



## “EFEITO DO CONSUMO DE SORVETE SIMBIÓTICO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA, DE AMÔNIA E NO pH FECAL DE MILITARES EM TREINAMENTO DE CAMPO”

VIEIRA, I. A., VALLE, M.C.P.R, SARTORATTO, A., FINO, L. C., CUNHA, D. T., BENATTI, F. B., ANTUNES, A. E. C.

### Resumo

Em ambiente militar, é comum ocorrerem treinamentos intensos em situação de acampamento, os quais são realizados em condições extremas de atividade física e de privação de sono e alimentar, fatores esse que favorecem a fragilização do sistema imune desse público, favorecendo a ocorrência de doenças como a diarreia aguda infecciosa <sup>[1,2]</sup>.

Os probióticos têm recebido atenção frequente por serem indicados para promover saúde e bem-estar ao atuarem sobre o sistema imune, favorecendo indivíduos que apresentam sintomas gastrointestinais e respiratórios, favorecendo também o estado de humor e bem-estar. Tais fatores podem ser benéficos para os militares, tendo em vista o elevado nível de estresse físico e psicológico ao qual são submetidos <sup>[3,4]</sup>.

Através de alguns parâmetros, como a presença de ácidos graxos de cadeia curta, amônia e o pH fecal, é possível avaliar a atividade metabólica de microrganismos benéficos <sup>[5]</sup>. Portanto, o objetivo desse ensaio clínico controlado aleatorizado duplo cego foi avaliar o efeito da suplementação de sorvete

simbiótico sobre a quantidade de amônia, de AGCC e o pH das fezes de 65 militares em treinamento de campo da Escola Preparatória de Cadetes do Exército (EsPCEEx).

### Metodologia

#### Suplementação

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (nº 90850718.8.0000.5404) e realizado com 80 militares voluntários, do segmento masculino ou feminino, com idade entre 18 e 22 anos. Destes, 65 participantes concluíram o estudo.

Os critérios de exclusão da pesquisa foram: idade inferior a 18 anos e superior a 22 anos, intolerância à lactose e alergia às proteínas do leite (ou algum dos outros ingredientes empregados nos produtos) e uso de antibiótico durante o período de pesquisa.

Os militares foram randomizados em grupo placebo e simbiótico. Do 1º dia ao 15º dia da pesquisa, os 65 voluntários se abstiveram do consumo de produtos contendo probióticos e prebióticos.

O período de suplementação com sorvete simbiótico (composto por contagens de 8 log UFC/g de produto de *B. animalis* BB-12 e *L.*

*acidophilus* LA-5 e com 2,5g de inulina na porção diária de consumo de 60 gramas) ou com sorvete placebo, teve a duração de 30 dias e o treinamento militar em campo durou 5 dias.

No período de pré-suplementação, pós-suplementação (pré treinamento) e pós-treinamento militar, ocorreram as coletas de amostras de fezes, para posteriormente ocorrerem as análises de pH, amônia e ácidos graxos de cadeia curta.

#### *Análise das fezes*

A quantificação de amônia ocorreu por meio de um medidor de íons específicos acoplado à um eletrodo seletivo de amônia. Os resultados obtidos foram divididos pela massa molar do íon amônio (18,04), sendo este expresso em mmol/L. Já a medição do pH foi realizada por meio de pHmetro digital, enquanto as análises de ácidos graxos de cadeia curta foram através cromatógrafo a gás Agilent, equipado com um detetor seletivo de massas.

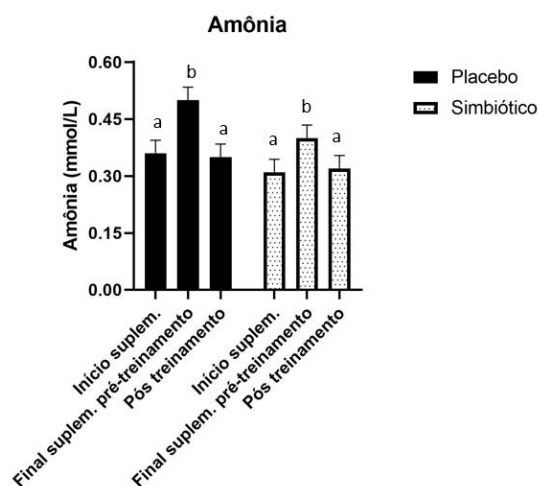
#### *Forma de análise do resultados*

Para comparação de variáveis quantitativas de dois grupos independentes (i.e. intervenção x controle) foram utilizados os testes t-Student ou teste U de Mann-Whitney, com base na distribuição. Para comparação de dois grupos dependentes (i.e. variáveis no baseline x variáveis após 30 dias) foram utilizados os testes t-pareado (T-student para amostras relacionadas) ou o teste de Wilcoxon.

## **Resultados e discussão**

Os resultados de amônia encontram-se na Figura 1, sendo possível observar que houve um aumento significativo ( $p=0,001$ ) na média de amônia das fezes entre o início e o final da suplementação, e retorno aos valores basais entre o final da suplementação e o final do treinamento de campo, tanto para o grupo placebo, como para o grupo simbiótico. Além disso, através da análise de interação entre grupo e tempo, observou-se que este efeito foi semelhante entre os grupos, logo, observou-se não haver diferença significativa de resultados entre os tratamentos oferecidos em relação à média de amônia nas fezes.

**Figura 1 – Média de amônia para os grupos simbiótico e placebo do início da suplementação até o final do treinamento (n=65).**



Letras iguais representam médias estatisticamente iguais e letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ , comparações intragrupos ou entre grupos).

Esse resultado está de acordo com o encontrado anteriormente em um estudo realizado pelo nosso grupo [6], no qual utilizaram o modelo SHIME®, que foi inoculado com amostras de fezes de militares. Foi observado que, após a

administração por 14 dias consecutivos de sorvete, a média de amônia nas amostras, na fase colônica da digestão, foi aumentada.

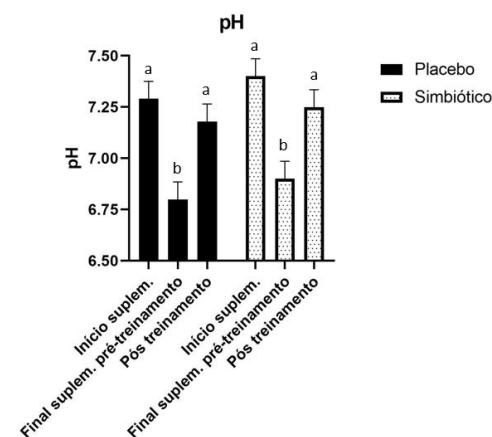
O aumento da média de amônia entre o período pré-suplementação e pós-suplementação para ambos os grupos foi causado, possivelmente, devido a matriz sorvete, tendo em vista que contém leite, o qual oferece quantidades consideráveis de proteína, tendo como um dos produtos de sua digestão a amônia [7,8].

Vale ressaltar que o sorvete deve ser considerado uma das opções para o consumo de probióticos e prebióticos, tendo em vista que é um produto eficiente para a veiculação das cepas probióticas que avaliamos, entretanto, deve ser consumido com moderação, tendo em vista que a elevação dos níveis de amônia (tal como observado) pode ser tóxico ao metabolismo dos enterócitos dependendo da sua concentração.

Os resultados da análise de pH estão descritos Figura 2. A partir dos resultados, observou-se que houve redução significativa ( $p=0,000$ ) do pH das fezes entre o início e o final da suplementação, e retorno aos valores iniciais entre o final da suplementação e o final do treinamento de campo, tanto para o grupo placebo, como para o grupo simbiótico. Assim como foi para a amônia, através das análises de interação entre grupo e tempo, observou-se que este efeito foi semelhante entre os grupos, demonstrando não haver diferença significativa de resultados entre os

tratamentos oferecidos em relação ao pH das fezes dos militares.

**Figura 2 – Média de pH fecal para os grupos simbiótico e placebo do início da suplementação até o final do treinamento (n=65).**



Letras iguais representam médias estatisticamente iguais e letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ , comparações intragrupos ou entre grupos).

Em um estudo no qual suplementaram idosos com inulina e lactose, não foram observadas mudanças no pH fecal. Foi discutido pelos autores que há outros fatores que afetam o cólon e que devem ser analisados para avaliar o metabolismo intestinal, como a quantidade de fibra da dieta, motilidade intestinal e as secreções intestinais. Portanto, o pH fecal pode não refletir o valor de pH do cólon [9].

Os resultados das análises dos ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) encontram-se na Figura 3.

Em relação ao ácido acético (acetato) (Figura 3A), este apresentou uma redução significativa entre o período de pós-suplementação e pós-treinamento militar, tanto para o grupo simbiótico

( $p=0,001$ ), quanto para o grupo placebo ( $p=0,005$ ), sendo que para o grupo placebo, a redução também foi significativa comparando o período pré-suplementação e o pós-treinamento militar ( $p=0,05$ ).

Em relação aos valores de ácido propiônico (propionato) (Figura 3B), não foi observada diferença significativa entre ambos os grupos, em todos os períodos.

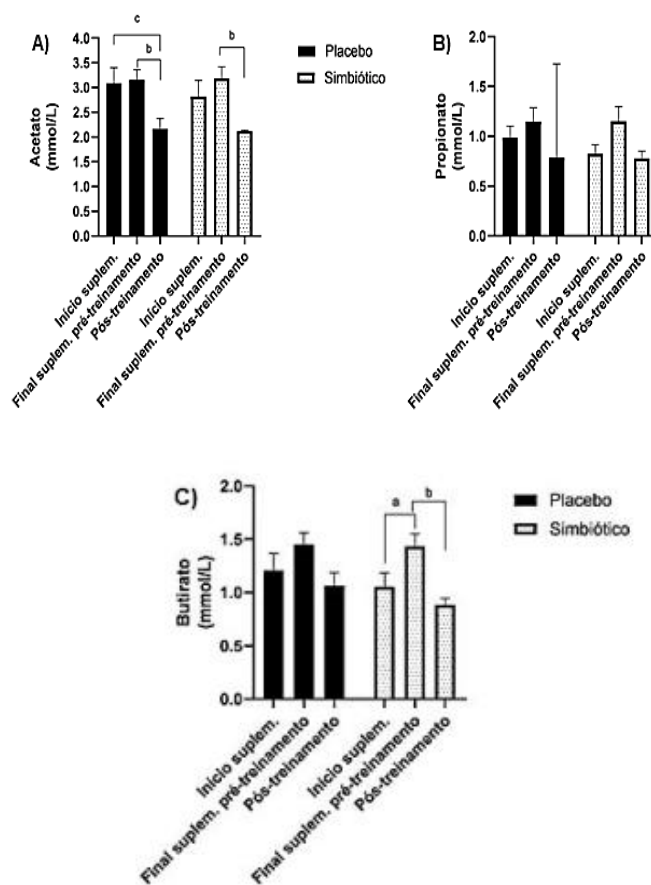
Em relação ao ácido butírico (butirato) (Figura 4C), um metabólito essencial para manter a saúde, proliferação e diferenciação dos colonócitos, houve um aumento significativo ( $p=0,046$ ) entre o período de pré-suplementação e pós-suplementação apenas para o grupo simbiótico. Entretanto, houve uma redução significativa ( $p=0,001$ ) entre o período de pós suplementação e pós-treinamento militar, retornando aos valores basais.

Nas análises entre grupos, foi possível observar que não houve diferença significativa entre os tratamentos, em relação aos níveis de ácidos graxos curta (acetato, propionato e butirato). Uma das hipóteses relacionada a esse resultado é o fato de que a amônia é um metabólito tóxico que, quando está presente em elevadas concentrações, leva a redução da produção de AGCC no cólon [10,11]. Portanto, é possível que o aumento do conteúdo de amônia tenha interferido nos resultados encontrados de ácidos graxos de cadeia curta.

Alguns estudos *in vitro* [12,13] demonstraram que pode haver

redução de alguns AGCC dependendo da fibra a ser fermentada, como por exemplo a inulina e a pectina, que estiveram relacionadas à redução de propionato, no estudo de Yang et al. (2013) [13].

**Figura 4 – Média de acetato, propionato e butirato para os grupos simbiótico e placebo do início da suplementação até o final do treinamento (n=65)**



a:  $p < 0,05$  Pré-suplementação vs Final suplementação pré-treinamento;  
b:  $p < 0,05$  Final suplementação pré-treinamento vs Pós-treinamento;  
c:  $p < 0,05$  Pré-suplementação vs Pós-treinamento

Esses resultados divergem daqueles encontrados em um estudo do nosso grupo, citado anteriormente, no qual se utilizou o modelo SHIME® (*Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*), com a suplementação por 15 dias com o mesmo sorvete utilizado na presente pesquisa,

havendo um aumento significativo desses metabólitos [6].

Outra hipótese para nosso resultado diz respeito ao fato de que nesse modelo, citado anteriormente, há a demonstração do que ocorre *in locus*, e não há a simulação da absorção, motivo pelo qual os resultados podem ter diferido dos que encontramos no presente estudo. Não foi possível medirmos a absorção dos AGCC, porém, se estes foram absorvidos de maneira eficiente, então houve uma pequena quantidade remanescente nas amostras de fezes.

Fato possivelmente confirmado pelos resultados obtidos na iniciação científica anterior à presente (quota 2018/2019), na qual observou-se mudanças nos parâmetros de humor e bem-estar, tendo em vista que os AGCC estimulam a síntese de serotonina (5-HT) pelas células enterocromafins, a qual pode modular a sinalização do sistema nervoso entérico, influenciando então o eixo microbiota-intestino-cérebro [14, 15].

Portanto, esses resultados reforçam a necessidade de mais estudos que avaliem os metabólitos derivados da atividade dessas bactérias, após o consumo de probióticos associados à prebióticos, e seus potenciais efeitos benéficos para a saúde humana.

## Referências Bibliográficas

[1] LIEBERMAN, H. R.; BATHALON, G. P.; FALCO, C. M.; KRAMER, F. M. et al. Severe decrements in cognition function and mood induced by sleep loss, heat, dehydration, and undernutrition during simulated combat. *Biol Psychiatry*, 57, n. 4, p. 422-429, Feb 2005.

[2] CHESTER, A. L.; EDWARDS, A. M.; CROWE, M.; QUIRK, F. Physiological, biochemical, and psychological responses to environmental survival training in the Royal Australian Air Force. *Military medicine*, 178, n. 7, p. e829-e835, 2013.

[3] FLOCH, M. H.; WALKER, W. A.; GUANDALINI, S.; HIBBERD, P. et al. Recommendations for probiotic use—2008. *Journal of clinical gastroenterology*, 42, p. S104-S108, 2008.

[4] LENOIR-WIJNKOOP, I.; SANDERS, M. E.; CABANA, M. D.; CAGLAR, E. et al. Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. *Nutr Rev*, 65, n. 11, p. 469-489, Nov 2007.

[5] TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev*, 81, n. 3, p. 1031-1064, Jul 2001.

[6] RODRIGUES, V. C. D. C.; DUQUE, A. L. R. F.; FINO, L. C.; SIMABUCO, F. M. et al. Modulation of the intestinal microbiota and the metabolites produced by the administration of ice cream and a dietary supplement containing the same probiotics. *Br J Nutr*, p. 1-12, Mar 2020.

[7] MONTALTO, M.; D'ONOFRIO, F.; GALLO, A.; CAZZATO, A. et al. Intestinal microbiota and its functions. *Digestive and Liver Disease Supplements*, 3, n. 2, p. 30-34, 2009.

[8] SCOTT, K. P.; GRATZ, S. W.; SHERIDAN, P. O.; FLINT, H. J. et al. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological research*, 69, n. 1, p. 52-60, 2013

[9] KLEESSEN, B.; SYKURA, B.; ZUNFT, H. J.; BLAUT, M. Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *Am J Clin Nutr*, 65, n. 5, p. 1397-1402, May 1997.

[10] HOPE, M. E.; HOLD, G. L.; KAIN, R.; EL-OMAR, E. M. Sporadic colorectal cancer—role of the commensal microbiota. *FEMS microbiology letters*, 244, n. 1, p. 1-7, 2005

[11] DAVILA, A.-M.; BLACHIER, F.; GOTTELAND, M.; ANDRIAMIHAJA, M. et al. Reprint of "Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host". *Pharmacological Research*, 69, n. 1, p. 114-126, 2013

[12] WANG, M.; WICHENCHOT, S.; HE, X.; FU, X. et al. In vitro colonic fermentation of dietary fibers: Fermentation rate, short-chain fatty acid production and changes in microbiota. *Trends in Food Science & Technology*, 88, p. 1-9, 2019.

[13] YANG, J.; MARTÍNEZ, I.; WALTER, J.; KESHAVARZIAN, A. et al. In vitro characterization of the impact of selected dietary fibers on fecal microbiota composition and short chain fatty acid production. *Anaerobe*, 23, p. 74-81, 2013.

[14] REIGSTAD, C. S.; SALMONSON, C. E.; III, J. F. R.; SZURSZEWSKI, J. H. et al. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *The FASEB Journal*, 29, n. 4, p. 1395-1403, 2015.

[15] KARL, J. P.; HATCH, A. M.; ARCIDIACONO, S. M.; PEARCE, S. C. et al. Effects of Psychological, Environmental and Physical Stressors on the Gut Microbiota. *Front Microbiol*, 9, p. 2013, 2018.