



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.^a Dr.^a. Fátima Pereira de Souza
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey
Coorientador: Dr. Ícaro Putinhon Caruso

São José do Rio Preto
2021

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

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^a Dr^a Fátima Pereira de Souza
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a Dr^a 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

1. INTRODUÇÃO	11
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
2. OBJETIVOS.....	23
2. 1. Objetivo geral	23
2. 2. Objetivos específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
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
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
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
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	41
REFERÊNCIAS.....	42

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).

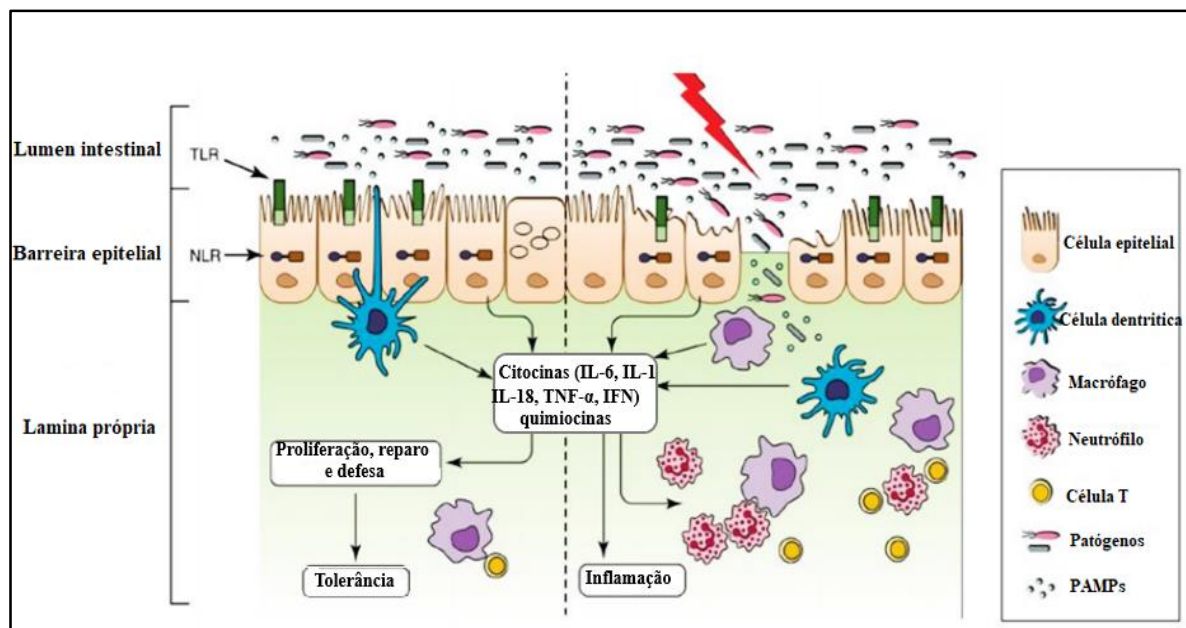
A sinalização por meio destes receptores pode desencadear uma resposta inflamatória fisiológica que favorece a proliferação de células progenitoras contribuindo para a integridade intestinal. Entretanto, quando há falhas nesses mecanismos, uma resposta não controlada pode ser estabelecida desencadeando 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 inume estimulando linfócitos TCD4⁺ 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).

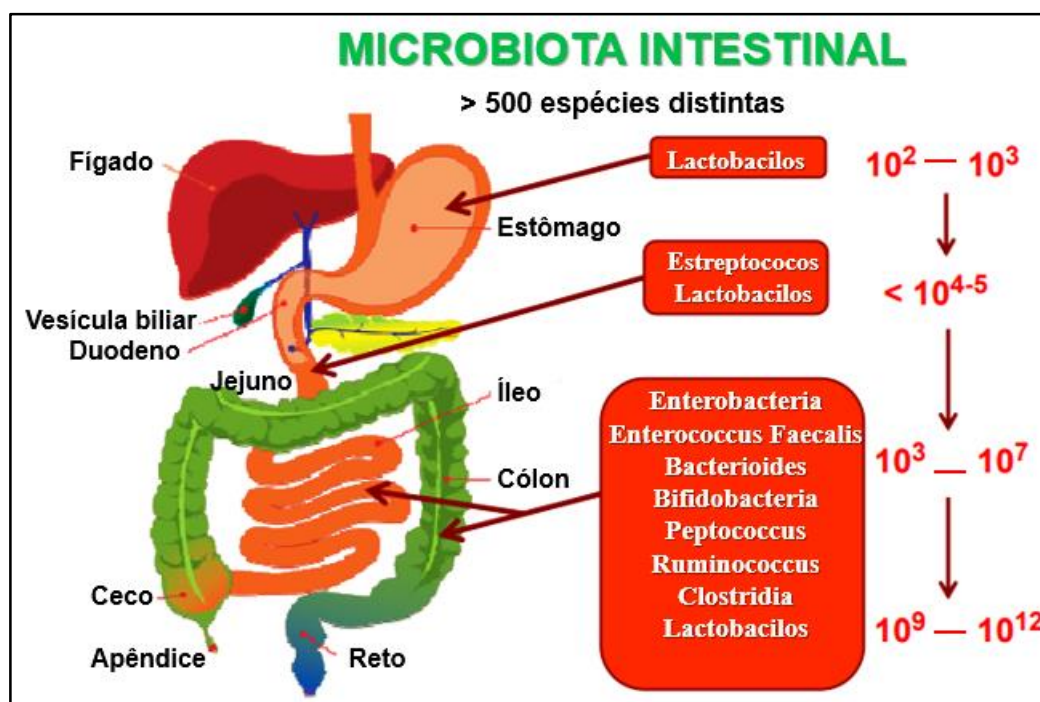
Dessa forma, o trato gastrointestinal é um componente fundamental na homeostase, visto que, esse sistema abriga a maior parte desses microrganismos. O TGI também possui importantes funções para manutenção da homeostase do organismo, o epitélio da mucosa forma uma barreira que impede a entrada de microrganismos 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 gêneros *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 consequentemente 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 consequentemente prejudicar o outro, estimulando por exemplo o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como as doenças de

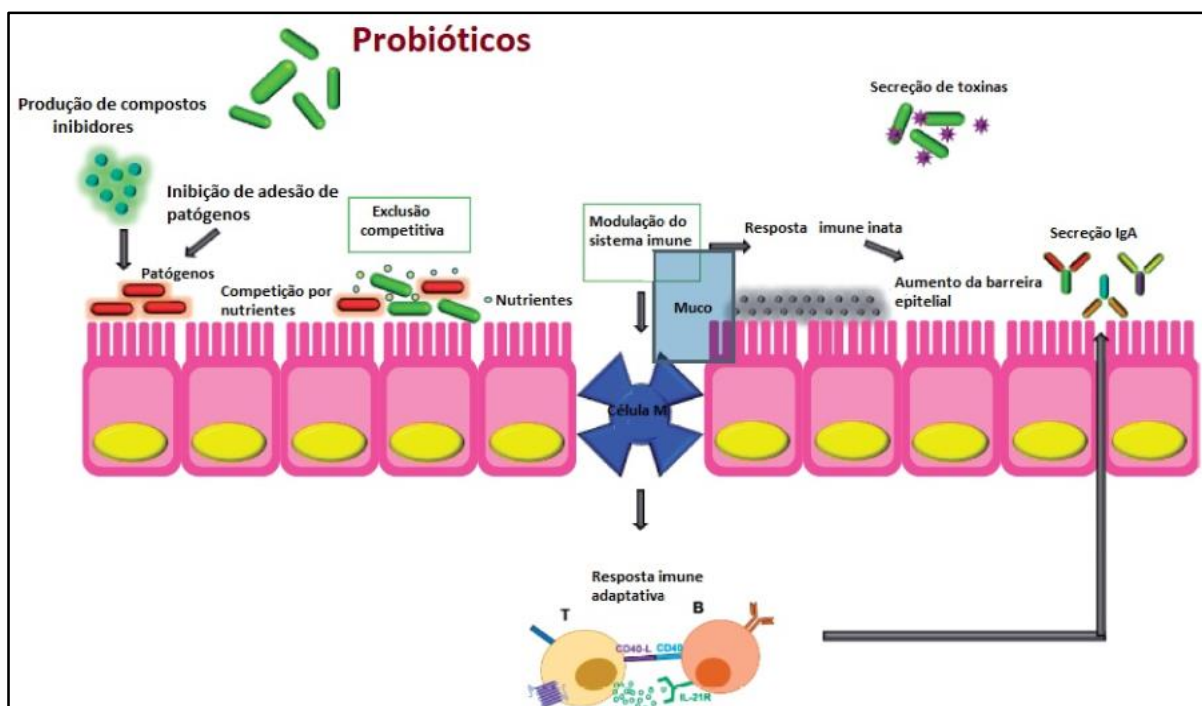
Parkinson (NESI; FRANCO; CAPEL, 2020) e de Alzheimer (MANCUSO; SANTANGELO, 2018).

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).

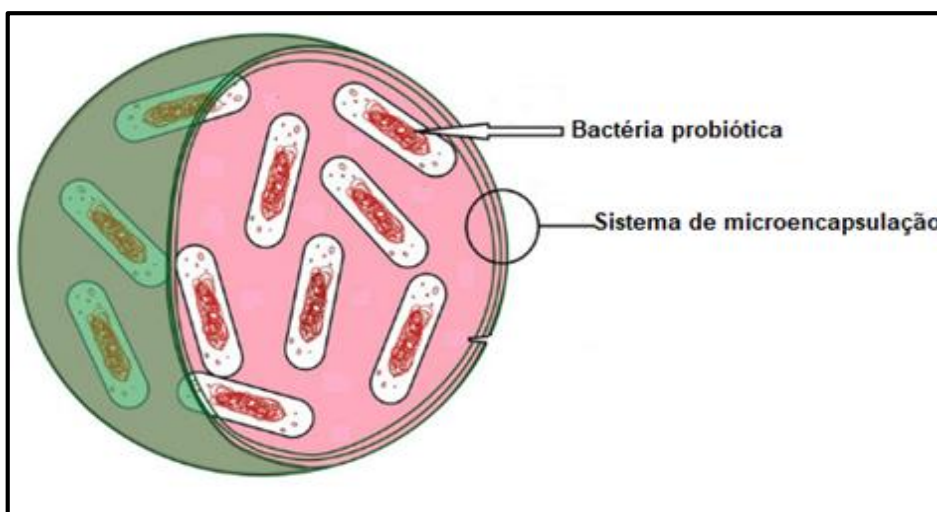
O método de microencapsulação tem sido usado por muitos pesquisadores com intuito de proteger os microrganismos das condições adversas citadas. Silva e colaboradores realizaram a encapsulação de probióticos com o objetivo de protegê-los das enzimas e das condições do TGI, os autores avaliaram também 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.

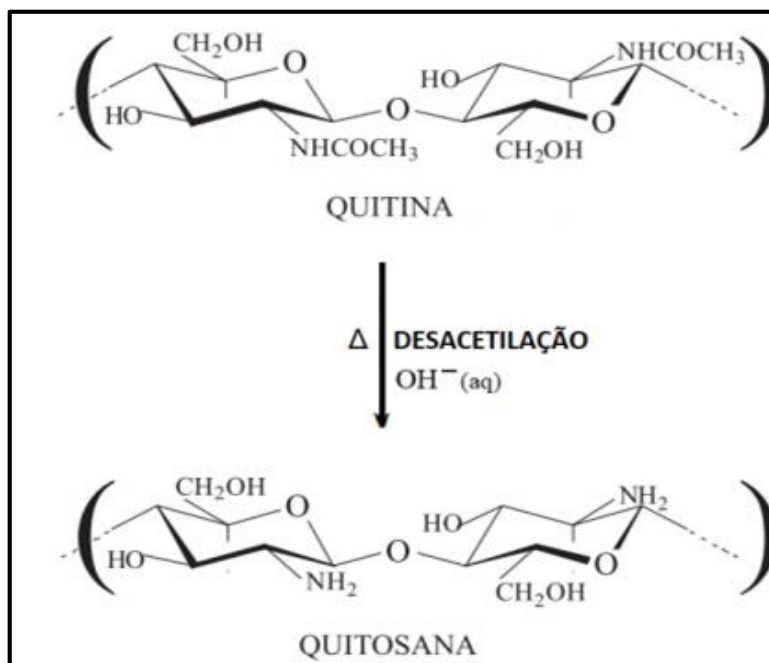


Fonte: Adaptado de CĂLINOIU, 2019.

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.

2. OBJETIVOS

2. 1. Objetivo geral

Avaliar a viabilidade do *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulado em matriz de quitosana após passagem pelo trato gastrointestinal simulado.

2. 2. Objetivos específicos

- Produzir as nanopartículas de quitosana contendo *Lactobacillus rhamnosus*
- Caracterizar a morfologia das nanopartículas
- Avaliar a eficiência do processo de microencapsulação
- Verificar a capacidade de sobrevivência do probiótico livre e encapsulado em cada etapa da simulação das condições gastrointestinais

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. 1. Infraestrutura

O presente estudo foi desenvolvido no Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB), Departamento de Física e também nos laboratórios de Leite e Derivados e no laboratório de Medidas Físicas I do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DETA), localizados no Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Campus São José do Rio Preto.

3. 2. Material

A matriz encapsulante utilizada foi a quitosana, de baixa massa molecular, obtida comercialmente da empresa Sigma Aldrich. O reagente tripolifosfato de sódio (TPP) foi adquirido do fabricante Êxodo. O microrganismo probiótico utilizado no presente trabalho foi o *Lactobacillus rhamnosus* GG, gentilmente cedido pela professora Ana Lúcia Barretto Penna do Departamento de Engenharia e Tecnologia de alimentos (DETA/IBILCE). A cultura foi mantida a -80 °C em ágar Man-Rogosa-Sharp (MRS), composto por peptona (10 g/L), extrato de carne (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L), glicose (20 g/L), fosfato dipotássio (2 g/L), acetato de sódio (5 g/L), citrato de triamônio (2 g/L), sulfato de magnésio (0,2 g/L), sulfato de manganês (0,05 g/L) e Tween 80% (1 mL/L).

3. 3. Ativação da cultura estoque e enumeração dos microrganismos

Os ensaios foram realizados utilizando a metodologia proposta por Krasaekoopt, Bhandari e Deeth, (2006) com algumas modificações. O microrganismo foi reativado em 10 mL de caldo MRS e incubado em estufa bacteriológica 37°C por 18 horas. Posteriormente foi realizado o repique em caldo MRS e a referida cepa foi incubada por 18 horas, 37°C em anaerobiose. Uma alíquota de amostra foi retirada para determinar o número de células viáveis, por meio da contagem de unidades formadoras de colônia UFC/mL, portanto, para essa etapa foram realizadas diluições decimais

seriadas em solução salina 0,9% estéril, essa etapa foi baseada no método da gota (*drop plate*) em ágar MRS. Para tanto, uma placa com ágar MRS foi dividida em 8 partes, em cada parte da placa foi pipetado 10 µL correspondente a cada diluição previamente obtida. As placas inoculadas foram acondicionadas em jarras de anaerobiose contendo um gerador de anaerobiose (Probac), e incubadas a temperatura de 37°C por 48 horas. As análises microbiológicas foram realizadas em duplicata, e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia (UFC/mL), o restante da amostra foi preparada para o encapsulamento.

3. 4. Preparo do inóculo probiótico

O preparo do inóculo do probiótico foi baseado no método descrito por Farias (2017) com algumas modificações. Após 18 horas de crescimento do inóculo, o mesmo foi preparado para o encapsulamento, posteriormente, foram transferidos 10 mL do inóculo para um recipiente e submetido a etapa de centrifugação para obtenção da biomassa celular, a 3600 rpm durante 15 minutos, 4°C. O sobrenadante foi descartado e as culturas foram lavadas duas vezes com solução salina estéril (0,9%), seguidamente o *pellet* foi ressuscitado e utilizado no processo de microencapsulação.

3. 5. Encapsulação dos probióticos em matriz de quitosana

A produção das nanopartículas com o probiótico foi realizada de acordo com o método de gelificação iônica descrito por Calvo et al., (1997). A solução de quitosana (0,5 mg/mL) foi preparada sendo dissolvida em 100 mL de ácido acético (0,5%), a solução permaneceu sob constante agitação mecânica por cerca de 24 horas, após total dissolução da quitosana a solução apresenta-se transparente e sem a presença de resíduos.

Posteriormente foi adicionado à solução de quitosana 0,5 mL do inóculo probiótico que foi preparado no passo anterior e homogeneizado por 2 horas. Foram preparados 50 mL da solução de TPP (0,1 mg/mL) e dissolvida em água destilada. As nanopartículas de quitosana foram produzidas adicionando-se gota a gota da solução de TPP na solução de

quitosana contendo o probiótico sob constante agitação magnética, promovendo desta forma a complexação entre espécies de carga oposta (quitosana/TPP), essa etapa foi realizada com auxílio da bomba do equipamento Spray Dryer, a figura 6 ilustra o sistema utilizado. Seguido a essa etapa, o sistema foi centrifugado a uma velocidade de 5000 rpm, 25°C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e a amostra remanescente submetida ao congelamento (-80°C) para posterior liofilização.

Figura 6: Sistema para obtenção das nanopartículas pelo método de gelificação iônica.



Fonte: Elaborado pela autora.

3. 6. Caracterização das nanopartículas

3. 6. 1. Índice de polidispersão e diâmetro hidrodinâmico

A caracterização das nanopartículas é uma análise de extrema relevância, uma vez que permite determinar o tamanho das nanopartículas bem como sua homogeneidade. O método de espalhamento dinâmico de

luz possibilita calcular o diâmetro hidrodinâmico das partículas assim como o índice de polidispersão. Por meio dessa análise é possível identificar se as nanopartículas em suspensão se apresentam monodispersas, fato que ocorre quando possuem uma distribuição de partículas do mesmo tamanho ou se apresentam grande heterogeneidade, possuindo uma grande variedade de tamanhos (XU, 2008). O Índice de Polidispersão (IPD) permite obter informações referentes ao grau de homogeneidade do sistema analisado, quanto menor o valor do IPD, maior será a homogeneidade do diâmetro das partículas no sistema, em contrapartida valores altos indicam heterogeneidade (SILVA, 2018), a tabela 1 mostra os valores de referência do IPD.

Para a análise do diâmetro hidrodinâmico assim como o índice de polidispersão das nanopartículas, foi utilizado o equipamento de espalhamento de luz dinâmico Zetasizer NanoZS90, Malvern Instruments.

A análise da caracterização das nanopartículas foi realizada solubilizando as nanopartículas em 150 µL de água, seguidamente as amostras diluídas foram colocadas em cubetas de poliestireno descartáveis e a intensidade de dispersão foi medida a 25 °C e índice de refração de 1.7. Os parâmetros utilizados para esta análise foram baseados na metodologia proposta por FURTADO (2018), cada análise foi realizada em triplicata.

Tabela 1: Valores de referência do Índice de polidispersão.

PDI	CARACTERÍSTICAS
0,00 a 0,05	Usual e somente para medidas encontradas para padrão de látex e/ou partículas produzidas e classificadas como monodispersas
0,05 a 0,08	Amostra quase monodispersa
0,08 a 0,7	Faixa de polidispersividade média
0,7	Amostra muito polidispersa: Toma-se cautela na interpretação dos resultados, pois amostra pode não ser adequada para a técnica de DLS, como por exemplo, deve haver quantidade significativa de partículas maiores.

Fonte: Adaptado de COSTA, 2013.

3. 6. 2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para observar a morfologia das nanopartículas, foi utilizado o método de microscopia eletrônica de varredura (MEV), método pelo qual é possível verificar o tamanho das partículas obtidas e verificar se as partículas estão agregadas. A utilização dessa técnica proporciona uma imagem de alta resolução, além disso, fornece o diâmetro dos materiais nano estruturados estudados e possui ainda a capacidade de identificar os elementos químicos que compõem o material em estudo (SOUZA, 2017).

As análises morfológicas das nanopartículas foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), o MEV utilizado para análise das nanopartículas vazias foi o FEI Magellan 400 L FEG (Field Emission Gun) e o Philips XL30FG para as nanopartículas com o probiótico.

3. 7. Processamento estatístico

A análise estatística (média e desvio padrão), dos resultados obtidos foi realizada por meio do Excel ® 2016 (Microsoft ®).

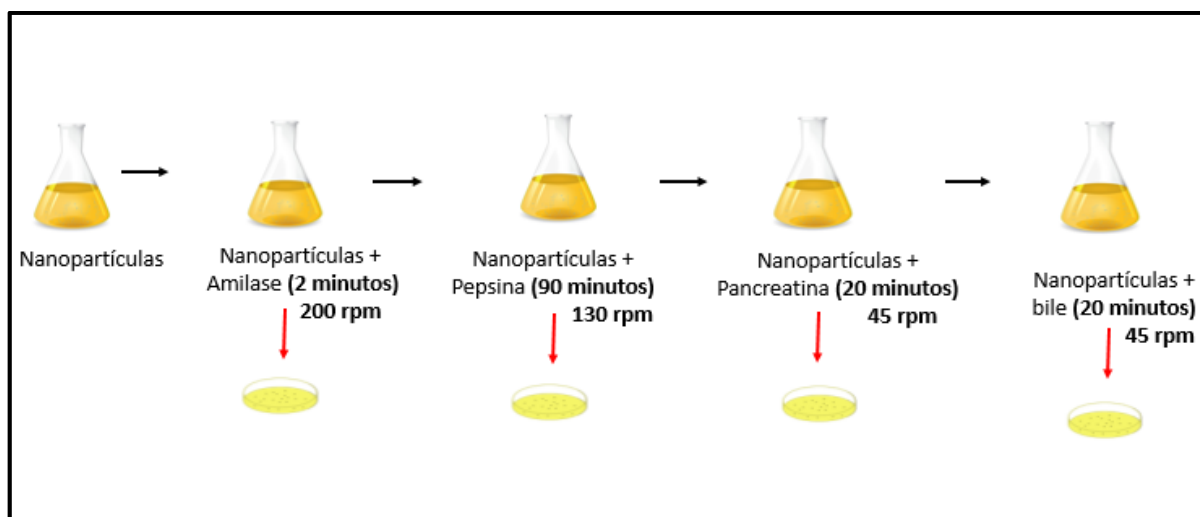
3. 8. Avaliação da sobrevivência do probiótico encapsulado submetido a simulação das condições gastrointestinais

A simulação do trato gastrointestinal foi realizada para testar a viabilidade do probiótico encapsulado, o preparo dos sucos digestivo, gástrico e intestinal simulados seguiram o descrito por CARVALHO (2017) e OLIVEIRA (2011) com necessárias modificações. Primeiramente as nanopartículas foram pesadas e em seguida preparadas as soluções para simulação do TGI na proporção de 0,1 g/mL de nanopartículas. Para a simulação do suco digestivo foi preparada a solução de α -amilase 100 U/mL em 1 mmol L⁻¹ CaCl₂, o pH foi ajustado para 6,9 com 1 mol L⁻¹ de NaHCO₃, o suco gástrico foi simulado utilizando uma solução de pepsina 3 g/L com pH ajustado para 2.0 com HCL, para o suco intestinal foi preparada a solução

de pancreatina e de bile na concentração de 2 g/L e 3 g/L respectivamente, ambas tiveram pH ajustado para 8.0 com NaHCO_3 .

Para simular a temperatura e os movimentos peristálticos, toda análise foi realizada sob constante agitação mecânica em *shaker* a 37°C. Desse modo, após pesagem das nanopartículas e preparo das soluções de simulação do TGI, as mesmas foram transferidas para um frasco tipo erlenmeyer no qual foi adicionada a solução de amilase, que foi submetida a agitação de 200 rpm por 2 minutos, uma amostra foi retirada e em seguida adicionou-se a solução de pepsina, que foi submetida a agitação de 130 rpm durante 90 minutos. Posteriormente, uma nova amostra foi retirada, e adicionada a penúltima enzima, pancreatina, mantida a 45 rpm por 20 minutos, uma amostra foi retirada, e por fim foi acrescentada a solução de bile, que foi incubada por 20 minutos a 45 rpm. Uma amostra foi retirada após tratamento. Ao final do ensaio, as amostras foram submetidas às análises microbiológicas para determinação da viabilidade. A figura 7 mostra o esquema da análise.

Figura 7: Simulação das condições gastrointestinais com os probióticos microencapsulados.



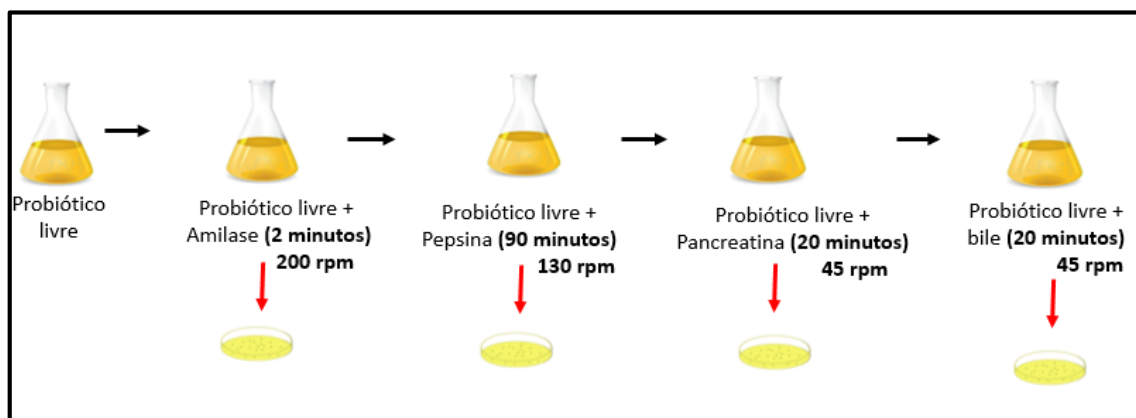
Fonte: Elaborado pela autora.

3. 9. Avaliação da sobrevivência do probiótico não encapsulado submetido a simulação das condições gastrointestinais

A simulação das condições gastrintestinais com células não encapsuladas foi realizada com base nas metodologias proposta por ECKERT (2016) e

FARIAS (2017) com algumas modificações. O microrganismo foi incubado por 18 horas a 37 °C sob anaerobiose. Após o cultivo, 10 mL foram centrifugados a 3600 rpm por 15 min para obtenção da biomassa celular. Em seguida, o pellet foi suspenso em 0,5 mL de solução salina 0,9%. Uma alíquota foi retirada e diluída seriadamente, a fim de verificar a viabilidade inicial da cultura. Uma alíquota de 0,2 mL foi utilizada para o ensaio de simulação do TGI, as condições de incubação e os fluidos da simulação foram os mesmos utilizados para o probiótico encapsulado, citado no item anterior. A figura 8 ilustra o esquema da análise dos probióticos não encapsulados.

Figura 8: Simulação das condições gastrointestinais com os probióticos não encapsulados.



Fonte: Elaborado pela autora.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

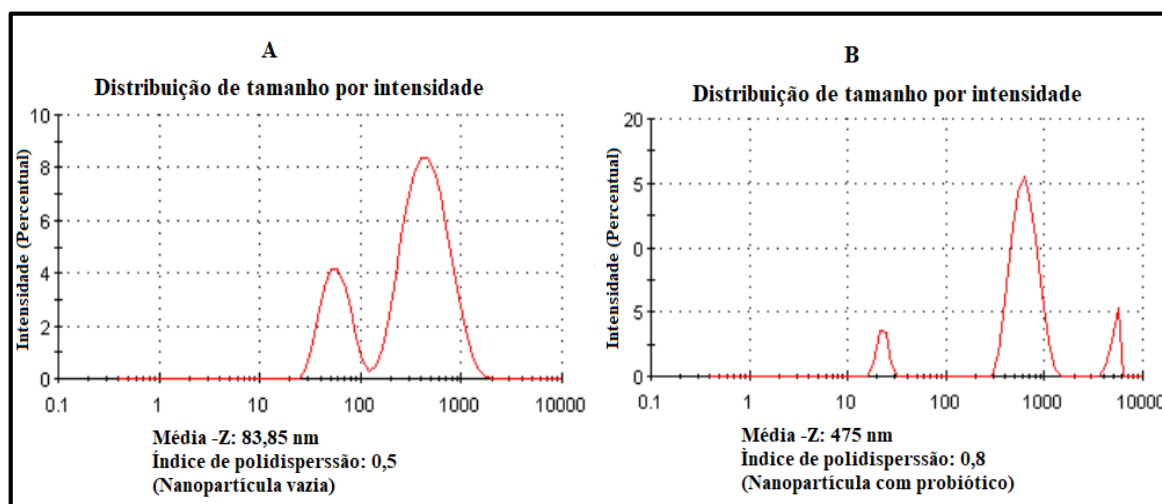
4. 1. Caracterização das nanopartículas

4. 1. 1. Índice de polidispersão e diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas

O estudo da polidispersividade de um sistema é importante para análise do comportamento das partículas em suspensão, visto que, esse dado permite caracterizar a homogeneidade ou a heterogeneidade da distribuição de tamanho das nanopartículas. A determinação do diâmetro hidrodinâmico também é relevante para o estudo de nanopartículas, uma vez que, fornece os dados do tamanho médio. É importante destacar que este tamanho pode ser influenciado pela agregação entre as partículas (SOUZA, 2017).

Com o objetivo de analisar e comparar o efeito do processo de encapsulação em relação a caracterização das nanopartículas, foram realizadas análises das nanopartículas vazias e com o probiótico. A figura 9 apresenta os dados obtidos mediante a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS).

Figura 9: Imagem referente a análise do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas.



Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 9-A é referente a análise realizada das nanopartículas vazias sem o probiótico, e a figura 9-B representa o resultado da análise das nanopartículas contendo o probiótico.

O índice de polidispersividade (IPD) das nanopartículas vazias foi de 0,5, as nanopartículas com o probiótico apresentaram um índice de 0,8, sendo esses valores considerados alto, indicando que ambas partículas não apresentaram boa homogeneidade (SILVA et al., 2010). Segundo Oliveira (2010) polímeros de origem natural que apresentam valores de IPD maiores que 0,4 são considerados nanopartículas polidispersas. Resultados semelhantes foram observados no trabalho de Lima e coautores (2013), no qual encapsulou o ativo quercetina em nanopartículas de quitosana com e sem a presença de um surfactante. Embora as nanopartículas sem a quercetina e o surfactante tenham apresentado um IPD de 0,3, as nanopartículas com a quercetina apresentaram IPD entre 0,4 e 0,5. A concentração dos agentes utilizados e os métodos de preparação são alguns fatores que influenciam no diâmetro médio e na polidispersão das partículas (GRANADA, et al., 2009).

O tamanho das nanopartículas é caracterizado como um dos fatores mais significativos em relação à aplicabilidade dos materiais nano estruturados (LIMA, 2013), sendo assim, o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas foi determinado. Para as nanopartículas vazias obtiveram-se valores de diâmetro hidrodinâmico igual a 83,85 nm, enquanto que para as nanopartículas com o probiótico apresentaram um valor de 475 nm. No estudo de Ebrahimnejada et al., (2017) foram encapsulados probióticos em nanopartículas de quitosana, os autores avaliaram o efeito da concentração do polímero sobre o processo de encapsulamento, além disso, diferenças no tamanho das nanopartículas com o probiótico e nanopartículas vazias também foram avaliados. O tamanho das nanopartículas vazias variou de 120 nm a 338 nm, por outro lado, as nanopartículas com o probiótico apresentaram tamanho de 146 nm a 500 nm, evidenciando que as nanopartículas com o probiótico exibiram tamanhos maiores que as nanopartículas vazias, possivelmente devido ao tamanho maior das bactérias probióticas. Outro estudo que também observou tamanho maior das nanopartículas carregadas quando comparadas com as vazias, foi o de Mohammadpour Doniqi et al., (2012).

Diante disso, nota-se que os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com a literatura, visto que as nanopartículas com o probiótico apresentaram maior diâmetro hidrodinâmico quando comparadas com as vazias.

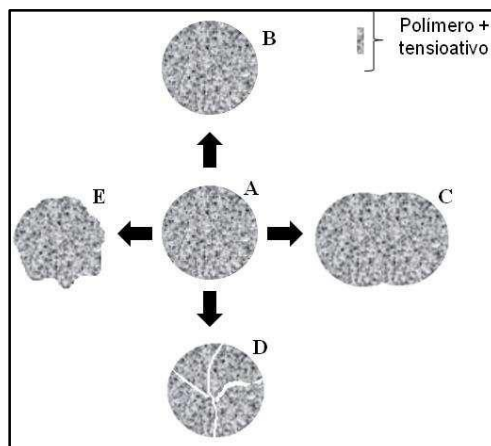
Entretanto, é importante destacar que a presença de aglomerados de nanopartículas é um fator que pode atuar significativamente nos resultados de caracterização. Ainda que a técnica de DLS possibilite uma estimativa de tamanho das nanopartículas, a presença de aglomerados também ocasionará aumento do diâmetro hidrodinâmico (TRAJANO et al., 2016).

Os resultados de MEV, sugerem a presença de aglomerados nas amostras, embora haja na literatura estudos de nanopartículas em que não foi constatado essa característica, existem estudos que relatam a presença de aglomerados de nanopartículas e descrevem possíveis maneiras de solucionar essa questão. Em um estudo 2006, de Abdelwahed o autor descreve que o processo de liofilização pode ser prejudicial a nanopartículas poliméricas, e que a adição de crioprotetores durante a produção protege as nanopartículas da aglomeração. Outros trabalhos que avaliaram o efeito de diferentes crioprotetores e evidenciaram proteção às nanopartículas, foram dos autores Araújo (2009) e de Saez (2000).

A adição de crioprotetores na amostra antes do processo de liofilização tem como objetivo evitar que as baixas temperaturas sejam capazes de alterar as propriedades físico-químicas das nanopartículas. A agregação que pode ocorrer após a liofilização, se deve ao maior contato destas partículas durante o congelamento, e em alguns casos elas podem se fundir. As baixas temperaturas durante o congelamento podem ocasionar quebra e modificações na morfologia das partículas, além disso a formação de cristais de gelo podem provocar um estresse mecânico na partícula.

Trealose, sacarose, glicose e manitol são alguns dos crioprotetores mais descrito na literatura (ARAÚJO, 2009). Embora o efeito protetor destes constituintes ainda não esteja totalmente elucidado, a hipótese de sua atuação na proteção pode ser devido à formação de uma matriz amorfa ao redor das nanopartículas, promovendo um espaçamento entre as mesmas, evitando assim, a agregação durante o congelamento, tornando-as redispersíveis (Saez et al., 2000). Contudo, a quantidade de crioprotetor a ser adicionada para promover essa estabilização varia muito na literatura (ARAÚJO, 2009). A figura 10 exemplifica algumas instabilidades que podem ocorrer nas nanopartículas.

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.



Fonte: Adaptado de ARAÚJO, 2009.

4. 1. 2. Análise morfológica das nanopartículas

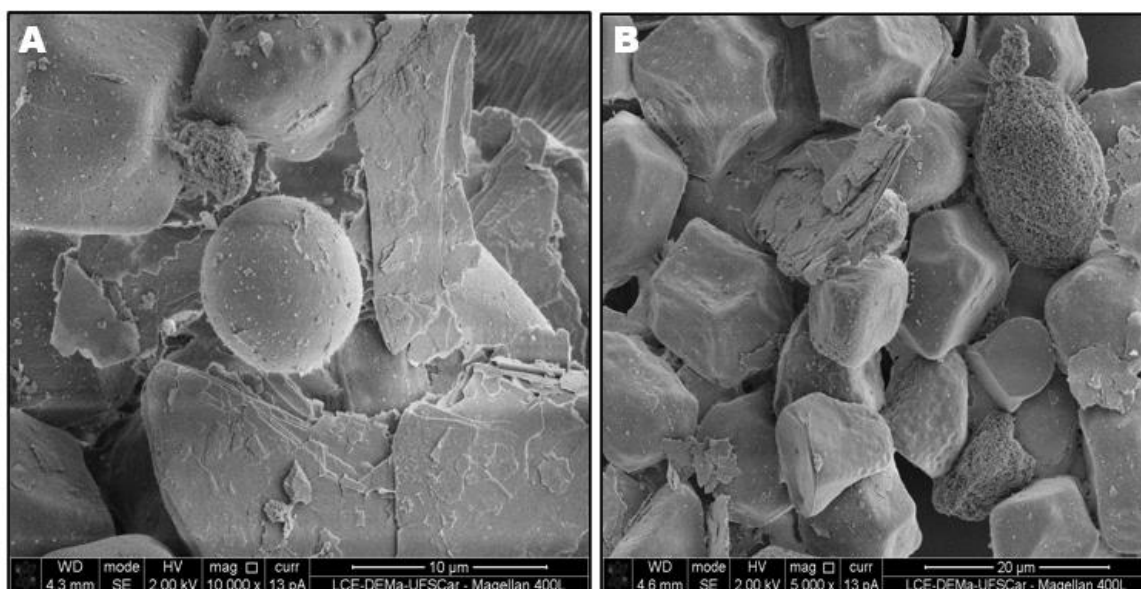
Em conjunto com as análises de DLS é importante verificar também a morfologia das nanopartículas, que no presente trabalho foi realizada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). A figura 11 apresenta as fotomicrografias das nanopartículas, as imagens A e B são referentes às nanopartículas vazias e as C e D representam as nanopartículas com o probiótico. A figura 11-A mostra o formato esférico de umas das nanopartículas obtidas, Silva e seus colaboradores (2015) descrevem em seu trabalho que obteve resultados morfológicos semelhantes, em que observou uma superfície relativamente lisa e sem fissuras em suas nanopartículas. Entretanto, as demais nanopartículas vazias representadas na imagem 11-B, apresentaram morfologias distintas. Essas imagens se assemelham com as obtidas no estudo de Poletto et al. (2019), no qual é relatada a presença de nanopartículas com morfologias distintas e rugosas. Os autores descrevem que também utilizaram um polissacarídeo de origem natural como matriz encapsulante, e relaciona a presença de rugosidade devido a desidratação do polissacarídeo liofilizado, resultando na formação de uma matriz porosa com aspecto semelhante ao de uma esponja. E destacam ainda que quando as nanopartículas são submetidas ao processo de liofilização a baixa temperatura, ocorre a formação de cristais de

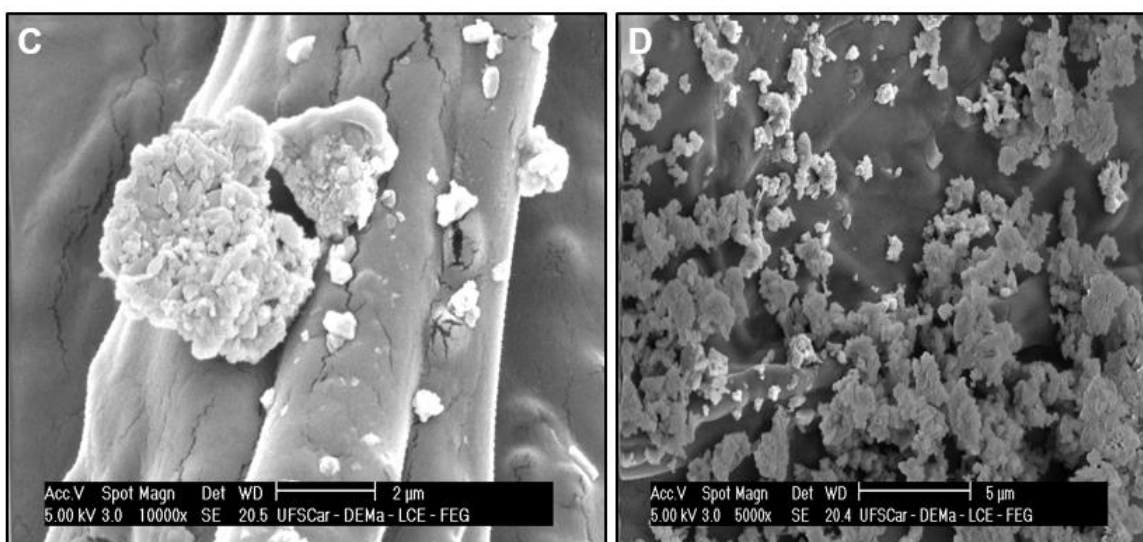
gelo e posteriormente a sublimação, processo que pode resultar em um produto seco e poroso.

Em relação às nanopartículas com o probiótico, as fotomicrografias sugerem a formação de agregados. Esses dados se assemelham com as fotomicrografias obtidas no trabalho de Sathyabama (2014), em que também foi utilizado um polissacarídeo de origem natural para encapsular probióticos. O autor descreve a observação de probióticos nas imagens de MEV, fato que não foi observado no presente estudo. Araújo (2009), utilizou a quitosana como material de revestimento para suas nanopartículas, o autor também descreve a presença de agregados entre suas partículas.

De acordo com os dados apresentados, há uma discrepância no tamanho das nanopartículas em relação às técnicas de DLS e MEV, Fan et al. (2012), relata que pode ser que as nanopartículas incham em meio aquoso e durante a análise de DLS se obtenha um maior diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, enquanto que as análises de microscopia dão um real diâmetro das nanopartículas no estado seco.

Figura 11: Fotomicrografias das nanopartículas vazias obtidas por MEV. A e B: Nanopartículas vazias, C e D: Nanopartículas com probiótico.





Fonte: Elaborado pela autora.

4. 2. Avaliação da sobrevivência às condições gastrointestinais simuladas

Para que o probiótico exerça a sua função e forneça os benefícios à saúde do hospedeiro é necessário que ele sobreviva às condições gastrointestinais, como o baixo pH e a presença de enzimas digestivas (COOK et al., 2012). Desse modo, as amostras de células livres e encapsuladas foram submetidas separadamente ao teste de digestibilidade *in vitro*. O resultado da avaliação da sobrevivência de *L. rhamnosus* na forma livre (não encapsulados), após exposição às condições ambientais do TGI simulado estão elencados na tabela 2.

Tabela 2: Viabilidade das células de *L. rhamnosus* não encapsuladas após exposição aos fluídos digestivo, gástrico e intestinal simulados.

Ensaio	Número de células log UFC/mL
Contagem inicial	11,68 ± 0,01
Pós amilase	9,93 ± 0,00
Pós pepsina	9,85 ± 0,19
Pós pancreatina	9,07 ± 0,07
Pós bile	0,00

Fonte: Elaborado pela autora.

As bactérias probióticas livres apresentaram contagem inicial de 11,68 ($\pm 0,01$) log UFC/mL antes da exposição às enzimas do TGI simulado, durante a realização do ensaio foi observada uma redução gradual da contagem dos probióticos à medida que foram sendo expostos as condições simuladas do TGI. A simulação teve início com a exposição das bactérias à enzima amilase por um período de dois minutos, embora tenha ocorrido redução na viabilidade das células quando comparadas com a contagem inicial, após essa etapa elas permaneceram viáveis. Araújo et al., descreve resultados semelhantes em seu estudo, no qual observou resistência das bactérias probióticas quando submetidas à fase de simulação da boca, fase do estudo que corresponde a ação da enzima amilase.

No presente estudo a fase gástrica foi representada pela enzima pepsina, que por sua vez tem ótima atividade em pH 2.0, a pesar de ser considerada uma condição prejudicial para sobrevivência de microrganismos (TULUMOGU; KAYA; SIMSEK, 2014), as bactérias de *L. rhamnosus* livres foram capazes de se manter viáveis após exposição por noventa minutos nessa condição. Madureira et al., (2005) buscou analisar a sobrevivência de microrganismos probióticos quando expostos a condições que simulavam o TGI, seus dados corroboram com os achados deste estudo, no qual foi observada a sobrevivência dos probióticos após exposição às condições que simulavam o ambiente gástrico.

A simulação do fluído intestinal foi representada pela atividade das enzimas pancreatina e bile, os dados apresentados evidenciam que a viabilidade dos probióticos após exposição à pancreatina foi mantida, resultados semelhantes são descritos no trabalho de Pieniz e coautores (2014), em que os probióticos analisados se mantiveram viáveis mesmo após 4 horas de incubação.

Embora as bactérias probióticas tenham se mantido resistentes às enzimas descritas anteriormente, quando foram submetidas a última etapa do fluído intestinal sob ação da enzima bile, não foi observado o mesmo resultado das etapas precedentes, por apresentarem contagem abaixo do limite de detecção. Essa condição pode ser nociva para alguns microrganismos devido a capacidade que os sais biliares possuem de desestruturar a membrana celular, sendo tóxicos às células (MEIRA et al., 2010). Esses dados corroboram com os

resultados retratados no trabalho de Silva et al., (2015), em que após a etapa de simulação não obteve contagem de células viáveis, em virtude de apresentarem contagem abaixo do limite de detecção. Meira (2011), estudou o efeito dos sais biliares sob algumas cepas probióticas, no qual observou a ausência de viabilidade na concentração de 1% de sais biliares. Resultados semelhantes foram descritos no trabalho de Ranadheera (2012), que após exposição das bactérias a essa condição foi relatada uma redução significativa da contagem de bactérias.

O processo de encapsulamento é um método essencial à proteção dos probióticos, no qual vários estudos utilizaram esse método com intuito de proteger e manter a viabilidade frente às diversas condições gastrointestinais (BIASUZ, 2018; COOK et al., 2012; EBRAHIMNEJADA; KHAVARPOUR; KHALILID, 2017; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2006; AREPALLY; REDDY; GOSWAMI, 2020). No presente estudo a quitosana foi usada como matriz encapsulante do probiótico *L. rhamnosus*, a tabela 3 ilustra o resultado da avaliação da sobrevivência de *L. rhamnosus* encapsulado, após exposição às condições ambientais do TGI simulado.

Tabela 3: Viabilidade das células encapsuladas de *L. rhamnosus* após exposição aos fluídos digestivo, gástrico e intestinal simulados.

Ensaio	Número de células log UFC/mL
Contagem inicial (pré-encapsulação)	8,84 ± 0,01
Pós amilase	0,00± 0,00
Pós pepsina	0,00 ± 0,00
Pós pancreatina	0,00 ± 0,00
Pós bile	4,30 ± 0,00

Fonte: Elaborado pela autora.

As bactérias probióticas apresentaram inóculo de 8,84 (±0,41) log UFC/mL no início do experimento, antes do processo de encapsulamento em matriz polimérica de quitosana, e ao final do experimento após a simulação do TGI apresentaram contagem de 4,30 (± 0,00) log UFC/mL, o que evidencia que ocorreu redução do microrganismo, esses dados corroboram com os obtidos no estudo de Farias (2017), no qual também realizou o encapsulamento de

microrganismos probióticos e ocorreu redução do número de células viáveis após a passagem pelo TGI simulado.

No estudo desenvolvido por Medeiros (2018), o autor comparou a sobrevivência de bactérias livres e encapsuladas em matriz de alginato de cálcio e quitosana, no qual verificou que embora as bactérias na forma livre tenham sobrevivido, ocorreu significativa redução quando submetidas às condições gastrointestinais, enquanto que as bactérias encapsuladas apresentaram uma taxa de sobrevivência muito maior, o autor relata que a encapsulação foi eficiente na proteção dos microrganismos.

Silva e colaboradores (2015), descrevem em seu trabalho que a baixa taxa de sobrevivência dos microrganismos probióticos é decorrente do pH gástrico e altas concentrações de sais biliares no intestino, em seu trabalho os probióticos que foram submetidos a essas condições na forma livre, ou seja, sem nenhuma técnica de encapsulamento, não resistiram às condições gastrointestinais, no entanto, o mesmo resultado não foi verificado para os probióticos encapsulados, que após serem submetidos ao mesmo teste de digestibilidade mantiveram-se viáveis, demonstrando que a microencapsulação protege os microrganismos das condições gastrointestinais simuladas.

Outro trabalho que evidencia a liberação de microcápsulas quando submetidas a condições intestinais é de Crittenden e coautores (2006), no qual conseguiram confirmar a abertura de cápsulas probióticas a nível intestinal por meio do uso de microscopia. As amostras analisadas indicaram que o microrganismo permaneceu aprisionado no material de parede mesmo quando exposto a condições gástricas, e quando transferidos para condições intestinais as cápsulas foram dissolvidas.

Embora no presente estudo, tenha ocorrido decréscimo significativo dos microrganismos quando comparada a contagem inicial e final da simulação, os resultados sugerem que a técnica de encapsulamento pode ter sido eficaz na proteção dos probióticos, visto que após serem submetidos às enzimas do TGI, os microrganismos mantiveram-se viáveis ao fim do processo. A ausência de células viáveis no fluido digestivo e gástrico sugere que não foi possível

quantificar o microrganismo devido ao processo de encapsulamento, que foi resistente à liberação dos probióticos nestas etapas, sendo liberado apenas no fluído intestinal, no qual foi possível determinar o número de células.

Contudo ainda se faz necessário a realização da eficiência de encapsulação, visto que essa análise fornecerá os dados referentes a quantidade de probiótico que foi encapsulado, antes de ser submetido ao teste de digestibilidade. Para tanto é necessário realizar o rompimento da partícula possibilitando a liberação do probiótico e posteriormente a quantificação. Na literatura são descritos vários tampões e métodos utilizados para romper nanopartículas poliméricas. No presente estudo alguns métodos foram testados, porém não foram obtidos resultados satisfatórios, visto que não foi verificado viabilidade celular, sugerindo que não ocorreu o rompimento. A tabela 4 ilustra as diferentes técnicas que foram testadas para rompimento das nanopartículas.

Tabela 4: Procedimentos testados para realizar rompimento das nanopartículas.

Tampão	Proporção	Procedimento	Referência
Citrato de sódio (0.1 M)	0.1g/10 mL	Agitação em vórtex (5 ciclos de 1 minuto com intervalo de 1 minuto em cada ciclo)	SOUZA (2015)
Fosfato (100mM pH 7,4)	0.1g/10 mL	Agitador magnético (15 minutos)	ECKERT (2016)
Fosfato salino (0.05 M)	0.01g/1 mL	Agitador magnético (150 rpm, 37°C, 5 minutos)	SILVA et al. (2015)

Fonte: Elaborado pela autora.

Neste contexto o estabelecimento de um protocolo que vise o rompimento eficiente e liberação dos probióticos ainda precisa ser desenvolvido.

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 à 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 α -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.; BRECHLEY, 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.

POLETO, 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.