

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/07/2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

ARTEMIZA DA SILVA MIRANDA

**Estudo do encapsulamento do *Lactobacillus rhamnosus* e avaliação da  
resistência ao trato gastrointestinal (TGI) simulado**

São José do Rio Preto  
2021

ARTEMIZA DA SILVA MIRANDA

**Estudo do encapsulamento do *Lactobacillus rhamnosus* e avaliação da resistência ao trato gastrointestinal (TGI) simulado**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Fátima Pereira de Souza  
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey  
Coorientador: Dr. Ícaro Putinhon Caruso

São José do Rio Preto  
2021

M672e	<p>Miranda, Artemiza da Silva</p> <p>Estudo do encapsulamento do <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e avaliação da resistência ao trato gastrointestinal (TGI) simulado / Artemiza da Silva Miranda.</p> <p>-- São José do Rio Preto, 2021</p> <p>51 f.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientadora: Fátima Pereira de Souza</p> <p>Coorientador: Ícaro Putinhon Caruso</p> <p>1. Microorganismos. 2. Nanopartículas. 3. Quitosana. 4. Sistema gastrointestinal. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ARTEMIZA DA SILVA MIRANDA

**Estudo do encapsulamento do *Lactobacillus rhamnosus* e avaliação da resistência ao trato gastrointestinal (TGI) simulado**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fátima Pereira de Souza  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gislane Lelis Vilela de Oliveira  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Ricchard Hallan Felix Viegas de Souza  
IFPR – Câmpus de União da Vitória

São José do Rio Preto  
08 de julho de 2021

Dedico esse trabalho às duas pessoas que eu mais amo nesse mundo, mamãe (*in memoriam*) e papai.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pois sem sua presença em minha vida jamais teria chegado até aqui, à Nossa senhora por iluminar meus caminhos e a Santa Catarina protetora dos estudantes, por sempre me dar inspiração e capacidade na minha jornada acadêmica.

Aos meus amados pais, José e Terezinha a quem devo tudo de mais precioso que tenho, minha vida, é impossível expressar em palavras meu amor por vocês.

À querida e doce irmã Loanda e ao meu amável esposo Fábio, por toda paciência, compreensão e tanta dedicação e amor que são demonstrados diariamente.

À querida orientadora Fátima, por toda paciência, todos os ensinamentos, por sua presença constante e por sempre ver e me fazer enxergar o lado bom das coisas, até das coisas não tão boas.

Aos queridos coorientadores professor Marcelo e professor Ícaro, por todo conhecimento compartilhado sempre com muito carinho e paciência.

Às queridas amigas que a vida acadêmica me presenteou Jéssica e Giovana, agradeço a amizade sincera, os conselhos, as risadas, os doces para deixar a vida mais leve e claro pela ajuda de sempre.

Aos queridos amigos de laboratório Raquel, Fernanda, Vitor, Thainá, Isabela e Renan.

Às queridas amigas do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Elisa, Taís e Márcia, por toda ajuda, todos os ensinamentos sempre com muita paciência e carinho, que Deus possa dar em dobro a vocês tudo o que fizeram por mim. O conhecimento é algo que adquirimos com muito estudo e dedicação, quando surgem pessoas na nossa vida que nos auxiliam nessa jornada é maravilhoso, e foi isso que vocês fizeram, sou imensamente grata.

À professora Vânia Regina Nicoletti e à professora Ana Lúcia Barretto Penna, por todas as orientações e por permitirem o uso do laboratório e dos equipamentos, obrigada pela confiança.

Ao professor José Márcio Tiera, por permitir o uso do liofilizador e ao seu aluno André, sempre muito prestativo.

A todos do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DETA), que me acolheram e foram sempre muito solícitos.

Aos professores da banca, por dedicarem o seu precioso tempo para contribuir com o presente trabalho, muito obrigada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia por todo conhecimento transmitido.

Ao IBILCE por ceder espaço para desenvolvimento desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001\*, à qual agradeço.

## RESUMO

A microbiota intestinal é composta por uma variedade de microrganismos que vivem em simbiose com o hospedeiro humano, proporcionando diversos benefícios como interação com sistema imunológico, influência na permeabilidade do epitélio e na produção de substâncias que atuam em processos metabólicos essenciais para o bom funcionamento do organismo. Estilo de vida, dieta e estresse são alguns dos fatores que podem contribuir para que ocorra a alteração da microbiota. A condição na qual se tem alteração da microbiota é denominada disbiose, e quando presente pode desencadear o desenvolvimento de muitas doenças, no entanto, a manutenção de uma microbiota equilibrada pode prevenir e até mesmo tratar diversas patologias, um dos métodos recomendados é a administração de formulações de probióticos. Os probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro, porém, algumas cepas não são capazes de tolerar as condições adversas do trato gastrointestinal (TGI), sendo necessário proporcionar uma barreira física externa como proteção. Portanto, o objetivo desse trabalho foi encapsular o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* utilizando a quitosana, um polímero de origem natural, como matriz encapsulante e avaliar a sobrevivência desse microrganismo às condições gastrointestinais simuladas. Desse modo, os probióticos foram encapsulados com quitosana por meio do método de gelatinização iônica, a simulação do TGI foi realizada com os probióticos livres (não encapsulados) e encapsulados. A caracterização das nanopartículas foi realizada por meio da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão (IPD). Para fins de comparação e análise da influência do processo de encapsulação na caracterização, foram produzidas nanopartículas vazias e nanopartículas com o probiótico. Os resultados mostraram que as nanopartículas com o probiótico apresentaram-se com diâmetro de 475 nm e as nanopartículas vazias obtiveram-se valores de 83,85 nm, em relação ao IPD ambas as amostras se apresentaram polidispersas. A análise de MEV das nanopartículas vazias evidenciou morfologias distintas, os resultados das fotomicrografias das nanopartículas encapsuladas sugerem a presença de agregação. Os resultados de digestibilidade evidenciam que os probióticos na forma livre não sobreviveram, visto que apresentaram contagem abaixo do limite de detecção ao final do processo, os resultados referentes aos probióticos encapsulados sugerem que o procedimento de encapsulação pode ter sido eficaz na proteção, uma vez que foi possível realizar a quantificação dos probióticos, apresentando valores de contagem inicial de 8,84 log UFC/mL e ao final da simulação 4,30 log UFC/mL. Entretanto ainda há necessidade de otimizar o processo de produção de nanopartículas, estabelecendo protocolo de avaliação da eficiência de encapsulação bem como evitar a presença de agregados uma vez que esse pode comprometer a aplicabilidade das nanopartículas com os probióticos.

**Palavras-chave:** Quitosana. Disbiose. Probióticos. Nanopartículas. TGI.

## ABSTRACT

The intestinal microbiota is composed of a variety of microorganisms that live in symbiosis with the human host, providing various benefits such as interaction with the immune system, influence on the permeability of the epithelium, and the production of substances that act in metabolic processes essential for the proper functioning of the body. Lifestyle, diet, and stress are some of the factors that can contribute to the alteration of the microbiota. The condition in which there is an alteration in the microbiota is called dysbiosis, and when present it can trigger the development of many diseases; however, the maintenance of a balanced microbiota can prevent and even treat several pathologies, one of the recommended methods is the administration of probiotic formulations. Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer health benefits to the host; however, some strains are not able to tolerate the adverse conditions of the gastrointestinal tract (GI tract), making it necessary to provide an external physical barrier as protection. Therefore, the objective of this study was to encapsulate the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* using chitosan, a polymer of natural origin, as an encapsulating matrix and to evaluate the survival of this microorganism to simulated gastrointestinal conditions. Thus, the probiotics were encapsulated with chitosan using the ionic gelatinization method, and the GIT simulation was performed with the free (non-encapsulated) and encapsulated probiotics. Characterization of the nanoparticles was performed by scanning electron microscopy (SEM) analysis, hydrodynamic diameter and polydispersity index (DPI). For comparison purposes and to analyze the influence of the encapsulation process on the characterization, empty nanoparticles and nanoparticles with the probiotic were produced. The results showed that the nanoparticles with the probiotic had a diameter of 475 nm and the empty nanoparticles had a diameter of 83.85 nm. In relation to the IPD, both samples were polydisperse. The SEM analysis of the empty nanoparticles showed distinct morphologies, the results of the photomicrographs of the encapsulated nanoparticles suggest the presence of aggregation. The digestibility results show that the probiotics in the free form did not survive, since they presented counts below the detection limit at the end of the process. The results concerning the encapsulated probiotics suggest that the encapsulation procedure may have been effective in protection, since it was possible to quantify the probiotics, presenting initial count values of 8.84 log CFU/mL and at the end of the simulation 4.30 log CFU/mL. However, it is still necessary to optimize the nanoparticle production process, establishing an evaluation protocol of the encapsulation efficiency as well as avoiding the presence of aggregates since this can compromise the applicability of nanoparticles with probiotics.

**Keywords:** Chitosan. Dysbiosis. Probiotics. Nanoparticles. GIT.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da interação microbiota e hospedeiro. ....	13
Figura 2: Composição e concentrações microbianas dominantes em diferentes regiões do trato gastrointestinal. ....	15
Figura 3: Mecanismos de ação dos probióticos. ....	18
Figura 4: Representação esquemática da microencapsulação de probióticos. ....	20
Figura 5: Representações das estruturas primárias de quitina e quitosana. ....	21
Figura 6: Sistema para obtenção das nanopartículas pelo método de gelificação iônica. ....	26
Figura 7: Simulação das condições gastrointestinais com os probióticos microencapsulados. ....	29
Figura 8: Simulação das condições gastrointestinais com os probióticos não encapsulados. ....	30
Figura 9: Imagem referente a análise do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas. ....	31
Figura 10: Esquema de possíveis instabilidades que podem ocorrer durante a produção de nanoesferas. (A): Partícula antes de liofilizar com forma esférica. (B): Partículas depois da liofilização (sem mudanças no tamanho e morfologia). (C): Presença de agregação/fusão. (D): Com quebra. (E): Com deformação de partícula. ....	34
Figura 11: Fotomicrografias das nanopartículas vazias obtidas por MEV. A e B: Nanopartículas vazias, C e D: Nanopartículas com probiótico. ....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de referência de Índice de polidispersão .....	27
Tabela 2: Viabilidade das células de <i>L. rhamnosus</i> não encapsuladas após exposição aos fluídos digestivo, gástrico e intestinal simulados. ....	36
Tabela 3: Viabilidade das células encapsuladas de <i>L. rhamnosus</i> após exposição aos fluídos digestivo, gástrico e intestinal simulados. ....	38
Tabela 4: Procedimentos testados para realizar rompimento das nanopartículas.....	40

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1. 1. Microbiota intestinal e sua importância.....	11
1. 2. Probióticos no tratamento da disbiose intestinal .....	17
1. 3. Encapsulação de probióticos .....	19
1. 4. Quitosana como matriz encapsulante .....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
2. 1. Objetivo geral .....	23
2. 2. Objetivos específicos .....	23
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
3. 1. Infraestrutura .....	24
3. 2. Material .....	24
3. 3. Ativação da cultura estoque e enumeração dos microrganismos .	24
3. 4. Preparo do inóculo probiótico.....	25
3. 5. Encapsulação dos probióticos em matriz de quitosana .....	25
3. 6. Caracterização das nanopartículas.....	26
3. 6. 1. Índice de polidispersão e diâmetro hidrodinâmico.....	26
3. 6. 2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	28
3. 7. Processamento estatístico .....	28
3. 8. Avaliação da sobrevivência do probiótico encapsulado submetido a simulação das condições gastrointestinais.....	28
3. 9. Avaliação da sobrevivência do probiótico não encapsulado submetido a simulação das condições gastrointestinais.....	29
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
4. 1. Caracterização das nanopartículas.....	31
4. 1. 1. Índice de polidispersão e diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas.....	31
4. 1. 2. Análise morfológica das nanopartículas.....	34
4. 2. Avaliação da sobrevivência às condições gastrointestinais simuladas .....	36
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>42</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1. 1. Microbiota intestinal e sua importância**

O termo microbiota intestinal refere-se ao conjunto de microrganismos presentes no intestino que vivem em estado de simbiose com o hospedeiro, contribuindo com as funções biológicas e metabólicas que beneficiam o hospedeiro (MERONI; LONGO; DONGIOVANNI, 2019).

A colonização microbiana é fundamental para homeostase do organismo, esse fato pode ser evidenciado por meio da sua ligação com o sistema imunológico (RODRIGUES et al., 2016). A relação entre o hospedeiro e a microbiota tem início no nascimento durante o parto, presumindo que esse seja o primeiro contato com um ambiente não estéril. (LA FATA; WEBER; MOHAJERI, 2018). Entretanto, estudos já evidenciaram a presença de microrganismos no líquido amniótico, no cordão umbilical e na placenta (LA FATA; WEBER; MOHAJERI, 2018; JIMÉNEZ et al., 2008; PETERSON; SHARMA; ELMÉN; PETERSON, 2015; STOUT et al., 2013). A diversidade da microbiota nesse caso será dependente do microbioma da mãe e está relacionado com o tipo de parto, visto que logo após o parto as bactérias da mãe e do ambiente circundante colonizam o intestino do recém-nascido (SILVA-JUNIOR et al., 2017).

Uma característica notável do sistema imune intestinal é a capacidade de estabelecer tolerância imunológica aos microrganismos comensais e desenvolver respostas imune contra microrganismos patogênicos (ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020). Um dos mecanismos de ligação entre o sistema imune e a microbiota está relacionado com o reconhecimento de componentes da parede celular ou segmentos DNA, que são identificados por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) localizados nas células epiteliais (ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020; CARDOSO, 2015). Esses receptores, como por exemplo, os Toll-Like (TLR) e NOD-Like (NLR) detectam sinais microbianos, denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e induzem resposta imunológica. Os PAMPs são estruturas presentes nos microrganismos, como componentes da parede bacteriana, DNA bacteriano entre outros. Desse

modo, os PAMPS não são exclusivos de patógenos e também estão presentes na microbiota (CARDOSO, 2015).

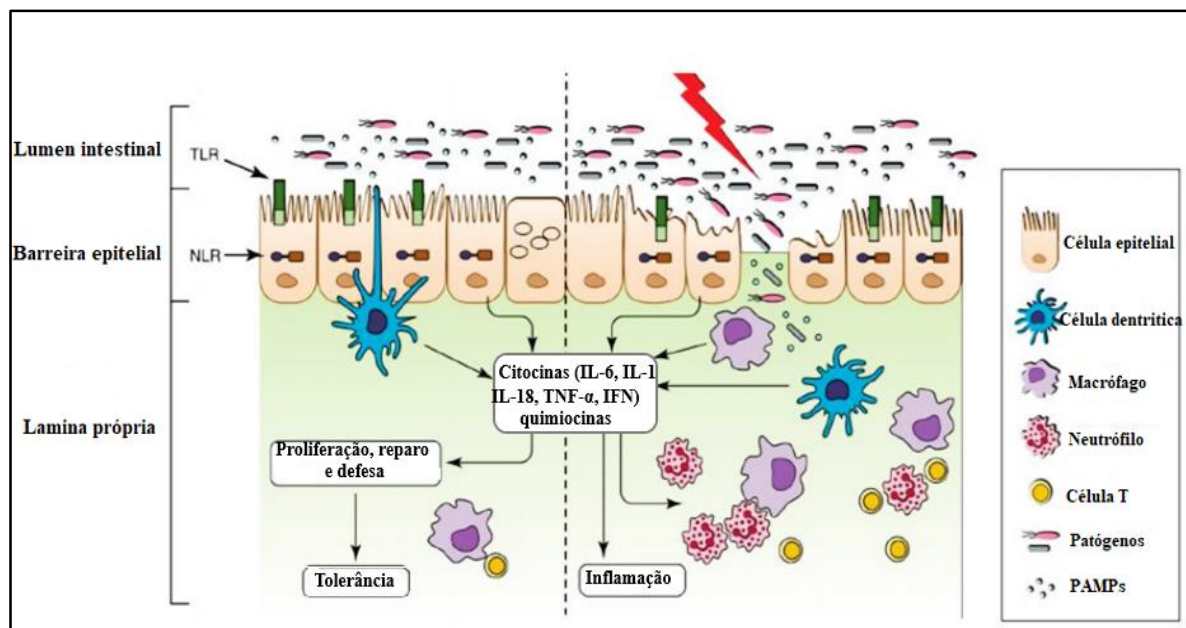
A sinalização por meio destes receptores pode desencadear uma resposta inflamatória fisiológica que favorece a proliferação de células progenitoras contribuindo para a integridade intestinal. Entretanto, quando há falhas nesses mecanismos, uma resposta não controlada pode ser estabelecida desencadeando um processo inflamatório inadequado, como ilustrado na figura 1 (CARDOSO, 2015).

Componentes microbianos também estão relacionados com o sistema imune, como o polissacarídeo A (PSA) produzido pelo microrganismo comensal *Bacteroides fragilis*, que possui a capacidade de gerar resposta imune estimulando linfócitos TCD4<sup>+</sup> a produzir interleucina (IL)10, uma citocina anti-inflamatória que restringe a inflamação patogênica no intestino. (ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020; CARDOSO, 2015; RAMAKRISHNA et al., 2019).

Além disso, muitos estudos relacionam a importância da interação do sistema imunológico do hospedeiro com a microbiota por intermédio de pesquisas desenvolvidas com animais livres de microbiota. As primeiras pesquisas com esses animais demonstraram que a ausência de microbiota estava relacionada com a redução do número de linfócitos, que tiveram seus valores normalizados após a colonização da microbiota. (ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020). O trabalho desenvolvido por Noah e colaboradores (2015) relaciona a relevância dessa interação na maturação do sistema imune, sua pesquisa evidenciou que camundongos livres de microbiota exibiam sistema imunológico intestinal subdesenvolvido, com estrutura de cripta alterada e espessura de muco reduzida devido a redução do número de células caliciformes, além da redução de IgA.

A manutenção da integridade da barreira é essencial e uma das funções do epitélio do trato gastrointestinal (TGI). Essa integridade é mantida por complexos multiproteicos, foi demonstrado que a expressão desse complexo é regulada por microrganismos da microbiota. No entanto, quando sua expressão é alterada, a funcionalidade da barreira é comprometida podendo ser prejudicial ao hospedeiro (LA FATA; WEBER; MOHAJERI, 2018).

**Figura 1:** Representação esquemática da interação microbiota e hospedeiro.



Fonte: Adaptado de CARDOSO, 2015.

A microbiota também contribui na metabolização de nutrientes e vitaminas essenciais para o organismo (GONÇALVES, 2014; TREMAROLI; BÄCKHED, 2012). Para se manter vivo o organismo precisa de energia que é obtida a partir da dieta, e para isso os nutrientes devem ser degradados para serem absorvidos, embora o intestino produza enzimas que degradam os hidratos de carbono, estas não conseguem degradar os hidratos mais complexos. Diante disso, a metabolização é realizada pelas bactérias que compõem a microbiota intestinal, as quais quebram essas moléculas em partículas menores tal como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (GONÇALVES, 2014; TREMAROLI; BÄCKHED, 2012), como por exemplo o butirato, acetato e propionato, que são absorvidos no cólon, sendo que o propionato e o butirato atuam no fígado como substrato nos processos de gliconeogênese e lipogênese, já o acetato funciona como substrato energético do metabolismo celular do epitélio do cólon (GONÇALVES, 2014; SCOTT et al., 2013). A microbiota intestinal também possui ação no metabolismo dos ácidos biliares que são sintetizados pelo fígado a partir do colesterol da dieta, uma pequena parte dos ácidos biliares primários que não é absorvida pelo intestino sofre ação da microbiota e são convertidos nos ácidos biliares secundários litocólico e desoxicólico, que são absorvidos no intestino. A conversão dos ácidos primários em ácidos secundários ocorre por uma

desidroxilação, reação catalisada por enzimas bacterianas (PIMENTEL, 2006; GONÇALVES, 2014; CLAUDEL et al., 2005).

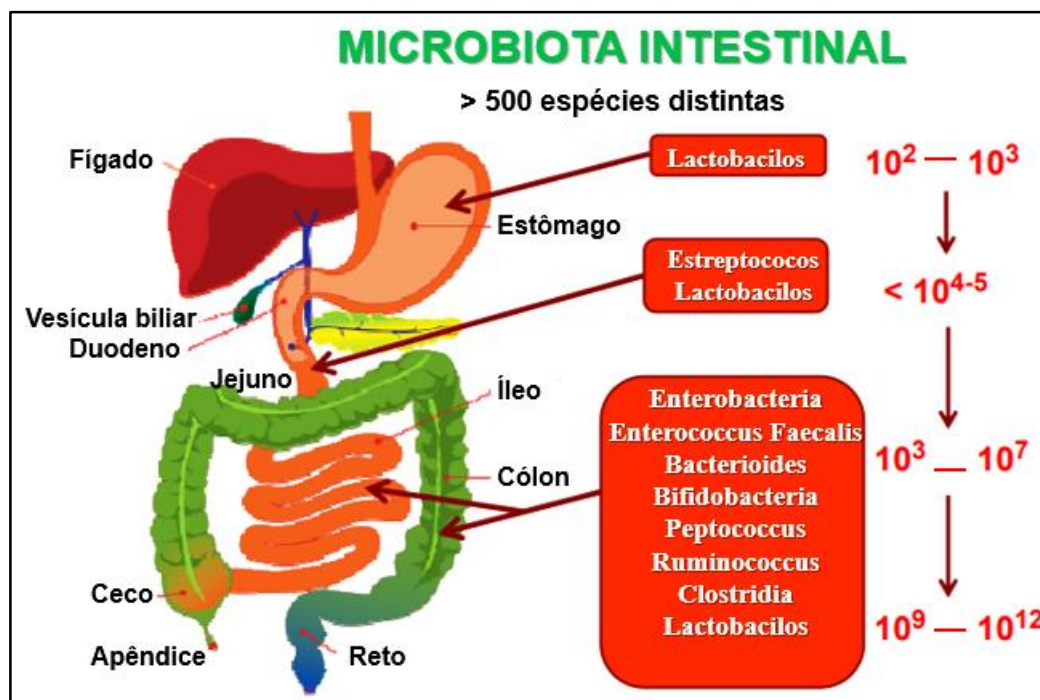
Dessa forma, o trato gastrointestinal é um componente fundamental na homeostase, visto que, esse sistema abriga a maior parte desses microrganismos. O TGI também possui importantes funções para manutenção da homeostase do organismo, o epitélio da mucosa forma uma barreira que impede a entrada de microrganismos comensais no meio estéril do hospedeiro, no qual podem ativar uma resposta imunológica sistêmica (BASHIARDES et al., 2016; KLATT; FUNDERBURG; BRENCHLEY, 2013). Essa proteção ocorre por meio de complexos componentes imunológicos da mucosa, que consistem em uma rede de populações celulares e por meio da estrutura mecânica exclusiva do intestino, que incluem junções estreitas que interconectam células epiteliais adjacentes e estão envolvidas na regulação da permeabilidade intestinal (BASHIARDES et al., 2016; PETERSON; ARTIS, 2014; BRENCHLEY; DOUEK, 2008). Em conjunto, todas essas características mantêm o equilíbrio e a funcionalidade intestinal, no entanto, a desregulação desse sistema pode prejudicar a funcionalidade das junções estreitas e levar a um intestino permeável (BASHIARDES et al., 2016; PETERSON; ARTIS, 2014), resultando na migração de microrganismos ou endotoxinas bacterianas, do lúmen intestinal para os linfonodos mesentéricos e outros locais extra intestinais, processo denominado translocação microbiana (migração dos microrganismos) (BRANDI et al., 2017) ou endotoxemia metabólica (migração de toxinas bacterianas, LPS) capaz de ocasionar diversos malefícios ao organismo (GATT; REDDY; MACFIE, 2006).

Além disso, o TGI é responsável pela secreção de enzimas digestivas e ácido gástrico capazes de conferir proteção contra microrganismos patogênicos. (MAIA; FIORIO; SILVA, 2018).

O ambiente intestinal é composto por uma variedade de bactérias anaeróbias que em geral são dos gêneros: *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Eubacterium spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.* e *Ruminococcus spp.* (MAIA; FIORIO; SILVA, 2018), sendo que ao longo do TGI a concentração e os tipos bacterianos

predominantes variam. O estômago e o intestino delgado proximal contêm um número relativamente baixo de bactérias, isso se deve a motilidade do intestino e também ao efeito antimicrobiano do ácido gástrico e do suco pancreático presentes no intestino. Já a região do íleo terminal predominam microrganismos gram-negativos e aeróbios. No cólon, a concentração e diversidade da microbiota altera-se drasticamente, no qual podem ser encontradas concentrações de  $10^{12}$  UFC/mL, constituídas predominantemente por anaeróbios, como os pertencentes aos géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Clostridium* (QUIGLEY, 2013). O perfil típico de distribuição e concentração bacteriana ao longo do TGI é ilustrado na figura 2.

**Figura 2:** Composição e concentrações microbianas dominantes em diferentes regiões do trato gastrointestinal.



Fonte: Adaptado de KONTUREK, 2015.

Neste contexto, fica evidente o papel da microbiota intestinal na saúde do hospedeiro, evidenciando que uma microbiota intestinal equilibrada resulta na atividade normal das funções fisiológicas do hospedeiro, assegurando assim uma melhor qualidade de vida. No entanto, a alteração dessa microbiota traz malefícios à saúde do hospedeiro podendo contribuir para o desenvolvimento de diversas patologias (ARAÚJO et al., 2019). A condição na qual se tem alteração

composicional e funcional da microbiota é denominado disbiose (BASHIARDES et al., 2016). A disbiose causa um desequilíbrio no organismo, ocasionando redução da absorção de nutrientes, degradação de vitaminas, inativação de enzimas, produção de toxinas cancerígenas e destruição da mucosa intestinal (ARAÚJO et al., 2019). Dieta, estresse, uso de medicação e estilo de vida são alguns dos fatores que podem influenciar essa modulação (MEJIA et al., 2012; WANG; WAN, 2019).

Algumas doenças possuem associação com a condição de disbiose, a começar pela obesidade que é uma doença caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal (WANDERLEY; FERREIRA, 2010) e tem se tornado um dos problemas de saúde pública mais relevantes, devido a sua contribuição para altas taxas de morbidade e mortalidade. Pesquisas têm relacionado a composição da microbiota intestinal com desenvolvimento da obesidade (ARAÚJO et al., 2019; BORONI et al., 2012). Um estudo desenvolvido por Boroni e colaboradores (2012), mostrou que há diferenças na composição da microbiota entre indivíduos magros e obesos, associando o desequilíbrio de peso às diferentes espécies microbianas presentes em cada grupo. Evidências em modelos animais indicam a probabilidade da microbiota de obesos possuir maior capacidade de captar energia proveniente da dieta, fornecendo substratos que podem ativar as vias lipogênicas. Os microrganismos podem ainda induzir a atividade da lipoproteína lipase e conseqüentemente interferir no acúmulo de triglicerídeos no tecido adiposo (BORONI et al., 2012).

Além da obesidade, outras patologias têm sido associadas a condição de disbiose, como a doença Inflamatória Intestinal (DII), que compreende um grupo de doenças inflamatórias crônicas, que afetam o TGI, dentre elas a doença de Crohn e a colite ulcerativa (GOMES, 2017). Estudos realizados mostraram que existe uma comunicação entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e o trato gastrointestinal (TGI), sendo essa comunicação responsável pela melhora na funcionalidade do trato digestório (CRYAN, 2019; SILVESTRE, 2016). Dada a associação entre esses dois sistemas, fica evidente que a alteração de um pode conseqüentemente prejudicar o outro, estimulando por exemplo o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como as doenças de

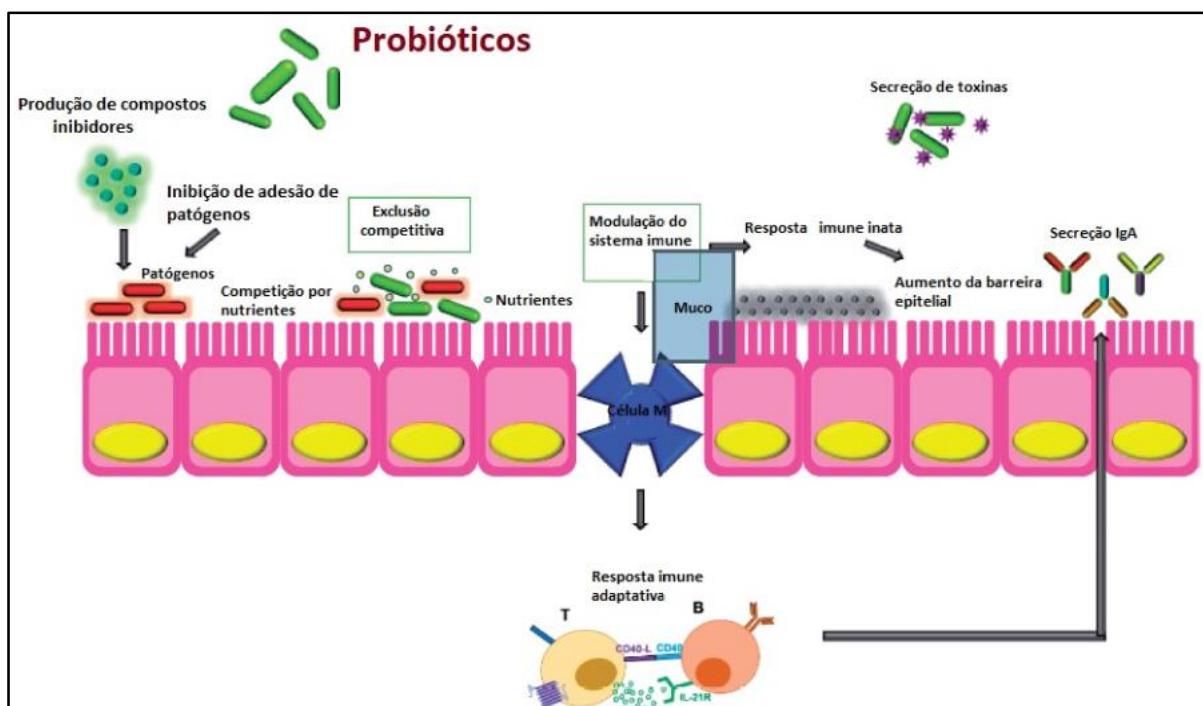
Parkinson (NESI; FRANCO; CAPEL, 2020) e de Alzheimer (MANCUSO; SANTANGELO, 2018).

Dentro do contexto apresentado, fica evidente o papel da microbiota intestinal tanto na doença quanto na saúde do hospedeiro, principalmente quando a condição de disbiose se estabelece. Contudo, a manutenção de uma microbiota equilibrada pode prevenir e até mesmo tratar diversas patologias, entre as terapias disponíveis destacam-se a administração de probióticos, prebióticos, simbióticos, mudanças nos hábitos alimentares e transplante fecal (SILVESTRE, 2016).

### **1. 2. Probióticos no tratamento da disbiose intestinal**

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (XIE; HALEGOUA, 2019; DEGNAN, 2008). Os probióticos possuem vários mecanismos que atuam na proteção do organismo, entre eles estão a proteção contra bactérias patogênicas por meio da competição, modulação do sistema imunológico, produção de compostos antimicrobianos, redução do pH e competição por nutrientes, além de possuírem a capacidade de aderência ao epitélio, visando posterior colonização (GONÇALVES, 2014). Eles auxiliam ainda na digestão através da fermentação dos carboidratos não digeríveis e atuam na regulação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. A figura 3 ilustra os principais mecanismos de ação dos probióticos (NESI; FRANCO; CAPEL, 2020).

**Figura 3:** Mecanismos de ação dos probióticos.



Fonte: Adaptado de PLATAN, 2019.

Diante da essencialidade dos probióticos para o organismo, cada vez mais seu uso vem sendo aceito pela comunidade científica. Probióticos como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são descritos como os gêneros mais utilizados. Pesquisas têm demonstrado a eficácia na profilaxia e até mesmo no tratamento de diversas patologias por meio da administração desses microrganismos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2006; GONÇALVES, 2014; DE ARAÚJO et al., 2017; XIE; HALEGOUA, 2019; DUSEJA et al., 2019). Assim, fica evidente que a utilização de probióticos pode fornecer muitos benefícios à saúde do hospedeiro, no entanto, para que esses microrganismos realizem suas funções e atinjam o efeito desejado, os níveis populacionais bioterapêuticos deve ser igual ou superior a  $10^7$  unidades formadoras de colônia (UFC/g ou UFC/ml) (FERREIRA, 2014). Para tanto, é fundamental que esses microrganismos suportem as condições gastrointestinais e cheguem viáveis ao intestino (CĂLINOIU et al., 2019; DIMITRELLOU et al., 2016), para isso é necessário utilizar algum método que vise a proteção desses microrganismos.

### **1. 3. Encapsulação de probióticos**

Alguns fatores podem influenciar na sobrevivência dos microrganismos probióticos, dos quais pode-se destacar, as características da cepa, processamento, atividade de água, presença de oxigênio e também o processo digestivo (SILVA, 2016), que possui condições que agem negativamente na sobrevivência dos probióticos. A começar pelo meio ácido do estômago que oscila entre os pHs 1 e 2,5, além das enzimas pancreáticas do intestino delgado e dos sais biliares, que possuem a capacidade de dissolver a membrana do microrganismo, pois apresentam natureza antimicrobiana. (SILVA, 2016; KLEEREBEZEM; VAUGHAN, 2009).

Deste modo, os benefícios proporcionados por meio do uso de probióticos só serão garantidos se os mesmos chegarem viáveis até o intestino, e para tal finalidade são necessárias ações para garantir sua viabilidade durante a vida de prateleira e na passagem pelo sistema gastrointestinal (SILVA, 2016). Uma alternativa para superar os problemas mencionados é o processo de microencapsulação desses microrganismos, (SILVA, 2016; VOS et al., 2010). A microencapsulação é definida como um processo de incorporação de probióticos em um material ou membrana específica que tem a capacidade de reduzir lesões ou a perda de células, as quais são decorrentes de fatores ambientais, com uma taxa de liberação controlada em condições específicas (CĂLINOIU et al., 2019; DESAI; PARK, 2007; PAVLI et al., 2018). O encapsulamento tem a capacidade de estabilizar as células e aumentar sua viabilidade durante a produção, armazenamento e manuseio (GBASSI; VANDAMME, 2012; VIDHYALAKSHMI; BHAKYARAJ; SUBHASREE, 2009).

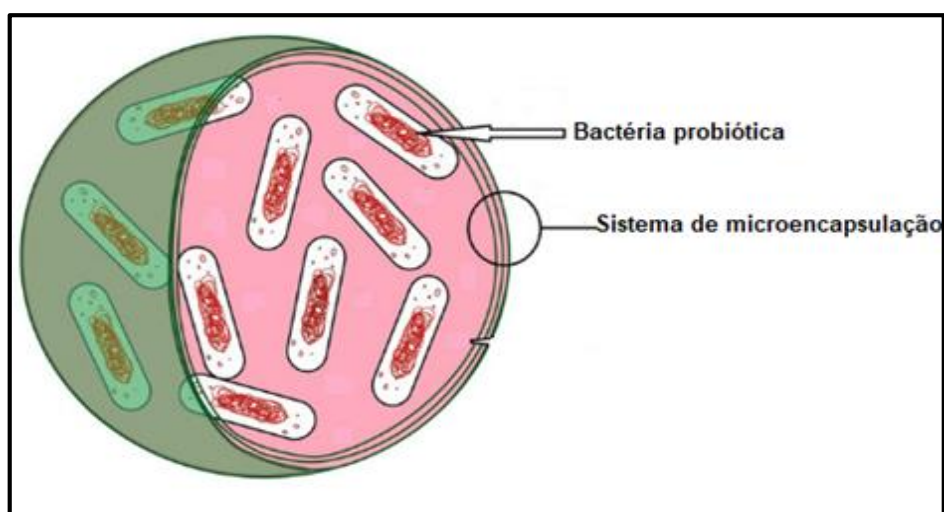
O método de microencapsulação tem sido usado por muitos pesquisadores com intuito de proteger os microrganismos das condições adversas citadas. Silva e colaboradores realizaram a encapsulação de probióticos com o objetivo de protegê-los das enzimas e das condições do TGI, os autores avaliaram também a viabilidade dos probióticos após 120 dias de armazenamento e concluíram que o processo foi eficiente na proteção. Ebrahimnejada e colaboradores, utilizaram em seu trabalho a quitosana como matriz encapsulante e de acordo com seus dados, o polissacarídeo mostrou-se

eficiente como método de proteção dos probióticos. Outros estudos que também utilizaram a encapsulação de microrganismos como método de proteção, constataram manutenção da viabilidade celular (BIASUZ, 2018; DIMITRELLOU et al., 2016; FARIAS, 2017; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2006; MAK et al., 2014).

A escolha do biomaterial para o processo de microencapsulação é de extrema relevância, pois determina a eficácia da proteção, suportando a passagem pelo estômago e desintegrando-se no intestino para liberar as células (GBASSI; VANDAMME, 2012).

Os biomateriais são definidos como qualquer material de origem natural ou não, que esteja em contato direto com uma estrutura viva e que seja destinado a agir em sistemas biológicos. Os biomateriais empregados no processo de encapsulamento de probióticos compreendem os polímeros naturais e sintéticos (GBASSI; VANDAMME, 2012; GENTILE, 1995). Como esses biomateriais estão em contato direto com células vivas, devem ser biocompatíveis e biodegradáveis. Alguns biomateriais podem ser usados no encapsulamento de probióticos como quitosana, carragenina, gelatina, proteínas de soro do leite, entre outros. (GBASSI; VANDAMME, 2012; ANAL; SINGH, 2007). No presente estudo a quitosana é aplicada como matriz encapsulante. A figura 4 ilustra o processo de microencapsulação.

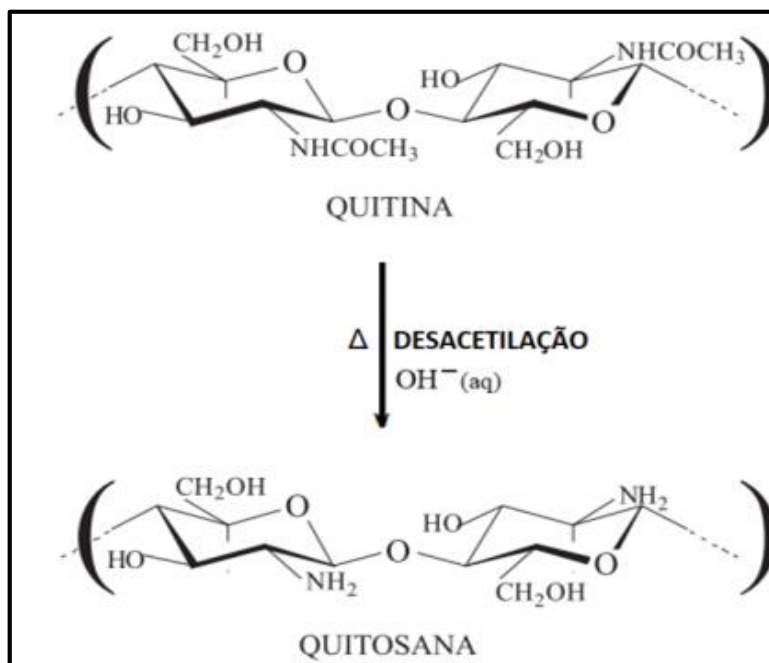
**Figura 4:** Representação esquemática da microencapsulação de probióticos.



#### 1. 4. Quitosana como matriz encapsulante

O uso de polímeros naturais para aplicações biomédicas vem ganhando destaque na área da pesquisa, a utilização desses compostos oferece algumas vantagens, tais como facilidade de obtenção, biocompatibilidade e biodegradabilidade (AZEVEDO et al., 2007). A quitosana é um heteropolissacarídeo de origem natural, obtida a partir da reação de desacetilação da quitina, um dos biopolímeros mais abundantes, derivado das conchas de crustáceos como as de camarões e caranguejos, bem como das paredes celulares de fungos (GONSALVES et al, 2011). As unidades que constituem a quitina e a quitosana são *N*-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina, na quitina há predomínio das unidades de *N*-acetil-*D*-glicosamina, enquanto a quitosana é constituída predominantemente por unidades de *D*-glicosamina (SILVA, 2006; VELÍŠEK; CEJPEK, 2015). Uma grande característica da quitosana é devido a sua natureza catiônica, propriedade essa, que lhe permite formar complexos eletrostáticos ou estruturas multicamadas com outros polímeros sintéticos ou naturais com carga negativa (CHEUNG et al., 2015; VENKATESAN; KIM, 2010).

**Figura 5:** Representações das estruturas primárias de quitina e quitosana.



Fonte: Adaptado de BATTISTI, 2008.

Em virtude das características apresentadas, a quitosana se mostra um excelente material para utilização em técnicas de encapsulamento de diversos biomateriais, além disso, seu uso tem se estendido também no aprisionamento de microrganismos vivos, proporcionando proteção às condições adversas e liberação no local de ação (EBRAHIMINEJADA; KHAVARPOUR; KHALILID, 2017). Portanto, a utilização desse polissacarídeo no aprisionamento de microrganismos probióticos é uma estratégia promissora, uma vez que, a administração destes, quando necessário, é imprescindível para saúde do hospedeiro, proporcionando diversos benefícios como os citados nesse trabalho. Por isso, a utilização da técnica de encapsulamento é uma estratégia para protegê-los e possibilitar a manutenção da viabilidade.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A principal conclusão do presente trabalho é que embora os dados de MEV tenham evidenciado morfologias sugestivas de agregação entre as nanopartículas com o probiótico, os resultados do teste de digestibilidade sugerem que o processo de encapsulação pode ter sido eficiente na proteção dos probióticos, visto que eles sobreviveram às condições simuladas do trato gastrointestinal. No entanto, ainda há a necessidade de otimização do processo de produção das nanopartículas, visando aumentar a quantidade de probióticos viáveis ao final do processo de digestibilidade. Dessa forma, uma das perspectivas do presente trabalho é realizar a produção das nanopartículas com adição de crioprotetores buscando evitar a formação de agregados, assim como também estabelecer um protocolo mais eficiente no rompimento das nanopartículas de quitosana e liberação do probiótico, possibilitando realizar a quantificação e avaliação da eficiência do processo de encapsulação. Portanto, o objetivo final dos resultados somados às perspectivas é encapsular probióticos para que quando necessária a administração possa sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal e proporcionar benefícios a saúde do hospedeiro, podendo ser utilizados como suplementos alimentares com alta eficiência terapêutica.

## REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends Food Sci. Technol**, 18, p. 240–251, 2007.
- ARAÚJO, D. G. S. et al. Alteração da microbiota intestinal e patologias associadas: importância do uso de prebióticos e probióticos no seu equilíbrio. **Temas em saúde**, v. 19, n. 4, p. 2447-2131, 2019.
- ARAÚJO, O. et al. Avaliação da sobrevivência de *lactobacillus* spp. às condições simuladas do trato gastrointestinal em suco de uva, maçã e laranja.
- ARAÚJO, Raquel Silva. Desenvolvimento, caracterização e liofilização de nanopartículas e encapsulamento de antibiótico de uso veterinário. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.
- AREPALLY, D.; REDDY, R. S.; GOSWAMI, T. K. Studies on survivability, storage stability of encapsulated spray dried probiotic powder. **Current Research in Food Science**, v. 3, p. 235-242, 2020.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- BASHIARDES, S. et al. Non-alcoholic fatty liver and the gut microbiota **Mol Metab.** n. 5, v. 9, p. 782–794, 2016.
- BATTISTI, M. V.; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Quím. Nova**, v. 31, n. 8, p. 2014-2019, 2008.
- BIASUZ, Thais. Obtenção de espécies de *Lactobacillus* microencapsulado em carragena com combinação proteica e aplicação em salame tipo milano. 2018. 79 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2018.
- BORONI, M. A. P. et al. Gut microbiota and the development of obesity. **Nutrición Hospitalaria**, v. 27, n. 5, p. 1408-1414, 2012.
- BOSCARIOLI, Milena Pacheco Martin. Influência de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvete. 2010. Dissertação (Mestrado em engenharia de processos químicos e bioquímicos) - Escola de engenharia Mauá de tecnologia, São Caetano do Sul, 2010.
- BRENCHLEY, J.M.; DOUEK, D.C. HIV infection and the gastrointestinal immune system. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 1, p. 23–30, 2008.
- CĂLINOIU, L. F. et al. Chitosan Coating Applications in Probiotic Microencapsulation. **Coatings**, v. 9, n. 3, 2019.

CALVO, P. et al. Novel Hydrophilic Chitosan–Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, p. 125–132, 1997.

CARDOSO, V. M. O Microbioma Humano. Universidade Fernando Pessoa Faculdade de Ciências da Saúde Porto, 2015.

CARVALHO, Mariana Wolff. Propriedades e simulação gastrointestinal in vitro de iogurte adicionado de extrato de stevia rebaudiana (bert.) em pó. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

CAVALHEIRO, C. P. et al. Encapsulação: alternativa para a aplicação de microrganismos probióticos em alimentos termicamente processados. **Ciência e Natura**, v.37, p. 65–74, 2015.

CHÁVARRI, M. et al. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p.185–189, 2010.

CHEUNG, R. C. et al. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. **Mar Drugs**. v. 8, n. 13, p. 5156-5186, 2015.

CLAUDEL, T.; STAELS, B.; KUIPERS, F. The Farnesoid X Receptor: A Molecular Link Between Bile Acid and Lipid and Glucose Metabolism. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, p. 2020-2030, 2005.

COOK, M. T. et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **J Control Release**, 20, 162(1), p. 56-67, 2012.

COSTA, Ana Carolina da Silva. Nanopartículas de quitosana para aplicação em sanidade de tabaquis amazônicos (*Colossoma macropomum*). 2013. (Dissertação) Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Pará Instituto de Ciências da Saúde Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Pará, 2013.

CRITTENDEN, R. et. al. Synbiotic Microcapsules That Enhance Microbial Viability during Nonrefrigerated Storage and Gastrointestinal Transit Synbiotic Microcapsules That Enhance Microbial Viability during Nonrefrigerated Storage and Gastrointestinal Transit. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.3 p. 2280-2282, 2006.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v. 4, n. 50, p. 434-61, 2010.

CRYAN, J. F.; O'RIORDAN, K.J., COWAN, C. S. M. The Microbiota-Gut-Brain Axis. **PhysiolRev**, v. 99, n. 4, p.1877–2013, 2019.

CUNHA, D. A. L. V. et al. Otimização do processo de obtenção de nanopartículas de quitosana-TPP pelo método de gelificação ionotrópica. Embrapa Instrumentação, São Carlos/SP, 21 a 22 de novembro de 2017. IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio.

DA SILVA, D. J. O Intestino Pode Ser a Peça que Falta na Descoberta da Patogênese da Doença de Parkinson?. **Neuro-psiquiatria**, v.80, 2019.

DA SILVA, J. P. L. et al. Processo de Encapsulação de Microrganismos Probióticos para Aplicação em Bebida Não Láctea Não Fermentada, Embrapa, 2017.

DE ARAÚJO, P. G. et al. Efeito de uma associação de cepas probióticas contendo lactobacillus e bifidobacterium na modulação da microbiota intestinal em pacientes constipados. **GED gastroenterol. endosc. dig**, v. 36, n. 3, p. 89 – 98, 2017.

DEGNAN, F.H. The US Food and Drug Administration and probiotics: Regulatory categorization. **Clin. Infect. Dis.** v. 2, n. 46, p.133–S136, 2008.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Dry. Technol**, 23, 1361–1394, 2007.

DIMITRELLOU, D. et al. Survival of spray dried microencapsulated Lactobacillus casei ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. **LWT Food Sci. Technol**, 71, p. 169–174, 2016.

DONTHIDI, A. R.; TESTER, R. F.; AIDOO, K. E. Effect of lecithin and starch on alginate-encapsulated probiotic bacteria. **Journal of Microencapsulation**, v. 1, n. 27, p. 67–77, 2010.

DOYLE, M. E.; EGAN, J. M. Mechanisms of action GLP-1 in the pancreas. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 113, p. 546-593, 2007.

DUSEJA, A. et al. High potency multistrain probiotic improves liver histology in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a randomised, double-blind, proof of concept study. **BMJ Open Gastroenterol**, v. 1, n. 6, 2019.

EBRAHIMNEJADA, P.; KHAVARPOUR, M.; KHALILID, S. Survival of Lactobacillus Acidophilus as Probiotic Bacteria using Chitosan Nanoparticles. **IJE TRANSACTIONS A: Basics**, v. 30, n. 4, p. 456-463, 2017.

ECKERT, Camila. "Bactérias lácticas: avaliação da resistência ao trato gastrointestinal simulado e encapsulamento com soros lácteos". 2016. Dissertação (Mestrado) – Curso de Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari - Univates, Lajeado, 2016.

FAN, W. et al. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 21–27, 2012.

FARIAS, Thaísa Gabriela Silva. Viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* E *Lactobacillus casei* encapsulados em sorvete de cajá. 2017. (Dissertação) Mestrado em nutrição. Universidade Federal de Pernambuco programa de pós-graduação em nutrição, Pernambuco, 2017.

FATA, L. A.; WEBER, P.; MOHAJERI, M. H. Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. **Probiotics Antimicrob Proteins**, v.1, n. 10, p.11-21, 2018.

FERREIRA, Geyza Souza. Disbiose intestinal: aplicabilidade dos prebióticos e dos probióticos na recuperação e manutenção da microbiota intestinal. 2014. Monografia (Graduação) – Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas, 2014.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2006). Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.

FORBES, J. D.; VAN DOMSELAAR, G.; BERNSTEIN, C. N. The Gut Microbiota in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. **Front Microbiol**, n. 7, 2016.

FURTADO, G. T. F. S. et al. Chitosan/NaF Particles Prepared Via Ionotropic Gelation: Evaluation of Particles Size and Morphology. **Materials Research**, v. 4, n. 21, 2018;

GATT, M.; REDDY, B.S.; MACFIE, J. Bacterial translocation in the critically ill – evidence and methods of prevention. **Aliment Pharmacol ther**, v. 25, p. 741-757, 2006.

GBASSI, G. K.; VANDAMME, T. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. **Pharmaceutics**, v. 1, n. 4, p. 149-163, 2012.

GENTILE, F. T. et al. Polymer science for macroencapsulation of cells for central nervous system transplantation. **React. Polym**, 25, p. 207–227, 1995.

GOMES, Ana Patrícia Pereira. A microbiota intestinal e os desenvolvimentos recentes sobre o seu impacto na saúde e na doença. 2017. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Lisboa, 2017.

GONÇALVES, Mara Andreia Pereira. Microbiota – implicações na imunidade e no metabolismo. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

GONSALVES, A. A. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana **Quim. Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

GOULET, O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease, **Nutrition Reviews**, v. 73, n. 1, p. 32–40, 2015.

GRANADA, A. Avaliação da influência de surfactantes sobre as características físico-químicas de suspensões de micropartículas poliméricas. Anais do 10o Congresso Brasileiro de Polímeros – Foz do Iguaçu, PR – outubro/2009.

HENAO-MEJIA, J. et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. **Nature**, 482, p. 179-185, 2012.

HOOPER, L. V. et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Ciência**, v. 291, n. 4, p.881-884, 2001.

JIMÉNEZ, E. et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Res Microbiol**, v. 3, n.159, p.187-93, 2008.

KLATT, N.R.; FUNDERBURG, N.T.; BRENCHLEY, J.M. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. **Trends in Microbiology**, v. 1, n. 21, p. 6–13, 2013.

KLEEREBEZEM, M.; VAUGHAN, E. E.Probiotic and gut *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*: molecular approaches to study diversity and activity. **The Annual Review of Microbiology**, v 63, p. 269-290, 2009.

KONTUREK, P. C. et al. Emerging role of fecal microbiota therapy in the treatment of gastrointestinal and extragastrointestinal diseases. **J Physiol Pharmacol**, v. 4, n. 66, p. 483–9, 2015.

KRASAEKOOPT, W. et al. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v.13, p.3-13, 2003.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. C. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT-and conventionally treated milk during storage. **LWT - Food Science and Technology**. 39, n. 2, p. 177-183, 2006.

LEE, Y. K.; MAZMANIAN, S. K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? **Science**, 24;330(6012), p.1768-73, 2010.

LIMA, Larisse Araújo. Nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio obtidas via gelatinização iônica para a nanoencapsulação de quercetina. 2013. iv, 54 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências de Materiais) –Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in Modified Alginate-chitosan Beads and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions. **Food Biotechnology**, v. 21, n.1, p.1-16, 2007.

MADUREIRA, A. R. et al. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6, p. 921-927, 2005.

MAIA, P. L.; FIORIO, B. C.; SILVA, F. R. A influência da microbiota intestinal na prevenção do câncer de cólon. **Arq. Catarin Med**, v. 1, n. 47, p. 182-197, 2018.

MAK, Z. et. al. Microencapsulation of Probiotics by Calcium Alginate-gelatinized Starch with Chitosan Coating and Evaluation of Survival in Simulated Human Gastro-intestinal Condition. **Iran J Pharm Res**, v. 3, n. 13, p. 843-852, 2014.

MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. "Alzheimer's disease and gut microbiota modifications: the long way between preclinical studies and clinical evidence." **Pharmacological research**, v.129, p.329-336, 2018.

MATHEWS, S. Microencapsulation of probiotics by calcium alginate and gelatin and evaluation of its survival in simulated human gastro-intestinal condition. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 4, p. 2080-2087, 2017.

MEDEIROS, José Alberto da Costa. Formulação de uma matriz alimentar sólida contendo probióticos encapsulados. 2018. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

MEIRA, S. M. M. et al. Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. **Brazilian Journal of Food Technology**, n. 12, p. 75-80, 2010.

MERONI, M.; LONGO, M.; DONGIOVANNI, P. The Role of Probiotics in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A New Insight into Therapeutic Strategies. **Nutrients**, v. 11, n. 11, 2019.

MOHAMMADPOUR DOUNIGHI, N et al. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthus eupeus scorpion venom as an antigen delivery system. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis**, v. 18, n. 1, p. 44-52, 2012.

MOHAMMED, M. A. et al. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. **Pharmaceutics**, 9, 53, 2017.

NESI, G. A.; FRANCO, M. R.; CAPEL, L. M. M. A disbiose da microbiota intestinal, sua associação no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e seus possíveis tratamentos. **Braz. J. of Develop**, v. 6, n. 8, p. 63306-63326, 2020.

NOAH, W. P.; ZOETE, M. R.; FLAVELL, R. A. Immune–microbiota interactions in health and disease. **Clinical Immunology**, v. 159, p.122-127,2015.

NUNES, P. P.; PORTO, A. L. M. Fisiologia hepática -Texto de Apoio. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Serviço de Fisiologia ano letivo 2006 / 2007.

OLIVEIRA, Marília Albuquerque. Síntese de nanopartículas à base do polissacarídeo *Anadenanthera macrocarpa* (angico) como matriz para incorporação de fármacos. 2010. 127 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

OLIVEIRA, Nízia Mayra de. Encapsulação de bifidobacterium lactis e sua tolerância a fluidos simulados do trato gastrointestinal. 2011. Monografia (Nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2011.

PATLAN, D. H. et al. The Use of Probiotics in Poultry Production for the Control of Bacterial Infections and Aflatoxins. **Prebiotics and Probiotics - Potential Benefits in Nutrition and Health**, 2019.

PAVLI, F. et al. Probiotic Incorporation in Edible Films and Coatings: Bioactive Solution for Functional Foods. **Int J Mol Sci**, v. 1, n. 19, 2018.

PETERSON, C. T. et al. Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. **Clin Exp Immunol**, v. 3, n. 179, p. 363-77, 2015.

PETERSON, L.W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews. Immunology**, v. 3, n. 14, p.141–153, 2014.

PIENIZ, S. et al. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. **Food Control**, v. 37, p. 251-256, 2014.

POLETTI, G. et al. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and different prebiotic agents by external ionic gelation followed by freeze-drying. **Ciência Rural**, v.49:02, e20180729, 2019.

PRAKASH, S.; TOMARO-DUCHESNEAU, C.; SAHA, S.; CANTOR, A. The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. **J Biomed Biotechnol**, 2011.

QUIGLEY, E. M. M. Gut Bacteria in Health and Disease. **Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 9. p. 560–9, 2013.

RAMAKRISHNA, C. et al. *Bacteroides fragilis* polysaccharide A induces IL-10 secreting B and T cells that prevent viral encephalitis. **Nature communications**, 10:2153, 2019.

RAMPINO, A. et al. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, p. 219– 228, 2013.

RANADHEERA, C. S. et al. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, p. 619–625, 2012.

ROCHA, Lenízy Cristina Reis. Desenvolvimento de micropartículas contendo suco de tomate via gelificação iônica. 2017. 87 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Biomateriais) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

RODRIGUES, F. A. P. et al. "Fisiologia da Barreira Epitelial Intestinal", p. 441 - 478. In: **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Blucher, 2016.

SAEZ, A. et al. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 50, n.3, p.379-87, 2000.

SATHYABAMA, S. et al. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. **Food Science and Technology**, v. 57, p. 419-425, 2014.

SCOTT, K. P. et al. The influence of diet on the gut microbiota. **Pharmacological Research**, vol. 69, p. 52-60, 2013.

SILVA, Hélio S. R. Costa. et al. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quím. Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SILVA, M. S. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. **Quim. Nova**, v. 33, n. 9, p. 1868-1873, 2010.

SILVA, Marlucci Palazzolli. Desenvolvimento e caracterização de chocolate meio amargo contendo microrganismos probióticos na forma livre e encapsulada. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências de Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2016.

SILVA, P. T. et al. Microencapsulação de probióticos por spray drying: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. **Ciência Rural**, v.45, n.7, p.1342-1347, 2015.

SILVA, Sanielly Jonhara Torres. Nanopartículas de quitosana-peg voltadas a liberação do ácido cumárico como agente antineoplásico. 2018. Dissertação (Mestrado em Morfotecnologia) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

SILVA-JUNIOR, V. L. et al. Obesity and gut microbiota - what do we know so far? **MedicalExpress** [online], v. 4, n. 4, 2017.

SILVESTRE, Carina Maria Rôlo Ferreira. O diálogo entre o cérebro e o intestino: qual o papel dos probióticos? Revisão de literatura. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina). - Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2016.

ŠIPAILIENĖ, A.; PETRAITYTĖ, S. Encapsulation of probiotics: Proper selection of the Probiotic strain and the influence of encapsulation technology and materials on the viability of encapsulated microorganisms. **Probiotics Antimicrob Proteins**, v. 1, n. 10, p. 1-10, 2018.

SOUZA, Aline Francisca de. Estudo da viabilidade de micorganismos probióticos encapsulados em matriz polimérica natural contendo ingredientes prebióticos e fibras alimentares. 2015. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

SOUZA, Juliana Rodrigues de. Estudo da desacetilação da quitosana e obtenção de suas nanopartículas para aplicação em Engenharia de tecidos. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 2017.

STOUT, M. J. et al. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. **Am J Obstet Gynecol**, v. 3, n. 208, p. 226.e1-7, 2013.

THOMAS, C. et al. TGR5-Mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. **Cell Metabolism**, vol. 10, p. 167-177, 2009.

TRAJANO, M. F et al. Influência das tensões e correntes no tamanho de partícula de cobre metálico por síntese de deposição sputtering. 2016.

TREMAROLI, V.; BÄCKHED, F. Functional Interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v. 489, p. 242-249, 2012.

TULUMOĞLU, S.; KAYA, H. I.; ŞİMŞEK, O. Probiotic characteristics of Lactobacillus fermentum strains isolated from tulum cheese. **Anaerobe**. 30, p.120 – 125, 2014.

VELÍŠEK, J.; CEJPEK, K. Biosynthesis of Food Constituents: Saccharides. 2. Polysaccharides – a Review. **Czech J. Food Sci**, 23, p. 173–183, 2005.

VENKATESAN, J.; KIM, S. K. Chitosan composites for bone tissue engineering—An overview. **Mar. Drugs**, 8, p. 2252–2266, 2010.

VIDHYALAKSHMI, R.; BHAKYARAJ, R.; SUBHASREE, R. S. Encapsulation “The future of probiotics”. **Adv. Biol. Res**, 39, p. 96–103, 2009.

VILAS BOAS, Fernanda Barbosa Ribeiro. Obesidade e sua possível relação com a microbiota intestinal. 2017. 19f. Monografia (Graduação) – Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2017.

VOS, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **Internatinal Dairy Journal**, v. 20, p. 292-302, 2010.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.1, n. 15, p.185-194, 2010.

WANG, L.; WAN, Y. J. Y. The role of gut microbiota in liver disease development and treatment, **Ke ai advancing research evolving science**, 3, p. 3-18, 2019.

XIE, C.; HALEGOUA-DEMARZIO, D. Role of Probiotics in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Does Gut Microbiota Matter?. **Nutrients**, v. 11, n. 11, 2019.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 112–115, 2008.

ZHAO, L. M. et. al. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. v. 28, n. 03, p. 353 - 362, 2011.

ZHENG, D.; LIWINSKI, T.; ELINAV, E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. **Cell Research**, n. 30, p. 492–506, 2020.