

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**COMPARAÇÃO DA VIABILIDADE DE BACTÉRIAS
ENTRE CÁPSULAS PROCESSADAS E AS FEZES DAS
QUAIS FORAM PRODUZIDAS**

DIEGO KAIRIS DA FONTE

Orientador: Prof. Dr. JOSIAS RODRIGUES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências
Biológicas.

BOTUCATU-SP

2025

DIEGO KAIRIS DA FONTE

**COMPARAÇÃO DA VIABILIDADE DE BACTÉRIAS
ENTRE CÁPSULAS PROCESSADAS E AS FEZES DAS
QUAIS FORAM PRODUZIDAS**

Orientador: Prof. Dr. JOSIAS RODRIGUES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências
Biológicas.

BOTUCATU-SP

2025

F682c Fonte, Diego Kairis da
Comparação da viabilidade de bactérias entre cápsulas processadas e as fezes das quais foram produzidas / Diego Kairis da Fonte. -- Botucatu, 2025
16 p. : tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Josias Rodrigues

1. Microbiota. 2. Bactérias anaeróbicas. 3. Crescimento bacteriano. 4. Criopreservação. I. Título.

DIEGO KAIRIS DA FONTE

**COMPARAÇÃO DA VIABILIDADE DE BACTÉRIAS
ENTRE CÁPSULAS PROCESSADAS E AS FEZES DAS
QUAIS FORAM PRODUZIDAS**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Universidade Estadual
Paulista, como parte das exigências para
a obtenção do título de Bacharel, do curso
de Graduação em Ciências Biológicas.

Botucatu, 15 de julho de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Josias Rodrigues
UNESP Câmpus de Botucatu
Orientador

Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca do Carmo
UNESP Câmpus de Botucatu

RESUMO

A microbiota intestinal desempenha um papel importante na saúde humana, e seu desequilíbrio, conhecido como disbiose, está associado a diversas doenças. A técnica de transplante fecal visa o tratamento de uma microbiota intestinal em disbiose por meio de uma microbiota saudável de um doador. Um dos métodos para esse transplante consiste na administração de cápsulas que possuem em seu interior o material fecal a ser transplantado, esse material é processado e armazenado conforme protocolo pré-estabelecido, visando homogeneidade e métodos de preservação do material interno por meio da utilização de matérias crioprotetores, já que serão congeladas para o armazenamento. O presente estudo avaliou e comparou a quantidade de bactérias em amostras fecais encapsuladas e em amostras fecais puras não processadas, ambas armazenadas a -80°C por aproximadamente três anos através de culturas anaeróbias. Os resultados sugerem que o processo de encapsulamento foi significativamente mais eficaz na preservação da viabilidade bacteriana.

ABSTRACT

The intestinal microbiota plays an important role in human health, and its imbalance, known as dysbiosis, is associated with several diseases. The fecal microbiota transplantation aims to treat dysbiotic intestinal microbiota by introducing a healthy donor microbiota. One method for performing the fecal microbiota transplantation involves the administration of capsules containing processed fecal material, prepared and stored according to pre-established protocols to ensure sample homogeneity and preservation, using cryoprotective agents due to the need for freezing. This study evaluated and compared the bacterial load in encapsulated fecal samples and in unprocessed pure fecal samples, both stored at -80°C for approximately three years, using anaerobic culture methods. The results suggest that the encapsulation process was significantly more effective in preserving bacterial viability.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
1.1	MICROBIOTA INTESTINAL.....	8
1.2	TRANSPLANTE FECAL E SELEÇÃO DE DOADORES.....	8
1.3	CÁPSULAS PARA TRANSPLANTE FECAL.....	9
2	OBJETIVO.....	9
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1	AMOSTRAS UTILIZADAS.....	10
3.2	CULTIVO ANAERÓBIO.....	10
3.3	REGISTRO DE CULTURAS.....	11
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VIABILIDADE BACTERIANA.....	11
4	RESULTADOS.....	11
4.1	CONCENTRAÇÃO BACTERIANA.....	11
4.2	COMPARAÇÃO DE CÁPSULAS E FEZES.....	12
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VIABILIDADE BACTERIANA.....	13
5	DISCUSSÃO.....	13
6	CONCLUSÃO.....	14
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15

1. INTRODUÇÃO

1.1 MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal, composta por uma grande quantidade e variedade de microrganismos, que incluem bactérias, arqueias, vírus, fungos e protozoários, sendo bactérias o grupo mais abundante, está localizada principalmente na região do cólon do intestino. Esses microrganismos possuem conhecidas funções no corpo humano, como a interação e a modulação do sistema imunológico, síntese de vitaminas, proteção contra uma variedade de patógenos e fermentação de alimentos, sendo capazes de modular a fisiologia humana por meio desses mecanismos[1][2][3].

Contudo, a maneira como essa microbiota irá interagir com o corpo humano depende de um delicado equilíbrio entre os microrganismos presentes, em questão, das bactérias. Em condições saudáveis ocorre uma autorregulação das bactérias presentes no trato gastrointestinal, evitando que bactérias patogênicas se tornem um problema, por meio da inibição de seu crescimento ou estabelecimento, por exemplo. Por outro lado, quando temos um desequilíbrio desses microrganismos, seja ele pela redução de microrganismos residentes, aumento de microrganismos patogênicos e ou uma perda de diversidade geral da microbiota, ou por uma combinação desses fatores, podem surgir algumas doenças relacionadas ao desequilíbrio fisiológico, como doença de crohn, retocolite ulcerativa, obesidade, alergias e diabetes tipo 1, entre outras enfermidades, esse quadro de desequilíbrio é denominado como disbiose[4].

A condição de disbiose do trato gastrointestinal pode ser desencadeada por diferentes fatores como por exemplo pelo uso de antibióticos, pela dieta do indivíduo, como dietas pobres em fibras ou rica em gorduras e carboidratos, alimentos ultraprocessados, infecções e até pelo estresse crônico, através de fatores inflamatórios[5].

1.2. TRANSPLANTE FECAL E SELEÇÃO DE DOADORES

O transplante fecal (TF), um método promissor que consiste na transferência de fezes de um doador saudável para um paciente, com o objetivo de restabelecer sua microbiota a um estado saudável, já é uma terapia considerada padrão para por exemplo infecções por *Clostridioides difficile*, refratária a antibioticoterapia e com taxas de sucesso superiores a 90%. Além disso, o TF também vem sendo avaliado para outros tratamentos relacionados a uma microbiota alterada, como síndrome do intestino irritável, doença hepática gordurosa não alcoólica e retocolite ulcerativa, por exemplo[8]. Contudo os desafios desse método de tratamento permanecem como fortes barreiras para a aplicação mais abrangente e facilitada, como a dificuldade na seleção de doadores de fezes, e preparo e estocagem do material e sua forma de administração.

A seleção de doadores é sem dúvidas um dos pontos mais críticos quando falamos em transplante fecal. Para garantir uma matéria-prima de qualidade, um processo rigoroso de seleção e triagem é feito para garantir que os doadores tenham uma microbiota intestinal que possa ser considerada boa para o uso em transplantes fecais. Questionários

iniciais para verificar a disponibilidade da pessoa incluindo região de residência, dias disponíveis e esclarecimento do método para coleta costumam eliminar boa parcela dos voluntários, porém visam tornar o processo de doação mais fácil tanto para os hospitais quanto para o doador. Etapas seguintes visam averiguar a vida que os voluntários levam, assim como seu histórico e os impactos que algumas condições podem causar na qualidade da microbiota intestinal em questão. Após os processos eliminatórios, o número de candidatos restantes é drasticamente reduzido em comparação ao inicial. Após esses processos, análises clínicas são feitas, mesmo que custosas, porém críticas e decisivas para garantir um material de qualidade e seguro para pacientes que poderão possivelmente receber o transplante. Apenas esses procedimentos podem reduzir a seleção de doadores adequados para a doação de fezes de 90% a 99% [6][7].

1.3. CÁPSULAS PARA TRANSPLANTE FECAL

A possibilidade da utilização de cápsulas para o transplante fecal traz consigo pontos vantajosos a serem considerados, como ser um procedimento menos invasivo, se compararmos a outros métodos como colonoscopia e enema por exemplo, que podem intimidar o paciente ou ser passível de alguma intolerância por ele. Também é uma forma de abordagem terapêutica que dá maior acessibilidade a quem está em tratamento por permitir a realização do tratamento em sua própria residência e não em um ambiente hospitalar, que muitas vezes pode ser de difícil acesso para alguns[8].

Porém esse método traz consigo desafios a serem considerados desde o seu preparo até sua administração. Técnicas e ambiente adequado de manuseio e preparo do material fecal doador como protocolos previamente testados e de garantia de bons resultados, componentes indispensáveis necessários para preservação em congelamento como o glicerol que atua como agente crioprotetor, ajudando a proteger os microrganismos da baixa temperatura, evitando a formação de cristais de gelo que poderiam romper as membranas celulares e comprometer a viabilidade do material durante o congelamento e até o material utilizado para envase, como cápsulas de gelatina e cápsulas gastroresistentes, quando combinadas, podem auxiliar na predição e determinação do local em que o material será exposto e entrará em contato com o organismo[8][9].

Os métodos mencionados para preparo da cápsula, visam não só a garantia de um material de qualidade como sua eficácia para o tratamento, e isso inclui a preservação dos microrganismos presentes nas fezes doadoras que serão encapsuladas e estocadas por indeterminados períodos até sua utilização.

2. OBJETIVO

Com isso o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a quantidade de bactérias presentes em amostras com o uso de um protocolo de preparo de cápsula para uso em transplante fecal com um material fecal de mesma origem que não recebeu nenhum tratamento, sendo apenas preservado a baixas temperaturas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS UTILIZADAS

As amostras utilizadas para este estudo foram provenientes do projeto desenvolvido por MISSIO A. P.[\[7\]](#). Amostras essas coletadas e preparadas, no caso das cápsulas, entre julho e outubro de 2022, nas quais cada lote de cápsulas foi devidamente identificado com base na sua data de fabricação e armazenada em frascos rotulados e lacrados, acondicionados em freezer -80 °C até o momento de uso para esse experimento. O material fecal puro foi mantido nas mesmas condições de temperatura, porém sem nenhum processamento prévio, sendo mantido em microtubos de 1,5ml.

As cápsulas utilizadas foram processadas a partir do material fecal puro, sendo peneiradas em uma malha de aço de 1,0 mm em uma mistura (1:1; p/v) de manteiga de cacau com glicerol (8:2; v/v), pré-aquecida a 37 °C e envasada em invólucros de gelatina 0.

Para o cultivo em placa foram selecionadas ao todo 17 datas distintas, ou seja, 17 amostras, de um total de 24, sendo selecionadas aquelas em que cápsulas processadas e material fecal puro armazenado pudessem estar pareadas com a mesma data de identificação, visto que algumas amostras não restam exemplares. Com isso mantendo a homogeneidade do estudo, totalizando 34 amostras correspondentes para cultivo anaeróbio.

3.2. CULTIVO ANAERÓBIO

Para avaliar a viabilidade bacteriana após o longo período de armazenamento de quase 03 anos e se os resultados dos métodos de preservação utilizando manteiga de cacau e glicerol das cápsulas foram diferentes do material fecal puro foi realizado o cultivo de amostras pareadas de cápsulas e fezes. Todo o protocolo foi realizado em um ambiente fechado, com equipamentos e insumos esterilizados previamente ao uso por meio de autoclave. Para cada amostra foram utilizados 0,05 g de material, coletados das cápsulas e dos tubos de material fecal com uma haste de madeira, que foram dissolvidos em 450 µL de solução salina estéril (0,9%) e em seguida foram misturadas individualmente por vórtex até que se obtivesse uma solução completamente homogênea. Em seguida foram feitas diluições seriadas (1:10) até 10⁵, garantindo a completa homogeneização entre as diluições com o uso de vórtex e lavagens da ponteiras no próprio meio entre cada uma delas. As diluições 10⁴ e 10⁵ foram semeadas em placas de Petri com meio Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar preparo conforme orientação do fabricante, adicionando 100 µL ao centro de cada placa e homogeneizando por toda ela com uma alça de drigalski. As placas foram deixadas por 10 minutos abertas ao lado de um bico de Bunsen para reduzir sua umidade superficial e, em seguida, incubadas em jarra de anaerobiose junto a um

reductor de oxigênio de meio ativado com 35 mL de água deionizada (AnaeroCult A – Merck Millipore) e deixadas em estufa de crescimento a 37 °C por 72 horas. As culturas foram realizadas em etapas conforme disponibilidade do espaço em jarras anaeróbias, sendo 06 amostras por jarra.

3.3. REGISTRO DE CULTURAS

As contagens de unidades formadoras de colônia (UFC) foram feitas nas placas que apresentavam quantidade e colônias contáveis, priorizando a diluição mais elevada como padrão (10^5). A contagem de cada placa foi feita manualmente, utilizando caneta permanente e um fundo preto para destaque. Os resultados foram fotografados e organizados em tabelas para controle experimental.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VIABILIDADE BACTERIANA

Para avaliar a diferença na viabilidade bacteriana entre os materiais encapsulados e não encapsulados, foi realizado um **teste t pareado** entre os valores de unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g), calculados a partir das contagens obtidas em placas de diluição 10^5 e 10^4 de 17 amostras pareadas de fezes e cápsulas. Nível de significância 0.05.

4. RESULTADOS

4.1. CONCENTRAÇÃO BACTERIANA

Foram realizadas culturas anaeróbias de 34 amostras (17 cápsulas e 17 fezes puras pareadas) em placas de cultivo contendo o meio de cultura Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar, totalizando 68 placas cultivadas.

A concentração de bactérias foi determinada pela contagem das UFC em placas e expressos em UFC/G, utilizando os valores de número de colônias, fator de diluição e na massa inicial da amostra.

Código da Amostra	Fezes (UFC/g)	Cápsula (UFC/g)
20220729	$8,01 \times 10^8$	$5,99 \times 10^9$
20220801	$5,31 \times 10^8$	$2,74 \times 10^9$
20220802	$2,61 \times 10^8$	$5,81 \times 10^9$
20220817	$5,40 \times 10^8$	$4,72 \times 10^9$
20220818	$9,00 \times 10^8$	$4,50 \times 10^9$
20220824	$6,80 \times 10^8$	$1,50 \times 10^9$
20220831	$1,19 \times 10^9$	$3,32 \times 10^9$
20220901	$1,24 \times 10^9$	$1,36 \times 10^9$
20220912	$6,39 \times 10^8$	$1,82 \times 10^9$
20220913	$2,25 \times 10^8$	$1,72 \times 10^9$
20220915	$6,21 \times 10^8$	$8,51 \times 10^9$
20220916	$3,51 \times 10^8$	$8,93 \times 10^9$
20220919	$5,46 \times 10^8$	$6,76 \times 10^8$
20221006	$2,52 \times 10^8$	$2,05 \times 10^9$
20221010	$1,46 \times 10^9$	$4,21 \times 10^9$
20221011	$4,41 \times 10^8$	$4,84 \times 10^9$
20221024	$1,52 \times 10^9$	$4,64 \times 10^9$

Tabela 1. Estimativa da concentração bacteriana (UFC/g) das amostras de fezes puras e de amostras de cápsulas após cultivo anaeróbio.

4.2. COMPARAÇÃO DE CÁPSULAS E FEZES

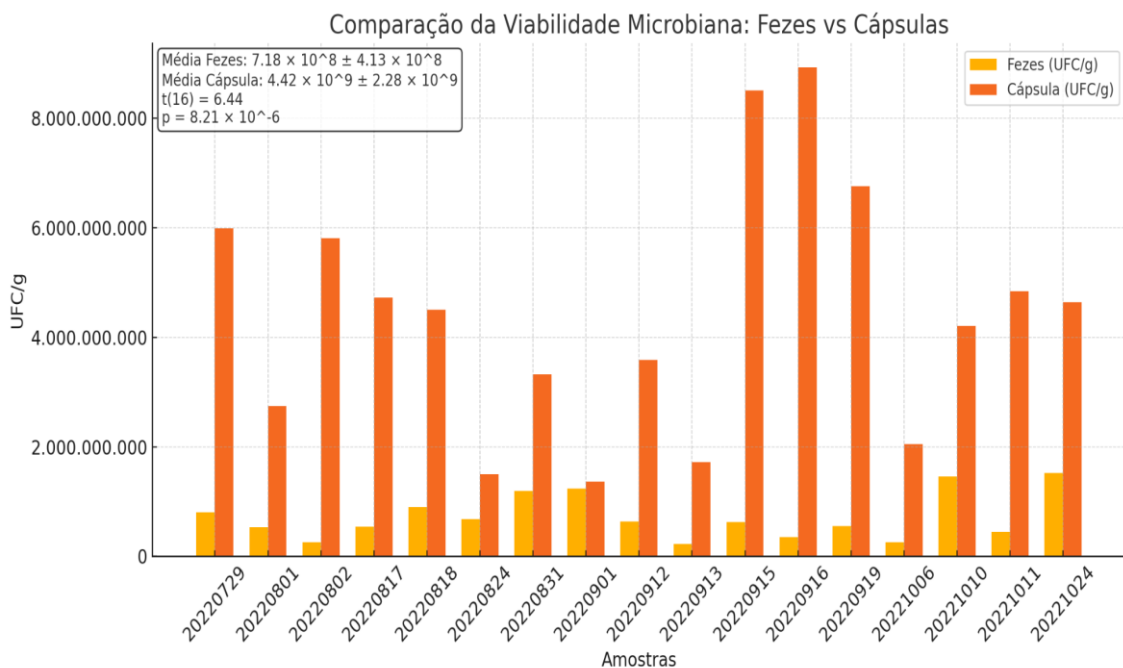


Figura 1. Comparação do número de unidades formadoras de colônia por grama (UFC/G) entre amostras de fezes e cápsulas processadas.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VIABILIDADE BACTERIANA

Os resultados mostraram que as cápsulas apresentaram valores consistentemente superiores de UFC/g em relação às fezes correspondentes, com uma diferença estatisticamente significativa: $p = 0,0000082$. O valor p é menor que o nível de significância 0.05.

5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que o encapsulamento e seus procedimentos envolvidos desde a peneiragem, até a adição de componentes crioprotetores como glicerol e manteiga de cacau foi significativamente mais eficaz na preservação da viabilidade bacteriana após um longo período de quase 03 anos de armazenamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em comparação a amostras de fezes não processadas. Esses dados podem dar um suporte a forma de como o material fecal é trabalhado após seu recebimento de um doador.

O aumento da viabilidade bacteriana foi apontado como significativo na comparação entre as cápsulas e as amostras de fezes sem tratamento. Esse resultado pode ser atribuído à combinação de manteiga de cacau e glicerol usados para realizar uma mistura entre as fezes, que logo foi envasado. Suas propriedades crioprotetoras, ou seja, redução do dano por congelamento pela redução da formação de cristais de gelo e estabilização do meio, além da homogeneização pelo processo de peneiragem estabelecido no protocolo foram cruciais para obtenção desse resultado.

A seleção de doadores para a coleta de material fecal e confecção das cápsulas é um importante ponto a ser levado em consideração na utilização desse método. A falta de um banco de fezes disponível e de fácil acesso se torna determinante visto que o processo de triagem é rigoroso e pode retirar até 99% dos candidatos pré-dispostos a realizar o procedimento de doação. O material fecal doado é a matéria-prima de todo o procedimento, estudo e aplicação prática que surgiram e podem vir a surgir, por isso tem grande valia para esse tipo de estudo. A ausência de um banco de fezes dificulta o acesso a esse tipo de material, sendo necessário repetir por completo o procedimento de triagem e coletas iniciais, e ainda sim, sem garantia de um material de qualidade[7][10].

O uso de cápsulas em comparação aos tratamentos convencionais como colonoscopia e enema por exemplo, vem com o objetivo de facilitar o tratamento, tornando-o menos invasivo e mais acessível aos pacientes, permitindo tratamento em locais em que a pessoa se sinta mais confortável, porém devemos considerar as diferenças entre os tratamentos, principalmente quanto a perda de microrganismos devido ao processo de estocagem. O processo de estocagem em cápsulas possui uma perda maior de quantidade de microrganismos do que em procedimentos como enema e colonoscopia, isso acontece por ter mais etapas de processamento que esses métodos, expondo por maior

tempo o material a um meio não ideal para sua sobrevivência, além do estresse causado pelas etapas de preparo como filtração, centrifugação, misturas e até o congelamento. [\[10\]\[11\]](#).

6. CONCLUSÃO

A necessidade de um método de preservação eficaz, que possa manter a qualidade do material fecal, preservando a viabilidade bacteriana nas cápsulas por longos períodos é fundamental para a consideração de sua utilização em tratamentos que envolvam a microbiota intestinal, isso devido principalmente por suas questões laboriosas de preparo e desafios iniciais como a obtenção de uma matéria-prima de qualidade.

Com uma análise em cultivo anaeróbio foi possível obter dados comparativos importantes sobre o comportamento a longo prazo do material tratado em comparação ao material não tratado. Os resultados demonstraram que, em todos os pares analisados, as cápsulas apresentaram valores superiores de UFC/g quando comparadas as amostras de fezes puras, sem tratamento, indicando uma maior viabilidade bacteriana. Essa diferença foi estatisticamente significativa, indicado pelo teste t pareado, descartando a hipótese de que os resultados se devem ao acaso.

Esses dados nos sugerem que o método de encapsulamento, incluindo seus princípios crioprotetores, ofereceram uma proteção significativa da viabilidade bacteriana em comparação ao meio não tratado, indicando que o encapsulamento pode ser um método eficaz para preservar amostras que sejam viáveis e deixando-as prontas para uso clínico, mesmo após longos períodos de armazenamento.

Estudos futuros devem considerar aprofundar a avaliação dos microrganismos preservados, avaliando a diversidade do cultivo, analisar sua funcionalidade metabólica como produção de ácidos graxos de cadeia curta e possivelmente sua eficácia terapêutica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Matijašić M, Meštrović T, Paljetak HČ, Perić M, Barešić A, Verbanac D. Gut Microbiota beyond bacteria-mycobiome, virome, archaeome, and eukaryotic parasites in IBD. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020;21(8):2668. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21082668>
2. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol* [Internet]. 2015;31(1):69–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/MOG.000000000000139>
3. Hillman ET, Lu H, Yao T, Nakatsu CH. Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes Environ* [Internet]. 2017;32(4):300–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1264/jsme2.ME17017>
4. DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2016;22(5):1137–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/MIB.0000000000000750>
5. Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2016;375(24):2369–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1600266>
6. Cammarota G, Ianiro G, Kelly CR, Mullish BH, Allegretti JR, Kassam Z, et al. International consensus conference on stool banking for faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* [Internet]. 2019;68(12):2111–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319548>
7. Missio AP. Estudo visando a produção de uma cápsula para transplantação fecal: da seleção de doadores de fezes aos ensaios laboratoriais [tese]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu; 2022.
8. Cold F, Baunwall SMD, Dahlerup JF, Petersen AM, Hvas CL, Hansen LH. Systematic review with meta-analysis: encapsulated faecal microbiota transplantation - evidence for clinical efficacy. *Therap Adv Gastroenterol* [Internet]. 2021;14:17562848211041004. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/17562848211041004>
9. Mullish BH, Merrick B, Quraishi MN, Bak A, Green CA, Moore DJ, et al. The use of faecal microbiota transplant as treatment for recurrent or refractory *Clostridioides difficile* infection and other potential indications: second edition of joint British Society of Gastroenterology (BSG) and Healthcare Infection Society (HIS) guidelines. *Gut* [Internet]. 2024;73(7):1052–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2023-331550>
10. Kao D, Roach B, Silva M, Beck P, Rioux K, Kaplan GG, et al. Effect of oral capsule– vs colonoscopy-delivered fecal Microbiota transplantation on recurrent *Clostridium difficile* infection: A randomized clinical trial. *JAMA* [Internet]. 2017;318(20):1985. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2017.17077>

11. Ianiro G, Maida M, Burisch J, Simonelli C, Hold G, Ventimiglia M, et al. Efficacy of different faecal microbiota transplantation protocols for *Clostridium difficile* infection: A systematic review and meta-analysis. *United European Gastroenterol J* [Internet]. 2018;6(8):1232–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/2050640618780762>