Treball de Recerca

Els probiòtics, salut en envàs.

Dirigit per Meritxell Navarrete Gatell
Èlia Figuera Pàmies
2n Batxillerat, A
Col·legi Lestonnac- L'Ensenyança

10 de desembre de 2013, Tarragona

Índex

0. Introducció 5

1. Aspectes teòrics

1.1. Els aliments funcionals 7

1.1.1. Els probiòtics 8

1.2. Els probiòtics i la salut humana 11

1.2.1. Investigació i etiquetatge correcte dels probiòtics 18
1.2.2. Mecanisme d'acció dels probiòtics, com actuen els probiòtics.....19
1.2.3. Dosis i qualitat dels probiòtics.....20
1.2.4. Innocuïtat del producte.....21

1.3. Quina diferència hi ha entre els probiòtics, els prebiòtics i els simbiòtics? 24

2. Treball al laboratori

2.1. Material utilitzat.....25

2.2. Comencem amb la pràctica.....26

2.2.1. Esterilització del producte..... 26

2.2.2.Recompte de cèl·lules.....28

2.2.3. Producció d'un iogurt.....33

3. La publicitat dels productes probiòtics.....34

3.1. Què hi ha de veritat en la publicitat dels productes probiòtics làctics.....34

4. Conclusions.....39

5. Bibliografia.....41

6. Annexos.....43

Agraïments: *A la Meritxell Navarrete, la meva tutora del Treball de Recerca; a l'Anna Borrull i a la Gemma Isabel López per tota l'ajuda que m'han prestat en la part pràctica del treball i a la URV per facilitar-me el material i l'espai per dur a terme les pràctiques de laboratori.*

Introducció

L'objectiu principal del meu Treball de Recerca ha estat descobrir què són els aliments funcionals, concretament els probiòtics, elements a vegades molt desconeguts per nosaltres, i intentar comprovar si són necessaris i beneficiosos per la salut humana.

Una de les motivacions que vaig tenir per tal de triar aquest tema per a realitzar el Treball de Recerca, és que m'agradaria enfocar el meu futur de cara a una carrera relacionada amb la investigació. Per aquest motiu aquesta era una ocasió única per començar a familiaritzar-me amb el material i les tècniques del laboratori.
Crec que el tema dels probiòtics i dels aliments funcionals és desconegut per la majoria de la població, ja que poques persones saben els efectes que provoquen aquests en el nostre organisme ni les dosis correctes en les quals s'han de consumir. Moltes persones confonem termes relacionats amb els aliments funcionals i els hi atribueixen qualitats que en realitat no tenen.
Una gran part de la societat pensa que el consum de productes probiòtics és més beneficiós per la salut del que verdaderament és. La població no està suficientment informada sobre el tema.

Això és el que principalment m'ha decidit a realitzar aquest treball.

He dividit el treball en dos apartats, la part teòrica i la part pràctica.

En la primera part, la teòrica, he investigat sobre els aliments funcionals, especialment els probiòtics, les seves característiques i propietats. També he aprofundit en els efectes dels probiòtics en la salut humana: els seus beneficis, les funcions clíniques, els seus mecanismes d'acció en el cos humà i les dosis adequades de consum. Durant el treball em vaig plantejar quina era la diferència entre probiòtics, prebiòtics i aliments funcionals, així que també vaig incloure aquesta diferència en el treball.
Partíem de la hipòtesi de que potser els probiòtics són beneficiosos per la salut.

Vaig voler aprofundir si era del tot certa o si, en qualsevol cas, venia condicionada per les campanyes publicitàries que fan les marques comercials fabricants d'aquests productes.
La informació principalment l'he extret de diferents webs especialitzades i de llibres tècnics.

L'altre gran bloc del treball és la part pràctica. En primer lloc vaig haver de cercar un laboratori que em permetés realitzar els meus experiments. Després de contactar amb diferents Institucions, el laboratori de microbiologia de la Universitat Rovira i Virgili em va acollir i tutelar aquesta tasca.
Inicialment, precisava familiaritzar-me amb els estris de laboratori i amb els aparells que em permetrien un bon desenvolupament de la pràctica així com amb el protocol de bones maneres per treballar en un laboratori i per tal de que per que la pràctica tingués èxit.
Vaig voler comprovar amb tècniques de laboratori la hipòtesi de que potser els probiòtics làctics comercialitzats contenen microorganismes vius. A la vegada, volia determinar la quantitat de bacteris i com eren al microscopi.
També, vaig voler comprovar la hipòtesi de que potser una colònia de bacteris extrets d'un dissolució de producte comercialitzat podia arribar a produir el meu propi iogurt.

Per complementar la part teòrica i la pràctica, em vaig plantejar realitzar un estudi comparatiu sobre la informació que figura en els envasos dels probiòtics làctics oferta per les diferents marques comercials als consumidors. Durant el treball em vaig assabentar de la polèmica en la qual es va veure relacionada la marca *Danone* fabricant de l'*Actimel*, un dels productes làctics estudiat Aquesta polèmica posava en dubte que el bacteri *L-Casei* fos el vertader causant de la millora immunològica del nostre organisme al prendre aquest producte. Per aquest motiu vaig investigar el succés. Volia arribar a una conclusió sobre qui era el vertader causant d'aquest efecte.

Els principals objectius del meu treball que vull assolir en la part teòrica del treball són:

- Diferenciar els aliments funcionals, els probiòtics i els prebiòtics.

- Investigar les funcions beneficioses que aporten els probiòtics al nostre organisme i la nostra salut.

Els principals objectius que vull assolir en la part pràctica són:

- Familiaritzar-me amb el material de laboratori, concretament amb el propi de l'especialitat de microbiologia.
- Fer el recompte de cèl·lules que hi ha en cada producte probiòtic làctic estudiat.
- Investigar quin bacteri dels productes probiòtics làctics estudiats és més eficient a l'hora d'elaborar un iogurt amb diferents tipus de llets.

1. Aliments funcionals: característiques i propietats

1.1. Els aliments funcionals

Els aliments funcionals són aquells que, a més de proporcionar un valor nutritiu a l'organisme (energia, greixos, sucres, proteïnes, vitamines, minerals, aigua…), hi afegeixen una funció concreta, com pot ser millorar la salut i reduir el risc de contraure malalties.

Els aliments funcionals poden ser: naturals o modificats tecnològicament, agregant-los components biològicament actius, com minerals, vitamines, àcids grassos, fibra o antioxidants.

Exemples d'aliments funcionals:

• Llets fermentades o iogurts, ja que els ferments del iogurt fresc exerceixen una acció beneficiosa sobre el funcionament i l'equilibri microbià intestinal (aliment funcional natural).

• Fruits secs, ja que el tipus de greixos que contenen (poliinsaturats[1]) poden prevenir l'aparició de malalties cardiocirculatòries (aliment funcional natural).

• Oli d'oliva, ja que el tipus de greixos predominants (monoinsaturats[2]) i els antioxidants naturals [3] que conté, prevenen l'aparició de trastorns de la circulació (aliment funcional natural).

• Làctis descremats o amb greixos modificats (omega 3[4]). Cal evitar els greixos continguts a la llet i als productes lactis (principalment els saturats). El consum de productes descremats pot millorar la prevenció de malalties cardiovasculars (aliment funcional modificat).

La dieta mediterrània és una alimentació molt funcional, perquè conté diversos components que aporten efectes beneficiosos per a la salut de forma natural.

1.1.1. Els probiòtics

La paraula "probiòtic" va ser introduïda per primer cop al 1965 per Lilly i Stillwell[5]; a diferencia dels antibiòtics, van definir els probiòtics com el factor d'origen microbiològic que estimula el creixement d'altres organismes.

Al 1989 Roy Fuller va introduir la idea de que un probiòtic havia de tenir un efecte beneficiós per l'individu que el prenia.

---

[1] Són els àcids grassos que tenen més d'un doble enllaç entre els carbonis de la cadena hidrocarbonada. Les seves molècules presenten colzes en els llocs on hi ha els dobles enllaços.

[2] Són els àcids grassos que només tenen un doble enllaç entre els carbonis de la cadena hidrocarbonada. Les seves molècules presenten colzes en els llocs on hi ha el doble enllaços.

[3] Són un grup de vitamines, minerals, colorants naturals i altres compostos de vegetals i enzims (substàncies pròpies del nostre organisme que intervenen en múltiples processos metabòlics), que bloquegen l'efecte perjudicial dels denominats radicals lliures. La majoria dels antioxidants es troba en aliments vegetals, cosa que explica que incloure fruites, llegums, verdures i hortalisses o cereals integrals a la nostra dieta sigui tan beneficiós.

[4] Els àcids grassos omega 3 constitueixen una família d'àcids grassos insaturats (molècules de la família dels lípids) que es caracteritzen per tenir el seu primer doble enllaç a la posició tercera començant pel darrer àtom de carboni. Aquest tret estructural distintiu els atorga unes propietats físiques especials i els converteix en precursors insubstituïbles de molècules que els éssers vius utilitzen per a regular determinades funcions circulatòries.

[5] Daniel M. Lilly and Rosalie H. Stillwell els primers científics en utilizar la paraula probiòtic. Un dels llibres que van escriure va ser *Growth promoting factors produced by mimicroorganisms.*

Actualment diem que els probiòtics són suplements alimentaris que contenen microorganismes vius i que ingerits en quantitats adequades milloren el balanç microbià de la flora intestinal del consumidor. Tècnicament la paraula "probiòtic" inclou a tots aquells microbis vius que en estudis amb humans controlats han demostrat produir un benefici per la salut.
Les espècies més utilitzades són *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i el llevat *Saccharomyces boulardi*, així com també algunes espècies de *Escherichia coli* i *bacilli.*

Els bacteris d'àcid làctic, entre els que es troba el *Lactobacillus*, s'han utilitzat en la conservació d'aliments mitjançant fermentació durant milers d'anys. Poden exercir una funció doble, actuant com a agents fermentadors d'aliments, així com generar efectes beneficiosos per la salut. La fermentació d'aliments brinda perfils de gust característics i redueix el pH, fet que impedeix la contaminació provocada per possibles agents patògens. La fermentació s'utilitza a nivell mundial pel manteniment d'una gama de materials agrícoles sense processar (cereals, arrels, fruites i hortalisses, llet, carn, peix, etc...).

Els probiòtics es poden incorporar a un ampli ventall de productes, tant en aliments, com en medicaments i suplements dietètics.

Les formes més comunes per a l'administració de probiòtics són els productes làctics i els aliments amb probiòtics afegits, però també hi ha al mercat comprimits, càpsules i sobres que contenen microorganismes en forma liofilitzada[6].

La investigació de probiòtics diu que aquests, tant els probiòtics de caràcter mèdic com els de caràcter alimentari, haurien de tenir una sèrie de beneficis potencials per la salut. De tota manera, els efectes descrits tan sols poden ser atribuïts a la/les soques analitzades en cada estudi i no es pot generalitzar a

[6] La liofilització consisteix en fer desaparèixer l'aigua dels aliments, que hauran d'estar en un recipient al buit. És una tècnica bastant cara i només s'aplica a productes d'alt preu i a algunes medecines. L'avantatge respecte a la deshidratació tradicional és que la recuperació d'aigua és instantània.

tota l'espècie ni a tot el grup de bacteris productors d'àcid làctic i a altres probiòtics.

El fet que els efectes són específics per cada soca té diverses implicacions:
- Han de documentar-se els efectes sanitaris de cada soca específica present en el producte de venda.
- Els resultats i els articles de revisió provinents d'estudis realitzats amb soques específiques no poden ser utilitzats com a prova per avalar els efectes sobre la salut de soques quan no han estat incloses en l'estudi.
- Els estudis que documenten l'eficàcia de soques específiques a una determinada dosis no constitueixen evidències suficients com per recolzar els efectes sobre la salut a una dosis més baixa.

També s'ha de considerar l'eventual paper beneficiós de la substància de vehicle. Alguns efectes poden no reproduir-se quan es canvia el vehicle utilitzat.
Una soca probiòtica es cataloga en base al seu gènere, espècie i a una designació alfanumèrica. En la comunitat científica s'ha acordat una nomenclatura pels microorganismes, per exemple *Lactobacillus casei* DN-114 001 o *Lactobacillus rhamnosus* GG.
Els noms comercials no estan subjectes a regulació, i les companyies poden denominar els probiòtics que posen als seus productes amb el nom que vulguin, com per exemple el *Lactobacillus* que utilitza *Danone* en els *Actimel*, l'anomenat *L- Casei Danone*.

Malgrat el consens científic existent, no hi ha definició legal del terme probiòtic.
Podem diferenciar entre dos tipus diferents de probiòtics, els probiòtics de caràcter mèdic (*pharmaceutical probiotic)* i el probiòtics de caràcter alimentari (*alimentary probiotic*).

Els criteris mínims exigits pels productes probiòtics són que el probiòtic ha de:
- Estar especificat per gènere i soca. La investigació sobre soques de probiòtics específics no pot aplicar-se a qualsevol producte comercialitzat com a probiòtic.

- Contenir els bacteris vius.
- Ser administrat en dosi adequada fins al final de la seva vida útil (amb variabilitat mínima d'un lot a l'altre).
- Haver demostrat ser eficaç en estudis controlats en humans.

Donat que les normes per les declaracions de continguts i etiquetatge sobre els productes no estan establertes universalment i/o no s'apliquen universalment, la indústria ha de mantenir la integritat en la formulació i el retolat perquè els consumidors puguin confiar en aquesta categoria de productes, els probiòtics.

1.2. Els probiòtics i la salut humana.

Principalment els probiòtics s'utilitzen per al tractament i la prevenció d'infeccions intestinals, tot i que també es poden utilitzar per prevenir o curar altres malalties digestives no infeccioses, així com també en afeccions d'altres òrgans (al·lèrgies, èczema, vaginitis...) Actualment, els probiòtics han demostrat ser útils i beneficiosos en:

- Tractament de la diarrea aguda infecciosa en nens i adults.
- Prevenció de la diarrea associada a antibiòtics en nens i adults.
- Algunes malalties inflamatòries intestinals (colitis ulcerosa[7]).
- Millora dels símptomes deguts a la mala digestió de la lactosa.
- Millora d'alguns símptomes de la síndrome del budell irritable.
- Prevenció de l'enterocolitis[8] narcotitzant en nou-nats pre-terme.

Altres situacions en les que els probiòtics podrien ser útils en un futur, però on encara es necessiten més estudis que avalin la seva eficàcia, són:

- Disminució dels símptomes d'asma i altres malalties de base al·lèrgica.
- Prevenció d'infecció urinàries i del tracte genital, sobretot en dones.

[7] La colitis ulcerosa es una malaltia inflamatòria de l'intestí gros. Esta caracteritzada per la inflamació i la ulceració de la paret interior del colon. Els símptomes són la diarrea, algunes vegades amb sang, y el dolor abdominal. <http://www.geosalud.com/Digestivo/colitisulcerosa.htm>

[8] Enterocolitis necrosant (ECN) és una malaltia que apareix al recent nascuts, especialment als prematurs, i que consisteix en la inflamació a causa per la destrucció de l'intestí. <http://es.wikipedia.org/wiki/Enterocolitis_necrosante>

- Prevenció i disminució de la gravetat de les infeccions en nou-nats prematurs.
- Disminució de les complicacions (sobretot infeccioses) en pacients ingressats en les unitats de cures intensives.
- Prevenció de les infeccions en pacients amb cirrosi hepàtica.
- Millora dels símptomes en pacients amb artritis reumatoide i altres malalties reumatològiques de tipus inflamatori.
- Prevenció d'aparició de tumors.
- Disminució dels nivells de colesterol.

D'altra banda, en persones sanes, el consum de probiòtics pot ajudar a mantenir la salut, per exemple en:

- Reduir el plor en nens amb còlics del lactant.
- Reduir els episodis de febre i diarrea en nens.
- Reduir la duració dels refredats però no la seva freqüència.

En general, l'evidencia clínica més rellevant a favor dels probiòtics està relacionada amb el seu ús en la millora de la salut de l'intestí i estimular la funció immunitària.

El probiòtics tenen molts afectes beneficiosos sobre la salut humana, però també tenen aspectes que podrien ser perillosos si no tenim precaució amb ells.

La ingestió d'un elevat nombre de microorganismes viables[9] obliga a investigar la seva seguretat. Des d'un punt de vista teòric, al tractar-se de microorganismes que normalment formen part de la nostre pròpia flora, difícilment podrien causar problemes infecciosos. Tot i que s'ha descrit algun cas aïllat de pas d'aquest gèrmens a la sang en pacients amb un sistema immunitari compromès i en pacients amb malalties com la colitis ulcerosa, el perfil de seguretat dels probiòtics més emprats en els estudis realitzats relacionats amb el tema, s'ha de considerar satisfactori. S'ha d'anar amb compte en administrar probiòtics en pacients greument immunodeprimits.

[9] El recompte de viables consisteix en comptar les cèl·lules que estan vives del producte probiòtic.

Si prenem els probiòtics en les quantitats recomanades no ens provocaran cap efecte negatiu, però si en prenem grans dosis, aquests, ens poden arribar a causar greus problemes en el funcionament del nostre organisme.

Els probiòtics tenen diferents funcions clíniques:

- Intolerància a la lactosa.

Un dels efectes probiòtics més consistents i reproduïbles, és la disminució dels símptomes associats amb la mala absorció de la lactosa, és a dir, el sucre de la llet. La lactosa, esta formada per una molècula de glucosa i una de galactosa. En la majoria d'humans, a mesura que s'envelleix, també sol disminuir la producció de lactasa, l'enzim que hidrolitza[10] la lactosa en glucosa i galactosa. Això resulta en deficiència de lactasa, més coneguda com a intolerància a la lactosa. Quan falta aquest enzim (lactasa), la lactosa sense hidrolitzar passa a l'intestí gros i els microorganismes la utilitzen i això pot provocar efectes secundaris: dolor abdominal, espasmes, flatulència, defecació urgent, vòmits i fins i tot febre a causa . Els mamífers adults, com que ja no beuen llet, deixen de fabricar l'enzim. És una qüestió d'estalvi d'energia: per a què fabricar un element que no té utilitat? Però la majoria dels humans adults occidentals tenim encara aquest enzim per una mutació genètica de fa milers d'anys. Les persones que són intolerants a la lactosa no presenten l'enzim lactasa. Generalment, les persones que presenten intolerància a la lactosa poden prendre productes làctics fermentats, com ara el iogurt, la llet agria o el formatge. Les bactèries de l'àcid làctic, com ara *Lactobacillus, Lactococcus*, i el *Leuconostoc* que participen en la fermentació tenen l'enzim lactasa, ja que el necessiten per fer la hidròlisi de la lactosa i d'aquesta manera obtenir galactosa i glucosa i així poder fer la fermentació. Per tant en un producte làctic fermentat

[10] La hidròlisi és una solvòlisi (reacció d'un solut amb els ions o les molècules del solvent en què es troba dissolt) on el dissolvent és l'aigua. Es tracta d'una reacció química de doble descomposició on un dels reactius és l'aigua, que al mateix temps és el dissolvent de la dissolució on el solut és l'altre reactiu. Els reactius diferents de l'aigua, i els productes de la hidròlisi, poden ser molècules neutres, com en la majoria d'hidròlisis que impliquen compostos orgànics, o ions, com en el cas de la hidròlisi de les sals, àcids i bases.

gairebé no hi ha lactosa, ja que els bacteris làctics s'han encarregat de trencar-la.
Entre un 50 i un 70% de la població humana pateix intolerància a la lactosa, però cal diferenciar-la de l'al·lèrgia a la llet, ja que l'al·lèrgia a la llet és la resposta immunitària exagerada, anormal, a les proteïnes presents a la llet.

- Efecte immunomodulador

Aquest efecte consisteix en que els bacteris làctics dels aliments funcionals han de ser capaços no només d'aportar-nos una immunoestimulació a nivell de les mucoses, sinó també de garantir l'absència d'efectes com per exemple la translocació microbiana[11].
Per aquest motiu és imprescindible avaluar l'efectivitat de les bactèries probiòtiques per a interactuar amb l'intestí i les cèl·lules del sistema immunitari associades a aquest.
Un exemple (Taranto i altres, 1999) el trobem en una mescla de bacteris utilitzats per a l'elaboració del formatge fresc probiòtic, aquests bacteris van ser capaços d'interactuar justament en els llocs més importants de l'intestí prim (les plaques de Peyer) i de l'intestí gros (nòduls limfoides mesentèrics) i de mantenir la relació entre Limfòcits T col·laboradors10 (CD4+) i LT citotòxics11 (CD8+). Els limfòcits T col·laboradors s'activen mitjançant altres cèl·lules immunitàries tals com els Limfòcits T citotòxics (CD8+), que són els encarregats de neutralitzar les cèl·lules infectades per microorganismes nocius injectant enzims tòxics que provoquen la destrucció de les cèl·lules infectades. Els Limfòcits T citotòxics al seu torn també activen als Limfòcits B, els quals alliberen anticossos específics. Així s'aconsegueix augmentar la resistència de l'hoste i facilitar l'exclusió de patògens de l'intestí de manera específica per a cada agent infecciós.
A més a més, s'han dut a terme alguns experiments *in vitro* i *in vivo* amb llets fermentades i amb diferents tipus de *Lactobacillus*, on s'han demostrat

[11] Pas dels bacteris i els seus productes per la mucosa intestinal cap a òrgans extra-intestinals com són per exemple el fetge i la melsa.

modificacions en alguns indicadors immunològics com per exemple en els anticossos, en l'interferó[12] i en l'activació de la fagocitosi.

- Reducció del colesterol

Un dels efectes probiòtics importants, que té una possible aplicació dins l'àrea de la medicina i la nutrició, és la capacitat d'alguns bacteris làctics de reduir el colesterol. Aquest compost afavoreix el desenvolupament d'àcids biliars, d'hormones esteroides[13] i el trobem també en la membrana plasmàtica de les cèl·lules eucariotes.
Tot i que el colesterol és essencial per la vida, un excés d'aquest afavoreix malalties com l'ateriosclerosi[14].
Encara es desconeix el mecanisme que utilitzen els probiòtics per a reduir el colesterol, però s'han formulat una sèrie d'hipòtesis respecte aquest fenomen, com per exemple:
- La producció de propionat[15]
- L'assimilació del colesterol per el bacteri.
- La degradació enzimàtica

- L'efecte gastro-protector

Una de les principals causes de la gastritis aguda crònica i de l'úlcera és la presència del bacteri *Helicobater pylori*. Quan aquest bacteri entra en contacte amb la mucosa intestinal, aquesta desencadena una reacció inflamatòria, la qual anomenem gastritis aguda. Aquesta inflamació pot desenvolupar-se i donar lloc a una gastritis crònica, una acumulació de limfòcits i altres cèl·lules

[12] Proteïna antivírica que produeixen el sistema immunitari de les cèl·lules dels animals vertebrats encarregada de respondre a agents externs com són els virus i cèl·lules cancerígenes.

[13] Tipus d'hormones que intervenen en el control del metabolisme, la inflamació, funcions immunològiques, equilibris de sal i aigua, desenvolupament corporal.

[14] Malaltia on es dipositen substàncies lipídiques a les parets arterials, és a dir, greixos.

[15] Sal o èster de l'àcid propiònic.

del sistema immunitari. Aquesta infecció pot evolucionar cap a malalties més greus com per exemple l'úlcera pèptica o el càncer gàstric.
Un exemple d'alteració gastrointestinal és la gastroenteritis, provocada per un retrovirus. La gastroenteritis produeix diarrea, vòmits i febre. El virus que provoca la gastroenteritis es transmet per aliments o mitjançant l'aigua contaminada amb matèria fecal.

Es aconsellable el consum de probiòtics quan es pateixen alteracions digestives, ja que, aquests, són fàcils de digerir, regulen la flora intestinal i tenen un efecte protector contra agents patògens.
Dos exemples d'aquests bacteris probiòtics gastro-protectors són els *Lactobacillus reuteri* i els *Lactobacillus rhamnosus*.

- Prevenció del càncer de còlon

La mort per càncer de còlon és molt comú a occident, ja sigui per algun factor genètic o per l'alimentació. Per exemple, quan cuinem la carn, la convertim en amines heterocícliques[16], i en la fermentació bacteriana de proteïnes obtenim amines i amoníac, que són un toxicogènics per tal de que això no passi hem d'ingerir un tipus de vegetals que contenen probiòtics que impedeixen que es desenvolupi aquest tipus de càncer.

- Prevenció de reaccions al·lèrgiques

Una al·lèrgia és la resposta exagerada del sistema immunitari a una substància en particular. Els al·lèrgens alimentaris, com per exemple les proteïnes de la llet de vaca, poden provocar una resposta inflamatòria a l'intestí . És possible que els bacteris probiòtics puguin prevenir aquesta disfunció, ja que hi ha una relació directa entre el teixit limfoide de l'intestí i la resposta al·lèrgica. Els probiòtics actuen reduint la inflamació intestinal, corregeixen la

[16] Quan un o més àtoms de nitrogen són membres d'una estructura orgànica cíclica.

descompensació de limfòcits i estimulen les citocines[17]. Alguns *Lactobacillus* i altres bacteris utilitzats com a probiòtics milloren el processament dels antígens que arriben a les plaques de Peyer[18] a través de l'alimentació.

- Inhibició d'agents patògens

La nostra flora intestinal ens protegeix de la possible entrada d'agents patògens i normalment, són neutralitzats. Però un mal ús o un ús excessiu d'antibiòtics pot fer-nos perdre aquesta flora i permetre que aquests agents patògens que ingerim ens produeixin infeccions.
Una correcta ingesta de probiòtics pot prevenir la infecció per part d'un patogen, ja que els probiòtics reforcen els bacteris intestinals.
Un exemple d'aquests tipus de probiòtics seria el *Lactobacillus acidophilus*, que actua sobre l'intestí fent variar una mica el ph, i com a conseqüència fa que els agents patògens morin i no puguin actuar.
Hi ha estudis (realitzats pel científic Jeffrey Gordon[19]) sobre aliments probiòtics on els resultats demostren que ingerir aquests bacteris de manera addicional té uns efectes mínims en l'organisme. Per això, diferents experts en microbiologia defensen que és aviat per extreure conclusions sobre aquest tema i que encara s'ha d'aprofundir en la recerca.

---

[17] Les citocines són un tipus de molècules senyalitzadores que, com les hormones i els neurotransmissors, són utilitzades àmpliament en la comunicació cel·lular. Són proteïnes, pèptids o glicoproteïnes. El terme citocina agrupa una gran i diversa família de reguladors polipeptídics produïts àmpliament arreu del cos per cèl·lules d'origen embriològic. <http://ca.wikipedia.org/wiki/Citocina>

[18] Les plaques de Peyer són uns cúmuls de teixit limfàtic que recobreixen interiorment les mucoses com ara les de l'intestí i les de les vies respiratòries. <http://es.wikipedia.org/wiki/Placas_de_Peyer>

[19] Jeffrey Gordon és biòleg i director del "Center for Genome Sciences and Systems Biology" de la universitat de Washington, St. Louis.
Gordon és internacionalment conegut per la seva recerca en el desenvolupament del sistema gastrointestinal i de com afecten les comunitats microbianes intestinals a la funció normal de l'intestí. És membre de la National Academy of Sciences, la American Academy of Arts and Sciences i l' Institute of Medicine of the National Academies.

1.2.1. Investigació i etiquetatge correcte dels probiòtics

Les afirmacions que sostenen els efectes beneficiosos dels probiòtics poden adoptar diferents formes, depenent de l'ús que es pretén del producte.
Els postulats més comuns són aquells que vinculen els probiòtics amb l'estructura i funcionament normal del cos humà, coneguts com "postulats d'estructura-funció" moltes vegades considerats com a "tous", ja que no permeten anomenar la malaltia o patologia. Si be els estudis *in vitro* i en animals són importants per desenvolupar estratègies clíniques, no es considera que siguin suficients per recolzar aquests postulats.

En aquest sentit, el Consell per a la Ciència i Tecnologia Agrícola[20] ha publicat un treball sobre els probiòtics que manifesta el següent:

- Es desafortunat que en l'actualitat es pugui retolar productes probiòtics sense estar ni ben definits ni provats en estudis controlats en humans.

- El ritme de la investigació sobre probiòtics s'ha accelerat en els darrers anys: entre 2001-2005 es van publicar un nombre quatre vegades més gran que el nombre d'assajos clínics publicats al període 1996-2000.

- Per alguns productes hi ha importants diferències entre l'eficàcia demostrada per la investigació i el que s'afirma en el mercat.

- S'han documentat casos en els que els productes no compleixen amb els postulats que figuren en les seves etiquetes en relació amb el nombre i tipus de microorganismes viables presents i sobre la quantitat que s'ha de consumir per tal de que resulti beneficiós per la salut.

- Al dissenyar les seves polítiques sobre les noves soques probiòtiques que es poden introduir per a l'ús en humans, els governs haurien d'examinar

[20] En anglès, SERC de Science and Engineering Research Council) és l'agència del Regne Unit encarregat de la recerca científica amb finança pública en les àrees d'astronomia, biotecnologia i ciències biològiques, espai i física de partícules.

l'evidència científica sobre els aspectes funcionals i la innocuïtat dels probiòtics en els aliments seguint les pautes establertes pel grup de treball FAO[21]/OMS[22] al 2002.

-Es suggereix que els fabricants declarin a l'etiqueta el gènere, l'espècie i la soca de cada probiòtic en un producte, junt amb el nombre de cèl·lules viables de cada soca probiòtica. (Veure taula1[23] on hi podrem trobar exemples sobre les soques de probiòtics en diferents productes).

1.2.2. Mecanisme d'acció dels probiòtics, com actuen els probiòtics.

El sistema de defensa de l'organisme contra les substàncies estranyes es coneix com sistema immune. Més de dues terceres parts del sistema immune de l'organisme es troben al budell. De fet, el tub digestiu[24] està en contacte amb l'exterior a través d'una extensa superfície. Els aliments poden ser un factor d'agressió cap al budell juntament amb els microorganismes (bactèries, virus i fongs).

La flora bacteriana intestinal està formada per milions de bactèries que proliferen a l'interior del budell gruixut i fermenten diferents elements produint substàncies beneficioses per la salut. Aquestes bactèries intervenen en el

---

[21] L'Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació (FAO, sigles de Food and Agriculture Organization) és una organització específica de la ONU, creada el 16 d'octubre de 1945, a la ciutat de Quebec. La FAO consta 188 membres (187 estats més la Unió Europea). El seu lema és «Ajudar a construir un món sense gana» i la seva seu és a la ciutat de Roma, Itàlia.La FAO realitza programes per elevar els nivells de nutrició i de vida, millora l'eficiència de la producció, elaboració, comercialització i distribució dels aliments i productes agropecuaris de granges, boscos i pesques, promovent el desenvolupament i millora de la població rural.

[22] L'Organització Mundial de la Salut (OMS) (WHO en el seu acrònim en anglès) és una agència de l'Organització de les Nacions Unides (ONU) amb seu a Ginebra (Suïssa) que actua com a autoritat coordinadora en temes de salut pública internacional; està especialitzada en gestionar les polítiques de prevenció, promoció i intervenció en salut a nivell mundial. Els 193 Estats Membres de l'OMS governen l'Organització per mitjà de l'Assemblea Mundial de la Salut. L'Assemblea està composta per representants de tots els Estats Membres de l'OMS.

[23] Veure annexos, annex 1.

[24] Format per l'estòmac, el budell prim i el gruixut.

desenvolupament normal del sistema immunitari i en la regulació de la resposta de l'organisme davant els organismes patògens[25].
La flora intestinal participa en diversos processos fisiològics com la digestió i els moviments del tub digestiu, així com en la producció d'algunes vitamines.
Els probiòtics actuen a nivell del tub digestiu estabilitzant la composició de la flora bacteriana i incrementant la resistència de l'organisme davant dels microorganismes patògens, i millorant i activant les defenses del nostre organisme. Els probiòtics produeixen substàncies que ajuden a combatre bacteris patògens i produeixen vitamines i enzims digestius.

1.2.3. Dosis i qualitat dels probiòtics.

Els probiòtics produeixen efectes beneficiosos sobre la salut, però aquests efectes només es poden atribuir als probiòtics específics estudiats per la indicació o situació concreta. Per tant, no tots els probiòtics es poden administrar per la mateixa situació, ni tots els probiòtics en totes les situacions.
S'han d'utilitzar les dosis de probiòtics que ens recomanen, a dosis més baixes o més elevades pot ser que no siguin efectius, o podrien ser nocius.
Com hem dit anteriorment, pacients greument immune deprimits, és a dir, amb el sistema de defensa del propi organisme compromès, no han de prendre probiòtics sense la recomanació d'un metge, ja que en aquestes circumstàncies el probiòtic podria arribar a comportar-se com un agent patogen i causar greus problemes a l'organisme.
Les formes més comuns dels probiòtics són els productes làctics i els aliments fortificats amb probiòtics. De tota manera, també hi ha al mercat comprimits, càpsules i sobres que contenen bacteris en forma liofilitzada.
La dosi de probiòtics necessària varia segons la soca del probiòtic i el tipus producte.

Molts dels productes de venda lliure, és a dir, venda al públic, proporcionen d'1 a 10 milions de ufc[26]/dosi, tot i que alguns d'aquests productes han demostrat

[25] És a dir, els microorganismes perjudicials per la salut.

[26] UFC: unitats formadores de colònies (bactèris viables).

ser eficaços en menys quantitat, mentre que altres requereixen quantitats superiors.

No és possible establir una dosis general pels probiòtics, la dosificació ha d'estar basada en estudis humans que mostrin un benefici per la salut.

Un aspecte molt important que afecta a la qualitat dels probiòtics i que molts cops molts de nosaltres no posem en pràctica és que s'han de seguir de manera estricta les normes de conservació dels productes probiòtics, ja que molts d'ells necessiten una temperatura determinada per mantenir-se.

1.2.4. Innocuïtat del producte.

Algunes espècies de *Lactobacillus* i *Bifidobacteris* són residents normals o que freqüentment transiten per l'aparell digestiu humà i com a tals no presenten infectivitat o toxicitat.

Generalment es considera que els bacteris *Lactoacidófils* tradicionals, associats des de fa molt de temps amb la fermentació dels aliments, són segurs per al consum oral com a part d' aliments i suplements per a la població generalment sana com als nivells emprats tradicionalment.

Les regulacions pels suplements dietètics són inexistents en molts països o molt menys estrictes que els que s'apliquen per als medicaments amb recepta. Actualment, la FDA[27] no ha aprovat cap declaració per a probiòtics que vinculi els probiòtics amb una reducció del risc de malaltia.

Les declaracions sobre estructura-funció són usades comunament per als probiòtics, però aquests no requereixen aprovació de la FDA pel seu ús.

[27] Food and Drug Administration, Agencia d'Aliments i Medicaments o Agencia de Drogues i Aliments dels Estats Units.

La producció de suplements de la dieta varia entre els fabricants i a vegades amb el temps varia per un mateix fabricant. És probable que l'eficàcia i els efectes col·laterals difereixin entre soques, productes, marques o inclús dins dels diferents lots de la mateixa marca.

No es coneixen els efectes a llarg termini de la majoria dels suplements alimentaris, a part de les vitamines i minerals, ja que molts suplements dietètics no són utilitzats a llarg termini.

Recentment s'està subministrant grans quantitats de productes probiòtics a pacients. L'ús de probiòtics en persones malaltes està restringit a les soques o indicacions amb una eficàcia provada. Les proves o l'ús de probiòtics en persones amb malalties tan sols és acceptable si s'han aprovat i si són aprovades per el comitè d'ètica independent.

Considerant la prevalença dels *lactobacils* en els aliments fermentats, com a colonitzadors normals del cos humà, i el baix nivell d'infecció que se'ls hi atribueix, es va revisar la seguretat d'aquests microbis, considerant que el seu potencial patogen es bastant baix, per tant si es prenen en les dosi adequades, són segurs per la salut humana.

Segons un informe d'un grup de treball conjunt de la FAO[28] i l'OMS[29] que redacta les "Pautes per a l'avaluació dels probiòtics en aliments" diu que l'examen dels aspectes patològics, genètics, toxicològics, immunològics, gastroenterològics i de seguretat microbiològica de les noves soques probiòtiques exigeix un enfocament multidisciplinari, és a dir, que s'ha d'estudiar des de diferents punts de vista.

[28] FAO: sigles de Organització de les Nacions Unides per l'alimentació i l'agricultura. Aquesta organització treballa peraconseguir la máxima seguretat alimentària i per assegurar a tothom aliments de bona qualitat.

[29] OMS: sigles d'Organització Mundial de la Salut. Aquesta institució és la autoritat directiva y coordinadora de l'acció sanitaria de les Nacions Unides.

No és suficient amb l' avaluació de seguretat i l'anàlisi toxicològic convencional, ja que per beneficiar als humans, els probiòtics suposadament han de sobreviure i/o multiplicar-se.

Des d'una perspectiva científica, la descripció adequada d'un producte probiòtic tal com s'expressa a l'etiqueta ha d'incloure:

- Identificació del gènere i espècie amb nomenclatura consistent en dos noms científics reconeguts.

- Recompte de microorganismes viables de cada soca al final de la vida útil.

- Condicions d'emmagatzematge recomanades.

- Seguretat en les condicions d'ús recomanades.

- Dosis recomanada del producte en condicions de salut normals.

- Una descripció exacta de l'efecte fisiològic.

- Informació de contacte per la vigilància post-comercialització.

1.3. Quina diferència hi ha entre els probiòtics, els prebiòtics i els simbiòtics?

Els prebiòtics són substàncies alimentàries que nodreixen a un grup selecte de microorganismes que poblen l'intestí i afavoreixen més la multiplicació dels bacteris beneficiosos que la dels perjudicials.
Els prebiòtics no es poden digerir ni absorbir fins que no arriben a la zona del còlon.
Són capaços de modificar la composició de la flora del còlon en un sentit favorable i el més freqüent es observar el creixement i/o l'activitat metabòlica de soques del grup dels *Lactobacillus* o de les *Bifidobacteries*.
Un exemple d'aquest tipus d'aliments són aquells en els quals se'ls hi han afegit fibres (fructo-oligosacàrids[30] o insulina[31], entre d'altres) que la digestió humana no pot utilitzar, però que són un substrat molt nutritiu pels bactèris intestinals i aquests, alteren positivament la nostra flora.

A diferència dels probiòtics, la majoria de prebiòtics s'utilitzen com a ingredients d'aliments, com per exemple en galetetes, cereals, xocolata o productes làctics. Els prebiòtics més coneguts són: oligofructosa, inulina, galacto-oligosacàrids, lactulosa...
Per exemple l'oligofructosa prebiòtica (OF) està present de manera natural en molts aliments com el blat, la ceba, les bananes, la mel, l'all i el porro. La fermentació de la OF en el còlon dóna lloc a gran nombre d'efectes fisiològics: augment del nombre de bifidobacteris en el còlon, augment de l'absorció de

[30] Anomenats també com oligofructosa o oligofructan, són oligosacàrids fructans, usats com substituts del sucre alternatius. Els FOS mostren nivells de dolçor situats entre el 30 i 50% del sucre en xarops preparats comercialment. Es presenten de forma natural, i el seu ús comercial emergí en els anys 1980 en resposta a la demanda dels consumidors per aliments més saludables i baixos en calories.

[31] La insulina és una hormona que té efectes importants sobre el metabolisme i altres funcions de l'organisme. La insulina fa que les cèl·lules del fetge, dels músculs i del teixit adipós agafin la glucosa de la sang, que aquesta sigui emmagatzemada en forma de glicogen al fetge i als músculs i que s'aturi l'ús del greix com a font d'energia. El nivell d'insulina és un mecanisme central de control metabòlic, alhora que la seva situació també és utilitzada com un senyal de control d'altres sistemes del cos, com ara la captació d'aminoàcids per les cèl·lules. També té diversos efectes anabòlics a l'organisme.

calci, augment del pes fecal, escurçament de la durada del trànsit intestinal i la reducció dels nivells de lípids en sang.

Els simbiòtics són combinacions apropiades en certs productes de prebiòtics i probiòtics. Un producte simbiòtic fa tan l' efecte dels prebiòtics com dels probiòtics.

2. Treball de laboratori[32]

El treball de laboratori es dividirà en dos parts. La primera part es centrarà en el recompte dels bacteris de diferents productes probiòtics làctics i la segona part es basarà en la producció d'un probiòtic a partir de les diferents colònies dels bacteris anteriors, d'aquesta manera podrem comprovar quin tipus de bacteri làctic és més apte per la producció d'un iogurt (centrant-nos en el criteri de la rapidesa amb la qual de la llet passa a iogurt per l'acció del bacteri corresponent).

2.1. Material utilitzat

El primer pas en un treball de laboratori és la preparació del material a utilitzar. En el meu cas vaig necessitar:

-Pipeta graduada
-Puntes de plàstic de 1ml
-Tubs d'assaig de plàstic
-Gradeta
-Espàtula de Digransky
-Bec Bunsen d'alcohol
-Etanol
-Càmera Neubauer
-Porta objectes
-Oli d'immersió
-Microscopi òptic amb objectiu d'immersió (100 x)

[32] Veure annex 4 on hi ha el reportatge fotogràfic de la pràctica.

-Plaques de Petri

-Estufa de cultiu precisa amb la capacitat de ser estabilitzada a una temperatura de 37ºC

-Retolador permanent

2.2. Comencem amb la pràctica

2.2.1. Esterilització

Primerament, per tal de fer el recompte de cèl·lules probiòtiques haurem d'esterilitzar el material utilitzat, és a dir, tots els procediments físics, mecànics i químics que s'utilitzen per destruir o inactivar els gèrmens, generalment els gèrmens patògens. A través de l'esterilització, els materials de laboratori que utilitzarem en el procés queden totalment desinfectats i s'evita la contaminació de les plaques on es vol fer el recompte de bacteris viables.

Els microorganismes es poden classificar segons si són resistents a les baixes o a les altes temperatures. Els crioresistents són els resistents a les baixes temperatures i els termoresistents, els que són resistents a les altes temperatures. Normalment, però, s'utilitza la classificació que es basa en la temperatura en la qual es reprodueixen millor aquests microorganismes. Segons aquest criteri de classificació, podem trobar organismes: criòfils, que es reprodueixen entre els -5 i els 14 °C; organismes mesòfils que es reprodueixen entre els 25 i els 47 °C, i per últim els organismes termòfils que es reprodueixen entre els 50 i els 113°C.

Amb motiu d'aquesta gran varietat de temperatures a les que són resistents i es poden reproduir, en l'esterilització hem d'utilitzar una tècnica que contempli totes aquestes variables.

Concretament, per fer aquesta pràctica esterilitzarem el material en una autoclau, un recipient metàl·lic amb parets gruixudes i que tanca hermèticament. Ens permet treballar a altes pressions. La pressió dintre de l'autoclau és molt alta i per això podem arribar a escalfar l'aigua que hi ha dins

del recipient a més de 100ºC. L'acció conjunta de la pressió i la temperatura produeix la coagulació de les proteïnes dels microorganismes, entre les quals es troben les que són essencials per la vida i per la reproducció d'aquests i això condueix a la seva destrucció.

Per esterilitzar el material, el col·loquem a 121ºC durant 30 min dins de l'autoclau.

Per tal de que les mostres no es contaminin hem de treballar dins d'una atmosfera estèril, per ha fer-ho hem d'utilitzar el mètode del flamejat. Aquest mètode consisteix en escalfar directament a la flama del bec de Bunsen els estris a utilitzar. Principalment es basa en treballar manipulant les mostres i els cultius dels bacteris a prop d'una flama, ja que la gran escalfor que emet la flama provocava la mort de qualsevol microorganisme contaminant.

Les puntes de la pipeta que hem utilitzat són d'un sol ús, per tal de garantir-ne l'esterilitat.

Les plaques de Petri ja han estat prèviament esterilitzades. Aquestes, han estat facilitades de manera gratuïta pel departament de microbiologia de la Universitat Rovira i Virgili. Em van facilitar 5 plaques de Petri, amb el medi selectiu MRS[33]. Per tal de que les plaques no es contaminessin les vaig guardar a la nevera del laboratori de la universitat fins que va arribar el moment de fer-les servir.

---

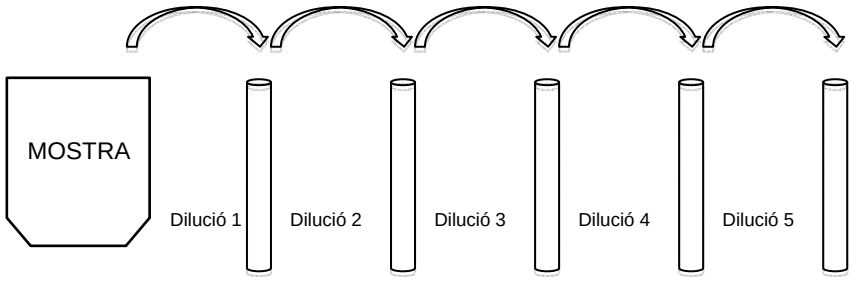
[33] L'agar MRS va ser desenvolupat per Man, Rogosa y Sharpe per tal de crear un medi de cultiu que pogués evidenciar un bon creixement de *Lactobacillus* i altres bacteris acido làctics.

Em medi de cultiu permet un abundant desenvolupament en totes les especies de *Lactobacillus.*

La peptona y la glucosa constitueixen una font de nitrogen, carboni i altres elements necessaris pel creixement bacterià. El citrat d'amoníac actua com a un agent inhibidor del creixement bacterià dels bacteris Gram negatius.

2.2.2. Recompte de cèl·lules

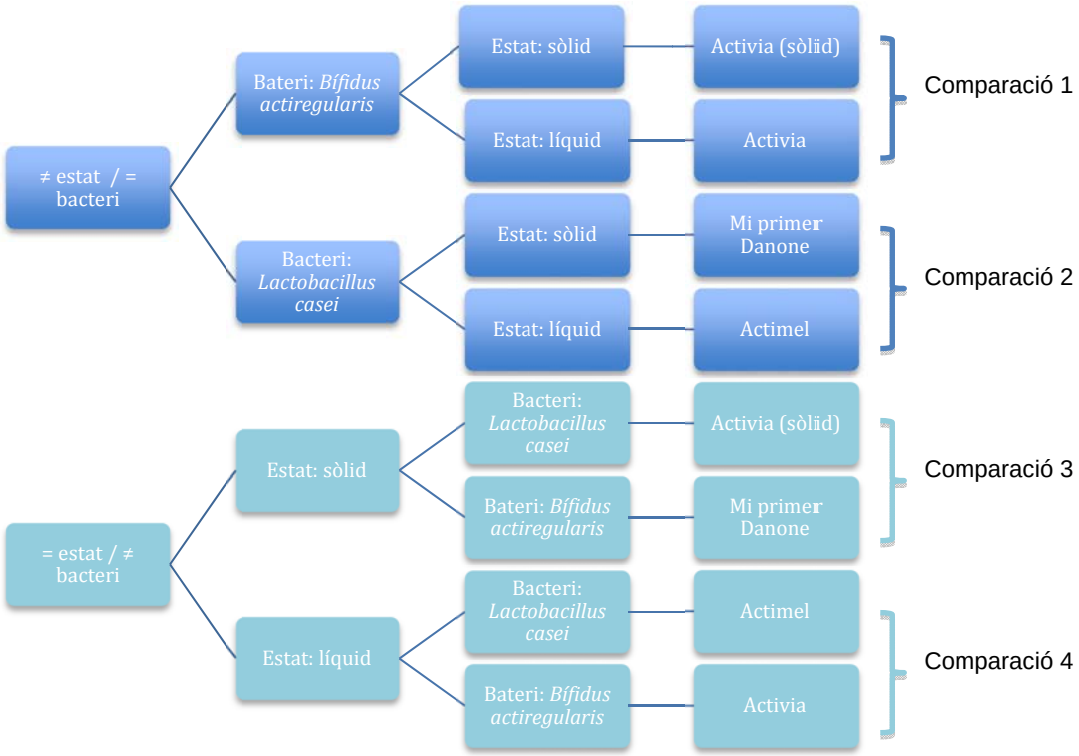
Quan el material esta esterilitzat, procedim a fer una dilució seriada de les mostres dels corresponents productes, és a dir, la reducció progressiva, pas a pas, de la concentració d'una substància en dissolució. Normalment el factor de dilució en cada pas és constant, això dona com a resultat una progressió geomètrica de la concentració. Concretament nosaltres agafem 1 microlitre de cada producte probiòtic làctic de cada mostra i el col·loquem en 900 microlitres d'aigua destil·lada, i a partir d'aquí diluïm fins a 5 vegades, per arribar als 10^3 microlitres de mostra.



Els productes làctics que estudiarem seran *Actimel* de la marca *Danone*, *mi primer Danone* de la marca *Danone, Activia* líquid i *Activia* iogurt.

Producte	**Bacteri que conté**
Activia (líquid)	*Bífidus actiregularis*
Activia (sòlid)	*Bífidus actiregularis*
Mi primer Danone (Sòlid)	*Lactobacillus casei*
Actimel (líquid)	*Lactobacillus casei*
Danone natural (sòlid)	*Lactobacillus bulgaricus i Streptococcus thermophilus*

Mitjançant aquestes mostres aconseguim fer una comparativa (en la segona part de la pràctica al laboratori) entre els bacteris, per tal de veure quin d'ells és més apte per produir iogurt, és a dir, quin produeix iogurt més ràpidament.



Les comparatives que farem seran, entre dos productes probiòtics làctics: un en estat sòlid i l'altre líquid, però amb el mateix tipus de bacteri; i entre dos productes probiòtics làctics en igual estat (líquid/sòlid), però amb un bacteri diferent.

Per les comparacions també utilitzarem els bacteris del iogurt *Danone natural* que conté els bacteris *Lactobacillus bulgaricus i Streptococcus thermophilus*[34].

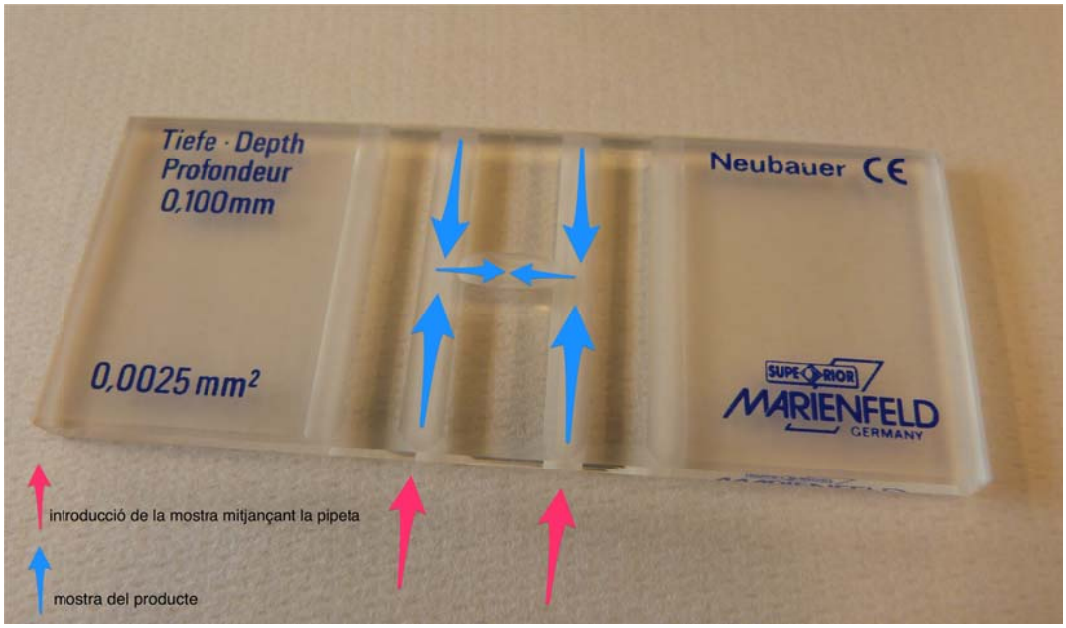
Tal com he explicat anteriorment, en la primera part de la pràctica de laboratori, farem un recompte del nombre de bacteris que té cada producte làctic.

Per a fer-ho, hem escollit una dilució de les que havíem fet prèviament,

[34] Aquesta informació la vaig obtenir enviant un correu a l'atenció al client de Danone, ja que el bacteri d'aquest iogurt no sortia especificat en cap lloc.

concretament la de 10^5. [35]

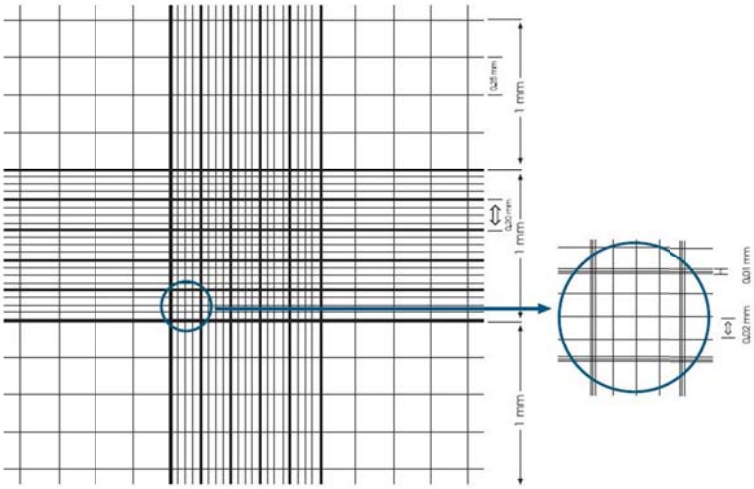
Primerament agafem 5 microlitres de la dilució 10^5, aquesta mostra de producte la introduïm a la càmera de Neubauer, que prèviament hem cobert amb un cubre. Introduïm la mostra mitjançant una pipeta, tal com mostrem en la imatge.



Quan ja tenim la mostra dins la càmera de Neubauer i coberta amb el cubre, amb molt de compte, la portem al microscopi per tal d'observar-la i analitzar-la.

En el microscopi a 40x observem les cèl·lules bacterianes. Mitjançant dues quadrícules que té la càmera de Neubauer i el microscopi, contem quantes cèl·lules veiem en cinc quadrícules de la càmera, i amb una breu fórmula acabem sabent quantes cèl·lules té el producte estudiat.

[35] Abans de fer el recompte mitjançant la mostra corresponent a la dilució de 10^5, havíem provat de fer el recompte de cèl·lules al microscopi mitjançant la dilució 10^4. Al col·locar la mostra dins la càmera de Neubauer i observar-la al microscopi, vam detectar que les colònies de cèl·lules es veien molt apilotonades, per tant, no era possible fer el recompte. Això ens fa duu a provar de fer el recompte mitjançant la dilució de 10^5. Aquesta última ja ens va aportar els resultats desitjats.



Els resultats obtinguts són:

	Activia líquid	***Activia sòlid***	***Actimel***	***Mi primer Danone***	***Danone natural***
Primera quadrícula	35 cèl·lules	A causa de que el producte està en estat sòlid, les colònies de cèl·lules estan molt juntes i fan impossible el recompte mitjançant aquest mètode.	44 cèl·lules	A causa de que el producte està en estat sòlid, les colònies de cèl·lules estan molt juntes i fan impossible el recompte mitjançant aquest mètode. Una dada important que he observat és que el iogurt *Mi primer Danone* mostrava les cèl·lules menys juntes que les de l'*Activia* i *Danone natural.* Això possiblement es degut a que *Mi primer Danone* està una mica més líquid que els altres dos iogurts.	
Segona quadrícula	32 cèl·lules		52 cèl·lules		
Tercera quadrícula	42 cèl·lules		54 cèl·lules		
Quarta quadrícula	30 cèl·lules		37 cèl·lules		
Cinquena quadrícula	24 cèl·lules		58 cèl·lules		
Nombre total de cèl·lules recomptades	163 cèl·lules		245 cèl·lules		

La fórmula que utilitzarem per saber el nombre total de cèl·lules que té el producte és $[\,] = \frac{cèl{\cdot}lules \times àrea \times profunditat}{5}$ el resultat que obtindrem a partir d'aquesta fórmula el multiplicarem per la dilució utilitzada, en aquest cas la de 10^5.

Els resultats obtinguts són:

- Activia líquid: 8,15 cèl·lules.
- Actimel: 2×10^6 cèl·lules.

El comptatge de bacteris també podria haver estat realitzat amb la tècnica de l'espectrometria mitjançant un espectrofotòmetre, o també mitjançant el Citòmetre de flux. Però per diferents motius la tècnica més eficaç ha estat la de la Càmera de Neubauer.

Després agafarem 5 microlitres de cada mostra (que recordem que té 900 micrometres d'aigua i 1 micrometre de producte làctic). Aquests 5 microlitres els introduirem en una placa de Petri, és a dir, en un recipient rodó de plàstic, de diferents diàmetres, de fons baix, amb una coberta de la mateixa forma que la placa, però una mica més gran de diàmetre, perquè es pugui col·locar damunt i tancar el recipient.

Utilitzem la tècnica de sembra en una placa de Petri en superfície. La placa contindrà prèviament un mitjà de cultiu solidificat adequat pel creixement dels bacteris.

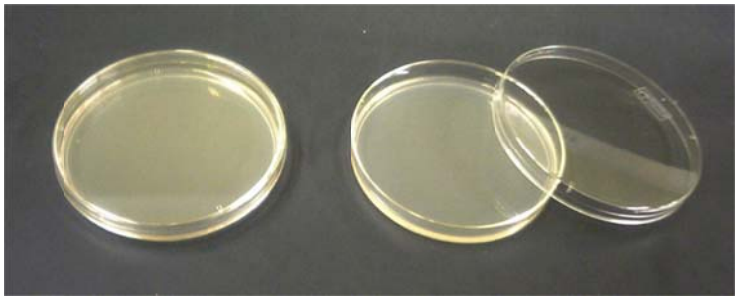
Amb l'ajuda d'una espàtula de Drigalsky repartirem la mostra de bacteris fins la seva absorció total pel medi de cultiu[36].

Quan ja tinguem totes les plaques sembrades amb cadascun dels productes làctics els col·locarem a l'estufa a 37ºC, que és la temperatura òptima per a la reproducció dels bacteris.

[36] Veure annexes (figura 4).

D'aquesta manera i al cap de 72h vaig observar el cultiu de bacteris que va créixer en cada placa.

Cal destacar que en aquest procés és fàcil que alguna placa pateixi una contaminació, però en el meu cas això no va succeir, per tant, vol dir que la pràctica la vaig realitzar correctament i dins d'una atmosfera que evitava la contaminació.



2.2.3. Producció d'un iogurt

En la segona part de la pràctica vull estudiar quina bacteri és més òptim per a la producció de iogurt.

Per a comprovar-ho vaig escollir cinc tipus de llets diferents en les quals introduiríem els cinc tipus de bacteris.

Les llets escollides són:

- *llet omega3*
- *llet enriquida amb calci*
- *llet desnatada*
- *llet fresca*
- *llet sencera ecològica.*

Mitjançant una pipeta vaig introduir 5 microlitres de la mostra 1 de cada producte làctic en 5mL de llet en un tub d'assaig.

Quan totes les llets tenen els bacteris de cada producte, col·loquem els tubs a l'estufa a 37ºC.

Al cap de 24h vaig comprovar que el pH de *Activia sòlid, Activia líquid* era un

pH2, en canvi, vaig comprovar que en l'*Actimel, el Danone natural i Mi primer Danone* a les 24h el pH era 7, per tant els vaig deixar a l'estufa fins a les 72h, en aquest punt el seu pH ja era de 2, és a dir, el pH propi dels iogurts, un pH àcid.

Per tant els bacteris més òptims per a la producció de iogurt són els provinents de l'*Activia sòlid i l'Activia líquid,* que són el *Bífidus actiregularis.*

3. La publicitat dels productes probiòtics[37].

3.1. Que hi ha de veritat en la publicitat dels productes probiòtics làctics.

Uns dels productes probiòtics que es consumeixen i es comercialitzen amb més freqüència són els que suposadament milloren el sistema immunitari, concretament de la marca Danone, l'Actimel.
Segons la web de Danone[38] se'ns defineix l'Actimel com una llet fermentada, amb els cultius propis d'un iogurt (*Lactobacillus bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*) i enriquida amb *L-Casei* DN-114 001 (un ferment patentat en exclusiva per Danone, rigorosament seleccionat fa 15 anys entre més de 3000 espècies per les seves característiques especifiques) i vitamines D i B6, que ajuden al normal funcionament del sistema immunitari.
Actimel és el producte patentat per *Danone*. Aquest producte ha donat lloc a molts altres de diferents marques blanques.

Recentment va aparèixer un conflicte que plantejava si vertaderament el bacteri *L-Casei* de l'*Actimel*, ajudava al sistema immunitari.
Anem a analitzar en deteniment si aquest argument és cert o no.

[37] Veure annex 2, comparativa de les composicions nutricionals per 100gr dels diferents marques de probiòtics làctics i comparació de preus dels diferents productes estudiats.

[38] http://www.actimel.es/ca/actimel/¿que-es-actimel/

Segur que si fem una enquesta en la qual mostrem un envàs d'*Actimel* i preguntem: "*Què és el que fa que aquest producte ajudi al sistema immunitari del cos humà*?" més del 90 % ens respondrà: "*Doncs els Lactobacillus aquells, els L.Casei de l'Actimel .*
Excel·lent pel departament de màrqueting de *Danone*.

A l'envàs d'Actimel comprovem que a part del *L.Casei* de *Danone* hi han afegit la vitamina B6 i la vitamina D. "El desayuno de las defensas" . Aquest eslògan és el que es transmet en les campanyes publicitàries de radio, televisió, internet, etc. Si no fos cert, *Danone* de ben segur que no ho faria. Per tant, ara anirem a veure com l'empresa *Danone* ho argumenta.
Quan observem amb deteniment l'embolcall de cartró de l'*Actimel*, a la part superior dreta de la darrera "s" de la paraula "defensas" hi ha un asterisc molt petit que et condueix a la frase transcrita "*Las vitamina B6 + D contribuyen al normal funcionamiento del sistema inmunitario. El sistema inmunitario es parte de las defensas".*

Segons *Danone*, els *L-Casei* no són els responsables de que l'*Actimel* ajudi al sistema immunitari. Per tant *Danone* no ho fa constar a l'ampolleta. La verdadera responsable és la vitamina B6. Afegim que la vitamina B6 està també disponible, de manera més barata i en quantitat més elevada, en molts dels aliments que prenem cada dia[39].

Segons l'estudi de la EFSA[40] sobre la vitamina B6, aquesta, contribueix al funcionament normal del sistema immunitari quan es compleixen certes condicions òptimes.
Aquest informe indica que no tan sols no hi ha evidències que l'absència d'una aportació externa de vitamina B6 pot perjudicar el funcionament normal del sistema immunitari, sinó que l'esmentada vitamina es pot aconseguir sense cap tipus de problema amb una dieta equilibrada, per la qual cosa no són necessaris suplements externs, com ara l'*Actimel*.
És molt freqüent la presència de vitamina B6 en molts aliments: carn, ous, peix, verdures, llegums, fruits secs, pa,…inclús a la pròpia llet amb la que s'elaboren els probiòtics. Les deficiències dietètiques de la vitamina B6 són molt escasses.

Com a conclusió podem dir que el component de l'Actimel que vertaderament és responsable de l'ajuda al sistema immunitari no és *L-Casei,* sinó que és la vitamina B6.

En altres marques blanques el dubte sobre qui és el responsable de l'ajuda al sistema immunitari està més ben resolt. Per exemple en la marca blanca *L-Casei* d' *Hacendado*, fa publicitat gràficament que el seu producte "*Ayuda al normal funcionamiento de tu sistema inmunitario".* A l'embolcall de cartró veiem a la dreta una taca blanca de llet de la que hi surten unes gotetes. Una de les gotetes és un petit asterisc que et condueix al text " *La vitamina B6 contribuye al normal funcionamiento del sistema inmunitario. Se recomienda el consumo*

[39] Per extreure aquestes conclusions ens hem basat en l'estudi realitzat per la revista scientiablog. (http://scientiablog.com/2012/06/18/la-verdadera-historia-del-actimel-ii-me-siento-enganado-por-danone/)

[40] L'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) evalúaa i comunica el risc a la Unió Europea sobre la seguretat dels aliments i pinsos.

de una unidad al día que, acompañado, de una alimentación variada y equilibrada y un estilo de vida saludable, pueden aportar al menos el 15% de la CDR en vitamina B6”.

Podem observar que no hi ha cap menció als *L-Casei* pel que fa a l’etiquetatge del *L-Casei* d’ *Hacendado*.

A l’altra marca blanca estudiada, *L-Casei* de *Carrefour,* no s’esmenta la vitamina B6. Per la qual cosa no poden dir res respecte a que aquests productes ajudin al sistema immunitari.

Carrefour
Discount
L.Casei
26 /10
Peso neto:
600g
(6x100g)
Carrefour
Discount
L.Casei
600g
(6x100g)

Leche fermentada azucarada para beber con Lactobacillus Casei.
Leche parcialmente desnatada, azúcar 7,4%, jarabe de glucosa de trigo, dextrosa de trigo, Lactobacillus casei y otros fermentos lácticos.
Consejos de conservación
Conservar en refrigeración entre 1 y 8ºC.
Consejos de preparación
Agitar antes de abrir.
Centros Comerciales Carrefour, S.A.
C/Campezo, 16.
www.carrefour.es - Teléfono de Atención al Cliente: 902 20 20 00.
Distribuido en España por C.I.F.: B-01321058.
Producto de Francia.
Valores energéticos y nutricionales medios:
Por: 100g
Una ración de: 100g
2000 kcal %CDO*
Energía 344 kJ 81 kcal 344 kJ 81 kcal 4%
Proteínas 2,9 g 2,9 g 6%
Hidratos de carbono 14,7 g 14,7 g 6%
de los cuales azúcares 14,3 g 14,3 g 16%
Grasas 1,2 g 1,2 g 2%
de las cuales saturadas 0,80 g 0,80 g 4%
Fibra alimentaria 0 g 0 g 0%
Sodio 0,04 g 0,04 g
Sal 0,10 g 0,10 g 2%
*Los valores expresados se refieren a cantidades diarias orientativas para un adulto (2000 kcal). Las necesidades nutricionales pueden variar según la edad, el sexo, la actividad física y otros factores. Este envase contiene aproximadamente 6 raciones de 100g.
¡Dieta variada, equilibrada y ejercicio!
Fecha de caducidad/Lote: Ver impresión en la parte superior del cartoncillo.
Peso neto:
600g (6x100g)
Para identificar la fábrica de elaboración ver las letras del lote:
FR 62.853.030 CE
FR 35.164.001 CE
8 431876 175707

Gràcies a la inversió en màrqueting de Danone, el públic ja associa els *L-Casei* amb els esmentats beneficis, que són erronis.
Danone té un bon departament de publicitat i màrqueting i estan venent productes que prometen efectes beneficiosos per la salut quan el producte que causa aquests efectes és un altre diferent i que es pot trobar fàcilment.

Per tant, podem concloure que comprar *Actimel* o marca blanca pels *Lactobacillus* esperant que ajudin a les defenses és una errada. L'únic component que pot ajudar és la vitamina B6 i es troba en aliments més econòmics i en quantitat més gran.

Pel que fa a la informació nutricional d'*Actimel* i la d'*Actívitas*, a la taula 3 veiem que hi ha els mateixos nutrients i en gairebé les mateixes proporcions, amb excepció de les vitamines B6 i E que aporta *Actimel* i *Actívitas* no.

4.Conclusions

Com que l'estudi dels aliments funcionals és molt ampli. M'he centrat en els probiòtics i més en concret en els probiòtics làctics.
La part teòrica m'ha permès aprofundir en aquest camp: que són, com contribueixen a la salut humana, les seves funcions clíniques i els mecanismes d'acció.

En la part pràctica del treball vaig voler confirmar: si els microorganismes que contenen els aliments probiòtics làctics estudiats han d'estar vius així com verificar si la informació que ofereixen les marques comercials en els productes contenen és certa. Per altre banda m'he centrat en el recompte dels bacteris de diferents productes làctics.
També m'ha interessat comprovar quin tipus de bacteri làctic és més apte per la producció d'un iogurt.

Un dels objectius era esbrinar, mitjançant el recompte de cèl·lules bacterianes, si hi havia cèl·lules vives en els producte probiòtics estudiats, i efectivament,

els microorganismes que contenen els probiòtics làctics estudiats, estan definitivament vius, tal com hem pogut comprovar en la segona part de la pràctica. Si els organismes no haguessin estat vius no haguéssim pogut obtindré iogurt a partir d'ells. Com que al introduir bacteris a la llet sí que vam poder obtenir iogurt, podem treure la conclusió de que efectivament estaven vius.

Els productes làctics comercials analitzats han estat: *Actimel* de la marca *Danone*, *mi primer Danone* de la marca *Danone*, *Activia* líquid i *Activia* iogurt. He pogut corroborar que, efectivament, els bacteris anunciats en el envàs són els que conté el producte analitzat. Són respectivament *Lactobacillus casei* en *Actimel* i *mi primer Danone* i *Bífidus actiregularis* en *Activia* líquid i *Activia* sòlid. A aquesta conclusió hi hem pogut arribar gràcies a la pràctica al laboratori.

El següent apartat del treball ha estat fer comparatives de quin bacteri és més veloç a l'hora de produir iogurt i en quin estat del producte (líquid/sòlid) és més eficaç.
Hem realitzat la pràctica introduït cada tipus de bacteri probiòtic en tots els tipus de llets escollides. El resultat ha estat que els bacteris provinents de l'*Activia sòlid i l'Activia líquid,* que són el *Bífidus actiregularis* són els més òptims per a la producció del iogurt ja que han estat més veloços.

El recompte de viables m'ha permès concloure que efectivament els bacteris estan vius, ja que si no ho haguessin estat no haguéssim pogut obtindré iogurt a partir d'ells.

A l'analitzar la publicitat he arribat a la conclusió que la publicitat és exagerada en alguns casos i que intenta vendre el producte donant una informació certa, conté milions de *Lactobacillus*, però enganyosa fent veure que el producte és completament necessari per a les nostres defenses, gairebé com un medicament preventiu.

Com hem vist, la llei estableix uns límits per a la publicitat per tal de no confondre la població. *Danone*, comparant *Actimel* amb un medicament ha

sobrepassat aquests límits inflant al màxim el valor dels seus producte i abraçar el màxim possible d'edats i condicions socials.

Durant el temps que he executat el treball de recerca m'ho he passat molt be i he après molt tant pel que fa a probiòtics com, sobretot, en tècniques de laboratori que malauradament no podem aprendre durant el batxillerat.

He fet molta recerca d'informació via internet, intentant sempre esbrinar quina informació extreta era certa i estava comprovada científicament. Els llibres especialitzats m'han ajudat molt a fer una bona selecció d'aquesta informació.

Els probiòtics és un tema molt estudiat i, particularment, he volgut donar un toc d'originalitat creant el meu propi iogurt a partir de colònies de bacteris aïllades de productes comercials.

5. Bilbliografia

Dia 16 d'agost:

V.CARRASCOSA, Alfonso. *¿Qué sabemos de? Los microbios que comemos.* Madrid: Catarata, 2011.

MARTI DEL MORAL, Amelia; MARTÍNEZ, J. Alfredo. *¿Sabemos realmente qué comemos? Alimentos transgénicos, ecológicos y funcionales.* Pamplona: Ediciones Universidad de Navarra, S.A. (EUNSA), 2005.

ARIAS, Matilde; BARRACHINA, Jordi; CLOSAS, M. Carme; FERRER, Ramon. *Biologia 2.* Barcelona: Castellnou, 2009.

SAZ, Pablo. *Equilibra tu flora intestinal, Cuerpo Mente 232.* P. 20-25.

STANIER,R. et al*. Microbiologia*. Madrid: Reverté, 1888.

FACULTAT DE CIÈNCIES. Departament de Microbiologia UAB. *Tècnica microbiològica*. 1888-89.

Dia 22 d'agost:

JAMES M., Jay. *Micobiologia moderna de los alimentos,* 1º edición, Ed. Aribia S.A

P. Cervera, J. Clapés, R. Rigolfas, *Alimentación y dietoterapia (nutrición aplicada a la salud).* 4º edición, Ed. Mc. Graw Hill- interamericana.

Dia 5 de setembre:

<http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/19_probioticos_prebioticos_es.pdf>

<http://www.old-herborn-university.de/literature/books/OHUni_book_15_article_1.pdf>

<http://www20.gencat.cat/portal/site/canalsalut/menuitem.41e04b39494f1be3ba963bb4b0c0e1a0/?vgnextoid=86f82c9c23c7e210VgnVCM2000009b0c1e0aRCRD&vgnextchannel=86f82c9c23c7e210VgnVCM2000009b0c1e0aRCRD&vgnextfmt=default#Bloc90484c489f800310VgnVCM1000008d0c1e0a___>

dia 1 de novembre
<http://www.monografias.com/trabajos24/esterilizacion-laboratorio/esterilizacion-laboratorio.shtml>

dia 2 novembre
<http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoIII.pdf>

Annexos

6. Annexos

ANNEX 1

Especie de Lactobacillus	Código de cepa	ICB a pH 5	ICB a pH 8
L. reuteri	3	0.088	0.077
L. vaginalis	15	0.127	0.215
L. vaginalis	20	0.117	0.203
L. reuteri	12 y 13	0.113	0.083
L. reuteri	25	0.103	0.116
L. reuteri	26	0.077	0.203
L. plantarum	27a	0.111	0.279
L. plantarum	27b	0.101	0.202
L. plantarum	27c	0.090	0.083
L. plantarum	27d	0.130	0.185
L. plantarum	27e	0.125	0.200
L. plantarum	28a	0.111	0.189
L. reuteri	28b	0.103	1.090
L. reuteri	29	0.110	0.274
L. salivarius	30	0.062	0.153
L. reuteri	31a	0.096	0.089
L. reuteri	31b	0.144	0.089
L. reuteri	34a	0.107	0.114
L. reuteri	34b	0.156	0.242

Taula 1. Podem observar diferents exemples de soques de probiòtics amb el seu nom específic i en codi de la seva soca. (Pàg: 18)

ANNEX 2 (Pàg.33)**:**

Comparativa de les composicions nutricionals per 100g de les diferents marques de probiòtics làctics.

Les composicions nutricionals dels productes *Actimel* de *Danone*, *Actívitas* d'*Eroski*, *L.Casei* de *Carrefour Discount*, *L.Casei* de *Hacendado*, són:

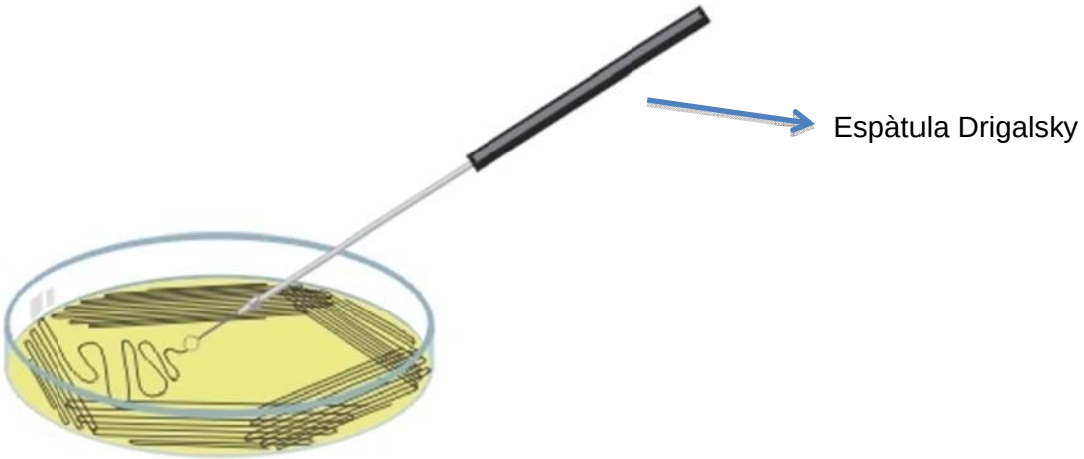
- *Actimel Danone*: Energia: 84 Kcal; proteïnes: 2,8 g.; hidrats de carboni: 11,6 g (dels quals 11,5 g són sucres); grasses: 2,6; fibra alimentària: 0 g. ; Vitamina B6: 0,21 mg.
- *Actívitas d'Eroski*: Energia: 75 Kcal; proteïnes: 2,8 g.; hidrats de carboni: 12,7 g (dels quals 10,9 g són sucres); grasses: 1,4 g ; fibra alimentària: 0 g.
- *L.Casei de Carrefour Discount*: Energia: 81 Kcal; proteïnes: 2,9 g.; hidrats de carboni: 14,7 g (dels quals 14,3 g són sucres); grasses: 1,2 g ; fibra alimentària: 0 g. ; Vitamina B6:0,21 mg.
- *L.Casei de Hacendado*: Energia: 75 Kcal; proteïnes: 2,4 g.; hidrats de carboni: 12,7 g (dels quals 12,7 g són sucres); grasses: 1,6 g ; fibra alimentària: 0 g.

La principal diferencia que veiem entre els diferents productes és la absència de vitamina afegides en la marca Actívitas d'Eroski i L.Casei de Carrefour Discount.

Comparativa sobre el preu dels probiòtics làctics estudiats.

Pel que fa al preu, els productes de marca blanca costen 40% menys que l'*Actimel* de *Danone.*

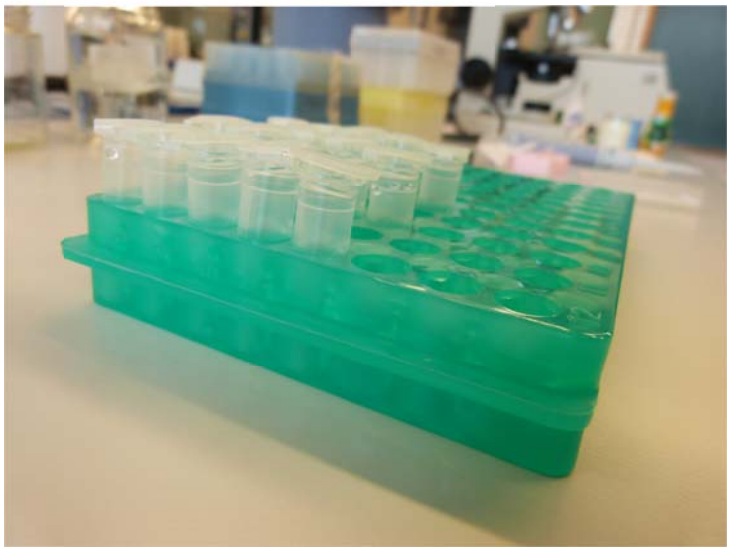
FIGURA 3



Imatge de la sembra en superfície d'un cultiu de bacteris en una placa de Petri.

ANNEX 4: Treball de laboratori. El procés en fotografies.

Autoclau: aparell que vam utilitzar per a esterilitzar.



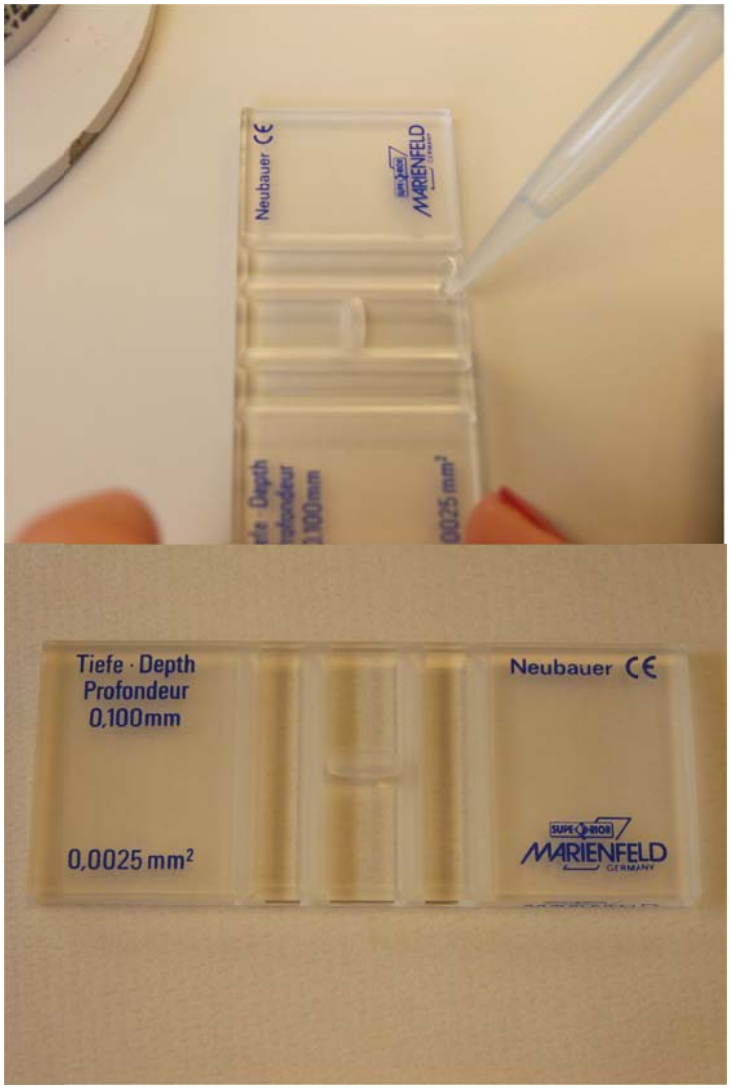
Tubs d'assaig de plàstic amb les dilucions seriades que vam realitzar.

Pipetes graduades

Bec Bunsen d'alcohol

Procés en el qual agafàvem mitjançant la pipeta i una punta de pipeta d'un 1mL, el producte probiòtic per fer-ne les dilucions.

Introducció de la dilució 10^5 a la càmera de Neubauer mitjançant una pipeta, per tal d'observar els bacteris de cada producte al microscopi.



Càmera de Neubauer

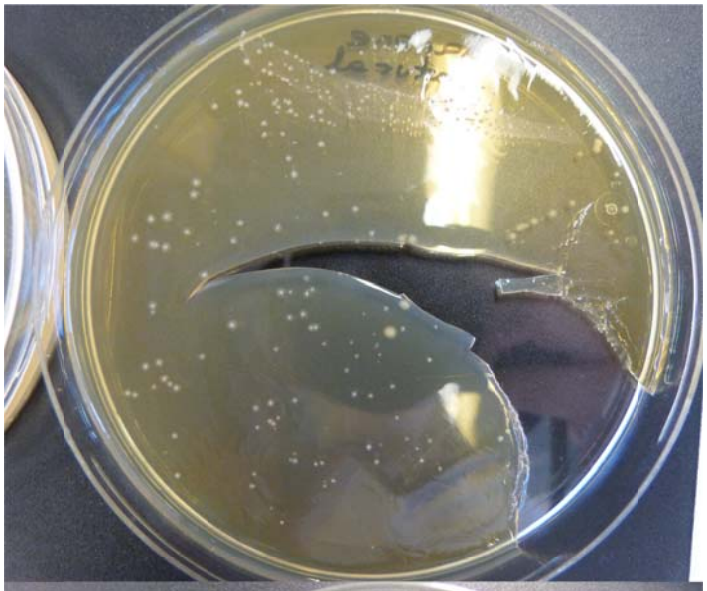
Microscopi òptic amb objectiu d'immersió (100 x).

Observació dels bacteris mitjançant la càmera de Neubauer i el microscopi òptic.

En aquestes fotografies agafem amb la pipeta una de les dilucions de cada producte i la introduïm en el la placa de petri amb el medi de cultiu agar MRS.
Quan tenim la mostra introduïda en la placa la escampem per tota la placa amb una espàtula de Digransky.

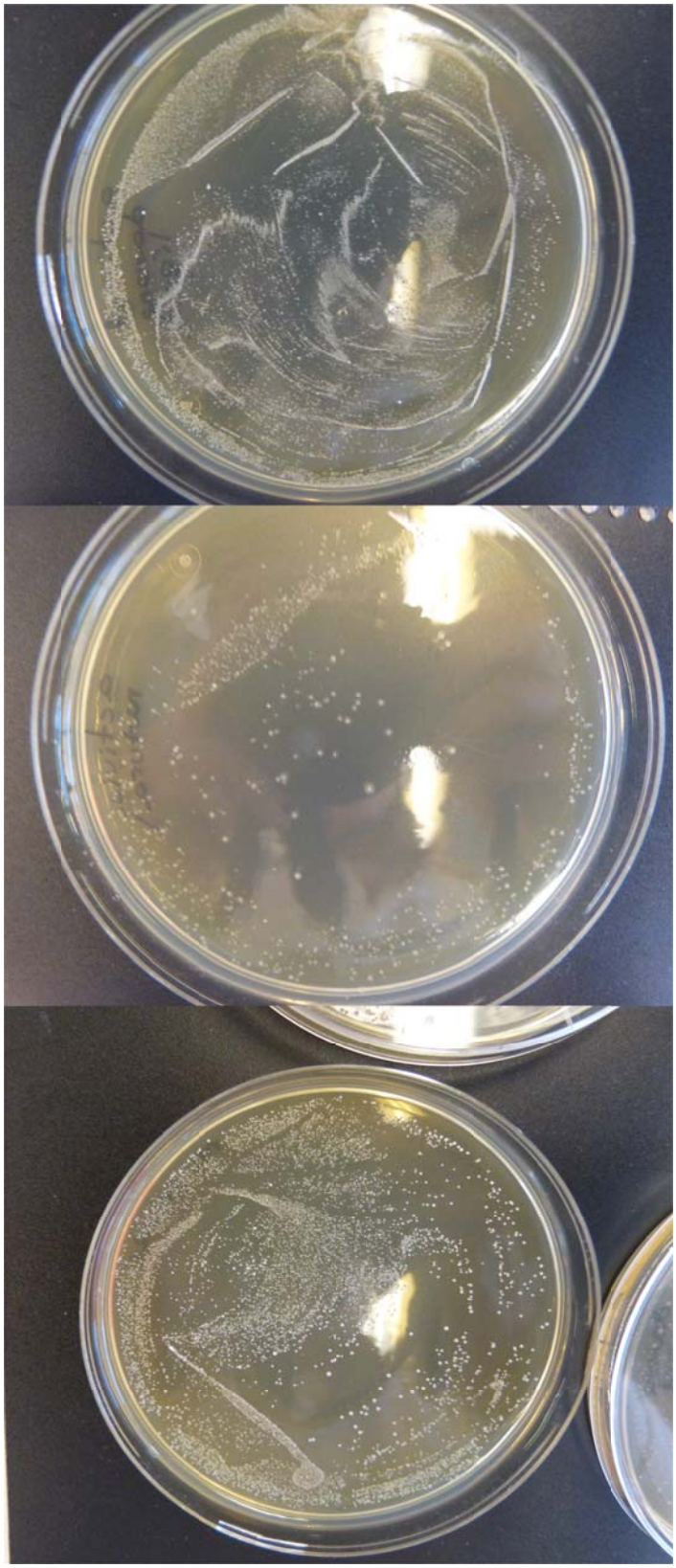
Introducció de les plaques a l'estufa.
Haurem d'esperar 72 hores per comprovar-ne els resultats.

Espectrofotòmetre, aparell amb el qual també podem calcular el nombre de bacteris d'un producte probiòtic. En aquest cas no el va utilitzar).



Placa del bacteri del *Danone natural*

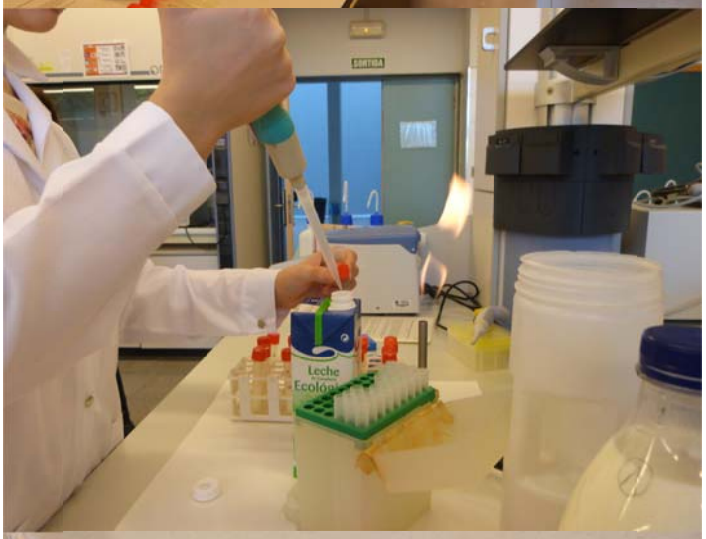
Placa del bacteri de l'*Activia Danone líquid*



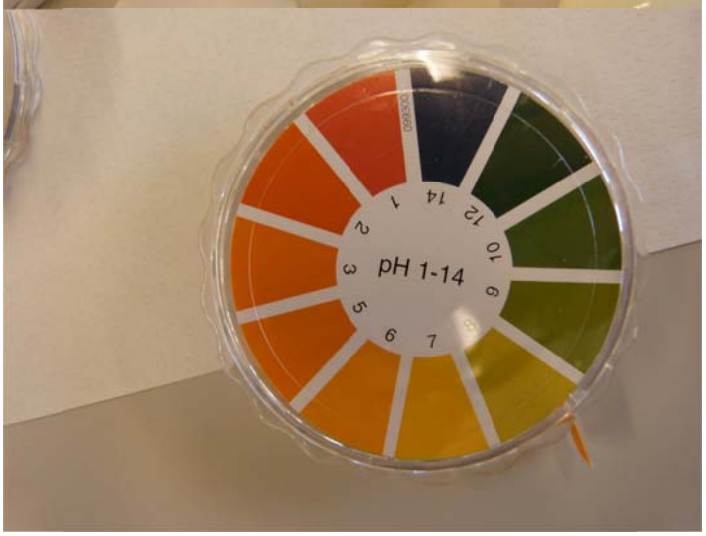
Placa del bacteri de l'*Actimel Danone líquid.*

Placa del bacteri de l'*Activia Danone sòlid*

Placa del bacteri de *Mi primer Danone*



Procés en el qual agafem mitjançant la pipeta una mostra de cada tipus de bacteri en les diferents llets per comprovar quin pH tenen i veure si ja han fermentat.



Paper indicador de pH.
En el nostre cas el pH de tots els iogurts va acabar sent pH 2.