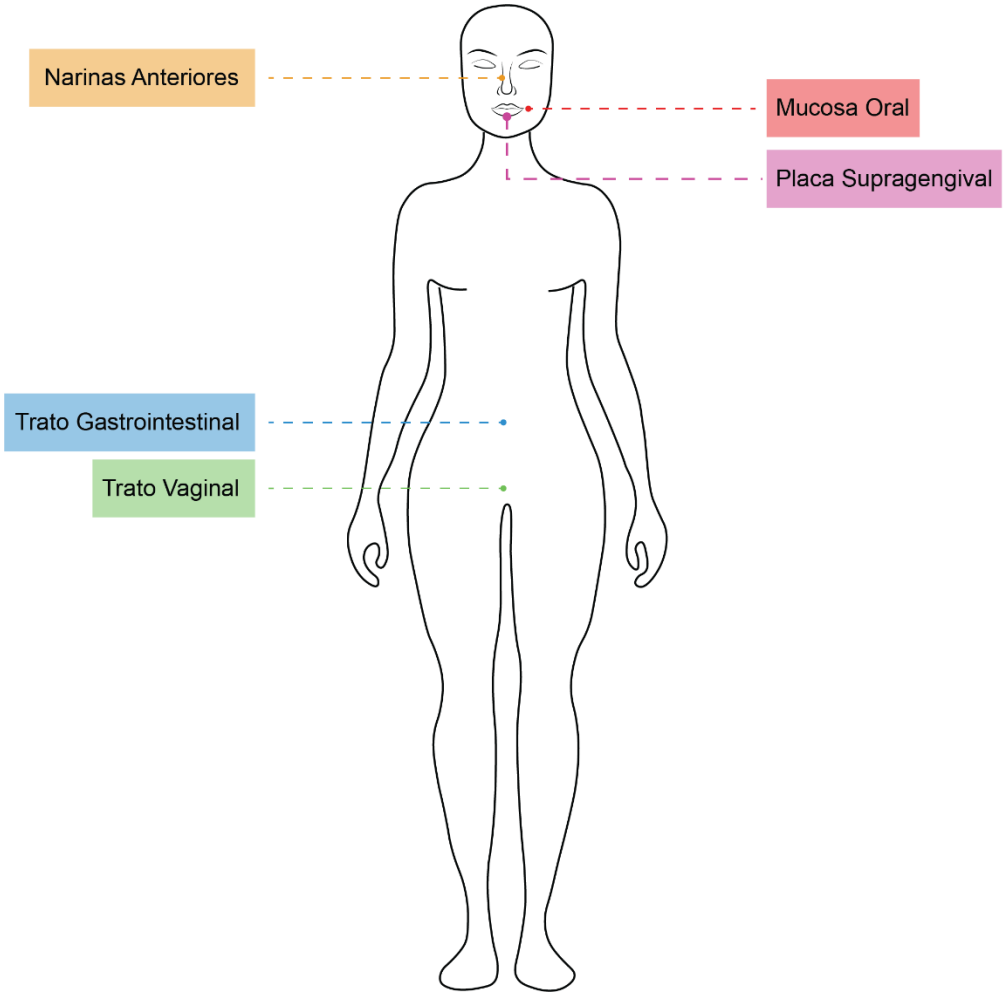
Em relação a quantidade de ingestão de probióticos para efeitos benéficos à saúde, a comunidade científica aceita um consumo diário de 10^8 a 10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de células viáveis probióticas como sendo a quantidade mínima necessário para conferir os benefícios desejados. Contudo, não são estabelecidas posologias uniformes para a ingestão de probióticos (HAFFNER; DIAB; PASC, 2016). A Agência de Vigilância Sanitária (Anvisa) abrange valores, dependendo da cepa utilizada, da idade e condição (gestante, lactante), entre 10^8 a 10^{10} UFC/sachê (BRASIL, 2018a).

2.3 Microbiota humana

O conceito de microbiota humana e seu papel na a saúde passou por mudanças significativas nos últimos anos. A antiga ideia da presença de microrganismos no organismo como algo estranho ou mesmo perigoso passou a ser visto como normal e até mesmo necessária para funcionamento adequado do organismo humano (SUVOROV, 2013).

O corpo humano é "habitado" por microrganismos cuja população é dez vezes superior ao número de células humanas. Estima-se que o corpo humano contenha cerca de 10 trilhões de células e que seja portador de aproximadamente 100 trilhões de bactérias, fungos e vírus (CARDOSO, 2015). A Figura 1 ilustra a localização da microbiota humana.

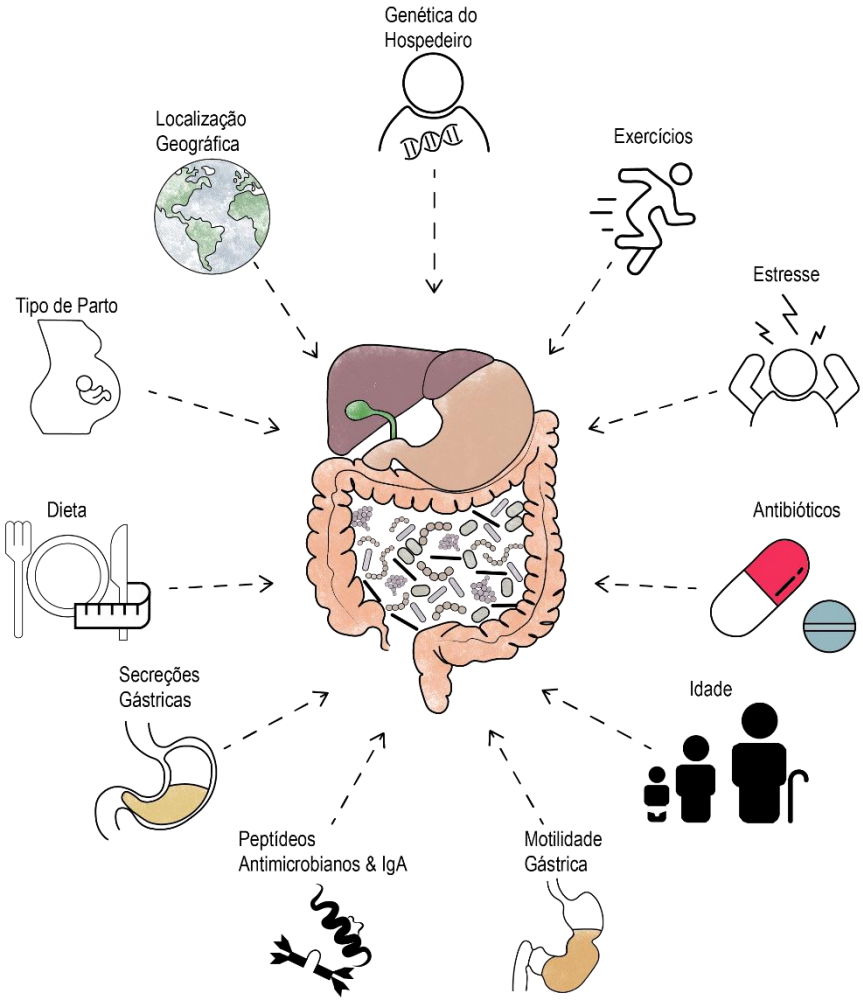
Figura 1 - Localização da microbiota humana



Fonte: Adaptado de Cardoso (2015)

O sistema gastrointestinal humano aloja a maior parte das bactérias, localizadas principalmente no cólon, incluindo centenas de espécies (WGO, 2017). A microbiota normal humana desenvolve-se desde o nascimento até a fase adulta, dando origem a comunidades bacterianas estáveis e próprias de cada indivíduo (CARDOSO, 2015). A composição da microbiota é influenciada pela microbiota da mãe, modo de entrega (parto normal ou cesárea), tipo de leite recebido (aleitamento materno ou fórmula infantil), introdução alimentar, ambiente que a criança está inserida, alimentação ao longo da vida, uso de antibióticos, dentre outros fatores (FERRARI, 2020), como ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Fatores que alteram a microbiota intestinal



Fonte: Adaptado de Ferrari (2020)

A interação normal entre as bactérias intestinais e seu hospedeiro é uma relação simbiótica. A presença de um grande número de estruturas linfoides organizadas na mucosa do

intestino delgado (placas de Peyer) e do intestino grosso (folículos linfoides isolados) indicam significativa influência das bactérias intestinais na função imunológica. O epitélio que cobre estas estruturas é especializado em captação e amostragem de antígenos, e contém centros germinais linfoides para indução de respostas imunes adaptáveis ou adquiridas. No cólon, os microrganismos proliferam fermentando os substratos disponíveis da dieta ou a partir de secreções endógenas e contribuem para a nutrição do hospedeiro (WGO, 2017).

Estudos demonstraram que as populações de microrganismos colonizadores diferem entre indivíduos saudáveis e outros com doença ou em condições insalubres. Entretanto, os investigadores não podem ainda definir a composição de uma microbiota humana saudável (WGO, 2017). No entanto, é estabelecido que o conteúdo bacteriano da microbiota intestinal humana é composto principalmente *de Firmicutes, Bacteriodetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria* e *Archaea* com predominância de *Firmicutes* e *Bacteriodetes* (SUVOROV, 2013).

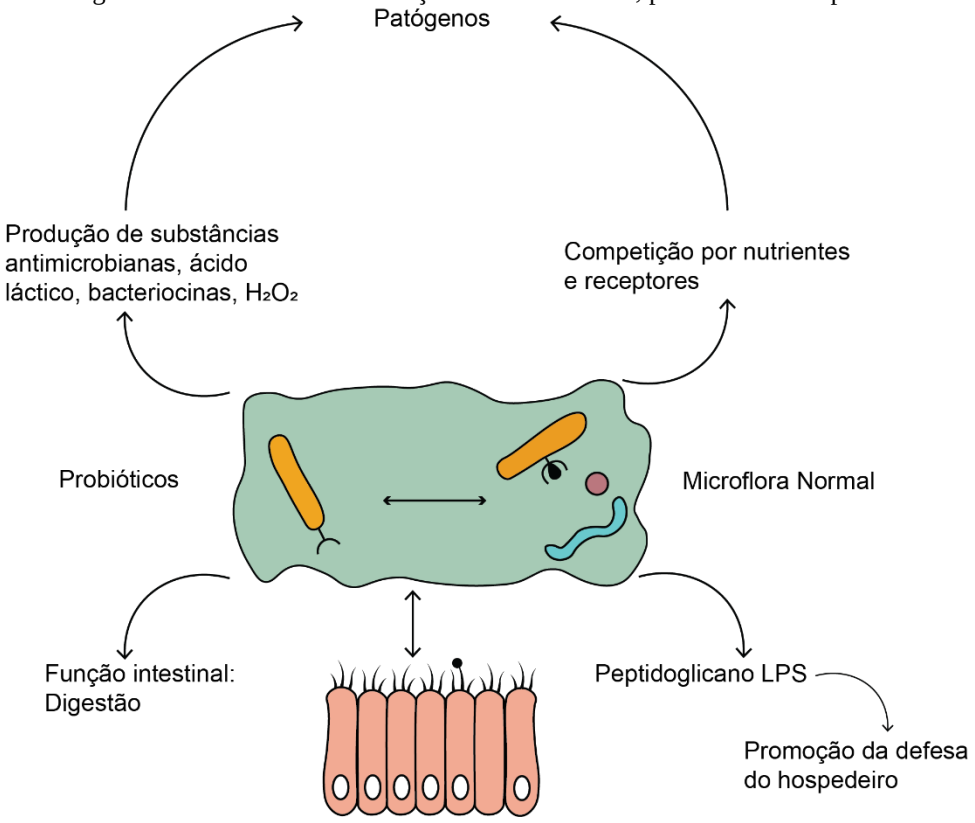
Há uma ampla associação entre a microbiota e o estado de saúde humana. A mudança geral do microbioma, causada por fatores ambientais, dieta, infecções, uso de antibióticos e outras drogas, predispõem os indivíduos a doenças e sintomas crônicos que abrangem doenças inflamatórias do intestino, síndrome do intestino irritável, câncer, alergias, asma, diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares, distúrbios neurológicos e mentais, e desequilíbrios gastrointestinais (ZOMMITI; FEUILLOLEY; CONNIL, 2020). A composição diversa e equilibrada da microbiota promove homeostase intestinal por ter função de barreira e estimuladora da resposta imune (PINTO; SILVA, 2018).

As ações tanto dos probióticos quanto dos prebióticos estão entrelaçadas com os microrganismos que colonizam os seres humanos. Os prebióticos servem como fonte de alimento para os agentes benéficos da comunidade bacteriana comensal, promovendo saúde. Já a interação entre probióticos e células hospedeiras, ou entre probióticos e microrganismos autóctones, oferece um meio importante de influência na saúde do hospedeiro (WGO, 2017). As interações entre a microbiota intestinal e a dieta têm um papel crucial na manutenção da saúde. Os componentes funcionais dos alimentos, incluindo probióticos e prebióticos, têm um efeito positivo comprovado sobre uma série de condições patológicas do trato gastrointestinal (RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; MILIVOJEVIĆ, 2020). Os probióticos podem restaurar a composição da microbiota intestinal e introduzir funções benéficas nas comunidades microbianas intestinais, resultando na melhoria ou prevenção da inflamação intestinal e outras doenças intestinais ou sistêmicas (HEMARAJATA; VERSALOVIC, 2013).

2.4 Mecanismo de ação dos probióticos

O mecanismo de ação dos probióticos, em prol da saúde, é diversificado e, ainda não totalmente claro, promovendo benefícios imunológicos e não imunológicos (COSTA, VARALHO, 2012; MARQUES *et al*., 2020). Os efeitos provocados pelos probióticos, podem ainda variar dependendo do microrganismo e da linhagem a que eles pertencem (ABRANTES, 2015). Os probióticos afetam a microbiota intestinal estimulando os mecanismos imunes da mucosa e também interagem com microrganismos potencialmente patogênicos, evitando a colonização de microrganismos oportunistas e patogênico (WGO, 2017). A Figura 3 ilustra os mecanismos de interação entre microbiota, probióticos e hospedeiro.

Figura 3 - Mecanismos de interação entre microbiota, probióticos e hospedeiro



Fonte: Adaptado de WGO (2017)

Os principais efeitos não imunológicos em decorrência da ação dos probióticos podem ser resumidos em: (i) digerir alguns tipos de alimentos e competir com os patógenos pelos nutrientes; (ii) alterar o pH local para criar um ambiente local desfavorável para os patógenos; (iii) produzir bacteriocinas para inibir os patógenos; (iv) fagocitar radicais superóxidos; (v) estimular a produção epitelial de mucina; (vi) aumentar a função da barreira intestinal; (vi)

competir pela adesão com os patógenos (vii) alterar toxinas de origem patogênica (WGO, 2017).

Em relação aos efeitos imunológicos os microrganismos probióticos estimulam, modulam e regulam a resposta imune do hospedeiro por diferentes mecanismos (MARQUES *et al*., 2020). Acredita-se que os probióticos influenciem a função imunológica principalmente em função da cepa bacteriana. Mesmo bactérias intimamente relacionadas têm diferenças em suas estruturas antigênicas e, portanto, influenciam o sistema imunológico de modo exclusivo. Assim, alguns efeitos na função imunológica dos probióticos são impulsionados por interações de estruturas bacterianas ou metabólitos com receptores, como os TLRs (do inglês *Toll-Like Receptors*) nas células epiteliais e imunológicas do hospedeiro (LEHTORANT; LATVALA; LEHTINEN, 2020). Ao aderir as células do epitélio intestinal células através dos receptores (TLRs), há um aumento na produção de citocinas, como IL-6 e liberação de proteína quimio-atraente de macrófago das células intestinais epiteliais. Fragmentos das bactérias probióticas internalizadas nas células epiteliais intestinais, promovem uma rede complexa de sinais que estimulam as células imunes e ativam principalmente a resposta inata e citocinas liberadas pelas células T. Outras células importantes que desempenham um papel fundamental na barreira epitelial são as células de *Paneth*. Os probióticos têm efeitos importantes sobre essas células, aumentando seu número nas criptas intestinais com o objetivo de reforçar a barreira epitelial (GALDEANO *et al.*, 2019).

Contudo, embora os efeitos imunológicos, em geral, sejam específicos da cepa, os probióticos também compartilham mecanismos comuns de estimulação imunológica, como a secreção de metabólitos, como por exemplo, pela secreção de ácidos graxos de cadeia curta que são conhecidos por terem efeitos imunomoduladores. Por outro lado, os probióticos podem influenciar a função imunológica indiretamente, alterando a composição e / ou atividade da microbiota hospedeira. Por exemplo, no intestino delgado, onde o número de bactérias endógenas é menor do que no intestino grosso, a ingestão de probióticos altera temporariamente a composição da microbiota e podem influenciar a resposta imune do hospedeiro (LEHTORANT; LATVALA; LEHTINEN, 2020).

É importante ressaltar que a ativação das células imunológicas não altera a homeostase intestinal, garantindo a segurança do consumo de probióticos por longos períodos de tempo sem efeitos adversos (GALDEANO *et al*., 2019).

2.5 Produtos probióticos

Desde a antiguidade, os microrganismos representaram, e ainda são, uma parte indispensável da vida humana e nutrição com altos níveis de seu consumo por meio de produtos fermentados naturalmente com grandes quantidades de microrganismos benéficos viáveis. Na história, os humanos, inconscientemente e, sem mesmo tendo uma pista sobre a existência do mundo microscópico, usaram microrganismos a fim de iniciar numerosos processos alimentares (ZOMMITI; FEUILLOLEY; CONNIL, 2020). Atualmente, as células probióticas estão disponíveis para consumo humano em alimentos fermentados, em alimentos incorporados com probióticos ou na forma de suplementos alimentares (MISRA; MOHANT; MOHAPATRA, 2019).

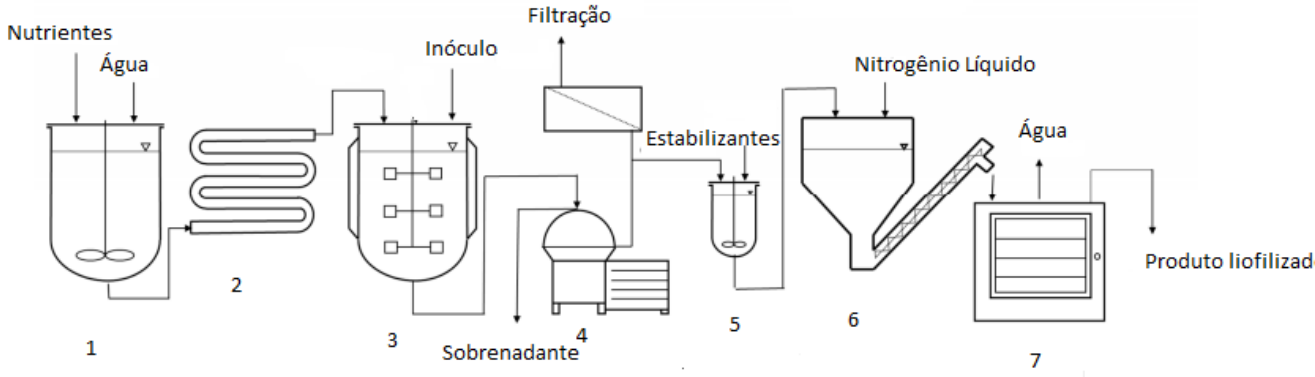
Um suplemento alimentar ou suplemento dietético é uma substância administrada por via oral projetada para fornecer um determinado ingrediente, para complementar a dieta. Em outras palavras, eles são não substancialmente aplicados para tratar ou curar uma doença humana específica (MEYBODI; MORTAZAVIAN, 2017). Segundo a Anvisa na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 243 de 2018, suplemento alimentar é definido como "produto para ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas, destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados" (BRASIL, 2018b).

A inclusão de probióticos em suplementos dietéticos utiliza, principalmente, probióticos no formato de pó liofilizado, cápsulas, comprimidos e pó em sachês são os mais comumente formatos encontrados e, geralmente, são armazenados em condições ambientais (FESTER *et al*., 2019).

Os processos de fabricação de probióticos para uso em suplementos alimentares ou em alimentos, como em laticínios apresentam etapas comuns. As cepas congeladas são cuidadosamente preparadas para garantir que sejam livres de contaminantes. É realizado um número limitado de fermentações sequenciais para atingir o volume de inóculo desejado e, ao mesmo tempo, reduzir riscos potencias de mutações genéticas. O inóculo é então transferido para um tanque de fermentação principal para o crescimento. O meio usado na etapa de fermentação é uma mistura de água, fontes de nitrogênio, carboidratos, sais e micronutrientes necessários para o crescimento, sendo esterilizado termicamente. Após a fermentação, as células são concentradas, separando as células do meio nutritivo por centrifugação. Dependendo da aplicação do produto final, soluções estabilizantes (ou seja, crioprotetores para

proteger as células de lesão durante o congelamento e/ou lioprotetores para proteger as células de lesão durante a liofilização) podem ser adicionadas às células. Os crioprotetores inibem a taxa de crescimento de gelo, aumentando a viscosidade da solução e mantendo a estrutura amorfa do gelo nas proximidades da célula. Os lioprotetores estabilizam a estrutura da bicamada lipídica da membrana celular na ausência de água. Crio e lioprotetores comumente usados são carboidratos e peptídeos. Após a incorporação das soluções estabilizantes, várias técnicas podem ser aplicadas para o congelamento ou liofilização dos probióticos e posterior emprego. Uma técnica simples de congelamento consiste em colocar o concentrado crioprotegido em latas e mergulhá-las em banho de nitrogênio. As latas congeladas podem então ser enviadas para empresas que incorporam probióticos em alimentos ou bebidas. Alternativamente, uma técnica mais produtiva consiste em peletizar o concentrado crioprotegido. O concentrado é derramado através de orifícios calibrados em um banho de nitrogênio líquido formando *pellets*. Os *pellets* (esferas de 4-5 mm de diâmetro) são então embalados e armazenados em uma temperatura variando de -45 a -55 ºC. Alternativamente, os pellets podem ser liofilizados e armazenados em temperatura ambiente (FESTER *et al*., 2019). A Figura 4 apresenta um esquema sobre o processo de produção dos probióticos.

Figura 4 - Representação esquemática da produção de probióticos para suplementos dietéticos e /ou para uso em produtos lácteos



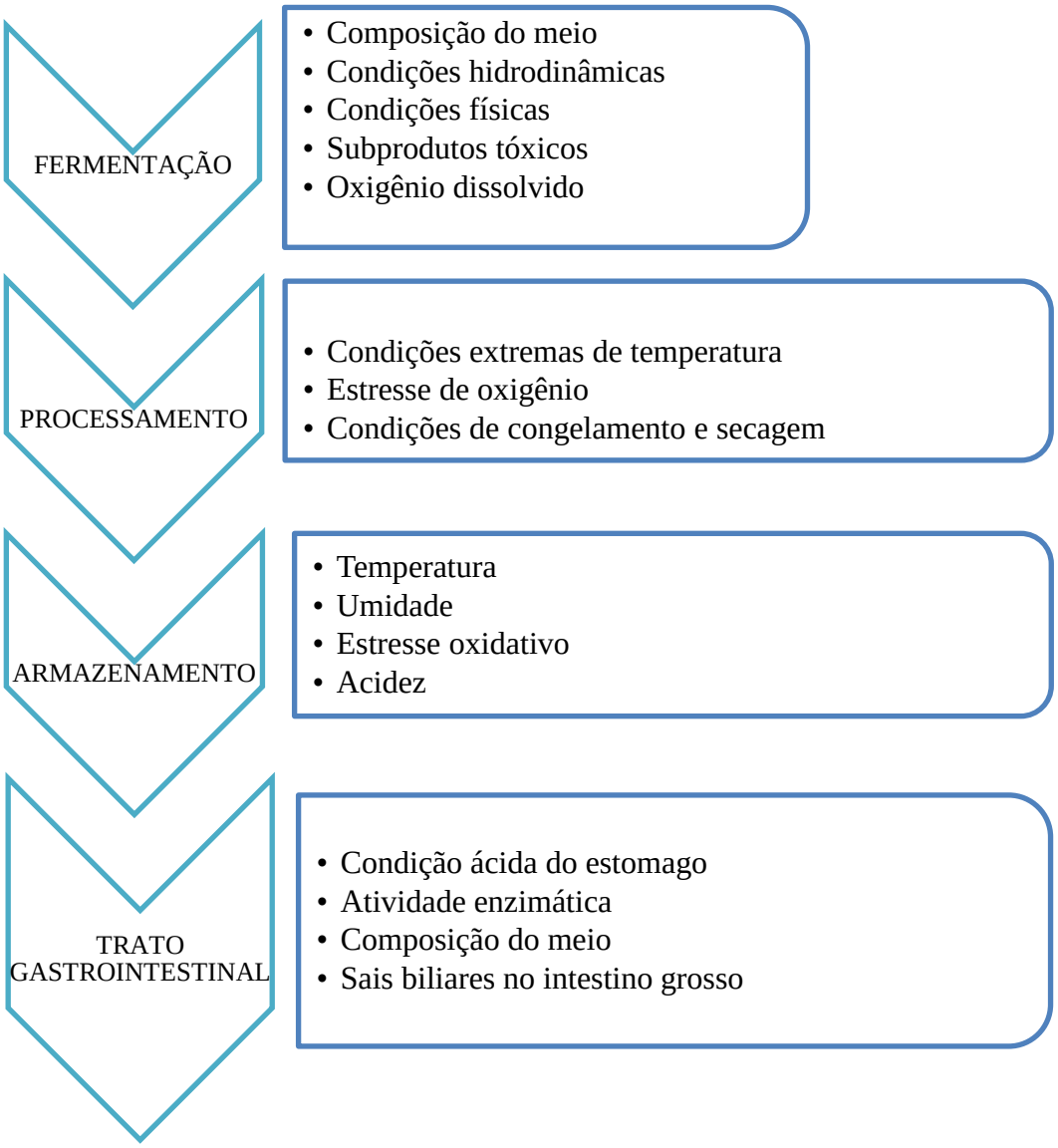
1-Tanque misturador; 2- sistema de aquecimento para esterilização do meio; 3- tanque fermentador; 4- centrífuga; 5- concentrador; 6- peletizador; 7- liofilizador.

Fonte: Adaptado de Fester *et al*. (2019)

A veiculação de probióticos em alimentos ou em preparações é eficaz quando as bactérias benéficas são adicionadas em quantidades suficientes e as condições são estabelecidas de forma a manter sua viabilidade. Parâmetros diferentes afetam a capacidade de sobrevivência

de bactérias probióticas e, devem ser avaliados durante todas as etapas de produção e uso. Esses fatores estão resumidos na Figura 4 (MEYBODI; MORTAZAVIAN, 2017).

Figura 5 - Fatores de influência na estabilidade dos probióticos nas etapas de processamento e uso

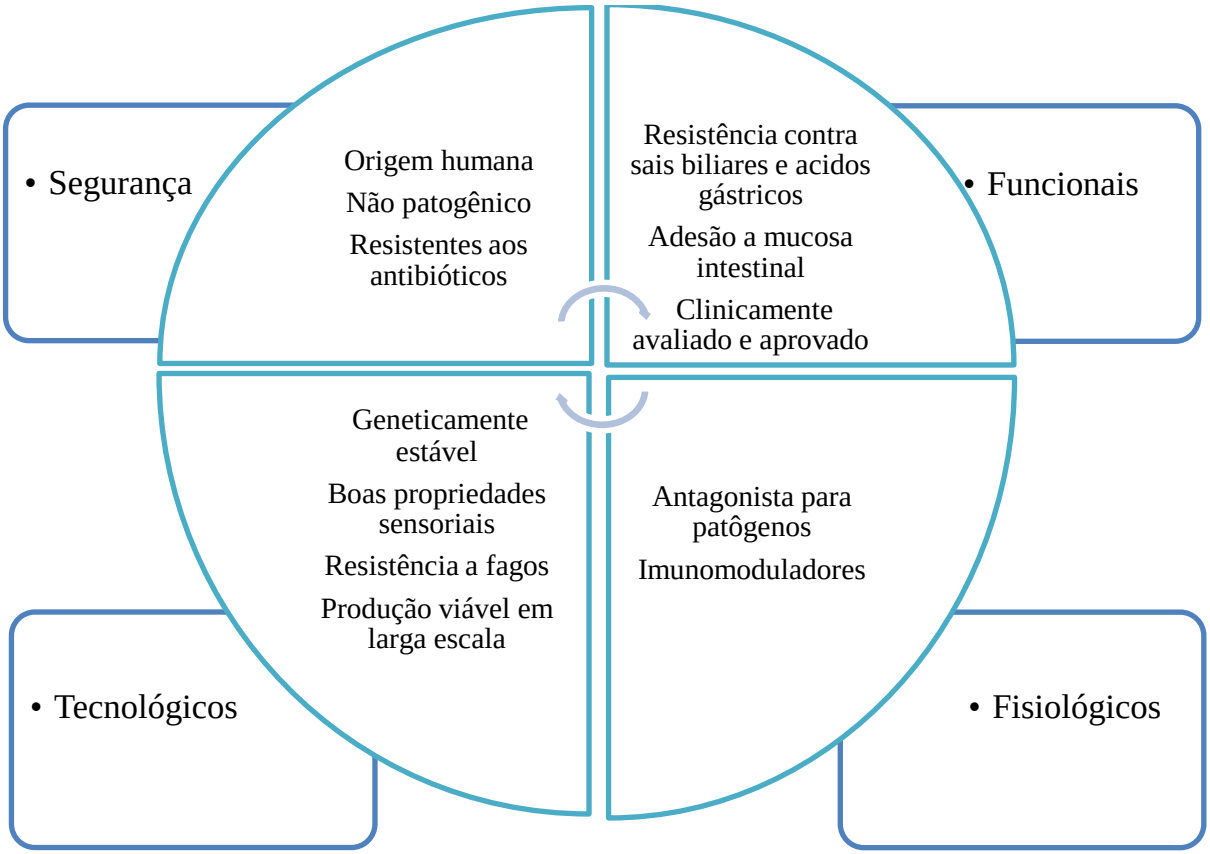


Fonte: SOCCOL *et al.*, 2010

Nos últimos anos, um interesse crescente em estudar e usar microrganismos probióticos têm sido observados, não apenas para o tratamento de doenças gastrointestinais, mas também para a melhora da saúde humana geral, como já citado. Vários estudos têm destacado a atividade sistêmica de probióticos e seu papel benéfico na melhoria do diabetes *mellitus* e gerenciamento de doenças alérgicas. No entanto, é muito difícil identificar qual formulação de probióticos é a melhor para promover a saúde humana, principalmente por causa da falta de conhecimento das características probióticas específicas (TOSCANO *et al.*, 2017). Além disso, o desempenho

tecnológico dos probióticos deve ser testado e adequado para aplicações em grande escala. (ANANDHARA; RANI; SWAIN; 2018). Os critérios de seleção para cepas probióticas potenciais são ilustrados na Figura 5.

Figura 6 - Critérios de seleção de cepa probiótica



Fonte: Adaptado de Anandhara, Rani e Swain (2018)

A primeira característica de um microrganismo essencial para ser utilizado como probiótico é que não seja patogênico, nem apresente toxicidade. No entanto, é crucial para sua administração oral, que seja capaz de resistir aos sucos gástricos e a exposição aos sais biliares. (ABATENH *et al*., 2018). Os microrganismos, na primeira etapa, precisam cruzar o ambiente ácido do estômago. Vários microrganismos probióticos têm sido selecionados por sua maior resiliência contra essas condições de acidez e muitas vezes recorre-se a metodologias para o encapsulamento de cepas probióticas visando sua proteção. Um segundo fator estressor é a presença de sais da bile que induzem as propriedades que comprometem as membranas dos microrganismos, devido à sua natureza anfifílica. Uma característica funcional específica dos

microrganismos é sua capacidade de lidar com o estresse causado pelos sais biliares por meio da hidrolase dos sais biliares (VANDENPLAS; HUYS; DAUBEC, 2015).

Considerando a alta taxa de crescimento do mercado de probióticos é fundamental a regulamentação nacional e internacional para avaliar a eficácia e segurança de bactérias probióticas. Considerando o risco de produtos probióticos ineficazes e com alegações falsas, é necessário que esses produtos sejam padronizados e executados requisitos essenciais antes de serem comercializados (MEYBODI; MORTAZAVIAN, 2017).

No Brasil, a Resolução de Diretora Colegiada (RDC) n° 241 (BRASIL, 2018a), dispõem, entre outras determinações sobre as exigências relativas à identidade, a segurança e aos benefícios que os probióticos destinados ao consumo humano devem apresentar. Considerando ainda o uso de probióticos como suplemento alimentar, foram estabelecidos pela RDC n° 243 (BRASIL, 2018b) requisitos de rotulagem, embalagens e a indicação para atendimento de quantidades mínimas e máximas indicados em Instrução Normativa n° 76 de 5 de novembro de 2020 (BRASIL, 2020).

Além disto, o registro de um suplemento alimentar contendo probióticos requer a comprovação da sua segurança quanto aos benefícios à saúde, ou seja, sua eficácia. A demonstração da sobrevivência da cepa às condições do trato digestório humano é também um requisito para comprovação do benefício do microrganismo, conforme artigo 14 da RDC nº 241/2018 (BRASIL, 2018a), estando diretamente relacionado à eficácia do probiótico (ANVISA, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo, numa primeira etapa, foi desenvolver e avaliar a estabilidade de duas formulações com probióticos para uso como suplemento alimentar. Na sequência, ensaio clínico controlado, randomizado e duplo-cego avaliou a eficácia e segurança dos suplementos desenvolvidos em adultos saudáveis com constipação funcional.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver, produzir e avaliar a qualidade dos suplementos alimentares com cepas probióticas específicas;
- Determinar a vida de prateleira (*shelf life*) dos suplementos alimentícios desenvolvidos através dos ensaios de estabilidade acelerada e de longa duração;
- Avaliar a eficácia e segurança dos suplementos alimentares por meio de ensaio clínico do tipo II, controlado, randomizado e duplo-cego, no aumento da frequência de evacuações semanais e melhora na qualidade das fezes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Componentes das formulações probióticas

As cepas de probióticos foram adquiridas pela empresa Roberg Alimentos e Medicamentos da Natureza Ltda (Votorantim/SP, Brasil) na forma de pó liofilizado e gentilmente cedidas. A tabela 3 apresenta as cepas e suas especificações. A Tabela 4 encontram-se os demais componentes utilizados na formulação dos suplementos alimentares.

Tabela 3 - Cepas na forma de pó liofilizado empregadas no preparo das formulações probióticas

Empresa	Cepa	Especificações
Probiotical (Novara, Itália)	*Bifidobacterium bifidum* BB01 ID 1722	lote FL561-17 data de fabricação 02/10/2017; UFC/g-100. 10^9 = 100 bilhões UFC
	Bifidobacterium animalis subsp lactis BS01 ID 1195	lote: FL532-17 data de fabricação: 15/09/17; UFC/g-100. 10^9 = 100 bilhões UFC/g.
	Bifidobacterium longum BL03 ID 1152	lote: FL 203-18; data de fabricação:04/04/18; UFC/g-100. 10^9 = 100 bilhões UFC/g.
	Lactobacillus paracasei LPC00 ID 1076	lote: LPC00 ID 1076; data de fabricação 26/11/16; UFC/g-100. 10^9 = 100 bilhões UFC/g
	Lactobacillus acidophilus LA02 ID 1688	lote: FL 207-18; data de fabricação 05/04/18; UFC/g-100. 10^9 = 100 bilhões UFC/g
	Lactobacillus rhamnosus LR04 ID 1132	Lote: FL 411-17; data de fabricação: 13/07/17; UFC/g-100. 10^9 = 100 bilhões UFC/g.
	Lactobacillus casei FC03 ID 1872	Lote: FL 418-1; data de fabricação: 20/07/17 UFC/g-100. 10^9 = 100 bilhões UFC/g.
THT (Liége, Bélgica)	*Bifidobacterium animalis animalis* THT 010803- 100 Bn	Lote: 17/BAA111/01; data de fabricação: 20/04/2017; 100 bilhões UFC/g

UFC= unidades formadoras de colônias

Fonte: Elaboração própria

Tabela 4 - Componentes utilizados na formulação dos suplementos alimentares

Empresa	Componente	Lote
Ingredion (Mogi-Guaçu, Brasil)	Frutooligossacarídeo de cadeia curta. (Nome comercial Nutraflora)	7648106201.
Fagron do Brasil Farmacêutica (São Paulo, Brasil)	Carbonato de cálcio	31/01/18
Taizhou Hisound Pharmaceutical Co Ltd (Xianju, China)	Vitamina D3 40.000.000 UI/g 9 (Colecalciferol)	B-1-51-m160608
Buschle & Lepper/S.A. (Joinvile, Brasil)	Hidróxido de magnésio	07167
Northeast Pharmaceutical Group Co., Ltd. (Shenyang, China)	Vitamina C (Ácido ascórbico)	DY0261621540
Huazhong Pharmaceutical Co., Ltd (Xiangyang, China)	Vitamina B1 (Cloridrato de tiamina)	Y01201605172
Jiangxi Dexing Parchn Sodium Iso Vitamin C Co., Ltd (Jiangxi, China)	Vitamina B2 (Riboflavina)	1703179
Daxia Doce Aroma Industria e Comercio (Guarulhos, Brasil)	Aroma natural de baunilha em pó	61402

Fonte: Elaboração própria

Foram desenvolvidas duas formulações do suplemento alimentar com diferentes cepas e concentrações de *Lactobacillus e Bifidobacterium*, sendo uma com 3 bilhões de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por unidade de produto (sachê) descrita na Tabela 5 e a outra com 8 bilhões de UFC por unidade de produto (sachê), apresentadas na Tabela 6.

Na Tabela 7 estão descritos os componentes da formulação utilizada como comparador, o qual tem uma fibra alimentar prebiótica que é um tratamento para a constipação funcional, assim, todos os voluntários tiveram um tipo de tratamento o que corrobora com a ética clínica. A expressão comparador foi empregada para indicar que o produto utilizado como padrão de comparação continha, adicionalmente substância utilizada como um tratamento padrão (KARLBERG; SPEERS, 2010), no caso, o prebiótico frutooligossacarídeo.

Tabela 5 - Formulação do suplemento alimentar com 3 bilhões de UFC por unidade de produto/sachê

Componente	**Quantidade**
Lactobacillus acidophilus LA 02 ID 1688	1 bilhão UFC
Bifidobacterium bifidum BB 01 ID 1722	1 bilhão UFC
Lactobacillus rhamnosus LR 04 ID 1132	1 bilhão UFC
Vitamina C (Ácido ascórbico)	45 mg
Vitamina B1 (Tiamina)	1,1 mg
Vitamina B2 (Riboflavina)	1,1 mg
Vitamina D-3 40.000.000 UI/g (Colecalciferol)	34 µg
Hidróxido de magnésio	0,3 g
Carbonato de cálcio	0,5 g
Aroma natural de baunilha	0,03 g
Fos (Frutooligossacarídeos)	qsp 3 g

Qsp= quantidade suficiente para; UFC= unidades formadoras de colônias

Fonte: Elaboração própria

Tabela 6 - Formulação do suplemento alimentar com 8 bilhões de UFC por unidade de produto /sachê

Componente	**Quantidade**
Lactobacillus acidophilus LA 02 ID 1688	1 bilhão UFC
Bifidobacterium bifidum BB 01 ID 1722	1 bilhão UFC
Lactobacillus rhamnosus LR 04 ID 1132	1 bilhão UFC
Lactobacillus paracasei LPC 00 ID 1076	1 bilhão UFC
Bifidobacterium longum BL 03 ID 1152	1 bilhão UFC
Bifidobacterium lactis BS 01 ID 1195	1 bilhão UFC
Lactobacillus casei LC 03 ID 1872	1 bilhão UFC
Bifidobacterium animalis THT 010803	1 bilhão UFC
Vitamina C (Ácido ascórbico)	45 mg
Vitamina B1 (Tiamina)	1,1 mg
Vitamina B2(Riboflavina)	1,1 mg
Vitamina D-3 40.000.000 UI/GR (Colecalciferol)	34 µg
Hidróxido de magnésio	0,3 g
Carbonato de cálcio	0,5 g
Aroma natural de baunilha	0,03 g
Fos (Frutooligossacarídeos)	qsp 3 g

Qsp= quantidade suficiente para; UFC=unidades formadoras de colônias.

Fonte: Elaboração própria

Tabela 7 - Formulação do suplemento alimentar utilizada como comparador controle (sem probióticos) por unidade de produto/sachê

Componente	**Quantidade**
Vitamina C (Ácido ascórbico)	45 mg
Vitamina B1 (Tiamina)	1,1 mg
Vitamina B2 (Riboflavina)	1,1 mg
Vitamina D-3 40.000.000 UI/g (Colecalciferol)	34 µg
Hidróxido de magnésio	0,3 g
Carbonato de cálcio	0,5 g
Aroma natural de baunilha	0,03 g
Fos (Frutooligossacarídeos)	qsp 3 g

Qsp= quantidade suficiente para

Fonte: Elaboração própria

Os suplementos alimentares foram embalados em sachês adquiridos da empresa Pontoforte Indústria e Comércio de Embalagens Plásticas Ltda (Barueri, Brasil), lote 9649. Os sachês eram compostos por camadas, sendo: politereftalato de etileno (PET), adesivo/tinta, tinta, alumínio, adesivo, polietileno de baixa densidade (PEBD). As embalagens laminadas apresentaram as seguintes especificações: barreira de oxigênio de 110 cm^3 /m^2/dia; barreira para vapor d`água de 40 g/m^2/dia; estrutura com Coeficiente de Fricção (COF) adequado para produção em equipamento de alta velocidade sendo do lado frente de 0,40 / 0,50 e do lado verso 0,25 / 0,35; e largura de 300 mm.

4.1.2 Soluções e reagentes

Todos as substâncias utilizadas como reagentes ou no preparo de soluções foram de grau PA (Pró-Análise). A água empregada nas preparações foi purificada em ultra purificador com resistividade final de 18,2 $M\Omega.cm^{-1}$ e condutividade de 0,05 $\mu S.cm^{-1}$.

4.1.3 Equipamentos industriais e analíticos

A produção, embalagem e rotulagem dos suplementos alimentares foram realizadas na Empresa Roberg Alimentos e Medicamentos da Natureza Ltda, a qual possui licença de

funcionamento para fabricação de alimentos e suplementos alimentares. Para estas etapas foram utilizados os equipamentos abaixo listados:

- máquina de envasar sachês (Maquinox Indústria de Máquinas Automáticas, Curitiba, Brasil);

- balança de pesagem com capacidade de 0 a 50 kg (modelo 2098, Toledo do Brasil, São Bernardo do Campo, Brasil);

- balança analítica com capacidade de 0,025 a 200 g (modelo BG 200, Gehaka, São Paulo, Brasil);

- balança analítica com infravermelho com controle de temperatura entre 50 a 210ºC /PID micro processado (modelo IV2500, Gehaka, São Paulo, Brasil);

- misturador em V em aço inox com capacidade máxima de 400 kg (modelo B77, SEW-Eurodrive do Brasil, Indaiatuba, Brasil).

Os demais ensaios (análise de pH, contagem de células viáveis, resistência ao suco gástrico e sais biliares) foram realizados no Laboratório de Filmes e Bacteriófagos da Uniso (Phagelab) e no Laboratório de Pesquisas Toxicológicas (Lapetox) da Uniso utilizando os seguintes equipamentos:

- cabine de segurança biológica de classe II tipo B2 (modelo 4SP-SBIIB2-1266/4, SP-Labor, Presidente Prudente, Brasil);

- autoclave vertical (modelo Autoclave Digital CS 50L, Prismatec, Manaus, Brasil);

- estufa de incubação microbiológica (modelo 502, Fanem, São Paulo, Brasil);

- ultrapurificador de água Master System All (modelo MS2000, Gehaka, São Paulo/SP, Brasil);

- balança analítica (modelo SHI-AUY-220, Tecnal, Kioto, Japão);

- peagômetro digital de bancada (modelo pH 300, Analyzer-Intrumentação Eletrônica São Paulo, Brasil);

- agitador magnético com aquecimento (modelo TE 0181, Tecnal, Piracicaba/SP, Brasil);

- centrifuga de bancada refrigerada (modelo Sorvall ST 16R, Thermo Scientific, Waltham/ Massachusetts, EUA);

- contador de colônias manual (modelo Ion CC- 90, Ionlab, Araucária/PR, Brasil).

4.2 Métodos

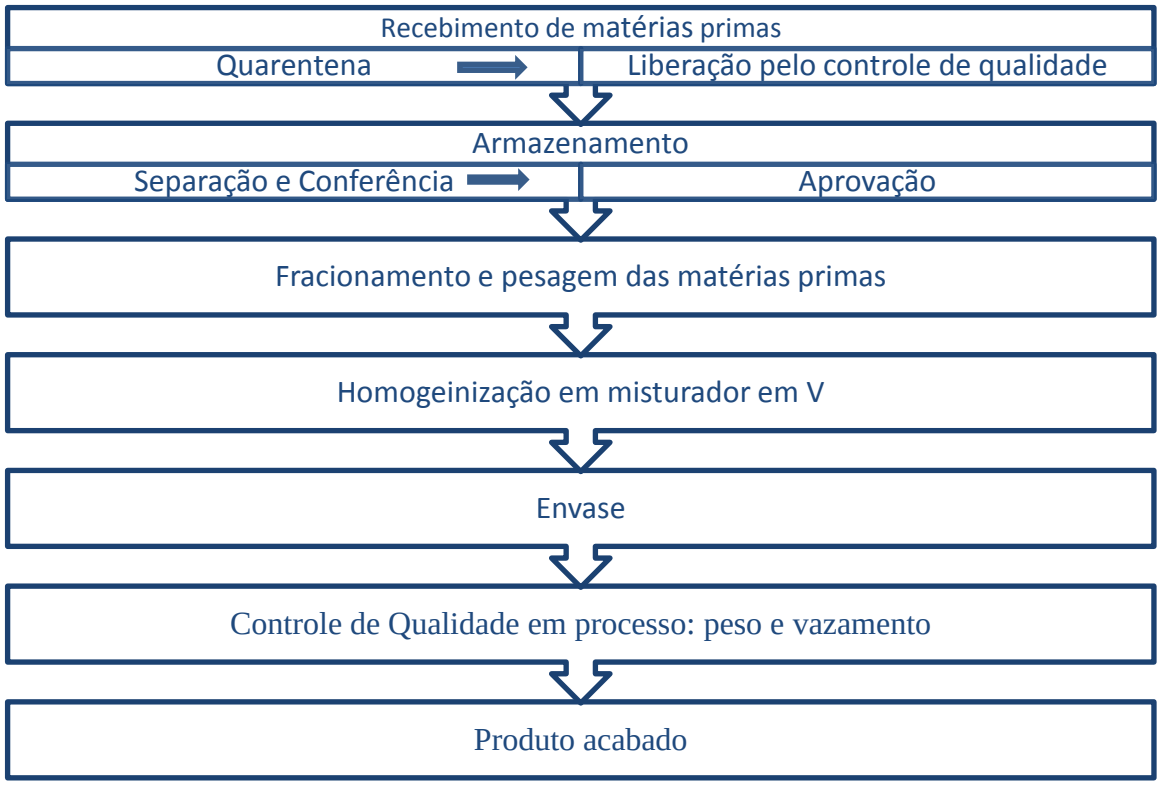
4.2.1 Preparo dos suplementos alimentares com probióticos

As formulações foram desenvolvidas seguindo as legislações sanitárias vigentes (BRASIL, 2005b; BRASIL, 2018a; CODEX ALIMENTARIUS, 2015).

As cepas de probióticos foram selecionadas através de estudos que indicaram a eficácia e segurança das mesmas (BAŞTÜRK *et al*., 2017; GUERRA *et al*., 2011; PIANO *et al*., 2010; PIANO *et al*., 2012; RIEZZO *et al*., 2012; XINIAS *et al*., 2018). As formulações foram feitas com concentrações de probióticos de 3 x 10^9 UFC /sachê e de 8 x 10^9 UFC/sachê (Tabelas 5 e 6).

A fabricação dos suplementos alimentares seguiu as etapas indicadas, de modo simplificado, na Figura 7.

Figura 7 - Diagrama esquemático simplificado da produção dos suplementos alimentares



Fonte: Elaboração própria

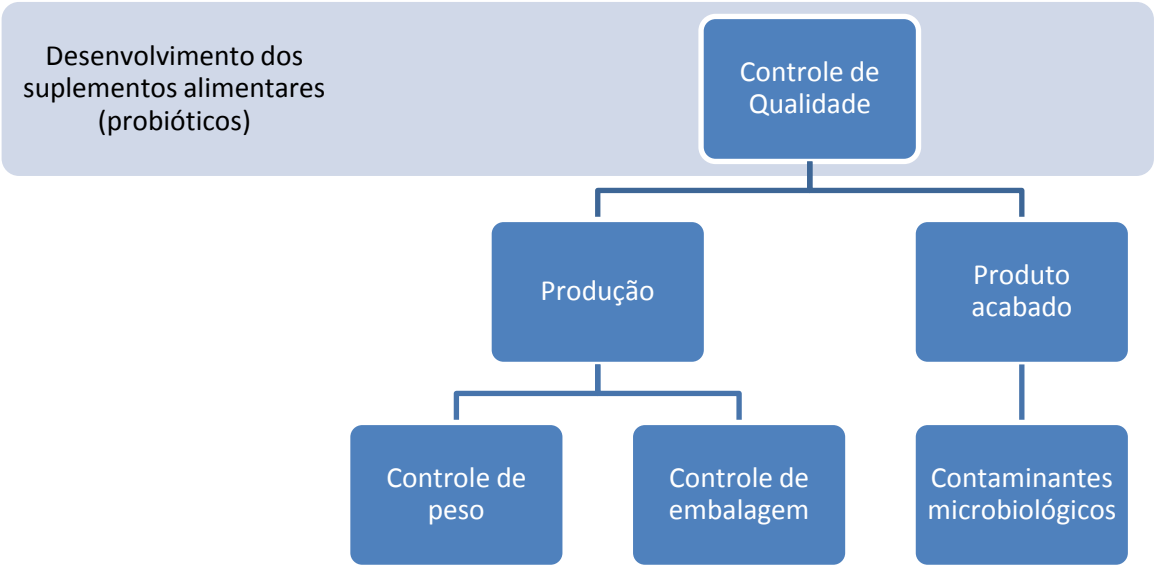
Na fase de recebimento das matérias-primas, foi verificado os dados da nota fiscal com o pedido de compras, condição da transportadora e das embalagens recebidas. Após esta checagem, as substâncias foram para a quarentena a fim de esperar a comprovação da qualidade e liberação para a produção.

Os responsáveis do setor de Controle de Qualidade avaliaram as características sensoriais de todas as matérias-primas utilizando como referência os laudos dos fabricantes. Após serem liberadas, as mesmas foram devidamente alocadas para o estoque com etiqueta de aprovação. Na sequência, ocorreu a separação das matérias-primas em função da ordem de produção, a qual foi emitida para produção de 5000 sachês para cada formulação. A seguir, as substâncias foram enviadas ao setor de fracionamento que fez a pesagem de cada componente. As substâncias pesadas foram, então enviadas para setor de mistura, a qual foi feita em misturador em V. As matérias-primas foram homogeneizadas por 20 minutos, excetuando-se as cepas probióticas. As cepas foram acrescidas apenas nos últimos 5 minutos da mistura. Após a finalização da mistura, ocorreu o envase em barricas, as quais foram devidamente identificadas com data de fabricação, validade, quantidade e nome do produto conforme ordem de produção. Estas barricas contendo os suplementos alimentares foram enviadas para o envase em sachês laminados. O acondicionamento foi realizado em máquina de sachês automática, a qual operou a uma umidade de, no máximo 25% ± 2°C e temperatura de no máximo 25ºC ± 2°C. Os produtos acabados foram armazenados em temperatura ambiente (em torno de 25ºC, sendo aceitável uma variação no intervalo entre 15 e 30ºC, segundo a Farmacopeia Brasileira (2019). Para a pesquisa clínica os sachês foram embalados em sacos plásticos com 30 sachês cada um.

4.2.2 Controle de qualidade dos suplementos alimentares

Os suplementos alimentares desenvolvidos passaram por controle de qualidade fisico do produto em processo e controle microbiológico do produto acabado, como ilustrado na Figura 8.

Figura 7 - Esquema simplificado do controle de qualidade dos suplementos alimentares



Fonte: Elaboração própria

Para o controle físico de qualidade do processo de produção foram avaliados peso e vazamento do sachê. A cada 15 minutos foram pesados 20 sachês a fim de garantir o peso médio entre 2,85g a 3,15g. Calculou-se a média e o desvio padrão. Para garantia de envase, a cada 15 minutos, 20 amostras de cada lote foram imersas em água a fim de detectar qualquer vazamento, por ocorrência de rasgos e micro furos ou problemas de selagem inadequada. Como o processo de produção e envase durou cerca de 60 minutos, 80 sachês (40 sachês para cada ensaio foram separados para as análises de pesagem e embalagem).

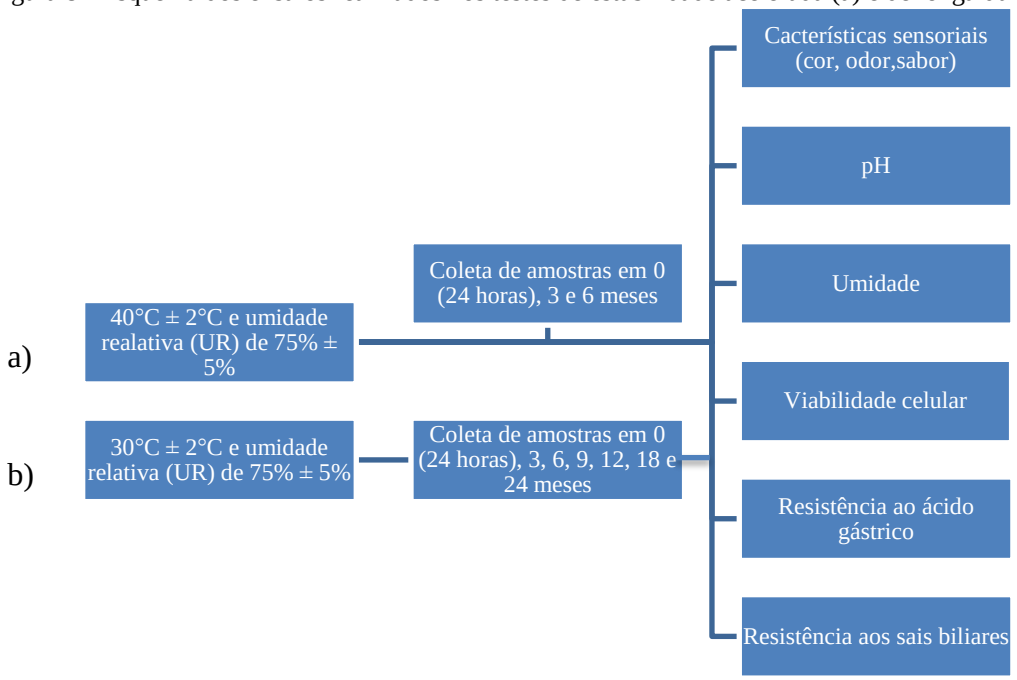
Para o controle de qualidade microbiológico foram feitas analises microbiológicas para coliformes fecais, *Bacillus cereus*, *Salmonella ssp.* e estafilococos coagulase positiva a seguir apresentadas (Item 4.2.5), atendendo as exigências apontadas no Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos, em particular para alimentos suplementos vitamínicos e minerais e similares, em forma de pó, cápsulas, drágeas e similares (BRASIL, 2001).

4.2.3 Ensaios de estabilidade acelerada e de longa duração

Para os estudos de estabilidade acelerada as amostras, em suas embalagens originais, foram expostas à temperatura de 40ºC ± 2ºC e umidade relativa (UR) de 75% ± 5% e realizadas diversas analises nos tempos 0 (24 horas após o preparo), 3 e 6 meses (Figura 9). Para os estudos

de estabilidade de longa duração as amostras foram armazenadas em temperatura de 30ºC±2ºC e 75% ± 5%UR, em suas embalagens originais, e realizados vários ensaios nos tempos 0 (zero) que significa até 24 horas após o preparo, 3, 6, 9, 12, 18, e 24 meses (Figura 9) (BRASIL, 2018b: ANVISA, 2018).

Figura 8 - Esquema dos ensaios realizados nos testes de estabilidade acelerada (a) e de longa duração (b)



Fonte: Elaboração própria

4.2.3.1 Medida de pH

As análises de pH foram realizadas conforme o Zenebon, Pascuet e Tiglea (2008). As amostras foram preparadas por dissolução em água recém purificada, conforme a indicação de uso do suplemento, sendo 1 sachê em 150 ml de água. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O limite aceitável foi entre pH 5,5 a 7.

4.2.3.2 Umidade

As análises de umidade foram realizadas em triplicata utilizando-se uma balança analisadora de umidade por infravermelho. Foram empregadas cerca de 4g de amostra, a qual foi espalhada por todo o prato da balança de modo uniforme. Utilizou-a temperatura de secagem de 120ºC e tempo de secagem de 15 minutos. O limite aceitável foi abaixo de 4,9%.

4.2.3.3 Avaliação da cor e odor /sabor

A avaliação foi realizada por comparação com amostra armazenada em refrigerador (8ºC). As amostras foram classificadas como igual ao controle ou diferente do controle. As especificações foram: cor opaco branco, sabor baunilha adocicado e odor levemente ácido e suavemente abaunilhado, após a dissolução das amostras em 150 ml de água potável.

4.2.3.4 Contagem dos probióticos viáveis

As contagens dos probióticos viáveis (*Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus paracasei, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium lactis, Lactobacillus casei, Bifidobacterium animallis*) foram realizadas segundo Tharmaraj e Shah (2003).

Para a reativação dos microrganismos (*Lactobacillus* e *Bifidobaterium*) presentes nos sachês, um grama de produto foi adicionado em uma preparação com 100 mL de leite desnatado, 1% (1g) de extrato de levedura (Kasvi, São José dos Pinhais/PR Brasil) e 1% (1g) de glicose (Labsynth, Diadema/SP, Brasil), previamente esterilizada a 121ºC por 30 minutos em autoclave. A reativação ocorreu durante 16 horas em temperatura ambiente (25°C ± 5 ºC).

As células foram então centrifugadas a uma velocidade de 4600 rpm a 6 °C por 12 minutos e lavados com solução salina (NaCl 0,9% m/v) por duas vezes, obtendo volume final de 50 ml em solução salina (NaCl 0,9% m/v) (amostra concentrada). Colocou-se 9 mL de solução salina e 1 mL da amostra concentrada e, a partir desta, foram feitas diluições sucessivas. O número de células viáveis de espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobaterium* foi estabelecido pelo método de inoculação em profundidade (Método Pour Plate) em ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Oxoid do Brasil, São Paulo/SP, Brasil) a pH 5.

Foi feita inoculação de 1 mL de cada amostra diluída em placa de Petri de 90 x 15mm com adição de 15 mL do meio ágar MRS fundido preparado de acordo com as instruções do fabricante. Homogeneizou-se suavemente em movimentos em forma de 8. As amostras (em duplicatas) foram então incubadas por 72 h a 43 ºC em modo anaeróbico (THARMARAJ; SHAH, 2003). Para determinação do número de UFC, foram contadas as colônias em todas as placas contendo entre 15 a 300 colônias. Para o cálculo final foram considerados os fatores de diluição.

4.2.3.5 Resistência ao ácido gástrico

A tolerância ao ácido gástrico foi estabelecida em soluções com pH 2,5 e pH 3,5. As soluções ácidas foram preparadas pesando-se 2,0 g de cloreto de sódio; 3,0 g de pepsina (Vetec Química Fina, Duque de Caxias/RJ, Brasil) e diluindo-se em 1000 mL de água. O pH foi ajustado com soluções de HCl 1 M e NaOH 1 M. As culturas das amostras foram ativadas como descrito no item anterior (item 4.2.3.3). Na sequência, 1mL de cada amostra concentrada foi transferida para 9 mL de cada solução de pH. A suspensão foi, então, agitada em agitador magnético por 120 min a 150 rpm em temperatura de 37º C (MISHRA; PRASAD, 2005). Foram retiradas amostras de 1 mL, as quais foram diluídas (10^{-2}), acrescentando-se 9 mL de solução salina esterilizada, e colocadas em placas de Petri de 90 x 15 mm. Sobre elas colocou-se 15 mL de ágar MRS pH 5,2 preparado de acordo com as instruções do fabricante.

Após homogeneização, a placas foram incubadas a 43ºC durante 72 horas em condição anaeróbica. Após este período as colônias foram contadas com auxílio de contador de colônias manual Ion Cc 90. Para o cálculo final foram considerados os fatores de diluição. Para estimar a resistência relativa de cada cepa às condições do trato gastrointestinal foi calculado um índice de sobrevivência, com base na população inicial (tempo 0) e final (após 120 min em sob simulação das condições gástricas). O experimento foi realizado em quadruplicata.

4.2.3.6 Resistência aos sais biliares

A determinação da resistência das células probióticas aos sais biliares foi realizada segundo Mishra e Prasad (2005) com alterações. As células ativadas (1mL da amostra denominada concentrada, descrita no item 4.2.3.3) foram adicionadas em 9 mL de uma solução aquosa de sais biliares 0,3% (Oxoid, São Paulo, Brasil). As amostras foram agitadas a 150 rpm a 37ºC em agitador magnético. Após 6 horas de agitação foram retiradas amostras de 1 mL, as quais foram diluídas (10^{-2}), acrescentando-se 9 mL de solução salina esterilizada, e colocadas em placas de Petri de 90 x 15 mm. Sobre elas colocou-se 15 mL de ágar MRS pH 5,2 preparado de acordo com as instruções do fabricante.

Após homogeneização, a placas foram incubadas a 43ºC durante 72 horas em condição anaeróbica. Após este período as colônias foram contadas com auxílio de contador de colônias manual Ion Cc 90. Para o cálculo final foram considerados os fatores de diluição. Para estimar a resistência relativa de cada cepa às condições do trato gastrointestinal foi calculado um índice

de sobrevivência, com base na população inicial (tempo 0) e final (após 360min sob simulação das condições entéricas). O experimento foi realizado em quadruplicata.

4.2.4 Prazo de validade

Os valores relativos as quantidades de UFC/sachê viáveis obtidos no estudo de estabilidade acelerada e em tempo real foram usados para se determinar a ordem da reação de degradação dos probióticos em estudo (BRASIL, 2005a). As análises foram realizadas a cada 3 meses (0, 3 e 6 meses) nas condições de temperatura 30ºC ± 2ºC e umidade relativa (UR) de 75% ± 5% e a 40°C± 2ºC e umidade relativa (UR) de 75% ± 5%.

Para se avaliar o efeito da temperatura na degradação do produto utilizou-se a equação de Arrhenius (Equação1). Descreveu-se a perda exponencial de viabilidade bacteriana ao longo do tempo pela equação de Arrhenius que expressa a relação entre a temperatura, a energia de ativação e a constante de velocidade (RUSSELL, 1994).

$$k = Ae^{-Ea/RT} \qquad \text{(Equação 1)}$$

Onde: k= constante de velocidade da reação; A= Fator de frequência (medida da probabilidade de uma colisão eficaz); Ea= energia de ativação ($J.mol^{-1}$); R = constante dos gases (1,987 $cal.mol^{-1}. K^{-1}$); T= temperatura (Kelvin).

Para a determinação da ordem da cinética das reações de degradação foram feitos gráficos da concentração *versus* tempo, do ln da concentração *versus* tempo e do inverso da concentração *versus* tempo. Os valores obtidos das inclinações das retas (a) dos gráficos do número de probióticos viáveis versus tempo (em meses) foram utilizados para determinar a energia de ativação da reação, sendo o gráfico escolhido aquele que apresentou o valor maior de R^2.

Além disto, pode-se utilizar o valor de Q_{10} que é obtido pelo quociente entre as velocidades de reação a uma temperatura 10ºC mais baixa ou 10ºC mais alta utilizando-se a Equação 2 (MARTINS, 2009). O valor de Q_{10} da reação de deterioração é usado para estimar a vida útil do produto nos testes de estabilidade acelerada para outras temperaturas de armazenamento (LABUZA; SCHMIDL, 1985).

$$Q_{10}=\frac{k\ (t)}{k(t-10)}=\frac{VP\ (t-10)}{VP(t)}$$ (Equação 2)

Onde: t = a temperatura em graus Celsius; VP =a vida-de-prateleira; k = velocidade de reação

Para a definição da vida útil do produto determinou-se o Q10 (Equação 3) utilizado os dados do teste de estabilidade acelerado.

$$Q_{10}=10^{\frac{Ea}{0,46\ x\ T^2}}$$ (Equação 3)

Onde: T = temperatura em graus Kelvin; Ea = energia de ativação

4.2.5 Análise microbiológica

Os padrões de qualidade microbiológica para alimentos, em vigor na ocasião da produção dos suplementos (BRASIL, 2001), indicam as especificações abaixo apontadas (Tabela 8). Neste sentido, foram realizadas análises microbiológicas para coliformes fecais, *Bacillus cereus, Salmonella ssp* e estafilococos coagulase positiva.

Tabela 8 - Padrões microbiológicos para suplementos alimentares conforme Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos da RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

Testes	**Parâmetros aceitáveis**
Pesquisa de coliformes a 45ºC	≤5UFC/g
Bacillus cereus/g	Ausente
Estafilococos coagulase positiva/g	Ausente
Samonella ssp/25g	Ausente em 25g

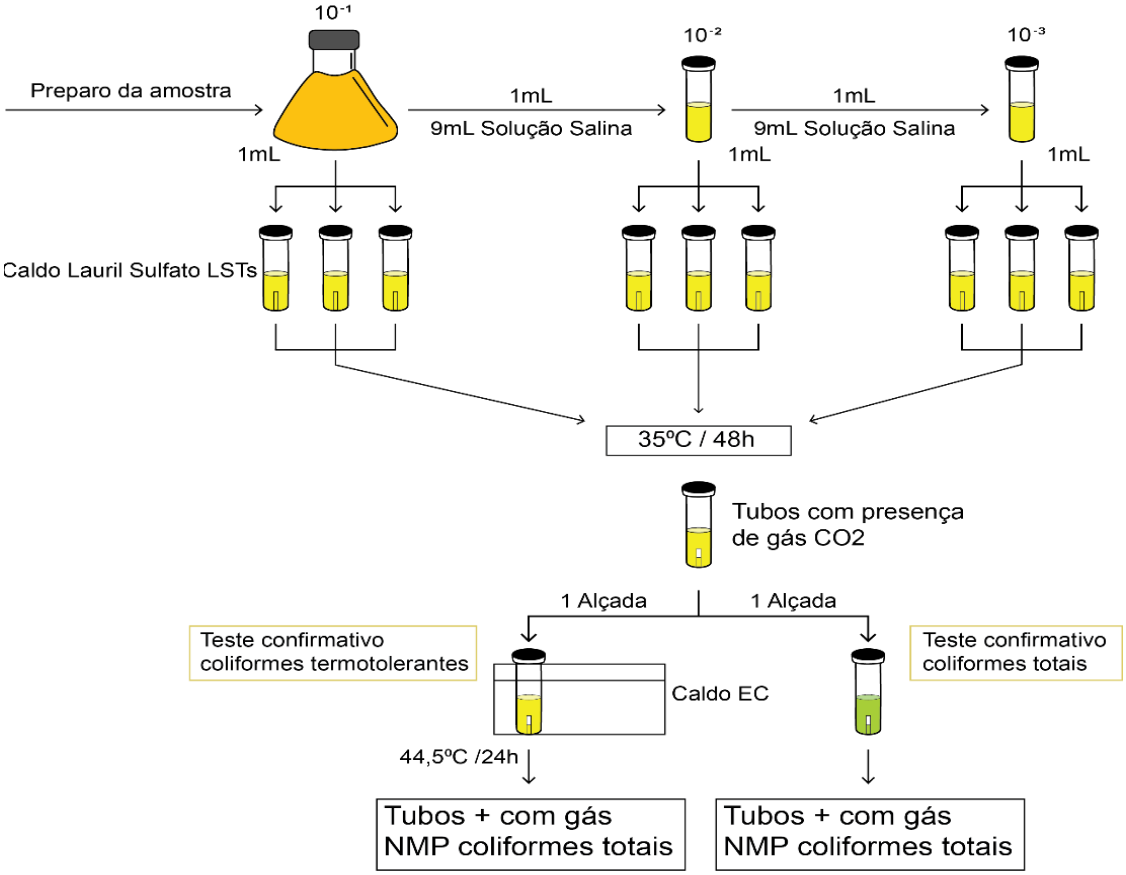
Fonte: Adaptado de Brasil (2001)

4.2.5.1 Análise microbiológica de coliformes totais

A análise de coliformes fecais foi feita pela técnica de tubos múltiplos segundo especificações de Silva et al. (2017). Cerca de 25g de cada amostra foi pesada assepticamente e transferida para Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada 0,1% (m/v) estéril (Kasvi, São José dos Pinhas/ PR, Brasil). A suspensão foi homogeneizada por agitação manual por

aproximadamente 1 minuto, obtendo-se diluição inicial de (10^{-1}). Na sequência foram feitas mais duas diluições (10^{-2}; 10^{-3}). Um (1) mL de cada diluição (10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}) foi distribuído em 3 tubos de ensaios contendo 9 mL de Caldo Lauril Triptose (LST) (Kasvi, São José dos Pinhas/ PR, Brasil) preparado de acordo com as instruções do fabricante contendo tubos de Durhan invertidos. Após 48 horas a 35°C, foram transferidos com alças de platina (cerca de 10 µL), alíquotas dos tubos de ensaio que se apresentaram positivos (presença de gás), para tubos de ensaio contendo tubos de Durhan e caldo verde brilhante (coliformes totais), e para tubos contendo meio para *Escherichia coli* (E.C) (contagem de coliformes fecais). Os tubos contendo CLBVB foram incubados a 35ºC por 48 h, enquanto tubos de E.C. foram incubados por 48 h a 44,5ºC em banho-maria. A formação de gás nos tubos de CLBVB indicou a presença de coliformes totais, sendo o resultado expresso em NMP de coliformes totais por grama de alimentos. A Figura 10 apresenta um esquema do método utilizado.

Figura 9 - Esquema ilustrativo da técnica de tubos múltiplos utilizada para a determinação de coliformes a 45ºC



Fonte: Adaptado de https://slideplayer.com.br/slide/44164/

4.2.5.2 Análise microbiológica de *Bacillus cereus*

O número presuntivo de *B. cereus* foi determinado pelo método de contagem direta em placas de acordo com Silva et al. (2017). A amostra foi preparada utilizando 25g, a qual foi diluída em água peptonada 0,1% (m/v) estéril (Kasvi, São José dos Pinhas/ PR, Brasil) de modo a obter diluições de 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}. Foram realizados plaqueamentos pela técnica de espalhamento em superfície no meio ágar Manitol-Gema de Ovo-Polimixina (Kasvi, São José dos Pinhas/ PR, Brasil) empregando-se alça de Drigalsky. Espalhou-se cerca de 0,1mL de cada diluição em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35ºC por 48 horas. As colônias foram contadas com auxílio de um contador de colônias. O resultado foi expresso em número de colônias por grama.

4.2.5.3 Análise microbiológica de Estafilococos coagulase positiva

A análise microbiológica para Estafilococos coagulase positiva foi realizada pelo método de contagem direta em placas de acordo com Silva *et al.* (2017). A amostra foi preparada utilizando 25g, a qual foi diluída em água peptonada 0,1% (m/v) (Kasvi, São José dos Pinhas/ PR, Brasil) estéril de modo a obter diluições de 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}. Foram realizados plaqueamentos pela técnica de espalhamento em superfície no meio Manitol Salt Agar (Kasvi, São José dos Pinhas/ PR, Brasil) empregando-se alça de Drigalsky. Espalhou-se cerca de 0,1mL de cada diluição em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35ºC por 48 horas. As colônias foram contadas com auxílio de um contador de colônias. O resultado foi expresso em número de colônias por grama.

4.2.5.4 Analise microbiológica de *Salmonella spp*.

A investigação da presença de *Salmonella ssp* foi feita de acordo com Silva *et al.* (2017) pelo método de contagem direta em placas. A amostra foi preparada utilizando 25g, a qual foi diluída em água peptonada 0,1% (m/v) (Kasvi, São José dos Pinhas/ PR, Brasil) de modo a obter diluições de 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}. Foram realizados plaqueamentos pela técnica de espalhamento em superfície no meio ágar padrão para contagem de salmonela (Kasvi, São José dos Pinhas/ PR, Brasil) empregando-se alça de Drigalsky. Espalhou-se cerca de 0,1mL de cada diluição em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35ºC por 48 horas. As colônias foram contadas com auxílio de um contador de colônias. O resultado foi expresso em número de colônias por grama.

4.2.6 Ensaio clínico

O protocolo do estudo clínico foi registrado no site (https://clinicaltrials.gov/) sob o número: NCT04437147.

Todas as diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos foram seguidas segundo as determinações da Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 (BRASIL, 2012). Para designar os indivíduos da pesquisa o termo participante foi empregado, uma vez que segundo esta legislação “participante da pesquisa é o indivíduo que, de forma esclarecida e voluntária, ou sob o esclarecimento e autorização de seu(s) responsável(eis) legal(is), aceita ser pesquisado.”

Foi realizado um ensaio clínico do tipo II, controlado, randomizado e duplo-cego. Os participantes da pesquisa foram expostos aos suplementos alimentares contendo cepas de probióticos, por um período de seguimento de 30 dias consecutivos comparados com um grupo em uso apenas de prebiótico. Destinou-se a avaliar a eficácia de duas misturas probióticas diferentes desenvolvidas contendo:

Fórmula (1): *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum e Lactobacillus rhamnosus* (3 bilhões de UFC) mais prebiótico.

Fórmula (2) *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus paracasei, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium lactis, Lactobacillus casei, Bifidobacterium animallis* (8 bilhões de UFC) mais prebiótico.

Fórmula (3) considerado o grupo comparador na qual continha o prebiótico.

Para garantir a característica de experimento duplo-cego foram utilizadas embalagens idênticas em aparência, cheiro e sabor sem qualquer identificação que pudesse vir a denunciar o conteúdo da formulação. Os suplementos foram embalados por um profissional não envolvido no manejo dos pacientes.

4.2.6.1 População e critérios de elegibilidade

Foram selecionados indivíduos, na faixa etária entre 20 a 80 anos e de ambos os sexos, que se consultaram na Clínica de Gastroenterologia Dra. Karin Häckel selecionada neste estudo localizada no Município de Sorocaba, São Paulo, Brasil.

Como critérios de inclusão foram considerados aptas as pessoas que procuram a clínica de gastrologia com queixas de distúrbios para evacuação e fezes endurecidas os quais foram avaliados e diagnosticados como constipados intestinais funcionais segundo critério Roma IV (MISZPUTEN, 2019).

Foram excluídos os participantes com outra doença gastrointestinal, gestantes ou que estavam fazendo uso de antibióticos ou suplementos alimentares contendo probióticos ou prebióticos nos últimos 15 dias.

Os participantes foram esclarecidos quanto a possibilidade de ocorrer diarreia, alergia, náuseas e vômito devido à algum constituinte da formulação. Informou-se ainda que, havendo qualquer desconforto, o mesmo deveria procurar a Clínica de Gastroenterologia ou os pesquisadores envolvidos. Após as explicações, os participantes que manifestaram

concordância, leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

4.2.6.2 Exames clínicos para diagnóstico da constipação intestinal

Todos os indivíduos convidados a participar desta pesquisa, passaram por avaliação clínica com médica gastroenterologista, a qual fez os exames clínicos preliminares e os classificou como portadores de constipação intestinal segundo Roma IV.

A forma das fezes é um parâmetro importante no diagnóstico da constipação intestinal avaliada por meio da Escala de Fezes de Bristol (BSFS do inglês *Bristol Stool Form Scale)* (Figura 11).

A BSFS classifica as fezes em sete categorias, incluindo tipo 1, protuberâncias duras separadas, como nozes; tipo 2, em forma de salsicha, mas irregular; tipo 3, tipo linguiça, mas com rachaduras na superfície; tipo 4, como salsicha ou cobra, lisa e macia; tipo 5, bolhas suaves com bordas bem definidas; tipo 6, fezes fofas com bordas irregulares, fezes pastosas; tipo 7, aquoso, sem peças sólidas. Esses tipos são categorizados em trânsito lento (tipos 1 e 2), trânsito normal (tipos 3-5) e trânsito rápido (tipos 6 e 7). Os indivíduos que apresentam fezes do tipo 1 e 2, além de outros parâmetros foram considerados como constipados (LEWIS; HEATON, 1997). Os participantes foram esclarecidos quanto a classificação relativa ao formato das fezes e receberam um desenho com escala de Bristol modificada (APÊNDICE B).

Figura 10 - Escala de Bristol Modificada

Fonte: Adaptado de Lewis e Heaton, 1997.

4.2.6.3 Tamanho de amostra

O tamanho da amostra baseou-se na experiência relatada em outro ensaio clínico randomizado Piano *et al*. (2010). Neste estudo, o número médio de evacuações em 30 dias no grupo placebo o qual continha 3g de maltodextrina, foi 5,81 +/- 1,98 e no grupo de probiótico o qual continha 2,95g de maltodextrina e 50mg de *B.animalis subsp lactis* BS01 (5 x 10^9 UFC) foi 6,93 +/- 1,75. Considerando o nível de confiança bilateral à 95%, o poder de 80% e a razão entre grupos 1:1, utilizamos a ferramenta OpenEpi, opção diferença de médias, para calcular o tamanho da amostra em cada grupo. Assim, o tamanho da amostra foi estimado em 51 pacientes em cada grupo, já prevendo uma taxa de abandono de 15%.

4.2.6.4 Recrutamento, randomização e coleta das informações

Para a recrutamento e seleção dos participantes foi feita divulgação nas redes sociais da Universidade de Sorocaba e disponibilizados cartazes na Clínica de Gastroenterologia Dra. Karin Häckel.

Os participantes foram divididos em 3 grupos, sendo:

- Grupo 1 (Fórmula com 3 bilhões de UFC/ sachê) - 51 participantes.
- Grupo 2 (Fórmula com 8 bilhões de UFC/sachê) - 51 participantes.
- Grupo 3 (grupo comparador) - 51 participantes

Os participantes foram alocados entre os grupos de forma aleatória. A randomização foi realizada pelo Random Allocation Software (RANDOM ALLOCATION SOFTWARE 2.0 FREE, 2019) e os participantes foram estratificados igualmente em 3 grupos, em blocos de 9 indivíduos. Foi escolhido o método de randomização em bloco, a fim de buscar o equilíbrio no número de participantes em cada grupo (APÊNDICE D).

Os pacientes elegíveis foram alocados (1: 1: 1) para receberem tratamento, por 4 semanas, com o suplemento probiótico contendo 3×10^9 UFC por sachê ou 8×10^9 UFC por sachê ou grupo comparador.

Após confirmação da elegibilidade do participante, leitura e assinatura do TCLE, os indivíduos receberam um envelope opaco lacrado com o número sequencial de acordo com a participação no estudo. A pesquisadora médica selecionou os participantes e ofereceu as amostras de sachês de acordo com o número do lote correspondente à randomização. As amostras diferiram apenas pela numeração dos lotes de fabricação, garantindo o cegamento dos participantes e da pesquisadora envolvida na coleta de dados.

Desta forma, os participantes do estudo e, todos aqueles com acesso aos resultados estavam cegos. Contudo, seria permitido, desmascarar e revelar a intervenção alocada durante o ensaio se houvesse um evento adverso grave para que o médico pudesse investigar se o produto foi realmente a causa.

Cada participante recebeu 30 amostras de suplemento alimentar com probióticos no formato de sachês que deveriam ser tomados diluindo em 150 mL de água ou junto com algum alimento ao se levantar, durante 30 dias, sem interrupções. Todos os sachês continham na sua rotulagem indicações do fabricante, lote e data de validade.

Os participantes também receberam um questionário para realização da Pesquisa Clínica (APÊNDICE B) e a lista de assinaturas para retirada do “Kit” (probióticos) (APÊNDICE C). Os participantes foram instruídos a preencher o formulário de forma adequada caso tivessem alguma reação adversa, que tipo de fezes apresentaram e frequência diária de evacuações.

Os participantes poderiam se retirar do estudo a qualquer momento por sua própria solicitação ou poderiam ser retirados a qualquer momento a critério do investigador, por segurança. Também foram retirados do estudo em caso de interrupção do tratamento por qualquer motivo, seja por esquecimento ou por apresentar reação adversa. Para promover a retenção dos participantes e o acompanhamento completo da pesquisa, uma mensagem de texto ou ligação foi enviada após 15 dias para saber como estava o tratamento e, se havia descontinuação ou desvio do protocolo de intervenção. Foram feitas as seguintes perguntas: por que não deu continuidade ao tratamento? Você teve alguma reação adversa?

4.2.6.5 Desfechos medidos

Os desfechos primários do estudo foram mudanças na frequência dos movimentos intestinais e na qualidade das fezes. As informações foram anotadas em uma tabela que o paciente foi instruído a preencher no momento do recrutamento com informações sobre a frequência diária e o tipo de fezes (em uma escala de 1-7 da escala de Bristol, ou se não houve evacuação).

A métrica de análise foi a comparação entre zero e 30 dias, considerando que o número de evacuações efetivas acima de 4 vezes na semana é um valor efetivo para o tratamento e a qualidade das fezes de 3 a 5 por semana.

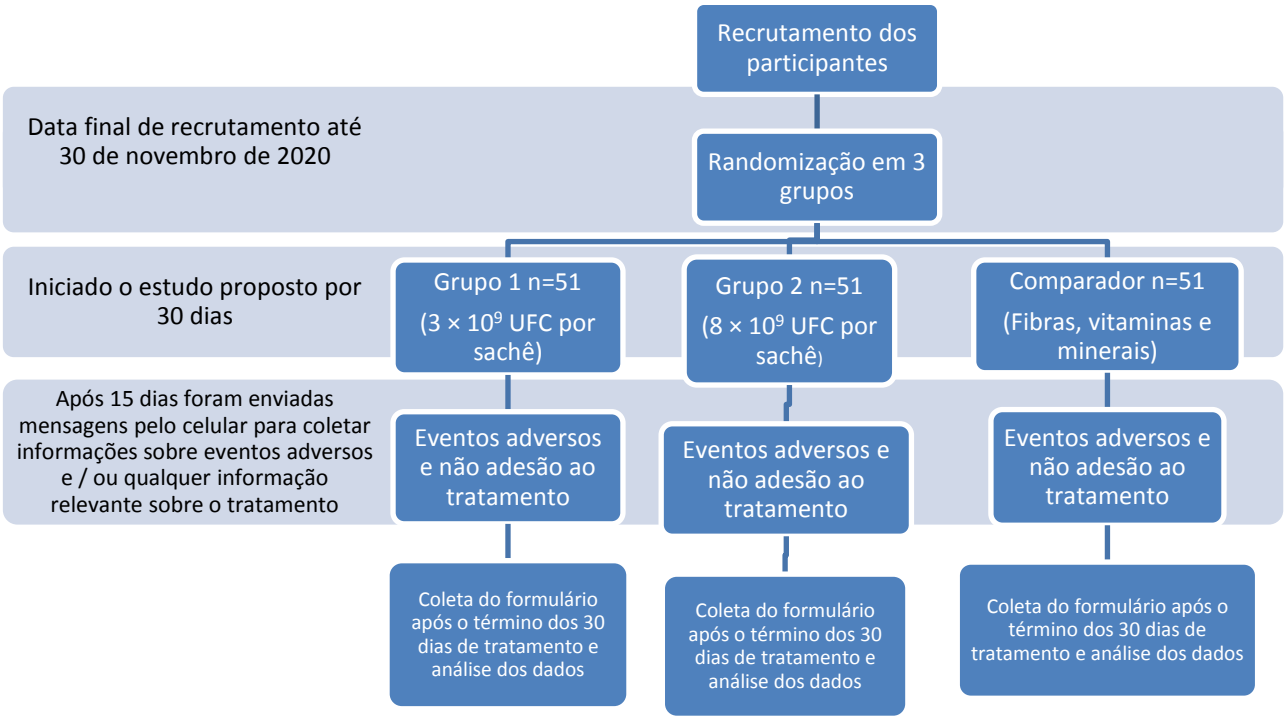
Os formulários foram coletados pessoalmente pela pesquisadora responsável (FCRM), ao final de 30 dias de intervenção. A Figura 12 apresenta um diagrama esquemático para a seleção, separação em grupos e coleta das informações.

Os desfechos secundários foram o número de eventos adversos e número de eventos adversos graves. Os eventos adversos são sinais ou sintomas indesejáveis que ocorrem durante o estudo e ocorrências que podem ou não estar causalmente relacionadas ao tratamento. Todos os eventos adversos considerados possivelmente, prováveis ou relacionados ao produto em teste foi anotado no formulário do paciente. O número de pacientes e eventos adversos foram registrados.

Eventos adversos graves são definidos como fatais, com risco de vida, incapacitante ou resultando em hospitalização ou permanência prolongada, ou resultando em malformação, seja relacionada ao produto em teste ou de outra forma (PINHEIRO *et al.*, 2019).

De acordo com estudos anteriores (GUERRA *et al*., 2011; PIANO *et al*., 2010; PIANO *et al*., 2012; RIEZZO *et al.*, 2012; XINIAS *et al*., 2018), os probióticos são seguros e qualquer evento adverso sério que pudesse estar relacionado aos produtos relacionados neste estudo seria considerado inesperado. Quaisquer eventos adversos sérios inesperados deveriam ser relatados a médica (KH) e imediatamente, o participante deveria interromper o uso do produto

Figura 11 - Diagrama esquemático da seleção e acompanhamento dos participantes da pesquisa.



Fonte: Elaboração própria.

4.2.6.6 Tratamento de dados e manutenção de registros

Os dados do prontuário dos participantes foram digitados em formato Excel e os prontuários foram armazenados em local seguro para comprovação do estudo.

Um formulário de coleta de informações foi utilizado para o registro dos dados de todos os participantes, sendo preenchido pela pesquisadora responsável. Os resultados foram verificados, em duplicata, para garantir a qualidade dos resultados medidos.

A análise de variância (Anova) foi usada para comparar as variáveis contínuas entre os grupos intervenção e controle. As mudanças de pontuação entre os grupos de intervenção e controle foram comparadas por Kruskall-Wallis (http://www.portalaction.com.br/técnicas-não-parametricas/teste-de-kruskal-wallis).

Dados sobre reação adversa aos probióticos e os demais desfechos foram analizados utilizando o teste *t* de Student e o teste de Mann-Whitney.

Em todas as medidas foram utilizadas a análise de intenção de tratar (http://www.leg.ufpr.br/lib/exe/fetch.php/disciplinas:ce001:vivian_-_teste_u_de_mann-whitney.pdf). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada no STATA v.14.2. (https://www.stata.com/stata14/).

4.2.6.7 Aspectos éticos

O projeto foi avaliado e aprovado em 11/09/2018 pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade de Sorocaba (CEP-Uniso) sob o número CAAE: 84003418.9.0000.5500 (ANEXO A).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e avaliação das formulações

A primeira etapa na formulação de um probiótico recaiu na seleção de microrganismos capazes de subsistirem ao longo do processamento e permanecerem viáveis, não tendo suas propriedades afetadas pelo período de armazenamento. As cepas selecionadas foram das espécies *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e apresentaram-se viáveis durante todo o período estudado.

De acordo com Ceresola *et al.* (2018) cepas de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium* podem reduzir o período do complexo mioelétrico migratório e acelerar o trânsito no intestino delgado em parte, devido ao aumento da liberação de serotonina que tem efeitos pró-motilidade. Corroborando com esta pesquisa, vários ensaios clínicos que avaliaram diferentes cepas de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium* no tratamento da constipação intestinal observaram resultados promissores (PIANO *et al.*, 2010; IBARRA *et al*., 2018; RIEZZO *et al*., 2012; LEWIS *et al.*, 2020; PRESTON *et al.*, 2018; MARTINÉZ-MARTINÉZ; CALABUIG-TOLSÁ; CAULI, 2018).

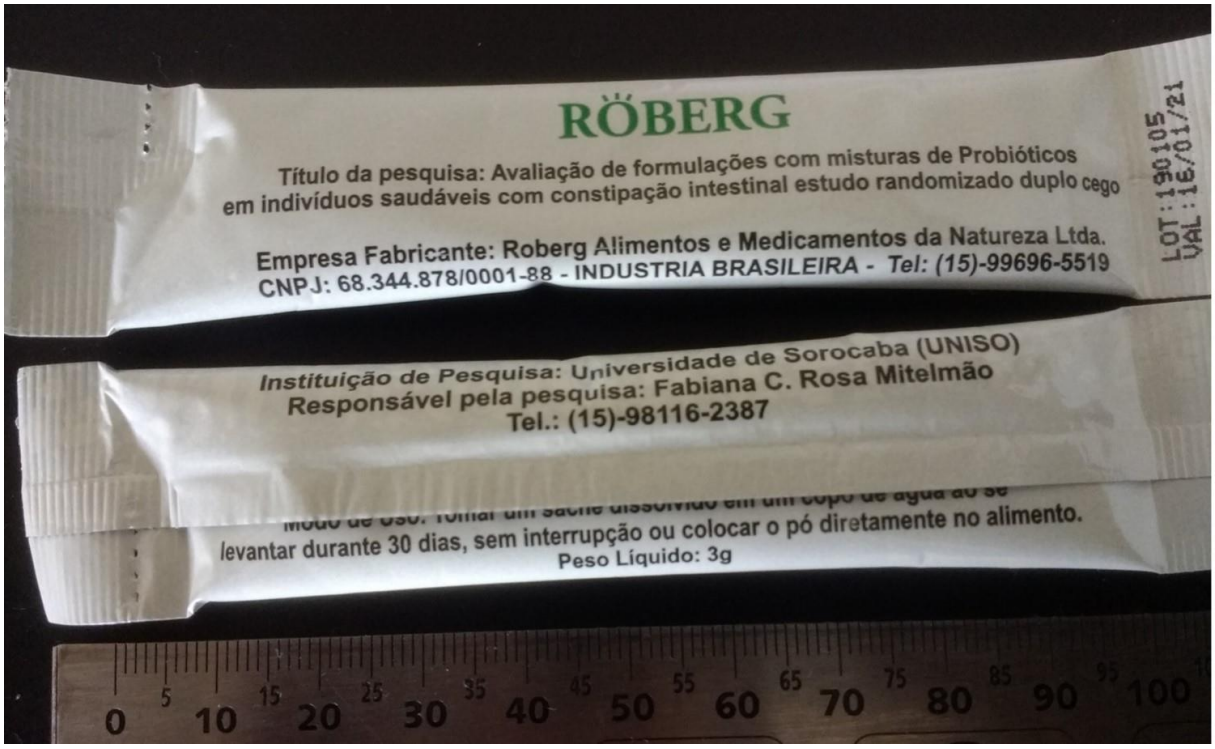
Outra preocupação recaiu sobre a dose correta de cepas probióticas, já que para que um probiótico seja bem-sucedido, deve existir uma relação ideal entre dose e eficácia pretendida (FINLEY *et al*., 2014; MEYBODI; MORTAZAVIAN, 2017). As formulações foram feitas com concentrações de probióticos de 3 x 10^9 UFC /sachê e de 8 x 10^9 UFC/sachê.

Alguns autores propõem que a dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica seja de 10^8 e 10^9 UFC, no entanto não há um consenso (SAAD, 2006). Além disso, segundo as determinações da Anvisa (BRASIL, 2018a), para o enquadramento de um produto como probiótico, não é possível pré-definir uma dose necessária de probióticos. A dose deve ter embasamento em estudos clínicos em humanos com benefício à saúde, pois a eficácia das cepas pode variar muito em função do produto. Algumas marcas de suplementos alimentares e alimentos com probióticos disponíveis no mercado nacional como “Atillus multi” da empresa Myralis (Valinhos/SP, Brasil) apresentam 3 bilhões de UFC por dose. Já o produto da empresa Danone “Activia” (Poços de Caldas/SP, Brasil) contêm 8 bilhões de UFC por 100 ml.

Os resultados encontrados no processo de fabricação dos produtos desenvolvidos ocorreram sem desvios de qualidade, obtendo-se sachês com peso médio de 3,00g ± 0,08g para a formulação 3 bilhões de UFC/sachê, de 2,94g ± 0,08g para a formulação 8 bilhões de

UFC/sachê e de 3,05g ± 0,08g para a formulação do grupo comparador. De acordo com os resultados, não houve problemas no processo de envase, já que a variação permitida, considerando critérios de avaliação da determinação de peso para formas farmacêuticas sólidas em dose unitária para pós para reconstituição (uso oral), pode ser de ± 7,5% para produtos com peso superior a 300 mg (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019). Em nenhuma das amostras houve problemas de envase em relação a selagem. De acordo com os resultados obtidos, o processo de fabricação foi realizado sem apresentar desvios atendendo as especificações de qualidade relativos aos parâmetros avaliados. A Figura 13 apresenta os sachês.

Figura 12 - Fotografia de sachê de probiótico desenvolvido (frente e verso)



Fonte: Elaboração própria.

O processo de produção de um suplemento alimentar é semelhante a medicamentos, no entanto, apresenta menor exigência em relação a alguns parâmetros de produção e qualidade. A produção na indústria de suplementos alimentares segue as Boas Práticas de Fabricação (BRASIL, 2002b) e deve considerar os conceitos de qualidade e exigências, dispostas na Legislação nacional vigente (RDC ANVISA nº 275/02; Portaria MS nº 326/97 e Portaria MS nº 1428/93) (BRASIL 2002; BRASIL, 1997; BRASIL, 1993). Contudo, de modo geral, os processos de produção são simples e, em sua grande maioria, constituem da mistura de matérias-primas e do seu envase (SILVA; RAZZOLINI FILHO, 2014).

O controle de qualidade microbiológico em suplementos alimentares é parte essencial para garantia de controle sanitário dos produtos (COSTA, 2016). Neste sentido, foram feitas analises microbiológicas nos suplementos desenvolvidos. Os resultados relativos as análises microbiológicas realizadas nos produtos no tempo zero (24 horas) e após 24 meses de armazenamento no estudo de longa duração, estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Análises microbiológicas nos produtos no tempo zero (24 horas) e após 24 meses de armazenamento a temperatura 30ºC ± 2ºC e umidade relativa (UR) de 75% ± 5% (n=3)

Testes	**Parâmetros**	**Amostra zero (24 horas)**	**Amostra 24 meses**
Pesquisa de coliformes a 45ºC	≤5UFC/g	Ausente	Ausente
Bacillus cereus/g	Ausente	Ausente	Ausente
Estafilococos coagulase positiva/g	Ausente	Ausente	Ausente
Samonella ssp/25g	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g

UFC = unidade formadora de colônia

Fonte: Elaboração própria

Pelos resultados obtidos, os produtos podem ser armazenados durante dois anos sem risco microbiológico. Este resultando é de fundamental importância para sua comercialização, visto que os probióticos estão sujeitos aos regulamentos contidos na lei geral dos alimentos, segundo a qual eles devem ser seguros para a saúde humana e animal (REIS, 2019). A contaminação microbiológica de suplementos alimentares pode representar um perigo para os consumidores e podem causar intoxicações alimentares (COSTA, 2016). Neste sentido, análises microbiológicas se tornaram exigidas pela Agência de Vigilância Sanitária, a fim de garantir a segurança no consumo de alimentos de acordo com a RDC nº 331 de 23 de dezembro de 2019 (BRASIL, 2019a) e da Instrução Normativa n° 60 de 23 de dezembro de 2019 (BRASIL, 2019b).

Segundo a RDC nº 331 de 23 de dezembro de 2019 (BRASIL, 2019a) os produtos fabricados antes da entrada em vigor da referida Resolução devem cumprir os padrões microbiológicos estabelecidos pela RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), até o fim de seus prazos de validade. Neste sentido, os suplementos alimentares desenvolvidos nesta pesquisa atenderam os padrões da RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação dos microrganismos usados para fins de consumos suplementos são regulamentados pela Anvisa, como já mencionado (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2018b). Entretanto, regulamentar probióticos é um desafio que envolve autoridades sanitárias de regulamentação, pesquisadores, fabricantes de produtos, fornecedores dos microrganismos, e consumidores uma vez que, o centro da questão está na comprovação do efeito benéfico esperado (ANVISA, 2017).

5.2. Estudos de estabilidade

A estabilidade de uma formulação prevê que o produto mantenha suas características em determinada temperatura, umidade relativa sofrendo pequenas, mas bem estabelecidas alterações, que são, até certo ponto aceitáveis pelo fabricante, pelo consumidor e pela legislação vigente até o final do prazo de validade. Em qualquer teste preditivo, os resultados não são absolutos, mas tem probabilidade de sucesso (SANTOS, 2015).

O estudo da estabilidade em formulações de suplementos alimentares é exigência, no momento do registro do produto na Anvisa, o que o torna essencial para a sua comercialização (BRASIL, 2018a). Além disto, o tempo de validade de um produto pode ser determinado mais rapidamente realizando o estudo acelerado e é o mais empregado nas indústrias de alimentos para lançar um produto no mercado atualmente (ANVISA, 2018).

Os parâmetros de qualidade abordados nos estudos de estabilidade foram avaliados através de ensaios físico-químicas (pH e umidade), análises sensoriais (cor, sabor e odor) e microbiológicos.

Os valores de pH obtidos, em todos os tempos analisados nos ensaios de estabilidade acelerada e de longa duração, estão apresentados nas Tabela 10 e 11 respectivamente. Pelos resultados observados houve estabilidade dos produtos em relação ao pH, utilizamos como faixa aceitável pH de 5,5 a 7.

Tabela 10 - Valor do pH dos suplementos armazenados nos tempos 0 (24 horas), 3 e 6 meses a temperatura 40ºC ± 2ºC e umidade relativa (UR) de 75% ± 5% no estudo de estabilidade acelerada (n=3)

	pH		
Amostra	**0 (24 horas)**	**3 meses**	**6 meses**
Fórmula com 3bilhões de UFC/sachê	5,97 ± 0,4	5,96±0,4	5,99±0,3
Fórmula com 8 bilhões de UFC/sachê	5,96±0,4	5,99±0,3	5,96±0,4

UFC = unidades formadoras de colônias

Fonte: Elaboração própria

Tabela 11 - Valor do pH dos suplementos armazenados nos tempos 0 (24 horas), 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses a temperatura 30ºC ± 2ºC e umidade relativa (UR) de 75% ± 5% no estudo de estabilidade de longa duração (n=3)

	pH						
Amostra	**0 (24 horas)**	**3 Meses**	**6 Meses**	**9 Meses**	**12 Meses**	**18 Meses**	**24 Meses**
Fórmula com 3 bilhões de UFC/sachê	5,97 ± 0,4	5,96±0,4	5,99±0,3	5,97±0,4	5,99±0,3	5,96±0,4	5,99±0,3
Fórmula com 8 bilhões de UFC/sachê	5,96±0,4	5,99±0,3	5,96±0,4	5,96±0,4	5,96±0,4	5,99±0,3	5,96±0,4

UFC = unidades formadoras de colônias

Fonte: Elaboração própria

A determinação de pH é um atributo importante em ensaios de qualidade (GIL, 2010). Tanto o pH, quanto a acidez estão ligados diretamente as características sensoriais e a aceitabilidade apresentada nos alimentos (SILVA, 2016), além de ser um indicativo de possível contaminação microbiológica.

A umidade também foi um parâmetro considerado significativo na manutenção da estabilidade dos suplementos probióticos preparados. A Tabela 12 mostra os resultados nos ensaios de estabilidade acelerada e, a Tabela 13 os resultados de umidade nos ensaios de estabilidade de longa duração.

Tabela 12 - Teor de umidade dos suplementos armazenados nos tempos 0 (24 horas), 3 e 6 meses a temperatura 40ºC ± 2ºC e umidade relativa (UR) de 75% ± 5% no estudo de estabilidade acelerada (n=3)

	Umidade (%)		
Amostra	**0**	**3 meses**	**6 meses**
Fórmula com 3 bilhões de UFC/sachê	3,23 ± 0,8	3,58±0,8	3,71±0,7
Fórmula com 8 bilhões de UFC/sachê	3,56±0,8	3,42±0,8	3,55±0,8

UFC = unidades formadoras de colônias

Fonte: Elaboração própria

Tabela 13 - Teor de umidade dos suplementos armazenados nos tempos 0 (24 horas), 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses a temperatura 30ºC ± 2ºC e umidade relativa (UR) de 75% ± 5% no estudo de estabilidade de longa duração (n=3)

	Umidade (%)						
Amostra	**0**	**3 meses**	**6 meses**	**9 meses**	**12 meses**	**18 meses**	**24 meses**
Fórmula com 3 bilhões de UFC/sachê	3,23±0,8	3,42±0,8	3,58±0,8	3,42±0,8	3,42±0,8	3,42±0,8	3,58±0,8
Fórmula com 8 bilhões de UFC/sachê	3,56±0,8	3,58±0,8	3,58±0,8	3,42±0,8	3,55±0,8	3,42±0,8	3,55±0,8

UFC = unidades formadoras de colônias

Fonte: Elaboração própria

A água presente no alimento desempenha um papel fundamental nos processos químicos e físicos dos alimentos, estando diretamente ligada a estabilidade dos mesmos (DAMODARAN; PARKIN; FENEMA, 2010). Além disto, maior teor de umidade resulta em alta atividade de água, o que permite o crescimento microbiano (PAWAR; THOMPKINSON, 2017). Assim, o teor de umidade de um produto alimentício é um parâmetro importante que, invariavelmente, afeta sua vida útil. A manutenção da umidade abaixo de 4,9% oferece segurança para os produtos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019), os suplementos alimentares desenvolvidos mantiveram teores de umidade dentro dos parâmetros esperados.

As tabelas 14 e 15 apresentam os resumos dos resultados dos ensaios de estabilidade dos produtos quanto a avaliação da cor, odor e sabor. Esta análise foi feita com amostras dos ensaios de estabilidade considerando cor (liquido opaco branco), sabor (baunilha adocicado) e odor

(levemente ácido e suavemente abaunilhado) após a dissolução das amostras em 150 ml de água potável. Todas as amostras se mantiveram estáveis, sem diferenças significativas aos atributos avaliados.

Tabela 14 - Estabilidade da formulação de 3 bilhões de UFC / sachê

Parâmetros	**Condições de armazenamento**								
	30ºC ± 2ºC UR 75% ± 5%UR							40ºC ± 2ºC UR 75% ± 5%UR	
	Meses							**Meses**	
	0	**3**	**6**	**9**	**12**	**18**	**24**	**3**	**6**
Cor	Igual ao controle							Igual ao controle	
Odor	Igual ao controle							Igual ao controle	
Sabor	Igual ao controle							Igual ao controle	
pH	5,97 ± 0,4	5,96 ± 0,4	5,99 ± 0,3	5,97 ± 0,4	5,99± 0,3	5,96 ± 0,4	5,99 ± 0,3	5,96 ± 0,4	5,99 ± 0,3
Umidade (%)	3,23 ± 0,8	3,42 ± 0,8	3,58 ± 0,8	3,42 ± 0,8	3,42 ± 0,8	3,42 ± 0,8	3,58 ± 0,8	3,58 ± 0,8	3,71 ± 0,7
Pesquisa de coliformes a 45ºC	Ausente							Ausente	
Bacillus cereus/g	Ausente							Ausente	
Estafilococos coagulase positiva/g	Ausente							Ausente	
Samonella ssp/25g	Ausente em 25 g							Ausente em 25 g	

UR= Umidade realativa

Fonte: Elaboração própria

Tabela 15 - Estabilidade da formulação de 8 bilhões de UFC/sachê

Parâmetros	**Condições de armazenamento**								
	30ºC ± 2ºC e UR 75% ± 5% UR							40ºC ± 2ºC e UR 75% ± 5% UR	
	Meses							**Meses**	
	0	**3**	**6**	**9**	**12**	**18**	**24**	**3**	**6**
Cor	Igual ao controle							Igual ao controle	
Odor	Igual ao controle							Igual ao controle	
Sabor	Igual ao controle							Igual ao controle	
pH	6,0 ± 0,4	5,99 ± 0,3	5,96 ± 0,4	5,96 ± 0,4	5,96 ± 0,4	5,99 ± 0,3	5,96 ± 0,4	5,99 ± 0,3	5,96 ± 0,4
Umidade %	3,56 ± 0,8	3,58 ± 0,8	3,58 ± 0,8	3,42 ± 0,8	3,55 ± 0,8	3,42 ± 0,8	3,55 ± 0,8	3,42 ± 0,8	3,55 ± 0,8
Pesquisa de coliformes a 45ºC	Ausente							Ausente	
Bacillus cereus/g	Ausente							Ausente	
Estafilococos coagulase positiva/g	Ausente							Ausente	
Samonella ssp/25g	Ausente em 25 g							Ausente em 25g	

UR = Umidade relativa

Fonte: Elaboração própria

A avaliação da cor, odor e sabor de alimentos é considerada um dos métodos mais antigos de controle de qualidade e, ainda hoje, é amplamente utilizada na indústria de alimentos. Do ponto de vista do consumidor, é uma das principais características com base na qual a qualidade do produto é decidida (PAWAR; THOMPKINSON, 2017).

Considerando os parâmetros avaliados, os resultados indicaram estabilidade dos produtos nas condições e tempos estudados.

5.2.1 Avaliação da resistência às condições do trato gastrointestinal (TGI)

Para estimar a resistência relativa de cada cepa às condições do TGI, foi calculado o índice de sobrevivência. Os valores obtidos para o índice de sobrevivência dos suplementos ao fluido gástrico simulado a pH 2,5 e pH 3,5 e entérico estão apresentados nas Tabela 16 e Figura 14 para a formula UFC/ sachê de 3 bilhões e na Tabela 17 e Figura 15 para a formula UFC/ sachê de 8 bilhões.

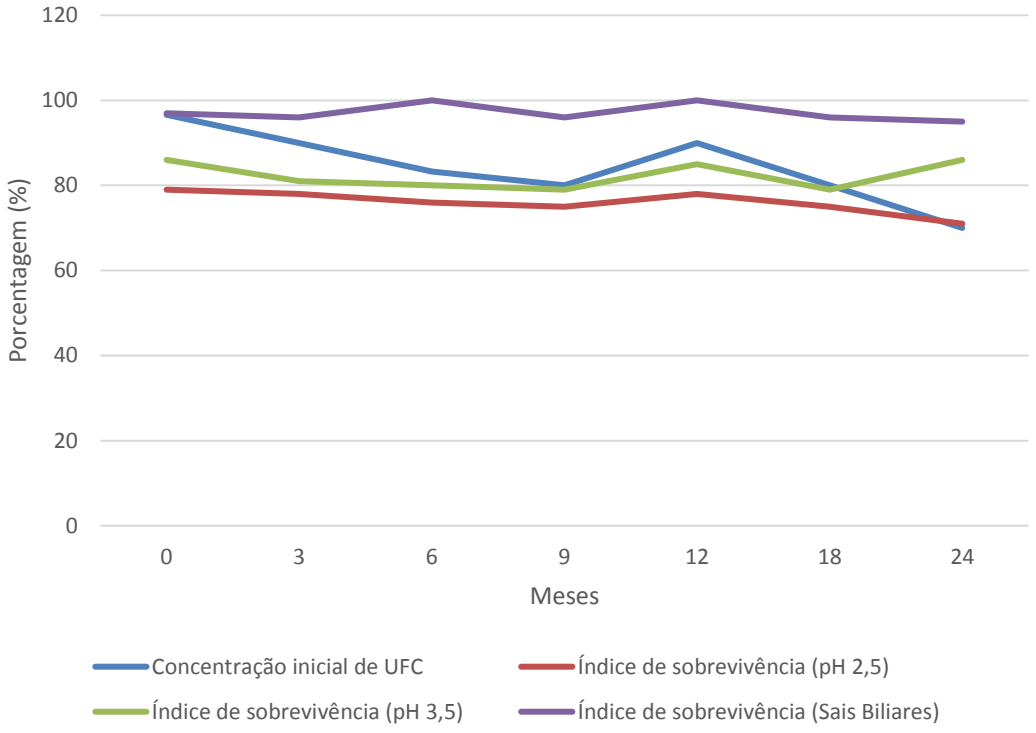
Tabela 16 - Índice de sobrevivência e valor de UFC/sachê das bactérias viáveis da formulação de 3 bilhões de UFC/sachê no estudo de estabilidade a longo prazo e no estudo de estabilidade acelerado.

Parâmetros	**Condições de armazenamento**								
	30ºC ± 2ºC UR 75% ± 5% UR							40ºC ± 2ºC UR 75% ± 5%UR	
	Meses							**Meses**	
	0	**3**	**6**	**9**	**12**	**18**	**24**	**3**	**6**
Quantificação inicial UFC/sachê	$2,9x10^9$	$2,7x10^9$	$2,5x10^9$	$2,4x10^9$	$2,7x10^9$	$2,4x10^9$	$2,1x10^9$	$2,1x10^9$	$2,0x10^9$
% da concentração inicial de UFC	96,6	90,0	83,3	80,0	90,0	80,0	70,0	70,0	66,6
pH 2,5 UFC/ sachê	$2,3x10^9$	$2,1x10^9$	$1,9x10^9$	$1,8x10^9$	$2,1x10^9$	$1,8x10^9$	$1,5x10^9$	$1,6x10^9$	$1,5x10^9$
Índice de sobrevivência (%)	79.0	78,0	76,0	75,0	78,0	75,0	71,0	76,0	75,0
pH 3,5 UFC/ sachê	$2,5x10^9$	$2,2x10^9$	$2,0x10^9$	$1,9x10^9$	$2,3x10^9$	$1,9x10^9$	$1,8x10^9$	$1,9x10^9$	$1,6x10^9$
Índice de sobrevivência (%)	86,0	81,0	80,0	79,0	85,0	79,0	86,0	90,0	80,0
Sais biliares UFC/ sachê	$2,8x10^9$	$2,6x10^9$	$2,5x10^9$	$2,3x10^9$	$2,7x10^9$	$2,3x10^9$	$2,0x10^9$	$1,8x10^9$	$1,6x10^9$
Índice de sobrevivência (%)	97,0	96,0	100,0	96,0	100,0	96,0	95,0	86,0	80,0

UFC= unidades formadoras de colônias; UR = umidade relativa

Fonte: Elaboração própria

Figura 13 - Representação gráfica dos resultados do índice de sobrevivência e valor de UFC/sachê das bactérias viáveis da formulação de 3 bilhões de UFC/sachê no estudo a longo prazo.



Fonte: Elaboração própria

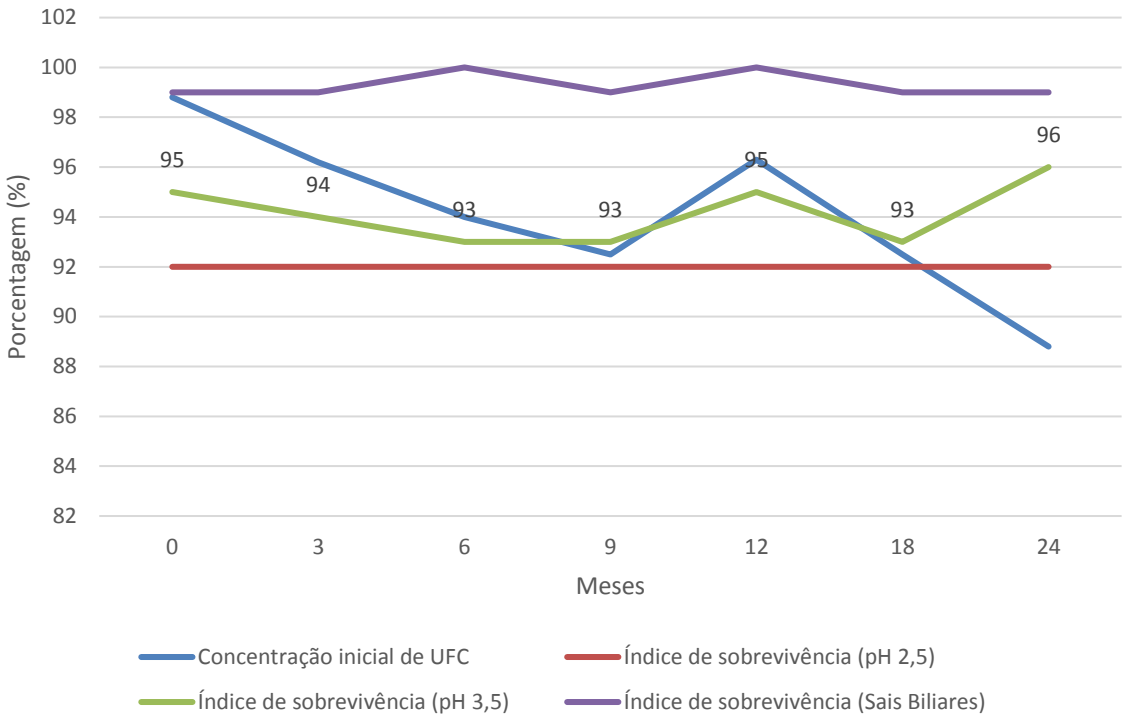
Tabela 17 - Índice de sobrevivência e valor de UFC/sachê das bactérias viáveis da formulação de 8 bilhões de UFC / sachê no estudo de estabilidade a longo prazo e no estudo de estabilidade acelerado.

Parâmetros	**Condições de armazenamento**								
	30ºC ± 2ºC UR 75% ± 5%							40ºC ± 2ºC UR75% ± 5%	
	Meses							**Meses**	
	0	**3**	**6**	**9**	**12**	**18**	**24**	**3**	**6**
Quantificação inicial UFC/sachê	$7,9x10^9$	$7,7x10^9$	$7,5x10^9$	$7,4x10^9$	$7,7x10^9$	$7,4x10^9$	$7,1x10^9$	$7,1x10^9$	$7,0x10^9$
% da concentração inicial de UFC	98,8	96,2	94,0	92,5	96,3	92,5	88,8	88,8	87,5
pH 2,5 UFC/sachê	$7,3x10^9$	$7,1x10^9$	$6,9x10^9$	$6,8x10^9$	$7,1x10^9$	$6,8x10^9$	$6,5x10^9$	$6,6x10^9$	$6,5x10^9$
Índice de sobrevivência (%)	92,0	92,0	92,0	92,0	92,0	92,0	92,0	93,0	93,0
pH 3,5 UFC/sachê	$7,5x10^9$	$7,2x10^9$	$7,0x10^9$	$6,9x10^9$	$7,3x10^9$	$6,9x10^9$	$6,8x10^9$	$6,9x10^9$	$6,6x10^9$
Índice de sobrevivência (%)	95,0	94,0	93,0	93,0	95,0	93,0	96,0	97,0	94,0
Sais biliares UFC/sachê	$7,8x10^9$	$7,6x10^9$	$7,5x10^9$	$7,3x10^9$	$7,7x10^9$	$7,3x10^9$	$7,0x10^9$	$6,8x10^9$	$6,6x10^9$
Índice de sobrevivência (%)	99,0	99,0	100,0	99,0	100,0	99,0	99,0	96,0	94,0

UFC= unidades formadoras de colônias; UR = umidade relativa

Fonte: Elaboração própria

Figura 14 - Representação gráfica dos resultados do índice de sobrevivência e valor de UFC/sachê das bactérias viáveis da formulação de 8 bilhões de UFC / sachê no estudo de estabilidade a longo prazo.



Fonte: Elaboração própria

Ambas as formulações avaliadas apresentaram sobrevivência nas condições estudadas que variaram de 71 a 79% em relação a quantidade inicial de probióticos no ambiente gástrico. A secreção gástrica é um dos mecanismos de defesa do organismo humano contra os microrganismos que podemos ingerir diariamente. O TGI é um ambiente hostil para a maioria dos agentes infecciosos, e a resistência a essas condições é uma propriedade a qual os probióticos devem apresentar para que tenham eficácia, entre outras exigências (COTTER; HILL, 2003; ZOMMITI; FEUILLOLEY; CONNIL, 2020).

Na etapa entérica, este índice permaneceu entre 80 a 100% de sobrevivência em relação a quantidade inicial de probióticos para as formulações. Segundo Iñiguez-Palomares *et al.* (2007), cepas com potencial probiótico tem um índice de sobrevivência superior a 45%. Portanto as cepas utilizadas apresentaram potencial probiótico durante todos os processos de resistência ao TGI *in vitro.*

Em formulações probióticas envolvendo muitas cepas a viabilidade celular pode ser afetada pela produção de agentes antagonistas ou pela competição por nutrientes ou sítios de ligação no TGI. Nesse sentido, é primordial não apenas escolher cepas que coexistam, mas

também atuem sinergicamente (MILLETTE *et al*., 2013). Pelos resultados, relativos aos índices de sobrevivência as cepas utilizadas parecem atuar sinergicamente.

5.3. Determinação do prazo de validade

O prazo de validade de um produto alimentício é o período de tempo em que o alimento permanece seguro e adequado para consumo, desde que armazenado de acordo com as condições pré-determinadas pelo fabricante. Existem muitos fatores que interferem no prazo de validade de um alimento, em função da complexidade da matéria-prima, dos processos envolvidos na sua produção e inúmeros fatores externos, como umidade, temperatura, oxigênio, luz, entre outros. O efeito da temperatura é significativo, pois as alterações de temperatura influenciam a natureza e a taxa de deterioração causada por mecanismos físicos ou químicos. Pode-se afirmar que, um aumento na temperatura aumenta a taxa das reações químicas. Esse efeito é a base da maioria dos estudos de estabilidade, pois quanto maior a temperatura a qual o produto é exposto, menor será o prazo de validade do produto (ANVISA, 2018).

O efeito da temperatura na degradação de um alimento é importante ser avaliada quando se deseja manter sua qualidade, sendo a equação de Arrhenius utilizada para representar os efeitos da temperatura (MARTINS, 2009).

A partir dos resultados obtidos na determinação de UFC/sachê nas amostras submetidas às diferentes condições de tempo e temperatura (40ºC ± 2ºC / 75% ± 5%UR e 30ºC ± 2ºC / 75% ± 5%UR) por 6 meses dos estudos de estabilidade acelerada e a longo prazo respectivamente, foi determinado a ordem da reação de degradação. Para isto foram feitos gráficos da concentração *versus* tempo (ordem zero); do ln da concentração *versus* tempo (1ªordem) e do inverso da concentração *versus* tempo (2ª ordem) (APÊNDICE F). A escolha das equações está explicitada na Tabela 18, sendo que a escolha foi em função do maior valor de R^2. A Tabela 18 exibe os valores de k para temperatura a 40ºC e 30ºC das formulações de suplemento alimentar contendo probióticos.

Tabela 18 - Valores de R^2 e equação da reta para as amostras de probióticos submetidas ao estudo de estabilidade acelerada e a longo prazo

Amostras	**R^2 a 40ºC± 2ºC**	**Equação da reta de 1ºordem**	***m***
3 bilhões UFC/sachê	0,865	y = -0,0633x + 4,5267	-0,0633
	R^2 a 40ºC± 2ºC	**Equação da reta de 1ºordem**	
8 bilhões UFC/sachê	0,8811	y = -0,0183x + 4,5683	-0,0183
Amostras	**R^2 a 30ºC± 2ºC**	**Equação da reta de 1ºordem**	***m***
3 bilhões UFC/ sachê	0,9985	y = -0,025x + 4,5683	-0,025
	R^2 a 30ºC± 2ºC	**Equação da reta de 1ºordem**	
8 bilhões UFC/ sachê	1	y = -0,0067x + 4,58	-0,0067

UFC= unidades formadoras de colônias; *m*= inclinação da reta; R^2= coeficiente de determinação
Fonte: Elaboração própria

Calculou-se Q_{10} (fator de aceleração da temperatura) que é um fator adimensional que significa que quanto maior o seu valor maior é a energia de ativação ao aumentar a temperatura no armazenamento do produto. Através da obtenção de Ea da reação também é possível quantificar o valor de Q_{10}, dado pelo quociente entre as velocidades de reação a uma determinada temperatura e a uma temperatura 10 °C mais baixa, ou pelo quociente entre as vidas de prateleira a uma determinada temperatura e a uma temperatura 10°C mais alta (LABUZA, 1985; RUSSELL, 1994; ITAL, 1996). O valor de Q_{10} da reação de deterioração é usado para estimar a vida útil do produto nos testes de estabilidade acelerada para outras temperaturas de armazenamento (LABUZA; SCHMIDL, 1985).

Para a obtenção do valor de Q_{10} aplicou-se a equação 2 descrita no item 4.2.4. (Prazo de Validade) obtendo-se valores de Q_{10} de 2,53 para o suplemento de 3 bilhões de UFC e de 2,74 para o suplemento de 8 bilhões de UFC. Isto significa que, para a formulação de 3 bilhões de UFC, a cada 10ºC de aumento de temperatura, a vida de prateleira dos suplementos é reduzida em 2,53 vezes, ou seja, a degradação dos probióticos aumenta em 2,53 vezes. Para a formulação de 8 bilhões, a cada 10ºC de aumento de temperatura, a vida de prateleira dos suplementos é reduzida em 2,74 vezes, ou seja, a degradação dos probióticos aumenta em 2,74 vezes.

Colocando o valor de 45% de cepas viáveis no valor de y nas equações das retas seguindo premissa de Iñiguez-Palomares *et al.* (2007) que indica que as cepas com potencial probiótico devem ter índice de sobrevivência superior a 45%, tem-se os resultados para o tempo estimado de validade, os quais estão disponibilizados na Tabela 19. Observa-se que a formulação de 3 bilhões UFC/sachê a 30ºC ± 2ºC a formulação de 3 bilhões UFC/sachê teria 45 % de cepas viáveis por 170 meses e 492 meses para a formulação de 8 bilhões.

Tabela 19 - Quantidade de meses estimados considerando viabilidade de 45% das cepas

Amostra	45% de viabilidade celular a 30ºC ± 2ºC	Equação da reta	Meses
3 bilhões UFC/sachê	ln 1,35	y = -0,025x + 4,5683	170
8 bilhões UFC/sachê	ln 3,6	y = -0,0067x + 4,58	492

UFC= unidades formadoras de colônias

Fonte: Elaboração própria

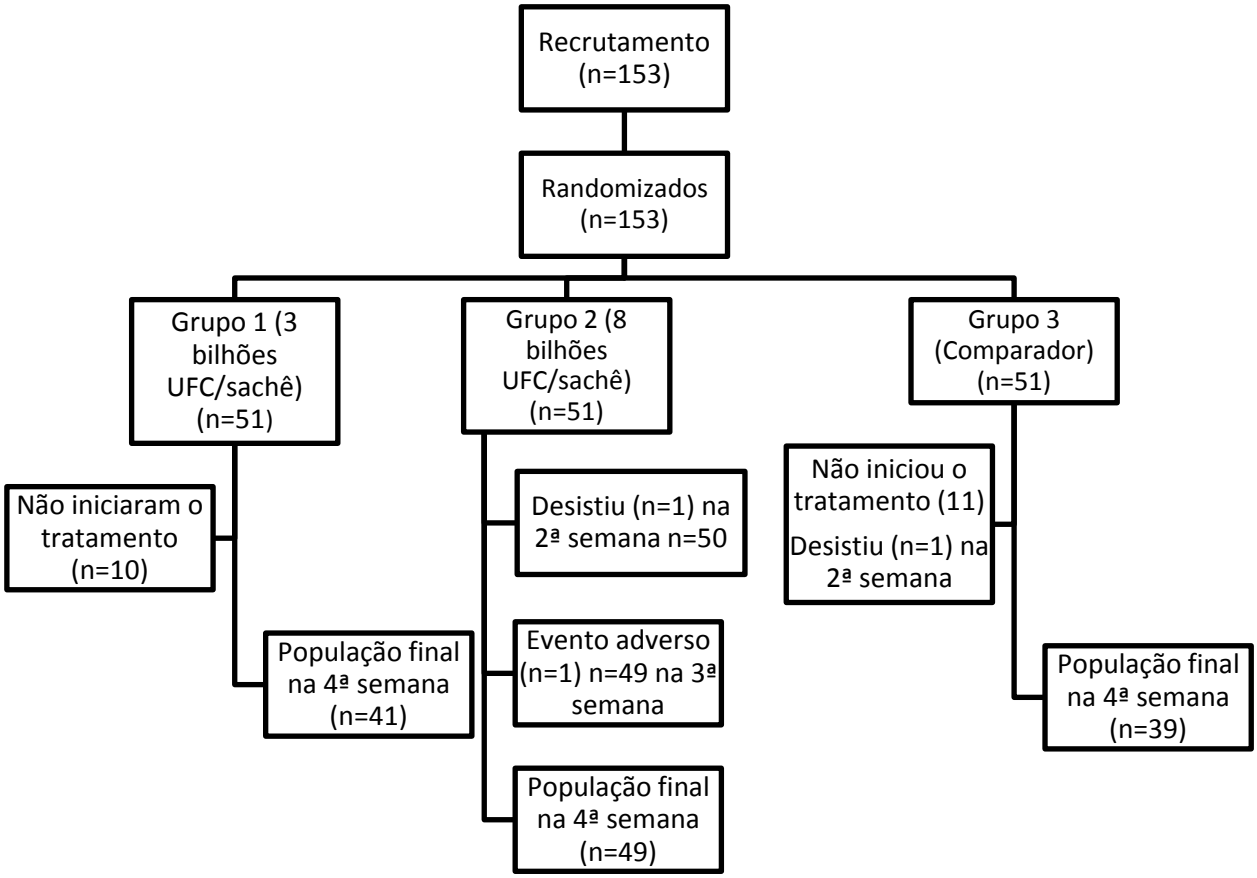
5.4 Ensaio clínico

As recomendações para o uso de probióticos na prática clínica seguem os benefícios observados a partir de estudos em seres humanos (WGO, 2017). A pesquisa com humanos se justifica para a comprovação da eficácia e da segurança das misturas probióticas e, só assim é permitido seu registro junto aos órgãos competentes, no caso do Brasil, a Anvisa (BRASIL, 2002).

5.4.1 Participantes

No total, 153 participantes foram selecionados, sendo divididos em três grupos com 51 indivíduos. Contudo, alguns participantes, que realizaram a etapa inicial da pesquisa (exame clínico, seleção com base nos critérios de elegibilidade, recebimento de esclarecimentos e leitura e assinatura do TCLE) não iniciaram o estudo. Assim, a pesquisa se desenvolveu com um total de 132 participantes (41 participantes que receberam a fórmula de 3 bilhões UFC/sachê, 51 com a fórmula de 8 bilhões UFC/sachê e 40 com o comparador). A Figura 14 mostra em um fluxograma a distribuição dos participantes que realizaram esta pesquisa, incluindo as desistências. O consumo foi interrompido por dois participantes da pesquisa os quais estavam no grupo 2 (8 bilhões UFC/sachê). O primeiro desistiu na segunda semana de tratamento sem qualquer justificativa e, o segundo na terceira semana de tratamento por desistência voluntária devido apresentar reação adversa, com queixa de flatulência e cólicas abdominais. Tivemos uma desistência no grupo 3 (comparador) na segunda semana de tratamento sem qualquer justificativa

Figura 15 - Disposição de participantes e características demográficas nos três grupos



UFC= unidades formadoras de colônias

Fonte: Elaboração própria segundo CONSORT (http://www.consort-statement.org/consort-statement/flow-diagram)

Os participantes selecionados na pesquisa não deferiram com relação ao sexo. A idade diferiu entre o Grupo 1 (3 bilhões UFC/sachê) em comparação ao Grupo 2 (8 bilhões UFC/sachê), entre o Grupo 1 (3 bilhões UFC/sachê) em comparação ao Grupo 3 (comparador) e esta diferença pode ter sido em decorrência das desistências ao longo do estudo. (Tabela 20). Observou-se que a grande maioria dos participantes foi do sexo feminino (88 a 98 %), provavelmente por ser um distúrbio que se observa mais mulheres e idosos (GALVÃO-ALVES, 2013; SCHMIDT *et al*., 2015).

Tabela 20 - Características dos participantes no início do estudo

	Grupo 1 (3bilhões UFC/sachê (n=51)		**Grupo 2 (8bilhões UFC/sachê) (n=51)**		**Grupo 3 (comparador) (n=51)**		**1 x 2**	**1 x 3**	**2 x 3**	**1 x 2 x 3**
Parâmetro	Média ± DP	n	Média ± DP	n	Média ± DP	n	*p*1	*p*2	*p*3	*p*4
Mulheres (%)	87,8	36	98,0	50	97,5	39	0,085	0,201	1,000	0,086
Idade	39,98± 12,57	41	43,06 ± 16,06	51	40,98 ± 14,69	40	**0,005**	**0,023**	0,588	**0,013**

1- valor *p* do teste t bicaudal para identificar as diferenças entre o grupo 1 e 2 nas semanas 0, 1, 2 ,3, 4.
2- valor *p* do teste t bicaudal para identificar as diferenças entre o grupo 1 e 3 nas semanas 0, 1, 2 ,3, 4.
3- valor *p* do teste t bicaudal para identificar as diferenças entre o grupo 2 e 3 nas semanas 0, 1, 2 ,3 ,4.
4- valor *p* da análise de variância para identificar as diferenças entre os grupos 1, 2 e 3 nas semanas 0, 1,2,3,4.
Grupo 1 = fórmula com 3 bilhões de UFC/ sachê; Grupo 2 = fórmula com 8 bilhões de UFC/sachê); Grupo 3= comparador; UFC= unidades formadoras de colônias; 1 x 2- Grupo 1 em comparação com o Grupo 2; 1 x 3- grupo 1 em comparação com o Grupo 3; 2 x 3- Grupo 2 em comparação com o Grupo 3; 1x 2x 3- Grupo 1 em comparação com o Grupo 2 e com Grupo 3.

Fonte: Elaboração própria

A constipação intestinal acomete mulheres por razões diversas como gravidez e parto; alterações hormonais próprias do sexo feminino, bem como fatores comportamentais, histórias de abuso sexual, físico e emocional. A população idosa também apresenta queixas recorrentes em relação a constipação intestinal. As alterações fisiológicas do envelhecimento como mobilidade reduzida, condições de saúde e uso de medicamentos predispõem os idosos ao desenvolvimento desta condição (SCHMIDT *et al*., 2015).

5.4.2 Justificativa para diminuição do número de participantes

Tivemos apenas 3 desistências durante o estudo. Um paciente que estava tomando a fórmula com 8 bilhões de UFC/sachê relatou, na terceira semana de uso do produto, flatulência e cólica abdominal. Estes efeitos adversos podem ocorrer pelo uso de probióticos, sendo reversíveis com a interrupção da ingestão (SAAD, 2006). A formação de gazes com distensão, inchaço e cólica abdominal estão entre as mais frequentes queixas gastrointestinais (LARIJANI *et al*., 2016). No entanto, provavelmente, estes incômodos podem estar relacionados ao tratamento ativo, um efeito possível por se tratar do aumento da motilidade intestinal, para formação do bolo fecal. Dois participantes pararam com o tratamento sem qualquer justificativa, sendo classificados como desistentes e os demais (n= 18) assinaram o termo de consentimento, mas não iniciaram o tratamento.

5.4.3 Avaliação da frequência semanal de evacuações e da qualidade das fezes

A constipação é um distúrbio intestinal multifatorial caracterizado pela presença de dois ou mais sintomas como esforço para evacuar, fezes irregulares ou duras, sensação de incompleta evacuação, sensação de obstrução, necessidade de manobras manuais para facilitar a defecação e um número de evacuações menos de 3 vezes por semana (PINHEIRO *et al.*, 2019). Neste sentido, avaliar o número de defecações e o formato das fezes é uma forma de avaliar o sucesso ou não de uma intervenção alimentar ou medicamentosa para o tratamento da constipação intestinal. Os resultados referentes a frequência semanal de evacuações e da qualidade das fezes segundo Escala de Bristol estão apontados na Tabela 21.

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os três grupos de tratamento. A frequência de evacuação semanal aumentou nos três grupos, levando em consideração que o grupo comparador continha um prebiótico. Os prebióticos têm um efeito positivo no microbioma intestinal, aumentando as espécies de bifidobactérias e lactobacilos (NASEER *et al*., 2020). O uso de um prebiótico nas formulações foi escolhido a fim de que todos os participantes tivessem algum tratamento. A utilização de placebo como grupo controle, quando não existe alguma forma de tratamento eficaz apresenta aspectos eticamente controversos (GRECO; PARIZI, 2014).

Tabela 21 - Frequência semanal de evacuações e da qualidade das fezes segundo Escala de Bristol*

	Grupo 1 (3 bilhões UFC/sachê)			**Grupo 2 (8 bilhões UFC/sachê)**			**Grupo 3 (comparador)**			**1 x 2**	**1 x 3**	**2 x 3**	**1 x 2 x 3**
Parâmetro	Média ± DP	n	p^1	Média ± DP	n	p^2	Média ± DP	n	p^3	p^4	p^5	p^6	p^7
Número Semanal de Evacuações													
Semana Anterior (0)	1,9 ± 0,8	41		1,8 ± 0,8	51		1,7 ± 0,8	40		0,481	0,149	0,413	0,353
Semana 1	4,9 ± 2,5	41	< 0,001	4,7 ± 2,0	51	< 0,001	6,4 ± 7,7	40	< 0,001	0,818	0,224	0,141	0,187
Semana 2	5,8 ± 2,7	41	< 0,001	5,1 ± 2,0	50	< 0,001	5,9 ± 2,9	39	< 0,001	0,119	0,946	0,118	0,217
Semana 3	5,5 ±2,6	41	< 0,001	5,0 ± 1,8	49	< 0,001	6,1 ± 2,4	39	< 0,001	0,262	0,278	**0,011**	0,066
Semana 4	5,2 ± 1,8	41	< 0,001	5,1 ± 2,0	49	< 0,001	5,5 ± 2,3	39	< 0,001	0,766	0,645	0,465	0,744
Qualidade das fezes segundo Escala de Bristol*													
Semana Anterior (0)	1,9 ± 0,8	41		1,8 ± 0,80	51		1,7 ± 0,76	40		0,481	0,149	0,413	0,353
Semana 1	3,0 ± 1,2	41	< 0,001	2,9 ± 1,07	51	< 0,001	2,7 ± 0,89	40	0,004	0,739	0,253	0,366	0,499
Semana 2	3,2±1,1	41	< 0,001	2,9± 1,10	50	< 0,001	3,2 ± 0,86	39	< 0,001	0,291	0,928	0,294	0,449
Semana 3	3,1 ± 1,1	41	< 0,001	3,4 ± 1,14	49	< 0,001	3,4 ± 1,11	39	< 0,001	0,219	0,250	0,966	0,395
Semana 4	3,6 ± 1,1	41	< 0,001	3,3 ± 0,97	49	< 0,001	3,3 ± 1,04	39	< 0,001	0,278	0,310	0,974	0,469

1- valor *p* do teste t pareado bicaudal para identificar as diferenças entre as semanas 1, 2, 3, 4 com a semana 0 no grupo 1; 2-valor *p* do teste t pareado bicaudal para identificar as diferenças entre as semanas 1, 2, 3, 4 com a semana 0 no grupo 2; 3-valor *p* do teste t pareado bicaudal para identificar as diferenças entre as semanas 1, 2, 3, 4 com a semana 0 no grupo 3; 4- valor p do teste t bicaudal para identificar as diferenças entre o grupo 1 e 2 nas semanas 0, 1, 2 ,3, 4.; 5- valor *p* do teste t bicaudal para identificar as diferenças entre o grupo 1 e 3 nas semanas 0, 1, 2 ,3, 4; 6- valor *p* do teste t bicaudal para identificar as diferenças entre o grupo 2 e 3 nas semanas 0, 1, 2 ,3 ,4.
7- valor *p* da análise de variância para identificar as diferenças entre os grupos 1, 2 e 3 nas semanas 0, 1,2,3,4; Grupo 1 = Grupo 1 (Fórmula com 3 bilhões de UFC/sachê; Grupo 2 (Fórmula com 8 bilhões de UFC/sachê); Grupo 3 (Comparador controle); UFC= unidades formadoras de colônias; *Qualidade das fezes pela Escala de Bristol segundo Lewis e Heaton (1997). **Fonte:** Elaboração própria adaptado de CONSORT (http://www.consort-statement.org/consort-statement/flow-diagram)

A pontuação média dos dias de evacuação na semana dos grupos no tempo anterior ao início do estudo foi de 1,8 ± 0,8, e após 4 semanas de tratamento foi de 5,3 ± 2,1, o que evidencia um aumento de aproximadamente 300% da condição inicial (Tabela 21).

De acordo com a análise, não houve diferença estatística entre os participantes na categoria de frequência das fezes, considerando o período desde a consulta inicial até o final do tratamento. Também não se observou diferenças significativas entre os grupos de tratamento em relação ao número de participantes.

O formato das fezes se modifica em vários problemas e doenças intestinais. A constipação intestinal pode ser diagnosticada por anamnese e pelo formato das fezes. No entanto, é difícil obter descrição precisa da aparência e consistência de fezes (MARTINEZ; AZEVEDO, 2012). A análise pós tratamento da frequência de evacuação semanal em conexão com a consistência das fezes, usando a contagem de eventos antes do tratamento e nas 4 semanas de tratamento, mostrou que em todos os grupos de tratamento, a consistência das fezes melhorou para a categoria ideal (saíram da categoria trânsito lento - tipos 1 e 2 para os de trânsito normal - tipos 3, 4 e 5). No entanto, não houve diferenças significativas entre os grupos.

5.4.4 Limitações e pontos fortes deste estudo

Uma limitação do estudo foi que os resultados foram baseados no autorrelato de sintomas pelos participantes em combinação com a observação direta.

O grupo comparador era formado apenas de prebióticos (fibras, vitaminas e minerais). Esta escolha de não usar um placebo inerte, ou seja, sem qualquer efeito na constipação, foi para evitar que os participantes ficassem sem tratamento. Assim, todas as formulações foram tratamentos para a constipação intestinal.

Os ensaios clínicos são estudos apropriados para avaliar eficácia e segurança de intervenções. Desta maneira, o presente estudo contribuiu em identificar alternativas terapêuticas para o tratamento da constipação intestinal em indivíduos saudáveis.

5.4.5 Implicações para a prática clínica e para a pesquisa

Os resultados obtidos podem orientar pacientes e profissionais de saúde e auxiliar na tomada de decisões no tratamento da constipação intestinal funcional, já que demonstraram que tanto os probióticos quanto os prébióticos desenvolvidos foram seguros e eficazes.

Neste estudo, observou-se que tratamentos com apenas prebióticos melhoram a constipação intestinal. Além disto, não houve diferença no uso de uma combinação de oito cepas de probióticos com o de três cepas, considerando a frequência intestinal aumentada e melhoria da qualidade das fezes.

6 CONCLUSÃO

As formulações desenvolvidas apresentaram características adequadas como suplementos alimentares probióticos, visto que as cepas estavam em quantidades adequadas, com viabilidade de 70% de bactérias probióticas para a formulação de 3 bilhões de UFC/sachê e de 89% para a concentração de 8 bilhões de UFC/sachê, após 24 meses a 30ºC.

Os suplementos alimentares apresentaram qualidade microbiológica e sobrevivência nas condições do trato gastrointestinal. Os produtos apresentaram um prazo de validade acima de 24 meses para ambas as concentrações de probióticos nas temperaturas de 30ºC e 40ºC. A produção industrial do produto mostrou-se viável pela facilidade do processo envolvido sendo uma alternativa viável para a comercialização.

Do ponto de vista clínico, os produtos foram considerados eficazes para o tratamento da constipação intestinal, na medida em que houve melhoria da constipação intestinal com aumento da frequência e da qualidade das fezes dos participantes nas três formulações testadas. A combinação de cepas de lactobacilos com de bifidobactérias foram bem toleradas e seguras para consumo, demonstrando sua segurança.

Desta forma, o consumo de quatro semanas destas misturas de probióticos e prebiótico melhorou sintomas digestivos, especialmente qualidade das fezes, em adultos com constipação.

REFERÊNCIAS

ABATENH, E. et al. Health benefits of probiotics. **Journal Bacteriology and Infection Disease**, v.2, n. 1, p 17-27, 2018.

ABRANTES, F.A. **Efeitos da *Bifidobacterium longum* 5[1a] sobre o restabelecimento da homeostase intestinal, em modelo experimental de colite ulcerativa induzida por DSS**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

ANANDHARAJ, M.; RANI, R.P.; SWAIN, M.R. Production of high-quality probiotics by fermentation. In: GUPTA, V. K. *et al.* **Microbial Functional Foods and Nutraceuticals**, John Wiley & Sons Ltd, 2018.

ANTUNES, A.E.C. et al. Probióticos: agentes promotores de saúde. **Journal Brazilian Society Food Nutrition** v. 32, n. 3, p. 103-122, 2007

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência-Geral de Alimentos. **Perguntas e Respostas.** Suplementos alimentares, 6ª edição, 2020. Disponível em http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33916/2810640/Suplementos+Alimentares/a6fd2839-6d80-496a-becb-8b2122eff409. Acesso em 12 de janeiro de 2021.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Gerência-Geral de Alimentos. Probióticos: Construção da lista de linhagens probióticas**. Anvisa, 2017. Disponível em http://antigo.anvisa.gov.br/documents/3845226/0/An%C3%A1lise+das+Linhagens+de+Probi%C3%B3ticos__23042018.pdf/6e37da13-2151-4330-85b0-0f449dbb0e95. Acesso em 15/03/2017

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Determinação de Prazos de Validade de Alimentos**. Guia 16/2018, Versão 1, Anvisa, 2018. Disponível em: http://segurancaalimentar.mprs.mp.br/alergenicos/guia.pdf Acesso em: 13 de janeiro de 2021.

ANZALDÚA-MORALES, A. **La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la prática.** Zaragoza: Acribia SA, 1994. 198 p.

BAŞTÜRK, A. et al. Investigation of the efficacy of synbiotics in the treatment of functional constipation in children: A randomized double-blind placebo-controlled study. **The Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 28, p. 388-393, 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária, Portaria 326 de 30 de julho de 1997. **Regulamento Técnico, Condições Higiênicos-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos**. Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF, 1997.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária, Portaria 1428 de 26 de novembro de 1993. Aprovar testos anexos "**Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos" - COD-100 a 001.0001, as "Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos" - COD- 100 a 002.0001, e o "Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e**

Qualidade (PIQ's) para Serviços e Produtos na Área de Alimentos"- COD- 100 a 003.0001 e COD- 100 a 004.000. Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF, 1993.
BRASIL, Ministério da Saúde, Agência de Vigilância Sanitária, Resolução da Diretoria Colegiada RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF, 7/01/2001

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência de Vigilância Sanitária, Resolução da Diretoria Colegiada RDC n.º 2, de 7 de janeiro de 2002**. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde**. Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF, 09/01/ 2002. Republicada no DOU em 17 de julho de 2002a.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 275, de 21 de outubro de 2002. **Dispõe o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2002b.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. **Guia para realização de Estudos de Estabilidade**. Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF, 01 de agosto de 2005a.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução, Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais,** Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF de 23/07/2005, Brasília, 2005b.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012. **Dispões sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.** Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF, 13/05/2013.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência de Vigilância Sanitária, 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 (DOU), Brasília, DF, 27/07/2018 Brasília, 2018a

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 243, de 26 de julho de 2018. **Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares.** Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF, 27/07/2018, Brasília, 2018b.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 331 de 23 de dezembro de 2019. **Dispõe sobre padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação.** Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF, 26/12/2019, 2019a.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa IN nº 60 de 23 de dezembro de 2019. **Estabelece as listas de padrões**

microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF, 26/12/2019, 2019b.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa IN nº 76, de 5 de novembro de 2020. **Dispõe sobre a atualização das listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares.** Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF, 11/11/2020, Brasília, 2020.

CARDOSO, V.M. **O microbioma humano**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2015.

CERESOLA, E. R. et al. F Targeting patients' microbiota with probiotics and natural fibers in adults and children with constipation. **European Review for Medical Pharmacological Science** v.22, n. 20, p. 7045-7057, 2018.

CHAVES, J. B. P. **Avaliação sensorial de alimentos: métodos de análise.** Viçosa: Editora UFV, 1980. 69p. (caderno 37).

CHAVES, J. B. P. **Métodos de diferença em avaliação sensorial de alimentos e bebidas.** Viçosa: Editora UFV, 2001. 91p. (caderno 33).

CHR. HANSEN. Method for counting probiotic bacteria. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacteria* in milk products made with nutrish cultures. **Christian Hansen Horsholm**, Dinamarca: Christian Hansen, p. 9, 1999.

CODEX ALIMENTARIUS. International Food Standarts. **General Principles for the Addition of Essential Nutrients to Foods**, 2015. Disponível em: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXG%2B9-1987%252FCXG_009e_2015.pdf.
Acesso em 12 de janeiro de 2021

COLLETE, V. L.; ARAÚJO, C.L.; MADRUGA, S. W. Prevalência e fatores associados à constipação intestinal: um estudo de base populacional em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, 2007. **Cadernos de Saúde Pública**, v.26, n. 7, 1391-1402, 2010.

COTTER, P.D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v.67, p. 429-453, 2003.

COSTA, A.C.V. **Avaliação da qualidade e segurança microbiológica de suplementos alimentares comercializados no mercado Português**. (Dissertação de Mestrado em Ciências do Consumo e da Nutrição), Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento de Território, Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2016.

COSTA, E.S.; VARALHO; M.A. probióticos e prebióticos: relações com a imunidade e promoção da saúde. **Revista Científica do ITPAC**, v.4 n. 2 p. 4-11, 2011.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENEMA, O.R. **Química dos alimentos**, 4 ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DEL'ARCO, A.P.W. T.; MAGALHÃES, P. QUILICI, F. A. SIM Brasil study – Women's gastrointestinal health: gastrointestinal symptoms and impact on the Brazilian women quality of life. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 54, n. 2, p. 115-122, 2017.

DWIVEDI, M. Role of probiotics in immune regulation. **Acta Scientific Microbiology** v1, n. 1, p. 29-30, 2018.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 6 ed. Vol. 1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/7985json-file-1 . Acesso em 11 de março de 2021

FERRARI, A.S. Microbiota e preferências alimentares: qual a relação? **Revista Brasileira de Nutrição Funcional** v. 46, n. 81, p. 12-23, 2020.

FESTER, K. et al. The production and delivery of probiotics: A review of a aractical approach. **Microorganisms** v. 7, n. 83, p. 1-16. 2019. doi:10.3390/microorganisms7030083

FINLEY J.W. et al. Launching a new food productor dietary supplement in the United States: Industrial, regulatory, and nutritional considerations**. Annual Review of Nutrition** v.34, p 421-447, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**, Canadá, 2002. Disponível: https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf. Acesso: 05 de janeiro de 2021.

GALDEANO, C.M. et al. beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. **Annais of Nutrition & Metabolism** v. 74, p.115-124, 2019.

GANJBAKHSH, S.E.; REZAEE, P. The effect of probiotics on immune system**. Journal of Bacteriology & Mycology Open Access**. v.5, n.4, p.319–320, 2017

GARCIA, L.B. et al. Constipação intestinal: aspectos epidemiológicos e clínicos. **Revista Saúde e Pesquisa** v.9, n. 1, p.153-162, 2016

GALVÃO-ALVES, J. Constipação intestinal. **Jornal Brasileiro de Medicina** v. 101, n.2, p. 31-37, 2013.

GIL, E.S**. Controle fisico-químico de qualidade de medicamentos**, 3ª ed. São Paulo, Pharmabooks, 2010

GOUDARZI, M.; GOUDARZI, H.; RASHIDAN, M. Probiotics: an update on mechanisms of action and clinical applications. **Novelty in Biomedicine** v. 2, p. 22-30, 2014

GOMES, D. O. V. S.; MORAIS, M.B Gut microbiota and the use of probiotics in constipation in children and adolescents: Systematic review. **Revista Paulista de Pediatria**. v. 38, p e2018123, 2019.

GRECO, D.B.; PARIZI, B. Bioética e uso de placebo em pesquisas clínicas. **Brasília Medica** v.51, n.1, p. 1-3, 2014

GUERRA, P.V.P. et al. Pediatric functional constipation treatment with *Bifidobacterium*-containing yogurt: A crossover, double-blind, controlled trial. **World Jounal of Gatroenterology**, v. 17, p. 3916-3921, 2011.

GUOWEI, S. et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* BB01 by xanthan–chitosan: preparation and its stability in pure milk**. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46 p. 588-596, 2018.

HAFFNER, F. B.; DIAB, R.; PASC, A. Encapsulation of probiotics: insights into academic and industrial approaches. **AIMS Materials Science** v. 3, n. 1, p. 114-136, 2016.

HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. **Therapeutic Advances in Gastroenterology** v. 6, n. 1, p. 39-51, 2013

HILL, C. et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic **Nature Review Gastroenterology & Hepatology** v.11, n.8, p.506-14, 2014 doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.

HOJSAK, I. et al. Guidance on the use of probiotics in clinical practice in children with selected clinical conditions and in specific vulnerable groups. **Acta Paedriatica** , v. 15, p 1-11, 2018.

HUI, Y. H. Sensory evaluation of dairy products. In: **Dairy science and technology handbook**. New York: VCH publishers, v. 1, 1992.

IBARRA A., et al., Effects of 28-day *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 supplementation on colonic transit time and gastrointestinal symptoms in adults with functional constipation: A double-blind, randomized, placebo-controlled, and dose-ranging trial. **Gut Microbes**v.9, n.3, p. 236-251, 2018. doi:10.1080/19490976.2017.1412908

IÑIGUEZ-PALOMARES, C. et al. Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. **Revista Latinoamericanica de Microbiology** v. 49, n.3-4, p. 46-54, 2007.

ITAL. Instituto de Tecnologia de Alimentos. **Reações de transformação e vida de prateleira de alimentos processados.** Campinas: Manual técnico, n. 6, 2 ed., 1996.

KARLBERG, J.P.E.; SPEERS, M.A. **Revisão de Estudos Clínicos: Um Guia para o Comitê de Ética.** Centro de Estudos Clínicos, Universidade de Hong Kong RAE de Hong Kong, RP da China Associação para a Certificação de Programas de Proteção em Pesquisas em Humanos, Inc. Washington, DC, EUA, 2010. Disponível em

https://cdn.pfizer.com/pfizercom/research/research_clinical_trials/ethics_committee_guide_portugese.pdf Acesso em 19 de abril de 2021

KLAUS, G.H. et al. Prevalência e fatores associados à constipação intestinal em idosos residentes em instituições de longa permanência. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 18, n.4, p. 835-843, 2015.

LABUZA, T. P.; SCHMIDL, M. K. Accelerated shelf-life testing of foods. **Food Technology**, v. 34, n. 2, p. 67-77, 1985

LACY, B.E.; PATEL, N.K. Rome criteria and a diagnostic approach to irritable bowel syndrome. **Journal of Clinical Medicine,** v. 6, n. 11, p. 1-8, 2017.

LARIJANI, B. et al. Prevention and treatment of flatulence from a traditional persian medicine perspective. **Iranian Red Crescent Medicine Journal** v.1, 2016, p 1-6, 2016, e23664. Disponível em: file:///C:/Users/User/Downloads/PreventionandTreatmentofFlatulence.pdf Acesso em 29/03/2021.

LEHTORANT, L.; LATVALA, S.; LEHTINEN, M.J. Role of probiotics in stimulating the immune system in viral respiratory tract infections: a narrative review N**utrients.** v.12, n. 3163, p. 1-19, 2020. doi:10.3390/nu12103163

LEWIS, S.J.; HEATON, K.W. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. **Scandinavian Journal of Gastroenterology,** v. 32, n. 9, p. 920-923, 1997.

LEWIS, E.D. et al. Efficacy of *Lactobacillus paracasei* HA-196 and *Bifidobacterium longum* R0175 in alleviating symptoms of Irritable Bowel Syndrome (IBS): A randomized, placebo-controlled study. **Nutrients** v.12, n.4, p.1159, 2021 doi:10.3390/nu12041159

MARKOWIAK, P.; SLIZEWSKA, K. Effects of probiotics, prebiotics, and symbiotics on human health. **Nutrition**, v. 9, n. 1021, p. 2-30, 2017.

MARQUES, C.G. et al. Prebiotics and probiotics in health and treatment of gut diseases: an integrative review. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, e6459109071, p 1-42, 2020.

MARTINÉZ-MARTINÉZ M.I.; CALABUIG-TOLSÁ, R.; CAULI, O. The effect of probiotics as a treatment for constipation in elderly people: A systematic review. **Archives Gerontology and Geriatrics** v 7, p. 142-149, 2017.

MARTINEZ, A.P.; AZEVEDO, G.R. Tradução, adaptação cultural e validação da Bristol Stool Form Scale para a população brasileira. Revista. **Latino-America de Enfermagem** v.20, n. 3, p. 1-7, 2012.

MARTINS, G.A.S. **Determinação da vida-de-prateleira por testes acelerados de doce me massa de banana CV prata.** (Dissertação de Mestrado), Curso de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras\ MG, 2009.

MCKENZIE, V.J.; KUENEMAN, J.G.; HARRIS, R.N. Probiotics as a tool for disease mitigation in wildlife: insights from food production and medicine. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v 1429, n 1, p.18-30, 2018.

MEYBODI, N.M.; MORTAZAVIAN, A.M. Probiotic supplements and food products: A comparative approach**. Biochemistry & Pharmacology: Open Access**, v. 6, n. 2, p.1-7, 2017

MILLETTE, M. et al. Gastrointestinal survival of bacteria in commercial probiotic products. **International Journal of Probiotics and Prebiotics** v. 8, n. 4, p.1-8, 2013

MISHRA, V.; PRASAD, D. N. Application of in vitro methods for selection *of Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. **International Journal of Food Microbiology** , v. 103, p 109-115, 2005.

MISRA, S.; MOHANT, D.; MOHAPATRA, S. Applications of probiotics as a functional ingredient in food and gut health. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 7, n.. 3, p. 213-223, 2019.

MISZPUTEN, S.J. Obstipação intestinal funcional. **Atualidades Médicas**, v. 3, p 15-25, 2019.

NASEER, M. et al. Therapeutic effects of prebiotics on constipation: A schematic review. **Current Clinical Pharmacology**, n.15, p. 1-9, 2020. Doi 10.2174/1574884715666200212125035

OLIVEIRA. J.L.; ALMEIDA, C.; BOMFIM, N.C. a importância do uso de probióticos na saúde humana. **Unoesc & Ciência - ACBS**, v. 8, n. 1, p. 7-12, 2017.

OPENEPI. **Estatísticas epidemiológicas de código aberto para saúde pública**. Versão, 2013. Disponível em: http://openepi.com./Menu/OE_Menu.htm Acesso: 03 de março de 2018.

PANDEY, K.R.; NAIK, S.R.; VAKI, B.V. Probiotics, prebiotics and simbiotics: A review. **Journal of Food Science and Technology** v. 52, n. 12, p. 7577–7587, 2015.

PAWAR, K.; THOMPKINSON D.K. Changes in the shelflife parameters of dietary supplement during storage. **Current Research in Nutrition and Food Science** v. 5, n.1, p 15-24,2017.

PIANO, M. D. et al. Comparison of the kinetics of intestinal colonization by associating 5 probiotic bacteria assumed either in a microencapsulated or in a traditional, uncoated form. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 46, p 85-92, 2012.

PIANO, M. D. et al**.** The use of probiotics in healthy volunteers with evacuation disorders and hard stools: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Journal of Clinical Gastroenterology,** v. 44, p. 30-34, 2010.

PINHEIRO, A.K. et al. Constipação intestinal: tratamento com fitoterápicos intestinal. **Revista Científica FAEMA. Faculdade de Educação e Meio Ambiente**. v. 9, n. edição especial, p. 559-564, 2018.

PINHEIRO, J.M.F. et al. Effect of a probiotic mix on functional constipation in adult women: a randomized double-blind study. **O Mundo da Saúde** v. 43, n. 3, p. 622-639, 2019. DOI: 10.15343/0104-7809.20194303622639.

PINTO, L.G.P.N.; SILVA T.F.C.F. A microbiota humana e suas interações: a importância da diversidade da microbiota na manutenção do equilíbrio energético e promoção da saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional**, v. 4, n. 76, p. 17-22, 2018.

PRESTON K. et al. *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 improve quality-of-life and IBS symptoms: a double-blind, randomised, placebo-controlled study. **Beneficial Microbes** v.9, n. 5, p.697-706, 2018 doi:10.3920/BM2017.0105.

RANDOM ALLOCATION SOFTWARE 2.0 FREE. Disponível em https://random-allocation-software.software.informer.com/2.0/. Acesso em 10 de janeiro de 2019.

RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; MILIVOJEVIĆ, V. Nutrition and gut microbiota. **Microbiota in Health and Disease,** v.1, e-193, p 1-6, 2020.

REIS, A.R. **Probióticos, potencialidades e desafios** (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, 2019.

RIEZZO G. et al. Randomised clinical trial: efficacy of Lactobacillus paracasei-enriched artichokes in the treatment of patients with functional constipation--a double-blind, controlled, crossover study. Alimentary Pharmacology and Therapeutic v 35, n.4, p.441-450. 2012. doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04970.x

ROMÃO, F.C. **As bactérias e seus produtos como agentes terapêuticos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Instituto Universitário Egas Moniz, Almada, Portugal, 2019.

RUSSELL, J. B. **Química Geral**. 2 ed. v. 2. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1994.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SANTOS, V.D.S. Desenvolvimento de uma formulação probióticas para prevenção e tratamento de mastites em bovinos. (Dissertação de Mestrado) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo Lorena/SP, 2015

SANTOS JÚNIOR, J.C.M. Constipação intestinal. **Revista Brasileira de Coloproctogia** v. 25, n. 1, p 79-93, 2005.

SHIN, J.E. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic functional constipation in Korea, 2015 Revised Edition. **Journal of Neurogastroenterology and Motility,** v. 22, n. 3, p.382-410, 2016.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**, 5 ed. São Paulo: Blucher, 2017.

SILVA, J.L.V. **Acidez e viscosidade como requisitos de qualidade em bebidas lácteas fermentadas.** (Trabalho de Conclusão de Curso) Curso de Engenharia de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

SILVA, C.M.; RAZZOLINI FILHO, E. **Avaliação da eficácia do Anexo II da RDC 275/02 para o alcance de alimentos seguros em uma indústria de suplementos alimentare** (Especialista em Gestão da Qualidade), Curso MBA em Gestão da Qualidade, Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2014.

SCHMIDT, F.M.Q. et al. Prevalência de constipação intestinal autorreferida em adultos da população geral. **Revista da Escola de Enfermagem da USP** v 49, n.3, p.443-452, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE COLOPROCTOLOGIA (SBCP). **Folhetos informativos em coloproctologia. Constipação**, 2009. Disponível: https://www.sbcp.org.br/pdfs/publico/constipacao.pdf. Acesso: 05 de janeiro de 2021.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNOLOGIA (SBI). **O intestino e o sistema imune**. Disponível em https://sbi.org.br/2019/04/29/o-intestino-e-o-sistema-imune/. Acesso em 06 de janeiro de 2021

SOBRADO, C.W. et al. Diagnosis and treatment of constipation: a clinical update based on the Rome IV criteria. **Journal of Coloproctology**, v. 38, n. 2, p. 137-144, 2018

SOCCOL, C.R. et al. The potential of probiotics: A review. **Food Technology and Biotechnology** v. 48; n.4, p. 413–434, 2010.

SUVOROV, A. Gut microbiota, probiotics, and human health. **Bioscience of Microbiota, Food and Health** v. 32, n.3, p. 81-91, 2013

TACK, J. et al. Diagnosis and treatment of chronic constipation: A European perspective **Neurogastroenterology & Motility** v.23, p.697–710, 2011.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M.; BARBETTA, P. A. **Análise sensorial de alimentos.** Florianópolis: Ed. da UFSC, 1987. 180 p.

THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacteria, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus,* and *Propionibacteria.* **Journal of Dairy Science**, v.86, p. 2288-2296, 2003. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73821-1

TOSCANO, M. A et al. consumer's guide for probiotics: 10 golden rules for a correct use. **Digestive and Liver Disease** v. 49, n. 11, p.1177-1184, 2017.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 1, p.6-21, 2015.

VIJAYARAM, S.; KANNAN, S. Probiotics: The marvelous factor and health benefits. **Biomedical and Biotechnology Research Journal**. v.2, p.1-8, 2018.

XINIAS, I. et al. A Synbiotic Infant Formula with High Magnesium Content Improves Constipation and Quality of Life. **Pediatric Gastroenterology Hepatology**, v. 21, p. 28-33, 2018.

WERTH, B.L. Epidemiology of constipation in adults: Why estimates of prevalence differ. **Journal of Epidemiological Research** v. 5, n. 1, p.37-49. 2019.

WEST, N.P. et al. Probiotics, immunity and exercise: a review. **Exercise Immunology Review** v.15, p.107-126, 2009.

WORD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION. Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia. **Probióticos e prebióticos**, 2017 Disponível emhttps://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-portuguese-2017.pdf Acesso em 25 de maio de 2020.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION Practice Guidelines. **Constipação: uma perspectiva mundial,** 2010 Disponível em https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/constipation-portuguese-2010.pdf Acesso em 26 de maio de 2020.

ZENEBON, O. PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. (org). Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 4 ed., 1 ed. Digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. Disponível em https://wp.ufpel.edu.br/nutricaobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf. Acesso em 15/03/2021

ZOMMITI, M.; FEUILLOLEY M.G.J.; CONNIL, N. Update of probiotics in human world: A nonstop source of benefactions till the end of time. **Microorganisms** 2020, v.8, n.1907, p. 1-33 2020. doi:10.3390/microorganisms8121907

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ANEXO B
(PACIENTE Nº)
TCLE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) desta pesquisa. A sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, poderá desistir e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará
O(a) Sr(a) assinará duas vias originais deste termo, onde constam o telefone e endereço do pesquisador(a) responsável e equipe de pesquisa, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação. Uma via ficará

Título da pesquisa: Avaliação de formulações com misturas de probióticos em indivíduos saudáveis com constipação intestinal estudo randomizado duplo cego.

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Profa. Dra. MARLI GERENUTTI
ENDEREÇO: Rodovia Raposo Tavares Km 92,5. CEP 18023-000. Sorocaba-SP
TELEFONE: 15 21017104

PESQUISADORA PARTICIPANTE: Ms. FABIANA CRISTINA ROSA MITELMÃO
ENDEREÇO: RUA FRANCISCO PRADO ARO, 450, Sorocaba, SP.
TELEFONE: 15 981162387

PESQUISADORA PARTICIPANTE: Dra. KARIN HACKEL
ENDEREÇO: Av. Dr Armando Sales de Oliveira 371, Trujillo – Sorocaba -SP
TELEFONE: 15 30192100

OBJETIVOS: O objetivo geral desta pesquisa é comparar a exposição a duas formulações de misturas de probióticos, com a evolução clínica do sintoma de constipação intestinal em indivíduos saudáveis.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO:
Trata-se de um ensaio clínico, duplo-cego, randomizado e placebo controle, com exposição aos probióticos, por um período de 30 dias consecutivos, a ser finalizado em 36 meses. Destina-se a avaliar a eficiência de duas misturas probióticas diferentes: (1) *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus ramnosus* (3 bilhões de UFC); (2) *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus ramnosus, Lactobacillus paracasei, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium lactis.*

RISCOS, DESCONFORTOS E O COMO O PARTICIPANTE SERÁ ATENDIDO
Os possíveis riscos e ou desconfortos: Diarréia, alergia a algum item da formulação, náuseas, vômito. Caso ocorra o desconformo, o participante deverá receber atendimento médico na "Clínica de Gastroenterologia Dra. Karin Häckel" localizada no Município de Sorocaba, São Paulo, Brasil.
NESTE CASO: Deverá informar ao pesquisador caso ocorra algum desconforto e se pretende continuar na

CUSTO/REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE: Não se aplica
CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: Todos os dados são de uso apenas para a pesquisa citada

_____
Assinatura do Pesquisador Responsável:

TERMO DE CONSENTIMENTO DE PARTICIPANTE DA PESQUISA

Eu,_____, RG _____, CPF _____, declaro que li as informações contidas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto intitulado " ", que tem como pesquisador(a) responsável e equipe de pesquisa e, fui devidamente informado (a) dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa e concordo em participar.

Foi garantido ao participante da pesquisa:

- Que todas as informações obtidas a seu respeito neste estudo, serão analisadas em conjunto com as de outros participantes, não sendo divulgada a sua identificação ou de outros participantes em nenhum momento;
- Que pode retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade;
- A qualquer momento, se for de seu interesse, pode ter acesso a todas as informações obtidas a seu respeito;
- Quando o estudo for finalizado, será informado sobre os principais resultados e conclusões obtidos neste estudo.

Declaro que recebi uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e concordo em participar da pesquisa.

Sorocaba, de de

NOME E ASSINATURA DO PARTICIPANTE OU RESPONSÁVEL:

Nome por extenso:

Assinatura:

APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO PARA REALIZAÇÃO DA PESQUISA

ANEXO A
QUESTIONÁRIO PARA REALIZAÇÃO DA PESQUISA CLÍNICA (PACIENTE Nº)
Título da pesquisa: Avaliação de formulações com misturas de probióticos em indivíduos saudáveis com constipação intestinal estudo randomizado duplo cego.
Empresa fabricante: Roberg Alimentos e Medicamentos da Natureza Ltda.
Instituição de pesquisa: Universidade de Sorocaba (UNISO)
Nome:
Idade:
Sexo:
Frequência semanal de evacuações:
Características das fezes tipo:
Medicamentos de uso contínuo:
Critérios de inclusão: Indivíduos que procuram a clínica de gastrologia com queixas de distúrbios para
Critérios de exclusão: Uso de antibióticos, prebióticos, probióticos ou doenças gastrointestinais, gravidez.
Data de início:
Data final:
Lote do sachê:
Data de Fabricação:
Data de Validade:
Modo de uso: Tomar um sachê dissolvido em um copo de água ao se levantar durante 30 dias, sem interrupção ou colocar o pó diretamente no alimento.
Descrever qualquer reação, caso ocorra:
Seguindo a tabela abaixo, assinale com um "X" a opção (ou opções) realizadas por dia de tratamento. Cada "X" equivale a uma evacuação. Caso não tenha evacuações marque com um "X" na última linha (não houve).

DIAS DE TRATAMENTO / TIPOS DE FEZES	1° dia	2° dia	3° dia	4° dia	5° dia	6° dia	7° dia	8° dia	9° dia	10° dia	11° dia	12° dia	13° dia	14° dia	15° dia
TIPO 1 Fezes "em bolinha", duras e separadas, É preciso fazer força para as fezes passarem.															
TIPO 2 Fezes moldadas, mas duras e com bolas agrupadas que podem se soltar. É preciso fazer força para as fezes passarem															
TIPO 3 Fezes moldadas, em forma de salsicha e com algumas rachaduras na superfície.															
TIPO 4 Fezes moldadas, compridas, em forma de salsicha e com superfície lisa Fáceis de evacuar															
TIPO 5 Fezes não moldadas, em pedaços e moles. Fáceis de evacuar															
TIPO 6 Fezes pastosas ou semi-líquidas, com alguns pedaços moles misturados															
TIPO 7 Fezes líquidas, sem pedaços sólidos															
Não houve															

DIAS DE TRATAMENTO / TIPOS DE FEZES	16° dia	17° dia	18° dia	19° dia	20° dia	21° dia	22° dia	23° dia	24° dia	25° dia	26° dia	27° dia	28° dia	29° dia	30° dia
TIPO 1 Fezes "em bolinha", duras e separadas, É preciso fazer força para as fezes passarem.															
TIPO 2 Fezes moldadas, mas duras e com bolas agrupadas que podem se soltar. É preciso fazer força para as fezes passarem															
TIPO 3 Fezes moldadas, em forma de salsicha e com algumas rachaduras na superfície.															
TIPO 4 Fezes moldadas, compridas, em forma de salsicha e com superfície lisa Fáceis de evacuar															
TIPO 5 Fezes não moldadas, em pedaços e moles. Fáceis de evacuar															
TIPO 6 Fezes pastosas ou semi-líquidas, com alguns pedaços moles misturados															
TIPO 7 Fezes líquidas, sem pedaços sólidos															
Não houve															

(PACIENTE Nº)

APÊNDICE C - LISTA PARA ASSINATURA DE RETIRADA DO “KIT” DE PROBIÓTICOS

Nº	Nome do individuo	Data de retirada do Kit na clínica	Lote do sachê	ASS	Data de devolução do questionário	ASS	Telefone de contato
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							

APÊNDICE D – RANDOMIZAÇÃO PRA RETIRADA DOS “KITS” DE PROBIÓTICOS

Lista de Randomização

0001: 190105 0003: 190109 0005: 190116 0007: 190116 0009: 190116
0002: 190109 0004: 190105 0006: 190105 0008: 190109
0010: 190109 0012: 190105 0014: 190105 0016: 190109 0018: 190116
0011: 190116 0013: 190105 0015: 190109 0017: 190116
0019: 190105 0021: 190109 0023: 190105 0025: 190116 0027: 190116
0020: 190109 0022: 190105 0024: 190109 0026: 190116
0028: 190109 0030: 190109 0032: 190116 0034: 190105 0036: 190109
0029: 190105 0031: 190116 0033: 190105 0035: 190116
0037: 190116 0039: 190116 0041: 190105 0043: 190109 0045: 190109
0038: 190116 0040: 190105 0042: 190105 0044: 190109
0046: 190105 0048: 190105 0050: 190109 0052: 190109 0054: 190116
0047: 190105 0049: 190116 0051: 190116 0053: 190109
0055: 190116 0057: 190109 0059: 190105 0061: 190116 0063: 190116
0056: 190105 0058: 190109 0060: 190109 0062: 190105
0064: 190105 0066: 190105 0068: 190116 0070: 190109 0072: 190116
0065: 190109 0067: 190109 0069: 190116 0071: 190105
0073: 190105 0075: 190109 0077: 190109 0079: 190109 0081: 190105
0074: 190116 0076: 190116 0078: 190116 0080: 190105
0082: 190105 0084: 190105 0086: 190116 0088: 190109 0090: 190116
0083: 190109 0085: 190105 0087: 190109 0089: 190116
0091: 190109 0093: 190109 0095: 190105 0097: 190105 0099: 190116
0092: 190109 0094: 190116 0096: 190105 0098: 190116
0100: 190116 0102: 190109 0104: 190109 0106: 190105 0108: 190105
0101: 190116 0103: 190105 0105: 190116 0107: 190109
0109: 190105 0111: 190105 0113: 190109 0115: 190116 0117: 190105
0110: 190116 0112: 190109 0114: 190116 0116: 190109
0118: 190105 0120: 190105 0122: 190109 0124: 190109 0126: 190105
0119: 190109 0121: 190116 0123: 190116 0125: 190116
0127: 190105 0129: 190116 0131: 190105 0133: 190109 0135: 190116
0128: 190116 0130: 190105 0132: 190109 0134: 190109
0136: 190109 0138: 190116 0140: 190116 0142: 190109 0144: 190116
0137: 190105 0139: 190105 0141: 190105 0143: 190109
0145: 190105 0147: 190105 0149: 190105 0151: 190109 0153: 190116
0146: 190116 0148: 190109 0150: 190109 0152: 190116

APÊNDICE E - GRÁFICOS PARA DETERMINAÇÃO CONCENTRAÇÃO *VERSUS* TEMPO; DO LOG DA CONCENTRAÇÃO *VERSUS* TEMPO E DO INVERSO DA CONCENTRAÇÃO *VERSUS* TEMPO

Gráfico da concentração % de bactérias probióticas *versus* tempo (meses) - ordem zero

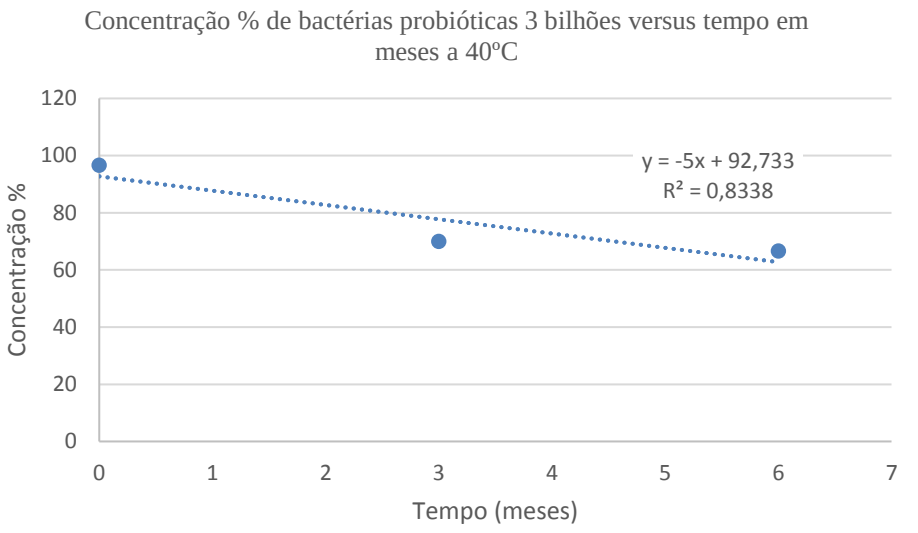


Gráfico ln concentração % de bactérias probióticas *versus* tempo (meses) de 1ª ordem

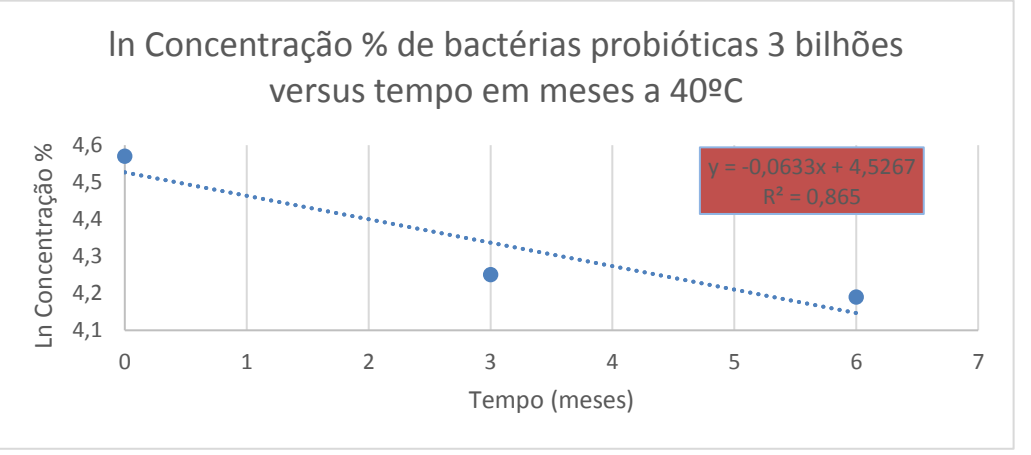


Gráfico da concentração % de bactérias probióticas *versus* tempo (meses) - 2ª ordem

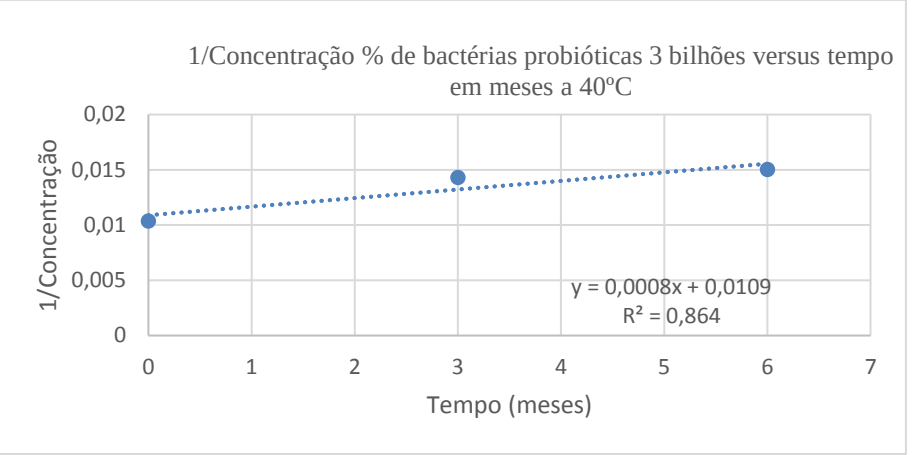


Gráfico da concentração % de bactérias probióticas *versus* tempo (meses) - ordem zero

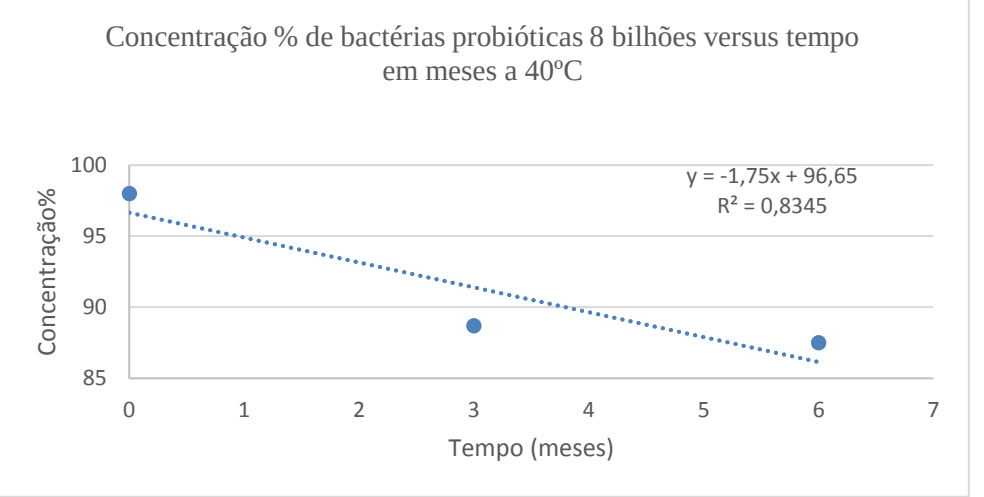


Gráfico ln concentração % de bactérias probióticas *versus* tempo (meses) - 1ª ordem

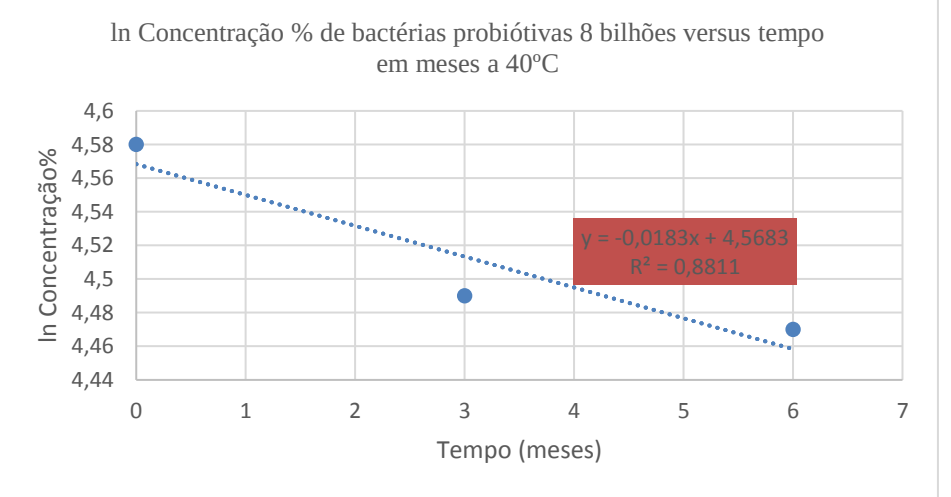


Gráfico da concentração % de bactérias probióticas *versus* tempo (meses) - 2ª ordem

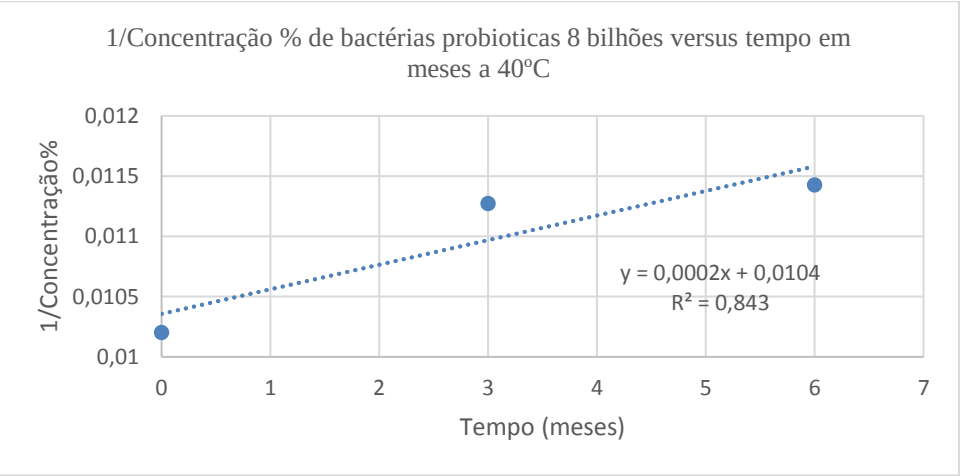


Gráfico da concentração % de bactérias probióticas *versus* tempo (meses) - ordem zero

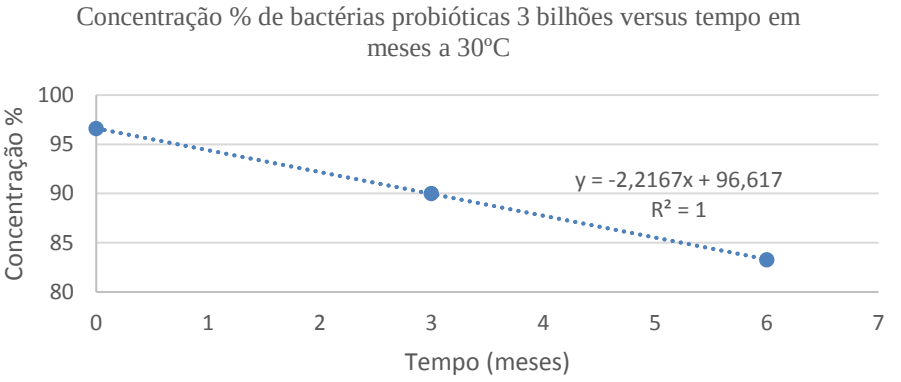


Gráfico ln concentração % de bactérias probióticas *versus* tempo (meses) - 1ª ordem

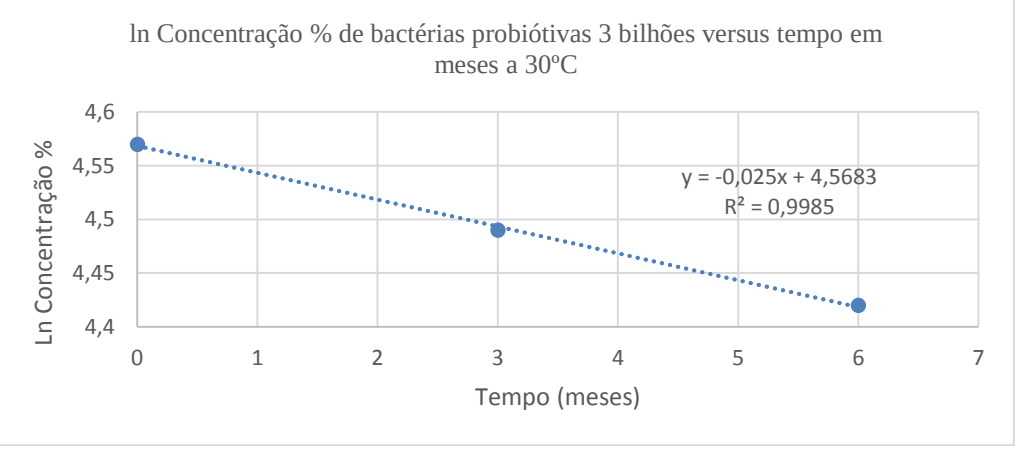


Gráfico 1/Concentração % de bactérias probióticas *versus* tempo (meses) - 2ª ordem

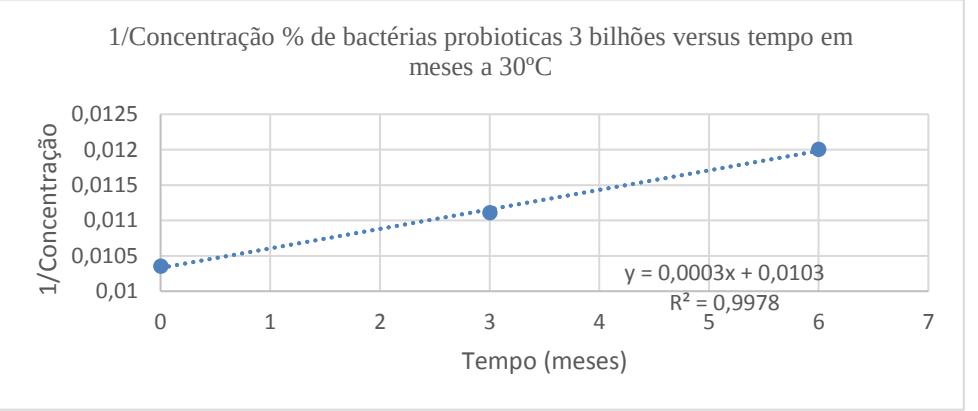


Gráfico da concentração % de bactérias probióticas *versus* tempo (meses) - ordem zero

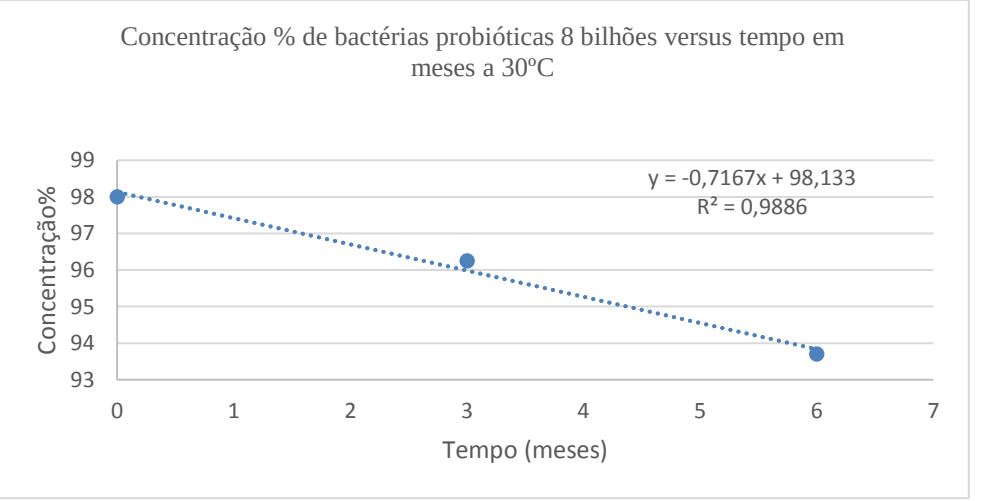


Gráfico ln concentração % de bactérias probióticas *versus* tempo (meses) - 1ª ordem

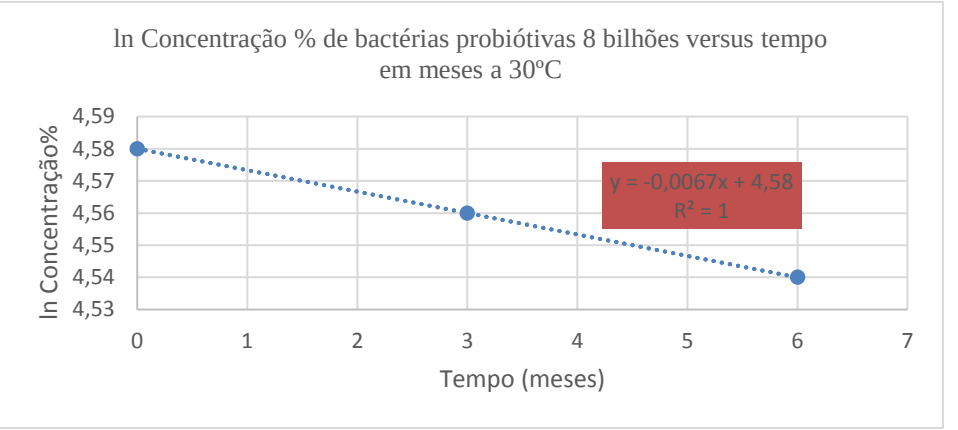
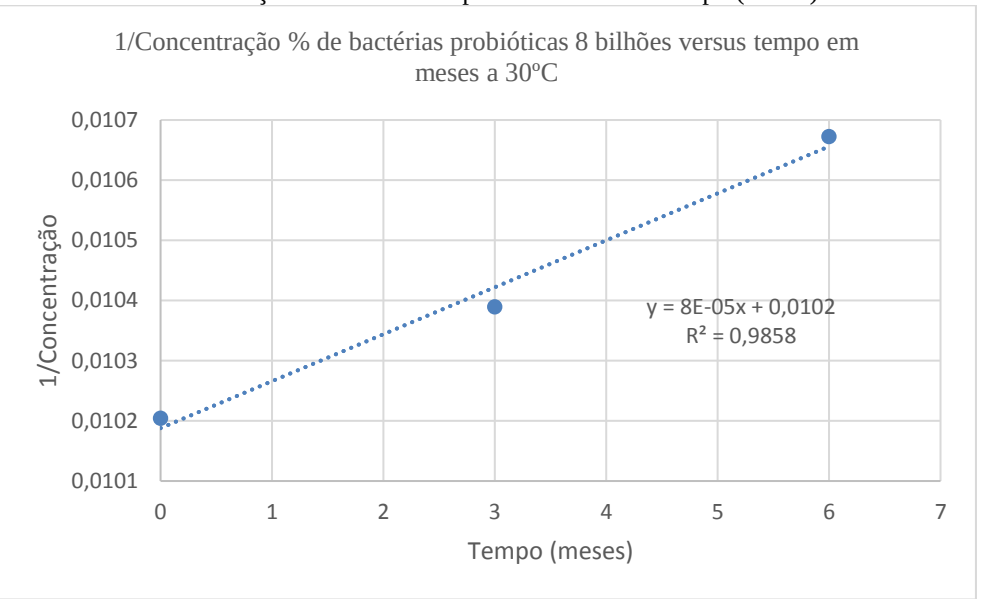


Gráfico 1/Concentração % de bactérias probióticas *versus* tempo (meses) - 2ª ordem



ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS DA UNIVERSIDADE DE SOROCABA (CEP-UNISO)

UNIVERSIDADE DE SOROCABA

PlataformaBrasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação de formulações com misturas de probióticos em indivíduos saudáveis com constipação intestinal.

Pesquisador: FABIANA CRISTINA ROSA MITELMÃO

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 84003418.9.0000.5500

Instituição Proponente: Universidade de Sorocaba - UNISO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.100.877

Apresentação do Projeto:

O projeto "Avaliação de formulações com misturas de probióticos em indivíduos saudáveis com constipação intestinal". Proposto pela pesquisadora responsável Fabiana Cristina Rosa Miltemão. Encontra-se aprovado por este Comitê em 11 de setembro de 2018. Trata-se de um ensaio clínico, duplo-cego, randomizado e placebo controle, por um período de três anos, para avaliar a eficiência de duas misturas probióticas diferentes. A pesquisadora responsável submete a este comitê a inclusão de uma pesquisadora para compor a equipe.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral desta pesquisa é comparar a exposição a duas formulações, com misturas de probióticos, com a evolução clínica do sintoma de constipação intestinal em indivíduos saudáveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Diarréia, alergia a algum item da formulação, náuseas, vômito. Caso tenha alguma dessas reações será suspenso o uso e procura da clínica responsável pela pesquisa, os sintomas desaparecem com a interrupção do tratamento.

Benefícios: Regulação da flora intestinal, aumento da absorção de nutrientes, melhoria significativa no número de movimentos intestinais semanais e nos principais problemas associados às evacuações, particularmente na consistência das fezes e na facilidade de expulsão.

UNIVERSIDADE DE SOROCABA

Continuação do Parecer: 4.190.697

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa é de interesse em função de avaliar a ação de probióticos para o funcionamento normal do intestino. A constipação intestinal é uma queixa muito comum nos dias de hoje com etiologia complexa e variada. Neste sentido, a busca por tratamentos não medicamentosos é de relevância.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Solicita-se a pesquisadora responsável a postagem de uma notificação com a solicitação da inclusão da pesquisadora Marta Maria Vila, como carta anexa.

E a inclusão do Currículo Lattes da pesquisadora incluída.

Recomendações:

Recomenda-se a pesquisadora a inclusão do Currículo lattes da pesquisadora e a submissão da notificação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Submissão na Plataforma Brasil de uma notificação para inclusão de uma pesquisadora na equipe.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto com emenda Aprovado na Reunião do Colegiado CEP-Uniso, no dia 10 de junho de 2020.

Solicita-se a pesquisadora submeter na Plataforma Brasil uma notificação de inclusão de uma pesquisadora, bem como a postagem do currículo lattes da pesquisadora. A pesquisadora ainda não foi incluída neste projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1563551_E_ET.pdf	21/06/2020 14:41:11		Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta.docx	21/06/2020 14:37:40	FABIANA CRISTINA ROSA MATEOS 06947	Aceito
Outros	Fabiana.pdf	18/06/2018 09:37:29	FABIANA CRISTINA ROSA MATEOS 06947	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Pesquisador	Projeto_Detalhado_03_04_2018.pdf	04/04/2018 17:49:22	Marli Gonzaga	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_apresentacao_projeto_pesquisa_ao_CEP.pdf	04/04/2018 17:37:47	Marli Gonzaga	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência de TCLE	TCLE_03_04_2018.pdf	04/04/2018 17:35:12	Marli Gonzaga	Aceito

Endereço: Rodovia Raposo Tavares, km 92,5
Bairro: Vila Artura CEP: 18.023-000
UF: SP Município: SOROCABA
Telefone: (15)3231-7288 Fax: (15)3231-7273 E-mail: cep@uniso.br

UNIVERSIDADE DE SOROCABA

PlataformaBrasil

Coordenação de Pesquisa - [illegible]

Ausência	TCLE_03_04_2018.pdf	04/04/2018 17:35:12	Marli Gonçalves	Aceito
Outros	CVDRAKARINHACKEL.pdf	29/05/2018 14:52:44	FABIANA CRISTINA ROSA MITELMAO	Aceito
Outros	Curriculo_Fabiana_Mitelmao.pdf	28/05/2018 17:28:07	Marli Gonçalves	Aceito
Outros	ANEXO_A_Questionario.docx	28/05/2018 17:24:34	Marli Gonçalves	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	28/05/2018 17:19:28	Marli Gonçalves	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SOROCABA, 20 de Junho de 2020

Assinado por:
Raquel de Mendonça Moss Castro
(Coordenador(a))

ANEXO B – PUBLICAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO I CONGRESSO BRASILEIRO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

CERTIFICADO

I CoBICET

Certificamos que o trabalho DESENVOLVIMENTO **FORMULAÇÕES PROBIÓTICAS PARA O TRATAMENTO DA CONSTIPAÇÃO INTESTINAL** de autoria de **FABIANA ROSA MITELMÃO, CRISTIANE DE CASSIA BERGAMASCHI, MARLI GERENUTTI, KARIN HÄCKEL, VICTOR MANUEL BALCÃO e MARTA MARIA DUARTE CARVALHO VILA** foi apresentado no formato de *anais online* no " I Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciências e Tecnologia – Um Mundo em Constante Transformação, realizado em entre 31 de agosto e 04 de setembro

Codigo de autenticidade 2869188.0167710.073353.8.8915883594453347767 8 https://www.even3.com.br/documentos

Profa Dra. Poliana Mendes de Souza
Presidente I CoBICET

Evento online, 04 de setembro de 2020.

ANEXO C – CERTIFICADO DO V CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS QUE

FABIANA ROSA MITELMÃO

realizou uma apresentação do trabalho "FORMULAÇÕES PROBIÓTICAS PARA O TRATAMENTO DA CONSTIPAÇÃO INTESTINAL: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO" exposta no V congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas que ocorreu entre 1 a 3 de outubro de 2020 digitalmente e gerou este certificado no total de 1 horas

Outros autores:
Cristiane de Cassia Bergamaschi, Marli Gerenutti, Karin Häckel, Victor Manuel Balcão, Marta Maria Duarte Carvalho Vila

FLÁVIO DA SILVA EMERY
Presidente da ABCF

RICARDO NEVES MARRETO
Presidente do V Congresso ABCF

V ABCF CONGRESSO

ABCF

ANEXO D - CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO DO INTERNATIONAL WORKSHOP ON RATIONAL USE OF MEDICINES / III WORKNOWLEDGE OF EVIDENCE-INFORMED POLICY / III SYMPOSIUM ISPE BRAZINT RIG / I SYMPOSIUM OF ISPE BRAZILIAN STUDENT CHAPTERS

V International Workshop on Rational Use of Medicines
III Worknowledge of Evidence-Informed Policy
III Symposium ISPE Brazilian International RIG
I Symposium of ISPE Brazilian Student Chapters

CONFIRA A AUTENTICIDADE DESTE CERTIFICADO www.portalrealize.com.br

CERTIFICATE

We certify that the abstract entitled "PROBIOTIC FORMULATIONS FOR THE TREATMENT OF INTESTINAL CONSTIPATION: DEVELOPMENT AND EVALUATION", by the following author(s): FABIANA CRISTINA ROSA MITELMÃO, KARIN HäCKEL, CRISTIANE DE CASSIA BERGAMASCHI, MARTA MARIA DUARTE CARVALHO VILA, MARCUS T SILVA, VICTOR M. BALCÃO, MARLI GERENUTTI, was presented in the form of a Pôster (Resumo simples) at the V International Workshop on Rational Use of Medicines / III Worknowledge of Evidence-Informed Policy / III Symposium ISPE BrazInt RIG / I Symposium of ISPE Brazilian Student Chapters, event held online, in 01 a 05 de Março de 2021.

Identifier: 05f5669acfa21f961044355af750b93a

Online Event, March 1st to 5th, 2021.

CRISTIANE DE CÁSSIA BERGAMASCHI
COORDINATOR OF THE GRADUATE COURSE IN PHARMACEUTICAL SCIENCES

LUCIANE CRUZ LOPES
CONGRESS PRESIDENT
PAHO/WHO EVIPNET-BRAZIL SERIEMA CENTER
PROFESSOR OF THE GRADUATE COURSE IN PHARMACEUTICAL SCIENCES

ANEXO E – ARTIGO PUBLICADO - THE EFFECT OF PROBIOTICS ON FUNCTIONAL CONSTIPATION IN ADULTS: DOUBLE-BLIND, RANDOMIZED, PLACEBO-CONTROLLED STUDY

Fabiana Cristina Rosa Mitelmão, PhD student[1], Cristiane de Cassia Bergamaschi, PhD[1], Marli Gerenutti, PhD[2], Karin Hackel, MD[3], Marcus Tolentino Silva, PhD[1], Victor M. Balcão PhD[1,4], Marta Maria Duarte Carvalho Vila, PhD[1]

[1] University of Sorocaba, Sorocaba, Brazil

[2] Pontifical Catholic University of São Paulo, Sorocaba, Brazil

[3] Clinic of Gastroenterology Dr. Karin Häckel, Sorocaba, Brazil

[4] Department of Biology and CESAM, University of Aveiro, Campus Universitario de Santiago, P-3810-193 Aveiro, Portugal

Abstract

Background: Evacuation disorders are common in industrialized countries, affecting an average of 15-20% of the healthy adult population. Probiotic therapy can reduce functional constipation and increase both the number of weekly bowel movements and quality of stools. Based on the hypothesis that a combination of more strains may provide better results for constipation and facilitate adherence to treatment, this study will evaluate the efficacy and safety of a combination of different strains of *Lactobacillus sp* and *Bifidobacterium Sp* in functional constipation.

Methods: A single-centre trial of adults aged 20-80 years with intestinal constipation will be conducted at a Gastroenterology Clinic in Sorocaba, State of São Paulo, Brazil. Participants will be allocated into three groups receiving: (1) mixture of 3 probiotics: (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus rhamnosus* (3×10^9 CFU)); (2) mixture of 8 probiotics *(Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium animallis* (8×10^9 CFU)); or (3) placebo, for 4 weeks. The outcomes of interest will be change in frequency of weekly bowel movements, change in

stool quality according to the 4-6 Bristol scale, number of volunteer withdrawal, number of adverse events and number of serious adverse effect.

Discussion: The probiotic products are expected to induce beneficial changes in the intestinal microbiota, thereby increasing intestinal frequency to over 3 times a week and improving stool quality. The results can guide patients and healthcare practitioners and help in decision-making in the treatment of functional constipation.

Trial registration and Registry name: ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04437147, The Effect of Probiotics on Functional Constipation in Adults: Study protocol for Double blind, Randomized, Placebo controlled Study

Abbreviations: CFU: Colony-Forming Unit, BSFS: Bristol Stool Form Scale

Keywords: *Lactobacillus ssp, Bifidobacterium ssp*, Intestinal Constipation, Probiotics

Protocol Version: Version 00 30th August 2020

Introduction

Of the gastrointestinal disorders, constipation is one of the most reported conditions in clinical practice (1,2). Constipation affects 15% to 20% of adults, of which 33% are over 60 years old, with predominance in females. The medical history of patients with constipation should be analysed together with parameters such as faecal consistency, defecator frequency, effort when defecating, feeling of incomplete evacuation, abdominal pain and discomfort, use of laxatives, surgical history, comorbidities, lifestyle and work activity (3). Functional constipation is based on symptoms of non-organic origin and diagnosed by the diagnostic criteria of Rome IV (4). The Bristol stool scale can help patients assess and describe aspects of their stool, facilitating the recognition of constipation severity (5). (Annex A)

Intestinal constipation impacts quality of life and can lead to significant costs in the search for treatments and purchase of laxatives (1, 6). The treatment of constipation is a challenge in that are used osmotic, stimulating, irritating and prokinetic laxatives (2). However, it appears that up to 47% of patients are not completely satisfied due to inconsistent response to laxatives and concerns about their safety, adverse effects, taste, inconvenience and cost (7).

Currently, it is known that there is an important interaction between microbes and intestinal physiology. Therefore, probiotics have been used to treat many intestinal problems (8), such

as infectious diarrhoea, diarrhoea associated with antibiotics, diarrhoea associated with *Clostridium difficile*, hepatic encephalopathy, ulcerative colitis, irritable bowel syndrome, functional gastrointestinal disorders, necrotizing enterocolitis and functional constipation (9-11).

Although the human microbiome comprises more than 400 bacterial species, evidence has shown that a decrease in the population of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in adults can result in intestinal constipation (12-14). Consequently, the probiotics used in humans for the treatment of constipation are more often of the species *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. According to Ceresola et al. (8), these *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* can shorten the migratory myoelectric complex period and accelerate small intestine transit, partly due to increased release of serotonin (5-HT) which has pro-motility effects.

Clinical trials evaluating different strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in the treatment of intestinal constipation have observed promising results (15-19), as well as systematic review on the topic (20). However, there is no consensus on probiotic strains and dosages for the treatment of constipation (12, 21).

Strain selection is an important step in the production of a probiotic. Probiotics should have a beneficial effect on the host and remain viable throughout the product lifetime (22).

This clinical trial will evaluated the efficacy and the safety of two different probiotic formulations compared to placebo. One of them is composed by four strains of *Lactobacillus* (*acidophilus, rhamnosus, paracasei and casei*) and four strains of *Bifidobacterium* (*bifidum, longum, lactis, and animalis*), given these are widely used in the treatment of adults with functional constipation. The other formulation will constitute two strains of *Lactobacillus* (*acidophilus, rhamnosus*) and one strain of *Bifidobacterium* (*bifidum*). Thus, this study will be to confirm whether these quantity of strains significantly influence constipation.

2. Methods

It is a single-center, controlled, randomized and blinded clinical trial outlined in accordance with the criteria set out by the SPIRIT statement. (23).

Study design and setting

This study is parallel and has the structure of superiority working with the hypothesis that the groups that will receive probiotics are more effective than the group that will receive the placebo (constituted of only fibers, vitamins and minerals which is a conventional treatment for constipation).

Over a 4-week period, a single-centre, double-blind, randomized, placebo-controlled study of 150 patients (50 patients per group) with functional constipation will be treated using probiotics containing 3 billion CFU of mixed strains probiotics containing 8 billion CFU of mixed strains or placebo.

The study will be conducted in Clinic of Gastroenterology Dr. Karin Häckel, localized in Sorocaba, State of São Paulo, Brazil. Patient recruitment for this study will be carried out through a collaborative effort between the University of Sorocaba and physician Karin Häckel that attending in Clinic of Gastroenterology. From the university, a flyer will be sent out via e-mail and letters distributed around Campus or messages texted via cell phone, and social media will also be exploited to promote the study.

The recruitment will be until the date of November 30, 2020. After verbal and written explanation, individuals who agreed to participate in the study will sign the Free and Informed Term of Consent already approved by the Ethics Committee of the University of Sorocaba. (Annex B)

Eligibility criteria

Inclusion criteria

- Patients eligible for the trial are adults aged 20 to 80 years;
- Clinical diagnosis of functional constipation according to Rome IV. The Rome IV Consensus defines functional constipation as a dysfunction that manifests with difficult, infrequent and incomplete bowel movements. The constipation must have started 6 months previous and become more frequent in the last 3 months, including two or more of the following characteristic: involving <25% of bowel movements: effort, hardened resistance (Bristol scale 1-2), feeling of incomplete removal, sensation of anorectal obstruction, digital manoeuvres to facilitate the exit of faecal content, less than 3 spontaneous bowel movements/week and need for laxatives (4);

- Granting of written informed consent.

Exclusion criteria

- Presence of gastrointestinal diseases;
- Use of antibiotics or dietary supplements containing probiotics or prebiotics in the last 15 days;
- Pregnancy

Interventions

Participants will be instructed to take a sachet before breakfast, in the form of mix or powder in water and drink, and to store the sachets at room temperature. To improve adherence to the treatment, messages will be sent and/or phone calls made to verify that participants are following the protocol correctly and that these are working as intended. During the clinical trial, the use of laxatives will be prohibited.

The study is composed by three parallel arms:

- **Active comparator: 3 Billion CFU strains of probiotics**

Lactobacillus acidophilus LA 02 ID 1688 1 billion CFU, *Bifidobacterium bifidum* BB 01 ID 1722 1 billion CFU, *Lactobacillus rhamnosus* LR 04 ID 1132 1 billion CFU, Vitamin C (Ascorbic acid) 45 mg, Vitamin B1 (Thiamine) 1.1 mg, Vitamin B2 (Riboflavin) 1.1 mg, Vitamin D-3 40,000,000 IU/GR (Cholecalciferol) 34 mcg, Magnesium hydroxide 0.3 g, Calcium Carbonate 0.5 g, Natural Vanilla Flavour Powder 0.03 g, Fos (Fructooligosaccharides) qsp 3 g, for 30 days, once daily in the form of sachet.

Assigned Interventions: Dietary Supplement of fibers plus vitamins and minerals will be administered for 30 days once daily in sachets containing 3 billion CFU strains of probiotics

- **Active comparator: 8 billion CFU strains of probiotics**

Lactobacillus paracasei LPC 00 ID 1076 1 billion CFU; *Bifidobacterium longum* BL 03 ID 1152 1 billion CFU; *Bifidobacterium lactis* BS 01 ID 1195 1 billion CFU; *Lactobacillus casei* LC 03 ID 1872 1 billion CFU; *Bifidobacterium animalis* THT 010803 1 billion CFU; *Lactobacillus acidophilus* LA 02 ID 1688 1 billion CFU, *Bifidobacterium bifidum* BB 01 ID 1722 1 billion CFU, Lactobacillus rhamnosus LR 04 ID 1132 1 billion CFU, Vitamin C

(Ascorbic acid) 45 mg, Vitamin B1 (Thiamine) 1.1 mg, Vitamin B2 (Riboflavin) 1.1 mg, Vitamin D-3 40,000,000 IU / GR (Cholecalciferol) 34 mcg, Magnesium hydroxide 0.3 g, Calcium Carbonate 0.5 g, Natural Vanilla Flavour Powder 0.03 g, Fos (Fructooligosaccharides) qsp 3 g, for 30 days, once daily in the form of sachet

Assigned Interventions: Dietary Supplement: Fibers plus vitamins and minerals will be administered for 30 days once daily in sachets containing 8 billion CFU strains of probiotics.

- **Placebo comparator: Placebo**

Vitamin C (Ascorbic acid) 45 mg, Vitamin B1 (Thiamine) 1.1 mg, Vitamin B2 (Riboflavin) 1.1 mg, Vitamin D-3 40,000,000 IU/GR (Cholecalciferol) 34 mcg, Magnesium hydroxide 0.3 g, Calcium Carbonate 0.5 g, Natural Vanilla Flavour Powder 0.03 g, Fos (Fructooligosaccharides) qsp 3 g, for 30 days, once daily in the form of sachet

Assigned Interventions: Dietary Supplement of fibers plus vitamins and minerals will be administered for 30 days once daily in sachets.

Measured outcomes

Primary outcomes

Changes in the frequency of bowel movements and in stool quality will be noted down in a table which the patient must fill out with information about daily frequency and type of stool (on a scale of 1-7 of the Bristol scale, or whether there was no bowel movement).

Stool form will be assessed using the BSFS (Bristol Stool Form Scale), a simple tool for estimating intestinal transit time (5). The BSFS classifies stools into seven categories, including type 1, separate hard lumps, like nuts; type 2, sausage-shaped, but lumpy; type 3, like a sausage but with cracks on the surface; type 4, like a sausage or snake, smooth and soft; type 5, soft blobs with clear-cut edges; type 6, fluffy pieces with ragged edges, a mushy stool; type 7, watery, no solid pieces (5). These types are categorized into slow transit (types 1 and 2), normal transit (types 3–5) and fast transit (types 6 and 7).

The metric of analysis will be the comparison between 0 and 30 days, considering that the number of effective bowel movements over 4 times a week is an effective value for the treatment and the quality of the stools from 3 to 5.

Secondary outcomes

The number of patients and adverse events will be recorded. Adverse events are undesirable signs or symptoms that occur during the study and whose cause may or may not be causal related to the treatment. All adverse events considered possibly, probably or related to the test product will be noted down on the patient's form (13). The number of patients and adverse events will be recorded.

Serious adverse events are defined as events that are fatal, life-threatening, disabling or result in hospitalization or prolonged stay, or result in malformation, whether related to the test product or otherwise (13)

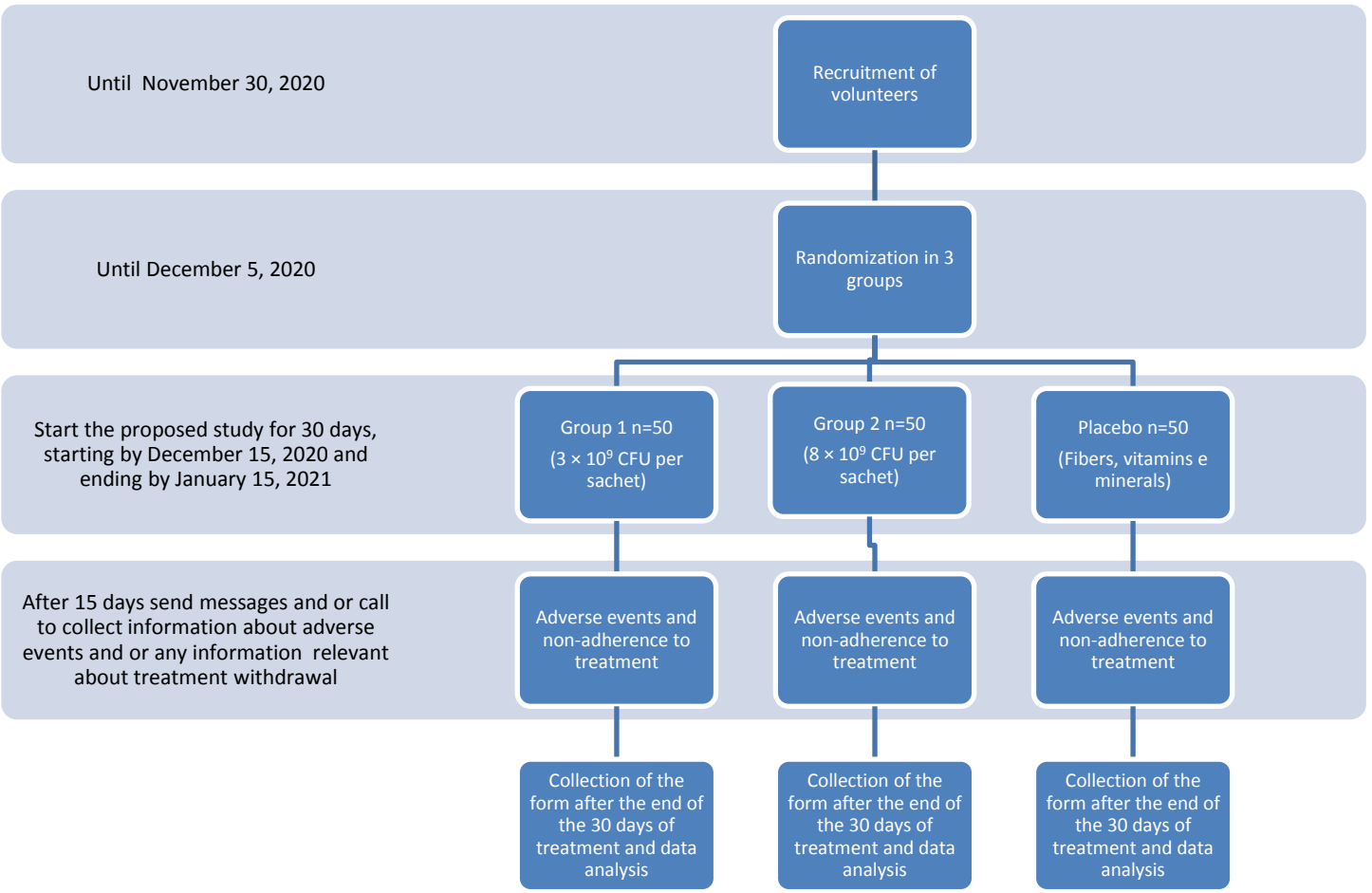
According to previous studies, probiotics are safe and any serious adverse event that could possibly, probably or be related to the test products will be considered unexpected. All unexpected serious adverse events will be reported to the physician. Any serious adverse event that may be related to the test product will immediately lead to discontinuation of the test product (13).

Sample size and recruitment

In order to achieve 80% statistical power (p-value= 0.05) between the three treatments, 132 patients should be recruited (44 patients per group). As a dropout rate of 15% is expected that will be included in the study 152 participants. A schematic diagram of time schedule of enrolment and interventions of the research groups is summarized in Figure 1.

The strategy to achieve the appropriate registration of participants to reach the target sample size will be disseminated on social networks at the University of Sorocaba and poster at the Gastroenterology Clinic Dra Karin Hackel.

Fig 1. Flowchart describing study design, sample composition, and experimental protocol



The sample size was calculated based on two means and their standard deviations. In preliminary studies, the correlation established using the website openepi.com.

Randomization and allocation concealment for treatment

After confirmation of eligibility and reading/signing of the informed consent form, patients will receive a sequential number randomized by one of researcher (FCRM). Randomization will be performed by Random Allocation Software. The patients will be

stratified equally into the 3 groups in blocks of 9. Patients will receive identical sealed opaque envelopes bearing the randomized sequential number.

The patients, physician, research taste and packaging differing only by numbering of manufacturing batches. The physician will select each volunteer according to lot number corresponding to the randomization.

Eligible patients will be allocated (1: 1: 1) to receive treatment, for 4 weeks, with the probiotic supplement containing 3×10^9 CFU per sachet, 8×10^9 CFU per sachet, or placebo. Participants of the study and all those with access to the results (outcome assessors - KH) will be blinded. All groups will receive identical sachets (same flavor, color and packaging, with no way to differentiate one batch from another).

It will be allowed to unmask and the revealing the intervention allocated during the trial if there is a serious adverse event which the doctor will investigate if the product was really the cause.

The volunteers can withdraw from the study at any time by their own request or they can be withdrawn at any time at the discretion of the investigator for safety. Volunteers will also be withdrawn from the study in the event of treatment interruption for any reason, whether due to forgetfulness or to experiencing undue intestinal discomfort.

To promote the retention of participants and complete follow-up, a text message or call will be sent after 15 days to find out how the treatment is going, and if there is discontinuation or deviation from the intervention protocol. The following questions will be asked: Why did you not continue with the treatment? Did you have any adverse events, if any?

Volunteers will be instructed to fill out the form properly if they have any adverse reactions and what type of stool and daily frequency.

Data handling and record keeping

The data from the volunteers' records will be entered in excel format and the records will be stored in a safe place in order to prove the study.

A data collection form will be used to record patient data for all participants and completed by the pharmaceutical researcher (FCRM), who will also enter the data into a database. The results will checked, in duplicate, to ensure the quality of the measured outcomes.

Volunteer withdrawal

The number of volunteer who dropped out of the study due to the presence of adverse events.

Ethical and regulatory aspects

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Sorocaba. The project is filed under the CEP-Single CAAE Number: 84003418.9.0000.5500 and was approved on 09/17/2018.

These documents state that volunteers' informed consent is an essential precondition for participating in the clinical study. The study will begin only after approval by the local Ethics Review Board of the University of Sorocaba.

Data analysis planning

Preliminary data indicate that the number of evacuations weekly is two or three times higher in patients than in control volunteers. The hypothesis is that treatment will likely increase the number of weekly bowel movements from 1 to 3 times to over 4 times a week, while no changes will be seen in the placebo group.

Anova will be used in order to compare continuous variables between the intervention and control groups. Score changes between the intervention and the control groups will be compared by kruskall-wallis.

Analysis of adverse events (if any) and the other outcomes will be performed using the Student t- test and Mann–Whitney U- test. In all measured will used the intention to treat analysis. The level of significance will be at $p<0.05$. The raw data will be input into the statistical software. Statistical analysis will be performed at STATA v.14.2.

All data collected on paper will be marked with a research identification number to avoid identifying the participants and stored in a locked cabinet. Only the author of the research report can access these identified data sets.

The data monitoring committee is not necessary because the statistical analysts will be blind to evaluate the outcomes data.

Volunteers will be instructed to write down any adverse events on the attached form A and if they feel the need to interrupt treatment due to inconvenience that they are unable to continue and write down what the reactions were.

Ethics and dissemination

The project is filed under the CEP-Single CAAE Number: 84003418.9.0000.5500 and was approved on 09/17/2018. Informed and signed consent will be obtained in the clinic participating in the research by outcome assessors (KH).

Personal information about participants will be collected and maintained in confidential before, during and after the end of trial only by researcher (KH which it will deliver to the researcher responsible for the clinical trial (FCRM).

The researchers declare no financial interests in this clinical study.

The researchers of this study declare will have access to the data set of the final essay.

The researchers will communicate the results of the trial to the participants by publishing the results in specialized journals which will be shared by text message.

Discussion

This study shall determine whether the combination of Lactobacillus and Bifidobacterium strains can improve functional intestinal constipation due to the action of bacterial flora and thereby increase the frequency of intestinal motility and improve the quality of faeces.

Therefore, the combination of different strains must be evaluated, as the species may differ in their effects, as well as in aspects related to their safety.

Clinical trials are essential to assess functional therapy for constipation and identify desirable therapeutic alternatives to increase treatment effectiveness and compliance levels.

This study combining eight strains of probiotics, as measured by benefits to the gastrointestinal system, has not yet been evaluated in a parallel group with probiotics

containing three strains, to determine which combination will have the best action in reducing constipation, using fibres as a placebo.

A limitation of this study is that results will be based on the self-reporting of symptoms by selected volunteers with functional constipation as opposed to direct observation.

The placebo will contain no probiotic strains (only fibres, vitamins and minerals) so that the desired effect of a significant difference in the treatment of constipation can be attributed solely to the probiotics.

Acknowledgements

Project funding by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil) (FAPESP Refs. No. 2016/08884-3 (Project PneumoPhageColor) and 2016/12234-4 (Project TransAppIL)), is hereby gratefully acknowledged. Funding for Victor M. Balcão through a BPE grant from FAPESP (São Paulo, Brazil) (Ref. No. 2018/05522-9, Project PsaPhageKill) is hereby gratefully acknowledged. This work also received support from CNPq, National Council for Scientific and Technological Development Brazil, in the form of Research Productivity (PQ) fellowships granted to Victor M. Balcão (Refs. No. 306113/2014-7 and 308208/2017-0). The authors extend their thanks to Capes under the Post-Graduate Support Program for Community Institutions (Prosuc-Capes). The authors have no conflicts of interest whatsoever to declare.

References

1. Pinto Sanchez MI, Bercik PJCJoG. Epidemiology and burden of chronic constipation. 2011;25.

2. Galvão-Alves JJJ. Constipação intestinal. 2013;101(2):31-37.

3. Sobrado CW, Corrêa Neto IJF, Pinto RA, Sobrado LF, Nahas SC, Cecconello IJJoC. Diagnosis and treatment of constipation: a clinical update based on the Rome IV criteria. 2018;38(2):137-144.

4. Lacy BE, Patel NKJJocm. Rome criteria and a diagnostic approach to irritable bowel syndrome. 2017;6(11):99.

5. Lewis SJ, Heaton KWJSjog. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. 1997;32(9):920-924.

6. Suares NC, Ford ACJAjog. Prevalence of, and risk factors for, chronic idiopathic constipation in the community: systematic review and meta-analysis. 2011;106(9):1582-1591.

7. Dimidi E, Zdanaviciene A, Christodoulides S, et al. Randomised clinical trial: Bifidobacterium lactis NCC2818 probiotic vs placebo, and impact on gut transit time, symptoms, and gut microbiology in chronic constipation. 2019;49(3):251-264.

8. Ceresola E, Ferrarese R, Preti A, Canducci FJERMPS. Targeting patients' microbiota with probiotics and natural fibers in adults and children with constipation. 2018;22(20):7045-7057.

9. Wilkins T, Sequoia JJAfp. Probiotics for gastrointestinal conditions: a summary of the evidence. 2017;96(3):170-178.

10. Hill C, Guarner F, Reid G, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. 2014;11(8):506.

11. Gareau MG, Sherman PM, Walker WAJNrG, hepatology. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. 2010;7(9):503.

12. Gomes DOVS, Morais MBdJRPdP. Gut microbiota and the use of probiotics in constipation in children and adolescents: Systematic review. 2020;38.

13. Pinheiro JMF, Batista MN, e Silva CdL, et al. Effect of a probiotic mix on functional constipation in adult women: a randomized double-blind study. 2019: [622-639].

14. Choi CH, Chang SKJJon, motility. Alteration of gut microbiota and efficacy of probiotics in functional constipation. 2015;21(1):4.

15. Del Piano M, Carmagnola S, Anderloni A, et al. The use of probiotics in healthy volunteers with evacuation disorders and hard stools: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. 2010;44:S30-S34.

16. Ibarra A, Latreille-Barbier M, Donazzolo Y, Pelletier X, Ouwehand ACJGM. Effects of 28-day Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 supplementation on colonic transit

time and gastrointestinal symptoms in adults with functional constipation: a double-blind, randomized, placebo-controlled, and dose-ranging trial. 2018;9(3):236-251.

17. Riezzo G, Orlando A, D'attoma B, et al. Randomised clinical trial: efficacy of Lactobacillus paracasei- enriched artichokes in the treatment of patients with functional constipation–a double- blind, controlled, crossover study. 2012;35(4):441-450.

18. Lewis ED, Antony JM, Crowley DC, et al. Efficacy of Lactobacillus paracasei HA-196 and Bifidobacterium longum R0175 in Alleviating Symptoms of Irritable Bowel Syndrome (IBS): A Randomized, Placebo-Controlled Study. 2020;12(4):1159.

19. Preston K, Krumian R, Hattner J, de Montigny D, Stewart M, Gaddam SJBM. Lactobacillus acidophilus CL1285, Lactobacillus casei LBC80R and Lactobacillus rhamnosus CLR2 improve quality-of-life and IBS symptoms: a double-blind, randomised, placebo-controlled study. 2018;9(5):697-706.

20. Martínez-Martínez MI, Calabuig-Tolsa R, Cauli OJAoG, Geriatrics. The effect of probiotics as a treatment for constipation in elderly people: a systematic review. 2017; 71:142-149.

21. Miller LE, Zimmermann AK, Ouwehand ACJWjog. Contemporary meta-analysis of short-term probiotic consumption on gastrointestinal transit. 2016;22(21):5122.

22. Shewale RN, Sawale PD, Khedkar C, Singh AJIJoP, Prebiotics. Selection criteria for probiotics: A review. 2014;9.

23. Spirit Statement. 2013. http://www.spirit-statement.org/

ANEXO F - Artigo em fase de submissão - The effect of probiotics on functional constipation in adults: a randomized, double-blind and placebo-controlled study

THE EFFECT OF PROBIOTICS ON FUNCTIONAL CONSTIPATION IN ADULTS: A RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND AND PLACEBO-CONTROLLED STUDY

Fabiana Cristina Rosa Mitelmão[1]; Karin Häckel[2]; Cristiane de Cássia Bergamaschi[1]; Marli Gerenutti[3]; Marcus Tolentino Silva[1]; Victor Manuel Balcão[1,4]; Marta Maria Duarte Carvalho Vila[1*]

[1]PhageLab - Laboratory of Biofilms and Bacteriophages, University of Sorocaba, 18023-000 Sorocaba/SP, Brazil;

[2] Clinic of Gastroenterology Dr. Karin Häckel, Sorocaba/SP, Brazil;

[3] Pontifical Catholic University of São Paulo (PUC-SP), Sorocaba/SP, Brazil;

[4] Department of Biology and CESAM, University of Aveiro, Campus Universitário de Santiago, P-3810-193 Aveiro, Portugal.

* Marta M. D. C. Vila, University of Sorocaba, Rodovia RaposoTavares Km 92.5, Sorocaba/SP, Brazil; e-mail: marta.vila@prof.uniso.br; Tel: +55 (15) 2101-7029; Fax: +55 (15) 2101-7000

Declaration of interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could influence the work reported in this research work.

THE EFFECT OF PROBIOTICS ON FUNCTIONAL CONSTIPATION IN ADULTS: A RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND AND PLACEBO-CONTROLLED STUDY

Abstract

Two formulations were developed, in the form of an oral sachet, with probiotics and their efficacy and safety were evaluated in adults with functional constipation. One formulation with *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus rhamnosus* (3 billion Colony Forming Units - CFU); and another with *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus paracasei, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium lactis, Lactobacillus casei, Bifidobacterium animallis* (8 billion CFU). The participants were randomized in a 3-arm parallel study and one oral sachet was auto-administered once a day for 30 days. Primary outcomes were improvement in increasing the frequency of weekly bowel movements and improvement in stool quality. Secondary outcomes were number of adverse events. In first week was observed an increase in stool frequency and in the quality of stools showing an improvement in constipation. No statistically significant differences were observed between the three treatment groups in relation to these outcomes ($p \geq 0.05$). Only one adverse event was observed in a patient of goup 2, related to abdominal pain. The two probiotic cocktails were effectives in improving the symptoms of functional constipation, by increasing both the weekly frequency of evacuation and stool quality and safe. Clinicaltrials.gov number: NCT04437147.

Keywords: *Lactobacillus, Bifidobacterium,* functional constipation, clinical trial

Introduction

Of the gastrointestinal disorders, constipation is one of the most reported conditions in clinical practice.[1,2] Constipation affects 15% to 20% of adults, of which 33% are over 60 years old, with predominance in women. The medical history of patients with constipation should be analyzed together with parameters such as fecal consistency, defecating frequency, effort when defecating, feeling of incomplete evacuation, abdominal pain and discomfort, use of laxatives, surgical history, comorbidities, lifestyle and work activity.[3] Functional constipation is based on symptoms of nonorganic origin and diagnosed by the diagnostic criteria of Rome IV.[4] The Bristol Stool Scale can help patients assess and describe aspects of their stools, facilitating the recognition of constipation severity[5]. Intestinal constipation negatively impacts the quality of life and can lead to significant costs in the search for treatments and purchase of laxatives.[1,6] The treatment of constipation is a challenge in the sense that osmotic, stimulating, irritating, and prokinetic laxatives are usually used.[2] However, it appears that up to 47% of the patients are not completely satisfied due to inconsistent response to laxatives and concerns about their safety, adverse effects, taste, inconvenience, and cost.[7]

Currently, it is known that there is an important interaction between microbes and intestinal physiology. Therefore, probiotics have been used to treat many intestinal disorders[8], such as infectious diarrhea, diarrhea associated with antibiotics, diarrhea associated with *Clostridium difficile*, hepatic encephalopathy, ulcerative colitis, irritable bowel syndrome, functional gastrointestinal disorders, necrotizing enterocolitis, and functional constipation.[9-11]

Although the human microbiome comprises more than 400 bacterial species, evidence has shown that a decrease in the population of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in adults can result in intestinal constipation.[12-14] Consequently, the probiotics used in humans for the treatment of constipation are more often of the species *Lactobacillus* and *Bifidobacterium. Lactobacillus* and *Bifidobacterium* can shorten the migratory myoelectric complex period and accelerate small intestine transit, partly due to increased release of serotonin (5-HT) which has promotility effects.[8]

Clinical trials evaluating different strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in the treatment of intestinal constipation have observed promising results,[15-19] conclusions also

supported by systematic reviews on the topic.[20] However, there is no consensus on probiotic strains and dosages for the treatment of constipation.[12,21] Strain selection is an important step in the production of a probiotic. Probiotics should have a beneficial effect on the host and remain viable throughout the product lifetime.[22]

The clinical trial reported herein evaluated the efficacy and safety of 2 different probiotic cocktails when compared to a placebo. One of the probiotic cocktails integrated 4 strains of *Lactobacilli* (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus casei*) and 4 strains of *Bifidobacteria* (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis* and *Bifidobacterium animalis*). The other probiotic cocktail integrated 2 strains of *Lactobacilli* (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*) and 1 strain of *Bifidobacteria* (*Bifidobacterium bifidum*). Hence, this study aimed at confirming whether the probiotic strains dosage increased the weekly frequency of bowel movements and the quality of stools, improving intestinal functional constipation in human subjects.

METHODS

Study design and setting

The study entertained herein consisted in a single-centre, randomized, double-blind and placebo-controlled clinical trial, registered in ClinicalTrials.gov (Identifier: NCT04437147). This study following the checklist Consort. http://www.consort-statement.org/media/default/downloads/CONSORT%202010%20Checklist.pdfand other information is available in the published protocol of this protocol. [23]

The parallel clinical trial worked with the hypothesis that the groups that received probiotics had a greater increase in weekly frequency of bowel movements and stool quality, being therefore more effective than the group that received the placebo control. During a 4-week timeframe, 153 patients (51 patients per group) with functional constipation were treated as follows: the first group recivied a probiotic cocktail containing 3 billion CFU of mixed strains of probiotic bacteria per sachet, the second group was treated with 8 billion CFU of mixed strains of probiotic bacteria per sachet and the third group was treated with placebo (composed by prebiotic fibers, vitamins and minerals, which is a conventional treatment for constipation).

The study was carried out single-center, at Dr. Karin Häckel's Gastroenterology Clinic, located in Sorocaba, State of São Paulo, Brazil. The recruitment of patients for this study was carried out through a collaborative effort between the University of Sorocaba and physician Karin Häckel at the Clinic of Gastroenterology.

For dissemination of the study, digital platforms were used via e-mail and letters distributed through the Campus or text messages via mobile phone, and social networks were also explored to promote the study. Recruitment of participants was carried out until November 30th, 2020.

After verbal and written clarification of the study, the participants that agreed to enter in the study signed the Informed Consent Form already approved by the Ethics Committee of the University of Sorocaba. All authors had access to the study data and reviewed and approved the final manuscript.

Eligibility criteria

Inclusion criteria

Eligible patients for the study were adults aged between 20 and 80 years with clinical diagnosis of functional constipation according to Rome IV.

The Rome IV Consensus defines functional constipation as a dysfunction that manifests itself as difficult, infrequent, and incomplete bowel movements. Constipation must have started 6 months earlier and become more frequent in the past 3 months, including 2 or more of the following characteristics: involving <25% of bowel movements (straining, hardened resistance - Bristol scale 1–2), feeling of incomplete evacuation, a sensation of anorectal obstruction, digital maneuvers to facilitate the removal of fecal content, less than 3 spontaneous evacuations/week and need for laxatives[4]. Participants entered the study only by granting written authorization.

Exclusion criteria

The exclusion criteria were the presence of gastrointestinal diseases, use of antibiotics or dietary supplements containing probiotics or prebiotics in the last 15 days, and pregnancy.

Interventions

Participants were instructed to store the sachets at room temperature and to take a sachet before breakfast, by dissolving the contents of a sachet in 150 ml of water. To improve treatment adherence, phone calls and/or messages were sent to verify that participants were following the correct protocol and working as planned.

During the clinical trial, the use of laxatives was prohibited. The sachets were auto administered during a timeframe of 30 days for all participants. The study consisted of 3 parallel arms:

(1) Active comparator: 3 billion CFU strains of probiotics (3 x 10^9 CFU per sachet) - *Lactobacillus acidophilus* LA 02 ID 1688 (1 billion CFU), *Bifidobacterium bifidum* BB 01 ID 1722 (1 billion CFU), *Lactobacillus rhamnosus* LR 04 ID 1132 (1 billion CFU), vitamin C (ascorbic acid) 45 mg, vitamin B1 (thiamine) 1.1 mg, vitamin B2 (riboflavin) 1.1 mg, vitamin D-3 40.000.000 IU/g (cholecalciferol) 34 µg, magnesium hydroxide 0.3 g, calcium

carbonate 0.5 g, natural vanilla flavor powder 0.03 g, FOS (fructooligosaccharides) up to 3 g: one sachet/day for 30 days.

(2) Active comparator: 8 billion CFU strains of probiotics (8 x 10^9 CFU per sachet) - *Lactobacillus paracasei* LPC 00 ID 1076 (1 billion CFU); *Bifidobacterium longum* BL 03 ID 1152 (1 billion CFU); *Bifidobacterium lactis* BS 01 ID 1195 (1 billion CFU); *Lactobacillus casei* LC 03 ID 1872 (1 billion CFU); *Bifidobacterium animalis* THT 010803 (1 billion CFU); *Lactobacillus acidophilus* LA 02 ID 1688 (1 billion CFU), *Bifidobacterium bifidum* BB 01 ID 1722 (1 billion CFU), *Lactobacillus rhamnosus* LR 04 ID 1132 (1 billion CFU), vitamin C (ascorbic acid) 45 mg, vitamin B1 (thiamine) 1.1 mg, vitamin B2 (riboflavin) 1.1 mg, vitamin D-3 40.000.000 IU/g (cholecalciferol) 34 µg, magnesium hydroxide 0.3 g, calcium carbonate 0.5 g, natural vanilla flavor powder 0.03 g, FOS (fructooligosaccharides) up to 3 g: one sachet/day for 30 days.

Placebo comparator: Vitamin C (ascorbic acid) 45 mg, vitamin B1 (thiamine) 1.1 mg, vitamin B2 (riboflavin) 1.1 mg, vitamin D-3 40.000.000 IU/g (cholecalciferol) 34 µg, magnesium hydroxide 0.3 g, calcium carbonate 0.5 g, natural vanilla flavor powder 0.03 g, FOS (fructooligosaccharides) up to 3 g: one sachet/day for 30 days.

The follow-up of patients was of 1 week after the end of the use of probiotics.

Measured outcomes

Primary outcomes

The changes in bowel frequency (movements and quality of the stools) were noted in a table that the patients filled in with information regarding the daily frequency of evacuation and type of stools (on a scale of 1 to 7 on the Bristol scale, or if there was no evacuation). The stool form was collected using the BSFS (Bristol Stool Form Scale), a simple tool to estimate intestinal transit time. The BSFS classifies stools into 7 categories, including type 1 (separate hard lumps such as walnuts); type 2 (sausage-shaped but irregular); type 3 (like sausage but with cracks on the surface); type 4 (such as sausage or snake, smooth and soft); type 5 (smooth bubbles with sharp edges); type 6 (fluffy pieces with jagged edges, pasty stools); type 7 (aqueous, in solid pieces).[5] These stool types are categorized into slow transit (types 1 and 2), normal transit (types 3 to 5), and rapid transit (types 6 and 7).

The metric of analysis was the comparison between 0 and 30 days, considering that the number of effective bowel movements over 4 times a week is an effective value for the treatment and the quality of the stools from types 3 to 5.

Secondary outcomes

Adverse events are undesirable signs or symptoms that occur during the study and occurrences that may or may not be causally related to the treatment. All adverse events considered possible or likely related to the test product were registered in the patient form.

Serious adverse events are defined as fatal, life-threatening, disabling, resulting in hospitalization or prolonged stay, or resulting in malformation, whether related to the product under test or otherwise. According to previous studies, probiotics are safe and any serious adverse event that could be related to the products under test would be considered unexpected. Any unexpected serious adverse events were to be reported to the physician. Any serious adverse events that could be related to the product under test would immediately lead to the discontinuation of the product under test[13]. The number of patients and of adverse events and serious adverse events were duly recorded.

Sample size and recruitment

The sample size was calculated based on two relative means and their respective standard deviations related to the weekly increase in bowel movements and stool consistency considering the data reported by Piano et al. (2010). The correlation was established using epidemiological statistics available on the OpenEpi website (OPENEPI, 2013). As a 15% dropout rate is expected, 153 participants were included in the study, aiming to reach the completion of at least 132 participants. The participants of study and treatment schedule are displayed in Figure 1.

Randomization and allocation concealment for treatment

Randomization was performed by Random Allocation Software. Participants were equally stratified into 3 groups, each with blocks of 9 participants.

After confirming the eligibility and reading/signing of the Informed Consent Form, the participants received an identical sealed opaque envelope with the randomized sequential number, by one of the researchers (FCRM). The packaging differed only in the number of manufacturing batches. All groups received identical sachets (same flavor, color and packaging), with no possibility of differentiating one batch from another.

The physician (KH) selected each participant according to the batch number corresponding to the randomization. Eligible participants were allocated (1:1:1 to receive treatment, for 4 weeks, with the probiotic supplement containing 3 x 10^9 CFU per sachet, 8 x 10^9 CFU per sachet, or placebo. Study participants and the investigator (KH) that provided the treatment and collected the outcomes were blinded.

To promote participant adherence to the study and complete follow-up, the text message or call was sent after 15 days to find out how the treatment was and whether there was discontinuation or deviation from the intervention protocol. The following questions were asked: Why did you not continue the treatment? Have you had any adverse events, if any? Participants were instructed to fill in the correct form if any adverse events occurred and what kind of stools and daily rate of evacuation.

Figure 1

Voluntary withdrawal

Participants could also be removed from the study if the treatment was interrupted in any way for any reason, whether due to forgetfulness or undue intestinal disconfort. Unmasking and revealing the intervention during the study was allowed if there was a serious adverse event reported, and the physician would investigate if the product was actually the cause. Participants were allowed to withdraw from the study at any time at their own request or be withdrawn at any time at the investigator's discretion for safety reasons.

Data treatment and record keeping

Data from the participant's medical records were entered into a Microsoft Excel spreadsheet and the medical records were stored in a safe place for proof of the study. The data collection form was used to record patient data from all participants and completed by the researcher (FCRM), who also registered the data in a Microsoft Excel spreadsheet. The results measured were verified, in duplicate, to ensure their quality.

Data Analysis

We used analysis of variance (ANOVA) to compare BSFS scores between groups and the paired *t*-test to compare BSFS scores within groups at different times. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using the software STATA v.14.2. (https://www.stata.com/stata14/) (StataCorp LLC, Texas TX, USA).

Ethics and Disclosure

The project was filed under the number CEP-Single CAAE: 84003418.9.0000.5500 and was approved on 09/17/2018. Informed and signed consents were declared at the clinic participating in the research by the outcome evaluators (KH). Personal information about the participants was collected and kept confidential before, during, and after the end of the clinical trial by only one of the researchers (KH), which was delivered to the researcher responsible for it (FCRM). The researchers stated that they had no financial interest whatsoever in this clinical study. All authors had access to the study data and reviewed and approved the final manuscript.

Results

A total of 153 participants were selected and 132 were enrolled in the study after clarification of the clinical trial and signing the informed consent form. Following randomization, 41 participants were treated with the 3 billion CFU/sachet (Group 1), 49 participants were treated with the 8 billion CFU/sachet (Group 2) and 39 participants were treated with the control placebo (Group 3). Figure 2 shows the distribution of

participants in the study groups. Table 1 shows the characteristics of the groups in which women with average ages of 39.9 to 43.1 years predominated.

Figure 2

Table 1

Table 2 presents the results obtained in relation to the frequency of bowel movements and the quality of stools. The analysis metric was a comparison between week zero until week 4 of the study. No statistically significant differences were observed between the three treatment groups in relation to the frequency of weekly bowel movements, which increased in all three groups as well as in improving stool quality ($p \geq 0.05$). The single adverse event that was reported in only one participant in Group 2, was related to abdominal pain.

Table 2

Discussion

The study entertained herein clearly demonstrated that treatment with a new probiotic cocktail of either 3 LAB strains (LA 02, BB 01, LR 04) or 8 LAB strains (LA 02, BB 01, LR 04, LPC 00, BL 03, BS 01, LC 03, THT 010803), ingested once a day, for 30 days, increased the weekly frequency of evacuation and the quality of stools in patients, who reported improvement in fuional intestinal constipation. In addition, the probiotic mixtures showed favorable safety profiles, as evidenced with only the report of one adverse event that was not considered a serious event.

Therefore, combination of different LAB strains did not have an impact in either their efficacy and safety, compared to the placebo which contained prebiotic fiber.

According to the literature, *Bifidobacteria* and *Lactobacilli*, alone or in combination, had beneficial results in patients with functional intestinal constipation and are safe for consumption.[16,17,18,19,20,25] These findings corroborate previous studies, which demonstrated a beneficial effect using strains of probiotics, alone or in combination, in patients with

functional constipation or some other gastrointestinal disorder. *Ibarra et al.* [16] *in a trial study used Bifidobacteria for the treatment of intestinal constipation.* The groups received capsules that contained the strains at 1×10^{10} CFU (high-dose group); capsules with the strains at 1×10^{9} CFU (low-dose group); and placebo capsules. The only significant difference in adequate relief of constipation was observed between the high-dose and placebo groups. The results presented in the study reported herein indicated that even with a lower dose (8 billion CFU/sachet or 3 billion CFU/sachet, but with different strains), there was an improvement in bowel function. The combination of strains can be an indication of greater effectiveness. Riezzo et al.[17] in a clinical trial employed ordinary artichokes or artichokes enriched with *Lactobacillus paracasei* (daily dose of 2×10^{10} CFU) for 15 days with a daily dose of 2×10^{10} CFU). The trial showed a positive effect on symptoms in constipated patients after intake of probiotic-enriched artichokes. However, the number of patients (20) was small, as well as the days of treatment (15 days). Lewis et al.[18] also used *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium longum* to check their effectiveness ahead of irritable bowel syndrome (IBS). The authors concluded that *L. paracasei* and *B. longum* may reduce GI symptom severity and improve the psychological well-being of individuals, indicating that these strains can also be useful in the treatment of intestinal constipation. Preston et al.[19] reported a clinical trial for the relief of symptoms of irritable bowel syndrome, using three strains of *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus; Lactobacillus casei; Lactobacillus rhamnosus*). For all efficacy endpoints, improvement of 30% or more *vs*. placebo was considered clinically significant. The trial focused on evaluating several GI disorders arising from the irritable bowel syndrome and not only constipation, however, it can be stated that these strains were effective for various intestinal problems, including constipation. Martínez-Martínez et al.[20] reported a systematic review work involving prebiotics in the treatment of elderly people. Differently from the work presented herein, that did not make this restriction. Those authors found that the most used strains were *Bifidobacteria* with improvement in intestinal constipation in 10% to 40% of the cases. However, the population was restricted to elderly persons and, in addition, the original study designs displayed heterogeneity. The studies, in general, corroborate the proof of the effectiveness of the LAB strains used in the present study in alleviating intestinal disorders, such as constipation.

The clinical trial reported here had a strong adherence, with only 4 patients discontinuing the study due to loosing follow-up (n = 3 participants), and 1 participant of the group that was administered with 8 billion CFU/g reported abdominal pain. This participant reported, in the third week of use of the product, flatulence and abdominal colic. These adverse effects can occur with the use of probiotics, being reversible by simply interrupting its ingestion[26].

A limitation of the study reported herein was that the results were based on self-reporting of symptoms by selected volunteers with functional constipation, as opposed to direct observation.

Although there were no significant differences in the efficacy of the products, combination of strains *of Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were well tolerated and safe for consumption. In addition, the four-week consumption of the probiotic mixtures improved digestive symptoms, especially the stool quality, in adults with constipation

Our findings will allow us to use all the formulations as a treatment for functional intestinal constipation, the symbiotic formulations which contained different concentrations of probiotics and the one which contained only prebiotics did not produce statistical differences between them, that is, all were beneficial and had their goal achieved since the first week of treatment. The advantage of using only prebiotics is due to the low cost to the patient, when compared to formulations integrating probiotic bacteria.

In conclusion, both probiotic bacteria cocktails integrating either 3 LAB strains or 8 LAB strains improved the symptoms of intestinal functional constipation by increasing the weekly frequency of evacuation and stool quality, as early as the first week of treatment, with sustained improvements throughout the fourth week. Treatment with these probiotic cocktails was safe and well tolerated, with only one adverse event resulting in discontinuation.

The results of this study are encouraging, but further studies are likely needed to support efficacy, safety, and durability of the effect.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development Brazil) by Research Productivity (PQ) fellowships granted to Victor M. Balcão (Refs. No. 306113/ 2014-7 and 308208/2017-0) an the support from PROSUP-CAPES in the form of scholarship granted to Fabiana C.R. Mitelmão. The authors are grateful to the participants for voluntarily entering in the study.

References

1. Pinto Sanchez MI, Bercik P. Epidemiology and burden of chronic constipation. *Can* J Gastroenter*ol* 2011;25(Suppl B):11B–5B.
2. Galvão-Alves J. Constipação intestinal. *J Bras Med* 2013; 101:31–7.
3. Sobrado CW, Neto IJFC, Pinto RA, et al. Diagnosis and treatment of constipation: a clinical update based on the Rome IV criteria. *J Coloproctol* 2018;38: 137–44.
4. Lacy BE, Patel NK. Rome criteria and a diagnostic approach to irritable bowel syndrome. *J Clin Med* 2017; 6:1–9.
5. Lewis SJ, Heaton KWJ. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32:920–4.
6. Suares NC, Ford AC. Prevalence of, and risk factors for, chronic idiopathic constipation in the community: systematic review and meta- analysis. *Am J Gastroenterol* 2011;106: 1582–91.
7. Dimidi E, Zdanaviciene A, Christodoulides S, et al. Randomised clinical trial: bifidobacterium lactis NCC2818 probiotic vs placebo, and impact on gut transit time, symptoms, and gut microbiology in chronic constipation. *Aliment Pharmacol Ther* 2019; 49:251–64.
8. Ceresola E, Ferrarese R, Preti A, Canducci F. Targeting patients' microbiota with probiotics and natural fibers in adults and children with constipation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22: 7045–57.
9. Wilkins T, Sequoia J. Probiotics for gastrointestinal conditions: a summary of the evidence. *Am Fam Physician* 2017;96: 170–8.
10. Hill C, Guarner F, Reid G, et al. Expert consensus document: the International Scientific Association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11: 506–14.
11. Gareau MG, Sherman PM, Walker WA. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat Rev Gastro Hepat* 2010;7: 503–14.
12. Gomes DOVS, Morais MB. Gut microbiota and the use of probiotics in constipation in children and adolescents: systematic review. *Rev Paul Pediatr* 2019;38:e2018123.
13. Pinheiro JMF, Batista MN, Silva CL, et al. Effect of a probiotic mix on functional constipation in adult women: a randomized double-blind study. *Mundo Saude* 2019;43: 622–39.
14. Choi CH, Chang SK. Alteration of gut microbiota and efficacy of probiotics in functional constipation. *J Neurogastroenterol Motil* 2015; 21:4–7.
15. Del Piano M, Carmagnola S, Anderloni A, et al. The use of probiotics in healthy volunteers with evacuation disorders and hard stools: a double- blind, randomized, placebo-controlled study. *J Clin Gastroenterol* 2010;44(Suppl 1):S30–4.
16. Ibarra A, Latreille-Barbier M, Donazzolo Y, Pelletier X, Ouwehand AC. Effects of 28-day Bifidobacterium animalis subsp lactis HN019 supplementation on colonic transit time and gastrointestinal symptomsin adults with functional constipation: a double-blind, randomized, placebo-controlled, and dose-ranging trial. *Gut Microbes* 2018;9: 236–51.
17. Riezzo G, Orlando A, D'Attoma B, et al. Randomised clinical trial: efficacy of *Lactobacillus paracasei*-enriched artichokes in the treatment of patients with functional

constipation–a double-blind, controlled, crossover study. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;35: 441–50.
18. Lewis ED, Antony JM, Crowley DC, et al. Efficacy of *Lactobacillus paracasei* HA-196 and Bifidobacterium longum R0175 in alleviating symptoms of Irritable Bowel Syndrome (IBS): a randomized, placebo- controlled study nutrients. *Nutrients* 2020; 12:1–19.
19. Preston K, Krumian R, Hattner J, et al. *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 improve quality-of-life and IBS symptoms: a double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Benef Microbes* 2018;9: 697–706.
20. Martínez-Martínez MI, Calabuig-Tolsa R, Cauli O, Geriatrics. The effect of probiotics as a treatment for constipation in elderly people: a systematic review. *Arch Gerontol Geriat* 2017;71: 142–9.
21. Miller LE, Zimmermann AK, Ouwehand AC. Contemporary meta- analysis of short-term probiotic consumption on gastrointestinal transit. *World J Gastroenterol* 2016;22: 5122–31.
22. Shewale RN, Sawale PD, Khedkar CD, Singh A. Selection criteria for probiotics: a review. *Int J Probiotics Prebiotics* 2014;9: 17–22.
23. Mitelmão FCR, Bergamasch CC, Gerenutti M, Häckel K, Silva MT, Balcão VM, Vila MMDC. The effect of probiotics on functional constipation in adults: double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Medicine* 2021; 100:1-10
24. EMEA. European Medicines Agency. ICH Topic E 10 Choice of Control Group in Clinical Trials. CPMP/ICH/364/96
25. Morovic W, Roper JM, Smith AB, et al. Safety evaluation of HOWARU® Restore (*Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus paracasei* Lpc-37, *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis Bl-04 and B. lactis Bi-07) for antibiotic resistance, genomic risk factors, and acute toxicity. *Food Chem Toxicol*. 2017; 110:316–324.
26. SAAD SMI Probiotics and prebiotics: the state of the art. *Braz J Pharm Sci*. 2006; 42: 1-16.

FIGURES CAPTION

Figure 1. Research group enrollment and treatment schedule. BSFS = Bristol Stool Form Scale; CFU = Colony Forming Unit

Figure 2. Distribution of patients in the study groups

TABLES

Table 1. Characteristics of the participants entering the study

	Group 1		Group 2		Group 3		1 x 2	1 x 3	2 x 3	1 x 2 x 3
Parameters	Average ± standart deviation	σ	Average ± standart deviation	σ	Average ± standart deviation	σ	*p*-value[1]	*p*-value[2]	*p*-value[3]	*p*-value[4]
Women (%)	87.8	36	98.0	50	97.5	39	0.085	0.201	1.000	0.086
Age	39.9 ± 12.6	41	43.1 ± 16.1	51	40.9 ± 14.7	40	0.005	0.023	0.588	0.013

1- *p*-value of the two-tailed *t*-student test to identify the differences between groups 1 and 2 at weeks 0, 1, 2, 3, 4.
2- *p*-value of the two-tailed *t*-student test to identify the differences between groups 1 and 3 at weeks 0, 1, 2, 3, 4.
3- *p*-value of the two-tailed *t*-student test to identify the differences between groups 2 and 3 at weeks 0, 1, 2, 3, 4.
4- *p*-value of the analysis of variance to identify the differences between groups 1, 2 and 3 in weeks 0, 1,2,3,4.
Group 1= Formula with 3 billion CFU/sachet; Group 2= Formula with 8 billion CFU/sachet; Group 3= control placebo; CFU colony-forming units; 1 x 2: Group 1 compared to Group 2; 1 x 3: Group 1 compared to Group 3; 2 x 3: Group 2 compared to Group 3; 1x 2x 3: Group 1 compared to Group 2 and group 3; σ = Standard Deviation

Table 2. Arrangement of participants in the study groups according to the CONSORT diagram and demographic characteristics of the three groups with the intention to treat.

	Group 1			**Group 2**			**Group 3**			**1 x 2**	**1 x 3**	**2 x 3**	**1 x 2 x 3**
Parameter	Average ± σ	n	*p*-value[1]	Average ± σ	n	*p*-value[2]	Average ± σ	n	*p*-value[3]	*p*-value[4]	*p*-value[5]	*p*-value[6]	*p*-value[7]
week 0	1.9 ± 0.8	41		1.8 ± 0.8	51		1.7 ± 0.8	40		0.481	0.149	0.413	0.353
week 1	4.9 ± 2.5	41	< 0.001	4.7 ± 2.0	51	< 0.001	6.4 ± 7.7	40	< 0.001	0.818	0.224	0.141	0.187
week 2	5.8 ± 2.7	41	< 0.001	5.1 ± 2.0	50	< 0.001	5.9 ± 2.9	39	< 0.001	0.119	0.946	0.118	0.217
week 3	5.5 ±2.6	41	< 0.001	5.0 ± 1.8	49	< 0.001	6.1 ± 2.4	39	< 0.001	0.262	0.278	0.011	0.066
week 4	5.2 ± 1.8	41	< 0.001	5.1 ± 2.0	49	< 0.001	5.5 ± 2.3	39	< 0.001	0.766	0.645	0.465	0.744
week 0	1.9 ± 0.8	41		1.8 ± 0.8	51		1.7 ± 0.8	40		0.481	0,149	0.413	0.353
week 1	3.0 ± 1.2	41	< 0.001	2.9 ± 1.1	51	< 0.001	2.7 ± 0.9	40	0.004	0.739	0.253	0,366	0.499
week 2	3.2 ±1.1	41	< 0.001	2.9 ± 1.1	50	< 0.001	3.2 ± 0.9	39	< 0.001	0.291	0.928	0.294	0.449
week 3	3.1 ± 1.1	41	< 0.001	3.4 ± 1.1	49	< 0.001	3.4 ± 1.1	39	< 0.001	0.219	0.250	0.966	0.395
week 4	3.6 ± 1.1	41	< 0.001	3.3 ± 0.9	49	< 0.001	3.3 ± 1.0	39	< 0.001	0.278	0.310	0.974	0.469

1- *p*-value of the two-tailed paired *t*-student test to identify differences between weeks 1, 2, 3, 4 with week 0 in group 1
2- *p*-value of the two-tailed paired *t*-student test to identify differences between weeks 1, 2, 3, 4 with week 0 in group 2
3- *p*-value of the two-tailed paired *t*-student test to identify differences between weeks 1, 2, 3, 4 with week 0 in group 3
4- *p*-value of the two-tailed paired *t*-student test to identify the differences between groups 1 and 2 at weeks 0, 1, 2, 3, 4
5- *p*-value of the two-tailed paired *t*-student test to identify the differences between groups 1 and 3 at weeks 0, 1, 2, 3, 4
6- *p*-value of the two-tailed paired *t*-student test to identify the differences between groups 2 and 3 at weeks 0, 1, 2, 3, 4
7- *p*-value of the analysis of variance to identify the differences between groups 1, 2 and 3 in weeks 0, 1, 2, 3, 4
Group 1 = Formula with 3 billion CFU/sachet; Group 2 = Formula with 8 billion CFU/sachet; Group 3 = Control placebo; CFU= colony-forming units