



Encapsulação de simbióticos para a modulação do  
*Microbiota-gut-brain axis*

Bernardo Almeida

UMinho | 2022



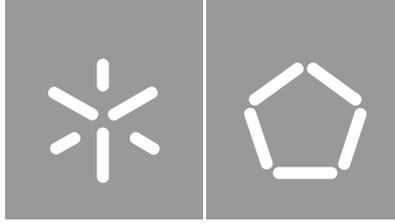
**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Bernardo Almeida

**Encapsulação de simbióticos para  
a modulação do  
*microbiota-gut-brain axis***

Agosto de 2022



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

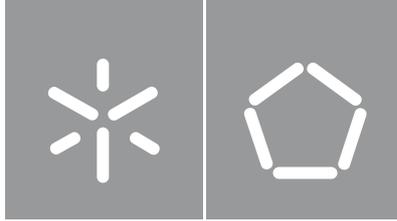
Bernardo Almeida

**Encapsulação de simbióticos para  
a modulação do  
*microbiota-gut-brain-axis***

Dissertação de Mestrado realizada no âmbito do  
Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação da:  
**Professora Doutora Lígia Raquel Marona  
Rodrigues** e da **Doutora Isabel Rodríguez  
Amado**

Agosto de 2022



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Bernardo Almeida

**Encapsulação de simbióticos para  
a modulação do  
*microbiota-gut-brain-axis***

Dissertação de Mestrado realizada no âmbito do  
Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação da:  
**Professora Doutora Lígia Raquel Marona  
Rodrigues** e da **Doutora Isabel Rodríguez  
Amado**

Agosto de 2022

## **DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS**

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

### ***Licença concedida aos utilizadores deste trabalho***



**Atribuição-NãoComercial-SemDerivações  
CC BY-NC-ND**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## **DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho acadêmico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

## Resumo

### **Encapsulação de simbióticos para a modulação do *microbiota-gut-brain axis***

Uma dieta pouco saudável e a falta de exercício produzem mudanças físicas e fisiológicas como a acumulação anormal de gordura corporal, modificações na secreção de hormonas e a perda de equilíbrio da microbiota intestinal, também conhecida por disbiose.

A obesidade é uma condição médica cuja prevalência aumenta significativamente todos os anos. Além dos efeitos físicos, potencia o aparecimento de outras condições como doenças cardiovasculares, diabetes, e pode até conduzir à morte do indivíduo.

Atualmente uma das vias mais estudadas para a promoção da saúde gastrointestinal é o consumo de simbióticos, uma mistura de probióticos e prebióticos que conseguem não só modular a microbiota intestinal para um estado mais saudável, como também reduzir a inflamação das mucosas e reduzir a resistência à insulina. No entanto, um dos grandes problemas com este tipo de tratamentos é a quantidade de células que sobrevivem ao processo de digestão e chegam ao intestino e ao cólon.

O objetivo do trabalho desenvolvido durante esta dissertação foi a encapsulação de uma espécie com atividade probiótica, *Bacillus coagulans*, avaliação da sua viabilidade durante o percurso gastrointestinal e determinar a atividade inibitória da  $\alpha$ -glucosidase.

A compatibilidade do *Bacillus coagulans* com o prebiótico foi estudada utilizando vários meios de crescimento cuja fonte de carbono foi substituída na sua totalidade por uma fibra prebiótica. Após encontrar uma combinação satisfatória de probiótico e prebiótico, um simbiótico, foi encapsulado, sendo que a cápsula desempenha não só uma função protetora durante a digestão, como funciona como alimento assim que o probiótico chega à porção superior do intestino. Nos ensaios de digestão simulada a encapsulação do probiótico resultou numa sobrevivência melhorada comparativamente a células livres. No entanto, a encapsulação não resultou em aumentos de viabilidade quando comparado com o estado esporulado da espécie. Por fim, foi testada a atividade inibitória da  $\alpha$ -glucosidase do simbiótico, sendo que a atividade, apesar de positiva, necessita de estudos futuros para aplicações clínicas.

**Palavras-chave:** Obesidade, Diabetes, Encapsulação, Simbiótico, Digestão

## **Abstract**

### **Encapsulation of Symbiotics for Microbiota- Gut-Brain Axis Modulation**

An unhealthy diet and the lack of physical exercise can lead to physical and physiological changes like an abnormal buildup of bodily fat, hormone secretion modifications and an unbalanced intestinal microbiota, also known as dysbiosis.

Obesity is a medical condition whose prevalence increases significantly every year. Besides the physical changes it catalyzes the appearance of other conditions like cardiovascular diseases, diabetes and can ultimately lead to death.

Recent research indicates that one of the many ways to promote gastrointestinal health is the consumption of symbiotics, a mixture of probiotics and prebiotics that not only can modulate intestinal microbiota to a healthier state but can also reduce mucosal inflammation and insulin resistance. However, the main issue with this kind of treatment is the number of viable cells that can survive the harsh digestion conditions and reach the intestine and colon.

The work described in this dissertation aimed to encapsulate a probiotic species, *Bacillus coagulans* in order to increase its viability along the gastrointestinal tract and determine  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity.

*Bacillus coagulans's* compatibility with a prebiotic fiber was evaluated using two different growth media whose carbon source was totally replaced with a prebiotic. After a successful match between probiotic and prebiotic, the symbiotic was encapsulated in a whey protein and alginate matrix. This capsule not only protects the cells during digestion, but the prebiotic used in its formulation serves as food when the cells arrive at the upper part of the intestine. *In vitro* digestion experiments demonstrated that encapsulation improves viability when compared to free cells. However, encapsulation did not significantly improve cell viability when compared to spores of the same species. Finally, experiments were conducted to determine  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity and even though there was some activity detected, further studies are needed for a potential clinical application.

**Keywords:** Obesity, Diabetes, Encapsulation, Symbiotic, Digestion

## Índice geral

I.	Introdução .....	1
1.	Obesidade .....	1
1.1.	Fatores que afetam a obesidade .....	3
1.2.	Doenças causadas e/ou catalisadas pela obesidade.....	3
1.3.	Diabetes .....	4
2.	Microbiota .....	5
2.1.	Aparecimento e evolução da microbiota ao longo da vida.....	5
2.2.	Importância da microbiota para a saúde do hospedeiro .....	6
2.2.1.	Importância para o metabolismo .....	7
2.2.2.	Importância no combate a bactérias patogênicas.....	8
2.2.3.	<i>Gut-brain axis</i> .....	8
2.2.4.	Disbiose.....	9
3.	Probióticos .....	10
3.1.	Efeito na saúde do hospedeiro .....	12
3.2.	Efeito anti-patogênico.....	12
3.3.	Efeito anti-obesidade.....	12
3.4.	Efeito anti-inflamatório .....	13
4.	Bactérias .....	14
4.1.	Membrana Plasmática .....	14
4.2.	Parede celular de bactérias Gram positivas .....	15
4.3.	Parede celular de bactérias Gram negativas .....	16
4.4.	Desenvolvimento bacteriano.....	16
4.4.1.	Fase de Latência.....	17
4.4.2.	Fase Exponencial .....	17
4.4.3.	Fase Estacionária.....	17
4.4.4.	Fase de Declínio .....	17
4.5.	Fatores que afetam o crescimento .....	18
5.	Prebióticos .....	19
5.1.	Definição .....	19
5.1.1.	Frutanos .....	20
5.1.2.	Galactooligossacáridos .....	20
5.1.3.	Amido.....	20
5.1.4.	Polifenóis.....	20
5.1.5.	Ácidos gordos polinsaturados .....	21
5.2.	Benefícios dos prebióticos.....	21

6.	Encapsulação .....	21
6.1.	Encapsulação à base de hidratos de carbono .....	22
6.1.1.	Encapsulação à base de alginato.....	22
6.1.2.	Encapsulação à base de quitosano.....	22
6.2.	Encapsulação à base de proteínas do leite .....	23
6.3.	Encapsulação com prebióticos .....	23
6.4.	Técnicas utilizadas.....	24
6.4.1.	Emulsão .....	24
6.4.2.	<i>Spray Drying</i> .....	24
6.4.3.	Liofilização.....	25
6.4.4.	Extrusão .....	25
II.	Materiais e Métodos.....	26
1.	Preparação de meios de cultura.....	26
2.	Preparação de stocks de <i>Bacillus coagulans</i> .....	26
3.	Curva de crescimento .....	27
4.	Alteração da fonte de carbono nos meios de inóculo .....	27
4.1.	Preparação de meios de cultura .....	27
4.2.	Preparação de inóculos e curvas de crescimento.....	28
5.	Encapsulação .....	28
5.1.	Preparação de soluções .....	28
5.2.	Encapsulação .....	29
5.3.	Eficiência de encapsulação .....	29
6.	Ensaio de digestão .....	30
6.1.	Fase oral .....	31
6.2.	Fase Gástrica.....	31
6.3.	Fase Intestinal .....	32
7.	Testes de inibição da enzima $\alpha$ -glucosidase .....	32
III.	Resultados e Discussão .....	33
1.	Escolha da melhor combinação meio <i>versus</i> prebiótico .....	33
1.1.	Substituição da fonte de carbono por Frutooligossacáridos (FOS).....	33
1.2.	Substituição da fonte de carbono por pectina .....	35
1.3.	Substituição da fonte de carbono por Fibrulina e Inulina .....	36
1.4.	Análise dos parâmetros do ajuste de cada um dos meios de cultura .....	37
2.	Ensaio de encapsulação.....	38
2.1.	Efeito da velocidade de fluxo e corrente.....	39
2.2.	Efeito da vibração do <i>Nozzle</i> .....	39

2.3. Tamanho e homogeneidade das partículas.....	40
3. Eficiência de encapsulação .....	42
4. Viabilidade após digestão .....	43
5. Testes de inibição da $\alpha$ -glucosidase .....	45
IV. Conclusão e Trabalho futuro .....	47

## **Lista de abreviaturas e siglas**

- BC – Background control, Branco;
- CFU – Unidades formadoras de colónias;
- $D_p$  – média do diâmetro das partículas;
- EC – Enzyme control, Controlo da enzima;
- FAO – Organização das Nações unidas para a alimentação e a agricultura;
- FDA – Administração de Alimentos e Medicação;
- FOS – Fructooligossacáridos;
- GLP-1 – Péptido semelhante a glucagon-1;
- GOS – Galactooligossacáridos;
- GRAS – Generally Regarded as Safe, Geralmente considerando seguro;
- IC – Inhibitor Control, Controlo do inibidor;
- IMC – Índice de Massa Corporal;
- LPS – Lipopolissacáridos;
- MRS – de Man, Rogosa e Sharpe;
- NAG – N-glucosamina;
- NAM – N-acetilmurâmico;
- $OD_{max}$  – Absorvância máxima;
- OMS – Organização Mundial de Saúde;
- PDI – índice de polidispersividade;
- PYY– Péptido Tirosina Tirosina;
- S – Sample, Amostra;
- SCFA – *Short Chain Fatty Acids*, Ácidos gordos de cadeia curta;
- SGF – Fluido gástrico simulado;
- SIF – Fluido intestinal simulado;
- SSF – Fluido salivar simulado;
- $t$  – Tempo de crescimento;
- TGY – Tryptone Glucose Yeast Extract;
- $\lambda$  – Latência de crescimento;
- $\mu_{max}$  – taxa de crescimento máximo;
- $\sigma$  – desvio padrão;

## Lista de figuras

Figura 1- Prevalência da Obesidade <b>a)</b> no mundo, onde ○-América, △-Europa, ▽-Mediterrâneo Este, □ -África, ◇-Pacífico Oeste, e ◁-Sudeste da Ásia e <b>b)</b> em Portugal, onde ▪ IMC >25 (18+ anos), ▪ IMC >25 (5-19 anos), ▪ IMC >30 (18+ anos), ▪ IMC >30 (5-19 anos), — Homens, - - Mulheres. ....	2
Figura 2 - Fatores que influenciam a microbiota durante os primeiros anos de vida .....	6
Figura 3 - Estrutura química dos ácidos gordos de cadeia curta: a) acetato, b) propionato e c) butirato .....	7
Figura 4 – Parâmetros de avaliação de um probiótico sugeridos pela FAO/WHO .....	11
Figura 5 - Formatos de células bacterianas. ....	14
Figura 6 - Representação esquemática da membrana fosfolipídica.....	14
Figura 7 - Estrutura esquemática da parede celular de um organismo Gram positivo, à esquerda e Gram negativo, à direita.....	15
Figura 8 - Variação do número de colónias ao longo das 4 fases de crescimento .....	16
Figura 9 – Esquematização da montagem experimental do encapsulador. ....	29
Figura 10 - Esquema da digestão <i>in vitro</i> descrita pelo protocolo do INFOGEST .....	31
Figura 11- Curvas de crescimento bacteriano e respetivo ajuste: A) TGY Dextrose; B) MRS; C) TGY FOS e D) MRS FOS. Curvas a azul representam 1% fonte de carbono, a laranja 2% fonte de carbono. ....	34
Figura 12 -Curva de crescimento bacteriano e respetivo ajuste E) MRS - Pectina; Curvas a azul representam 1% fonte de carbono, a laranja 2% fonte de carbono.....	36
Figura 13 - Curvas de crescimento bacteriano e respetivo ajuste: F) TGY fibrulina; G) MRS fibrulina; H) TGY inulina; I) MRS inulina. Curvas a azul representam 1% fonte de carbono, a laranja 2% fonte de carbono. ....	36
Figura 14 - Imagens de microscopia ( <i>Nikon Ni-E Upright Microscope</i> , Japão) obtidas com a objetiva 5x das cápsulas produzidas. Todos os parâmetros foram fixados à exceção da frequência, sendo que: A) 1000 Hz; B) 1800 Hz; C) 2000 Hz D) 2200 Hz. ....	40
Figura 15- Influência da frequência de vibração do <i>noozle</i> no diâmetro de partícula .....	41
Figura 16 – Unidades formadoras de colónias de <i>Bacillus coagulans</i> por ml de solução polimérica, antes e depois do processo de encapsulação .....	42
Figura 17 - Viabilidade das células em estado vegetativo, encapsuladas e esporos de <i>Bacillus coagulans</i> durante as fases de digestão. ....	44

Figura 18 - Influência das diferentes fases da digestão no aspeto das cápsulas: A) Antes da digestão; B) Após 2h de fase gástrica; C) Após 2h de fase intestinal. .... 45

Figura 19 - Resposta inibitória da  $\alpha$ -glucosidase em diferentes pontos da curva de crescimento de *Bacillus coagulans*. .... 46

## **Lista de tabelas**

Tabela 1- Soluções salinas, concentrações e quantidades necessárias para fazer as soluções simulantes de fluido gástrico e intestinal. ....	30
Tabela 2 - Dados obtidos do ajuste das curvas de crescimento obtidas com a substituição da fonte de carbono.....	37
Tabela 3 - Eficiência de encapsulação em função da quantidade de probiótico inicial e quantidade de FOS presente nas cápsulas.....	43

## **I. Introdução**

A obesidade é uma condição médica extremamente relevante atualmente que facilita o aparecimento de muitas outras condições médicas graves, podendo inclusivamente levar à morte. Uma dessas condições é a diabetes de tipo 2, uma doença caracterizada pela resistência à insulina, o que leva a um aumento do açúcar presente no sangue. O trabalho desenvolvido ao longo desta dissertação tem como objetivo o tratamento da obesidade e da diabetes concomitantemente, usando um simbiótico, uma mistura de probiótico e prebiótico. O objetivo foi sintetizar cápsulas que protegem a espécie probiótica ao longo do trato gastrointestinal, protegendo as bactérias do ácido estomacal e permitir a sua libertação seletiva no intestino. As cápsulas têm na sua composição fibras não digeríveis que ajudam na proteção dos organismos encapsulados e ao mesmo tempo ajudam a promover o seu crescimento no intestino. Estas espécies probióticas podem não só melhorar a microbiota intestinal, como produzir substâncias "saciantes" e substâncias que ajudam no tratamento da diabetes.

### **1. Obesidade**

A obesidade é uma condição médica caracterizada pela acumulação de gordura excessiva, podendo acarretar consequências negativas para o indivíduo. Uma medida simples, normalmente utilizada, para a determinação da obesidade é o IMC – Índice de Massa Corporal, valor definido utilizando a altura e o peso da pessoa. Em adultos, um indivíduo com um  $IMC \geq 25 \text{ kg}\cdot\text{m}^2$  é considerado com excesso de peso, enquanto um indivíduo com um  $IMC \geq 30 \text{ kg}\cdot\text{m}^2$  é considerado obeso [1]. No entanto, este índice é relativamente simplista, uma vez que não tem em consideração outros fatores como idade, etnia, e composição corporal e, no geral, não permite uma distinção entre a massa gorda e massa magra do indivíduo, podendo levar a diagnósticos errados [2, 3].

A prevalência desta doença tem vindo a aumentar nos últimos anos, de acordo com estatísticas da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Federação da Obesidade mundial. Este valor triplicou desde 1985, sendo que em geral, a população feminina é mais suscetível à obesidade [1, 4], diferença esta que se acentua com a idade [2].

A causa mais óbvia para o aparecimento da obesidade é a disparidade entre a ingestão e o dispêndio de calorías. Relativamente à ingestão calórica, esta tem vindo a aumentar ao longo dos anos devido ao aparecimento de alimentos altamente processados e a uma adição de

açúcares exagerada [5]. No entanto, de acordo com tendências mais recentes, a população mais informada prefere produtos que representem menos riscos para a sua saúde [6]. Outro fator responsável pelo aparecimento da obesidade, nomeadamente o decréscimo de energia gasta, pode ser atribuído ao avanço tecnológico e às conseqüentes comodidades que daí advêm. Profissões que no passado requeriam uma quantidade de energia correspondente aos objetivos de atividade física diária, hoje em dia foram atualizadas para serem menos exigentes, originando um decréscimo de energia gasta [7].

O Observatório de Saúde Global, utilizando dados disponíveis na base de dados da OMS [8], reporta a evolução da prevalência da obesidade ao longo dos anos e em diferentes panoramas sócio-económicos, como representado na figura 1.

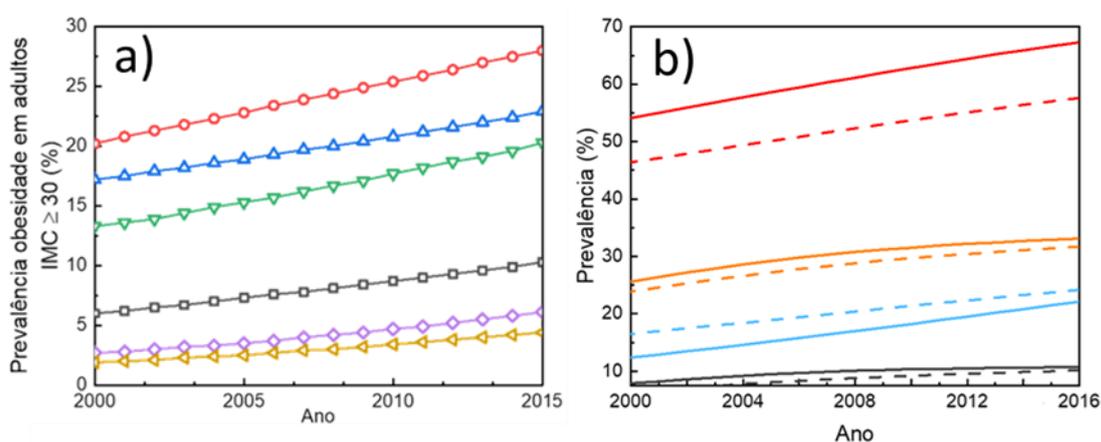


Figura 1- Prevalência da Obesidade **a)** no mundo, onde  $\circ$ -América,  $\triangle$ -Europa,  $\nabla$ -Mediterrâneo Este,  $\square$ -África,  $\diamond$ -Pacífico Oeste, e  $\triangleleft$ -Sudeste da Ásia e **b)** em Portugal, onde  $\bullet$  IMC >25 (18+ anos),  $\bullet$  IMC >25 (5-19 anos),  $\bullet$  IMC >30 (18+ anos),  $\bullet$  IMC >30 (5-19 anos), — Homens, - - Mulheres.

No panorama global, figura 1 **a)** relativa a um IMC igual ou superior a 30, é preocupante o facto de em todas as regiões do mundo haver uma tendência crescente para o aumento da prevalência da obesidade. Adicionalmente, as regiões com maior incidência de obesidade são a América e a Europa, o que era expectável por apresentarem um maior desenvolvimento tecnológico e maior poder de compra.

Analisando especificamente o caso de Portugal, figura 1 **b)**, é possível concluir que o excesso de peso (IMC superior a 25) apresenta uma tendência de crescimento independentemente da faixa etária e do género. Esta prevalência atinge valores máximos de 67.3% em homens adultos e 57.6% em mulheres adultas, sendo que a discrepância entre os géneros tem vindo a aumentar desde o ano 2000. Por outro lado, na fase juvenil, apesar de apresentar uma tendência crescente, ainda que não tão acentuada como na fase adulta, a diferença entre géneros tem vindo a diminuir

desde o início do século, atingindo o valor de 1.4% em 2016. Quanto aos valores de obesidade (IMC superior a 30), a diferença também diminui ao longo do tempo, no entanto, é de notar que a prevalência é superior para as mulheres adultas. Por fim, a incidência de obesidade juvenil apresenta valores muito próximos em ambos os sexos, sendo a diferença de apenas 0.5%.

### **1.1. Fatores que afetam a obesidade**

A prevalência de obesidade num indivíduo é influenciada por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. A alimentação revela ser um fator essencial, no entanto, fatores como o género, a etnicidade, fatores socioculturais, económicos, e até fatores como o stress diário têm influência na prevalência da obesidade. O panorama social de um dado indivíduo, por exemplo, pode influenciar a sua tendência para a obesidade, nomeadamente, a sua origem cultural pode significar certas técnicas culinárias que envolvam por exemplo a fritura de alimentos ou o consumo de alimentos ricos em gorduras e açúcares. O contexto económico do indivíduo também representa um papel importante, uma vez que uma pessoa com menos recursos económicos recorre a alimentos processados, com menos valor nutricional, ou habitar em zonas que não permitam a aquisição de produtos alimentícios saudáveis como frutas e legumes frescos.

Um dos fatores que afeta e é afetado pela obesidade é a saúde da microbiota intestinal. Por um lado, uma dieta rica em gorduras saturadas, açúcares e comidas processadas além de ser causadora de obesidade também prejudica o equilíbrio da microbiota intestinal, diminuindo a quantidade total de bactérias e aumentando as espécies patogénicas, levando a um estado de disbiose. A disbiose é causadora de um número de condições, entre elas a síndrome metabólica que potencia o aparecimento da obesidade.

### **1.2. Doenças causadas e/ou catalisadas pela obesidade**

A obesidade manifesta os seus malefícios de duas maneiras diferentes; por um lado é responsável pela deformação do corpo ao ponto de dificultar ou mesmo impossibilitar o indivíduo de realizar certas tarefas. Por outro lado, é responsável pela ampliação dos sintomas de doenças pré-existentes e pelo aparecimento de doenças muitas vezes letais. Dado o aumento da prevalência da obesidade ao longo dos anos, existem inúmeros estudos que relatam o aumento de doenças cardiovasculares [9-11], aterosclerose [12, 13] e complicações durante a gravidez para pacientes do sexo feminino [14-17]. Talvez uma das condições mais marcantes causadas pela obesidade é a Síndrome Metabólica. Esta condição caracteriza-se pela presença de alguns fatores comuns na

obesidade e no excesso de peso como elevado perímetro abdominal, hipertensão, dislipidemia e resistência à insulina [18, 19]. A síndrome metabólica é responsável pelo aumento da prevalência de doenças como a diabetes do tipo 2 e doenças cardiovasculares, que são, atualmente, os maiores responsáveis por toda a mortalidade no mundo. Existem também vários estudos que provam que os fatores comuns à obesidade e à síndrome metabólica, aumentam a incidência de cancro [20]. Apesar dos mecanismos desta relação não serem bem conhecidos, existem diversas teorias baseadas na resistência à insulina; o aumento de insulina faz aumentar os níveis do fator de crescimento tipo insulina (IGF-1) e faz aumentar o stress oxidativo no organismo, resultando numa maior probabilidade de aparecimento de cancro. [21]

### **1.3. Diabetes**

A diabetes (diabetes melitus) é uma doença metabólica caracterizada por níveis anormalmente altos de glucose no sangue, hiperglicemia, durante longos períodos. Pode ser dividida em diferentes categorias dependendo da razão, sendo que as principais são a diabetes de tipo 1 e tipo 2. Existem outras categorias menos recorrentes, como a diabetes gestacional, em que uma mulher com níveis normais de glicemia demonstra hiperglicemia durante a gravidez [22].

Estima-se que cerca de 1 em 11 pessoas no mundo tenham diabetes, sendo que 90% desses casos é de tipo 2 [23]. A diabetes do tipo 1 é caracterizada por uma deficiência na produção de insulina, causada por destruição de células  $\beta$  do pâncreas através de um ataque autoimune. Esta doença pode aparecer em qualquer idade e em qualquer pessoa, com ou sem pré-disposição genética [24].

A diabetes do tipo 2 é caracterizada por uma resistência à insulina produzida, comumente associado ao excesso de peso ou obesidade. Nestes casos, existe um desvio ao comportamento normal dos tecidos sensíveis à glucose: o tecido adiposo, muscular e o fígado, o que leva à hiperglicemia.

Os sintomas da diabetes tipo 1 normalmente envolvem uma excreção excessiva de urina, sede, fome, perda de peso e fadiga [22]. O tipo 2 geralmente é assintomático, mas pode manifestar alguns dos sintomas do tipo 1.

Os tratamentos da diabetes do tipo 1 geralmente passam pela administração de insulina. Relativamente ao tipo 2, pode ser tratado com a aderência a uma dieta rica em grãos, fibras, fruta, carnes magras e gorduras insaturadas. De uma forma geral, o consumo de comidas muito

processadas, carnes vermelhas, e gorduras saturadas e *trans* são fatores que resultam num aumento da incidência da diabetes do tipo 2 [23].

Existem ainda formas alternativas para o tratamento desta condição, como é o caso de inibidores da  $\alpha$ -glucosidase tipo a acarbose e o miglitol. Estas substâncias funcionam bloqueando a enzima que hidrolisa os di-, oligo- ou polissacáridos que chegam à primeira metade do intestino, o que retarda a absorção dos açúcares, eliminando o pico de glicose no sangue característico do período pós-prandial [25].

## **2. Microbiota**

A microbiota é o conjunto de microrganismos que habitam um determinado ambiente, normalmente de uma forma sinérgica com o hospedeiro [26]. A Microbiota humana é o resultado de milhares de anos de evolução que levaram à presença de mais de  $10^{14}$  bactérias e 1000 espécies distribuídas ao longo do sistema digestivo. A grande quantidade de bactérias e a sua diversidade permite que todas as pessoas tenham uma microbiota específica, no entanto, o rácio de quantidades entre certos grupos de bactérias permanecem mais ou menos constantes entre os humanos [27], de forma a realizar as funções metabólicas necessárias como síntese de vitaminas [28]. Os filos dominantes são os Bacteroidetes e os Firmicutes que representam 90% da distribuição filogenética, sendo que os Firmicutes constituem 60-80% desta distribuição [27].

### **2.1. Aparecimento e evolução da microbiota ao longo da vida**

A microbiota varia de indivíduo para indivíduo, dependendo assim de fatores intrínsecos como o património genético do indivíduo, e de fatores extrínsecos como a alimentação e zona de habitação, como esquematizado na Figura 2. No entanto, a microbiota no início da vida é partilhada a partir da mãe, sendo que o primeiro contacto é com a placenta e com o fluido amniótico, que até há pouco se julgavam estéreis [29, 30]. A microbiota do bebé é influenciada desde o parto, uma vez que um parto natural permite o contacto com a microbiota vaginal da mãe e um parto por cesariana por sua vez, facilita o contacto com a microbiota da pele [31]. A alimentação do recém nascido mais uma vez tem influência na população de microrganismos, por exemplo, bebés alimentados com leite materno em vez de fórmula infantil, apresentam maiores quantidades de Bifidobactérias nas fezes [32].

A microbiota da criança vai ser alterada a um ritmo muito acelerado, à medida que ela cresce e contacta com alimentos, pessoas e objetos diferentes. Esta expansão abrange

drasticamente após os 5 anos, e a mais notável mudança é o aparecimento de espécies produtoras de ácido butírico [33]. O ácido butírico faz parte um grupo de substâncias extremamente importantes produzidas pela microbiota intestinal, o grupo dos ácidos gordos de cadeia gorda, ou SCFA do inglês (*Short Chain Fatty Acids*), que além de baixarem o pH do colon inibindo o crescimento de bactérias patogênicas [34], contribuem para o crescimento e manutenção de células epiteliais, fortalecendo a barreira intestinal [35], possuindo ainda propriedades anti-inflamatórias [36]. As quantidades de diferentes espécies de bactérias vão sendo alteradas a um ritmo cada vez mais lento à medida que o indivíduo passa a fase da adolescência e enquanto adulto, a composição da microbiota é relativamente estável. Esta estabilidade não é de todo permanente, uma vez que a composição da microbiota pode sofrer alterações com mudanças na alimentação, especialmente quando há introdução de alimentos com prebióticos ou probióticos, ou quando o indivíduo toma antibióticos. Por fim, a microbiota começa a sofrer degradações com o avanço da idade, normalmente devido a condições que o indivíduo desenvolve, ou com a perda de imunocompetências [37]. Podemos assim concluir que fatores como a idade, sexo, contexto social e ambiental, dieta e o património genético têm influência na microbiota de um indivíduo.

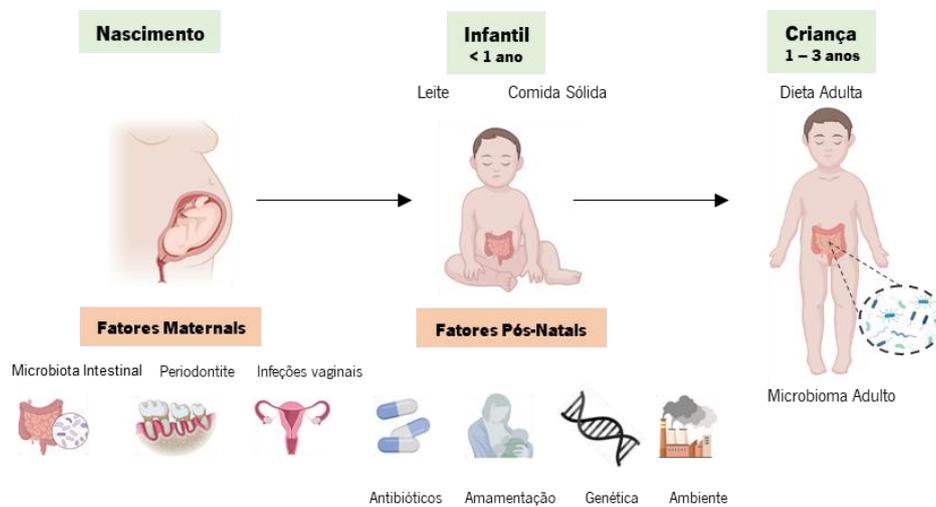


Figura 2 - Fatores que influenciam a microbiota durante os primeiros anos de vida

## 2.2. Importância da microbiota para a saúde do hospedeiro

O papel da microbiota é de extrema importância, comportando uma série de funções sem as quais o hospedeiro não conseguiria uma qualidade de vida normal. Para testar a extensão das funções da microbiota realizam-se experiências com animais criados em ambiente estéril e com uma população selecionada de microrganismos, denominados de gnotobióticos. Quando comparados com ratos normais, os ratos gnotobióticos apresentam deficiência metabólica, como

demonstrado pelo facto de precisarem de mais quantidade de alimento para manterem o mesmo peso corporal [38] e da sua resistência à obesidade induzida pela dieta [39]. É ainda possível aferir a importância da microbiota até no âmbito da mente, como relatado em revisões como a de Luczynski *et al.* [40] que demonstra que estes animais gnotobióticos reagem de forma diferente a estímulos externos e desenvolvem respostas químicas e hormonais diferentes de animais normais.

### 2.2.1. Importância para o metabolismo

Os ácidos gordos de cadeia curta, SCFA, são maioritariamente produzidos através da fermentação de hidratos de carbono. Estes hidratos de carbono, são, em grande quantidade, substâncias que não foram digeridas pelo sistema digestivo e que chegam quase intactos ao fim do trato digestivo. Os principais SCFAs são o acetato, o propionato e o butirato, representados na Figura 3.

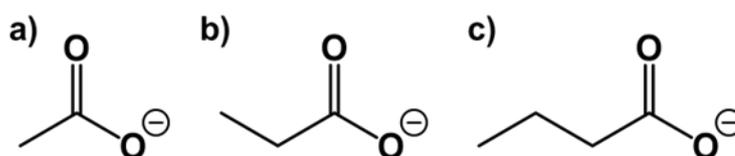


Figura 3 - Estrutura química dos ácidos gordos de cadeia curta: a) acetato, b) propionato e c) butirato

O acetato é produzido por quase todos os grupos de bactérias, sendo aquele que alcança as maiores concentrações entre os SCFAs principais [41]. Relativamente ao propionato e ao butirato, estes são produzidos apenas por espécies do filo dos Bacteroidetes como os *Bacteroides* e *Prevotella* que produzem propionato e filo dos Firmicutes como *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* produtores de butirato [42]. Estes 3 SCFAs também diferem no seu percurso, uma vez que o propionato participa na glucogénese no fígado e o butirato é usado como fonte de energia pelos colonócitos, células do colon [41], onde, na presença de CO<sub>2</sub>, é utilizado na produção de ATP [43]. O butirato tem sido alvo de vários estudos devido às suas características importantes na saúde. Estudos mostram que este contribui para baixar a inflamação das mucosas intestinais, reforça a barreira epitelial, modula sensibilidade visceral e mobilidade intestinal e ainda tem um papel significativo na prevenção do cancro colorretal [44]. O propionato é responsável pelo aumento da expressão de várias hormonas reguladoras do apetite como é o caso da leptina, Péptido Tirosina Tirosina (PYY) e Péptido semelhante a glucagon-1 (GLP-1) [45].

Além destes ácidos orgânicos, a microbiota contribui ainda para a produção de vitaminas. Como parte do seu metabolismo normal, as bactérias que habitam o trato intestinal produzem

vitaminas como é o caso da Riboflavina (B2), Biotina (B7), Ácido fólico (B9), Cobalamina (B12), a Vitamina K [46]. Dada a quantidade muito elevada de bactérias presentes, o excesso destas vitaminas passa para o ambiente, sendo depois utilizado pelo ser humano. Apesar da quantidade sintetizada não perfazer os 100% da quantidade diária necessária, as vitaminas sintetizadas pela microbiota são suficientes para manter o organismo no caso de uma dieta deficiente nestas vitaminas [47]. A importância desta síntese é denotada pela falta comum de Vitamina B9 e B12 em pessoas idosas, cuja microbiota está enfraquecida como mencionado anteriormente [47].

### 2.2.2. Importância no combate a bactérias patogénicas

O papel da microbiota no combate a agentes patogénicos é bastante importante. Foi verificado em estudos com animais gnotobióticos, que demonstram que sem uma microbiota normal, estas espécies são mais suscetíveis a ataques de espécies patogénicas [48, 49].

A interação entre as diferentes espécies pode ser feita de uma maneira direta, uma vez que algumas bactérias produzem bacteriocinas que inibem o crescimento de bactérias da mesma espécie [50]. Além da produção direta de bacteriocinas, as bactérias podem introduzir mudanças no ambiente que são desfavoráveis para o crescimento de outras espécies. Por exemplo, uma flora vaginal saudável produz ácidos orgânicos que baixam o pH, dificultando a proliferação de espécies associadas com infeções urinárias, que preferem um pH neutro [51]. O mesmo acontece com a flora intestinal e a produção dos ácidos gordos já mencionados, que ao baixarem o pH, inibem o crescimento de espécies patogénicas como *Salmonella* spp., *Escherichia. coli* e *Bacillus cereus* e sua respetiva segregação de enterotoxinas [52].

### 2.2.3. Gut-brain axis

Por fim, a microbiota tem um papel crucial no chamado *gut-brain axis*, e no desenvolvimento do cérebro do hospedeiro. Esta relação entre a flora intestinal e o cérebro é uma ligação bidirecional, uma vez que alterações na microbiota podem afetar a condição psicológica do indivíduo [28], no caso de condições como o autismo e depressão. O oposto também se verifica, uma vez que o cérebro é responsável pelo controlo das funções gastrointestinais e um estímulo negativo ao sistema nervoso pode provocar desequilíbrios na microbiota [53].

Além disso, o trato gastrointestinal também interage com o sistema nervoso e com o cérebro de forma a limitar a quantidade de comida ingerida através da secreção de hormonas saciantes [54].

Um estudo que revela a importância da microbiota até no comportamento, envolveu o transplante de microbiota intestinal entre duas espécies de ratos com comportamentos distintos. Foi usada uma espécie muito ativa, com tendência para explorar o ambiente que o rodeia, NIH, e uma espécie mais calma, que exibe tendências para a ansiedade BALB/c. Quando a espécie NIH recebe a microbiota da espécie BALB/c, desenvolve um comportamento menos ativo, e começa a demonstrar alguns sintomas de ansiedade. O contrário também se verifica, sendo que a espécie BALB/c quando recebe microbiota da outra espécie, exibe um comportamento mais exploratório [55].

Outros estudos indicam ainda que a microbiota afeta o desenvolvimento motor e psicológico nas fases iniciais da vida [56], influencia a resposta a situações de *stress* [57] e, pode ainda desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento social [58].

A microbiota representa, portanto, um papel fundamental em vários aspetos que se julgavam antes desconectados, relacionados com o desenvolvimento intelectual, social e emocional do indivíduo através de interações com o sistema endócrino e com o sistema imunitário [53].

#### 2.2.4. Disbiose

A disbiose é caracterizada como a falta de equilíbrio da microbiota seja pela diminuição total da população, pela alteração dos rácios das espécies normalmente presentes ou pelo aumento das espécies patogénicas. A disbiose pode ser causada por mudanças nos hábitos alimentares como mencionado previamente [59]. O aumento da quantidade de proteína, gorduras saturadas e açúcares simples, assim como o baixo consumo de fibras são fatores responsáveis pela disbiose. Além das mudanças alimentares, fatores como o aumento do stress, (o que salienta mais uma vez a importância do *gut-brain axis*) e o consumo de antibióticos também são fatores relevantes para o aparecimento da disbiose.

Doenças como a síndrome do intestino irritável, assim como todas as doenças associadas, têm uma ligação forte com a disbiose [60]. A disbiose tem ainda um efeito no aumento de lipopolissacáridos (LPS) presentes na corrente sanguínea; este composto é responsável pelo aumento da resistência a hormonas saciantes assim como à diminuição da expressão das mesmas, levando a um desenvolvimento da obesidade [54].

### 3. Probióticos

O termo probiótico provém de um termo grego que significa “para a vida” e é usado para definir microrganismos não patogénicos assim como os seus efeitos benéficos no hospedeiro [61].

O conceito de um probiótico é uma ideia relativamente recente, mas o uso de microrganismos para acrescentar valor a um alimento é um conceito muito antigo. Nos países Balcãs, os povos ancestrais usavam a fermentação como forma de conservação de alimentos, especialmente do leite, produzindo o que hoje em dia conhecemos por iogurte [62]. O prémio Nobel Eli Metchnikoff estudou a dieta destes povos, comprovando que o consumo destes produtos, e por consequente destas bactérias, apresentava uma redução do envelhecimento das pessoas [63]. Mais tarde, os microrganismos que participam na fermentação destes produtos foram estudados, chegando a duas espécies relevantes: *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, as mesmas espécies que ainda hoje são utilizadas para a produção de iogurte no mundo inteiro.

A definição de probiótico foi evoluindo até se chegar à definição oficial definida pela OMS que conhecemos hoje, onde se pode ler que um probiótico consiste em “Microrganismos vivos que quando consumidos em quantidades adequadas conferem efeitos benéficos ao hospedeiro” [64].

Os probióticos mais populares consistem em bactérias lácticas, bifidobactérias, bactérias criadoras de esporos como do género *Bacillus* e algumas espécies de leveduras como *Saccharomyces boulardii*. O efeito benéfico é fornecido ao hospedeiro por uma ou várias espécies de probióticos, sendo que existem já produtos no mercado que possuem na composição uma mistura de espécies. No entanto, há que ter em atenção que os efeitos benéficos são específicos para cada variante genética da espécie, e os efeitos são diferentes quando usados em conjugação com outras espécies/ variantes genéticas. Por fim, o efeito dos probióticos pode ainda diferir para diferentes grupos de pessoas.

Dadas as vastas aplicações dos probióticos, a OMS e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) definiram algumas linhas guia para a aplicação dos probióticos em alimentos, assim com as propriedades que uma dada espécie de microrganismo tem de possuir para poder ser classificada como um probiótico (figura 4) [65].

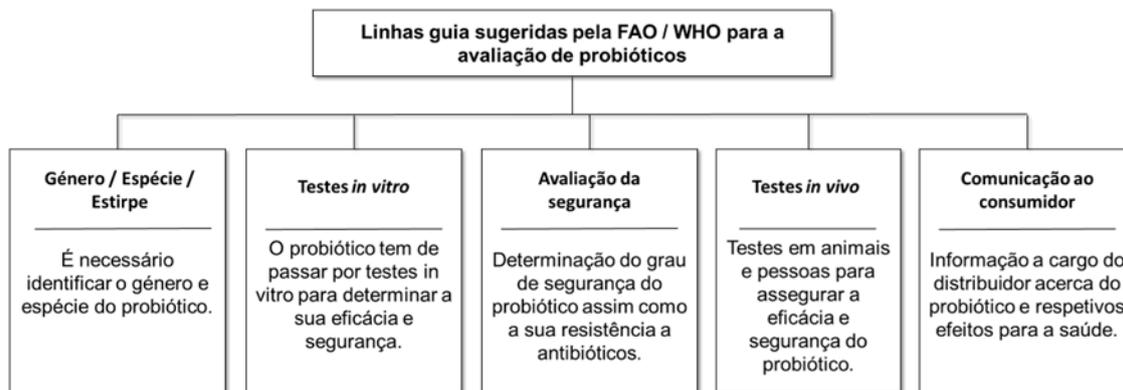


Figura 4 – Parâmetros de avaliação de um probiótico sugeridos pela FAO/WHO

Dado que o efeito probiótico de uma determinada bactéria é produzido apenas por uma estirpe específica, é necessária uma identificação exata do probiótico em avaliação [66]. No entanto, se existirem evidências substanciais de que os efeitos probióticos não são específicos da estirpe em estudo, esta identificação pode ser ignorada.

A realização de testes serve para conhecer os mecanismos pelos quais a espécie exerce efeitos probióticos, mas também é útil para entender a segurança da espécie e a sua adequabilidade ao meio onde vai exercer ação. Para isso, é necessário que a espécie tenha algumas características, avaliadas com estes testes, como é o caso da resistência a pH gástrico, resistência a sais biliares, aderência à mucosa intestinal/ células epiteliais e ação antimicrobiana.

Relativamente às considerações de segurança, é necessário que a estirpe em questão seja bem caracterizada relativamente aos potenciais efeitos adversos assim como a sua resistência a antibióticos. Cabe ao produtor da estirpe provar que o probiótico em questão não apresenta um risco significativo de virulência nem de transferência de resistência a antibióticos. Como tal, a OMS recomenda que sejam feitos testes para determinar a resistência a antibióticos, determinar a atividade metabólica e se a estirpe pertencer a uma espécie que apresente produção de toxinas ou potencial hemolítico, é necessário que os respetivos testes sejam feitos.

Como forma de complementar os testes de segurança, são recomendados testes *in vivo* em animais e em humanos. Estes testes devem avaliar a eficácia e a efetividade e numa fase posterior monitorizar possíveis efeitos adversos. É ainda recomendado que estes testes sejam efetuados por vários centros de investigação e que quaisquer descobertas sejam publicadas em artigos científicos para sustentar a eficácia do probiótico em questão.

Por fim, para assegurar a informação ao consumidor, a OMS recomenda que o produtor especifique no rótulo o gênero, espécie e estirpe do probiótico, a dose mínima a consumir para garantir um número adequado de células para conferir o efeito probiótico indicado, o número de células viáveis no fim do período de validade do produto, os efeitos benéficos conferidos e condições ideais de armazenamento.

### **3.1. Efeito na saúde do hospedeiro**

Os probióticos têm inúmeras funções vantajosas para o ser humano. Estão demonstrados efeitos anti-patogênicos, anti-diabéticos, anti-obesidade, anti-inflamatórios, anti-cancerígenos e efeitos no cérebro e no sistema nervoso [67].

### **3.2. Efeito anti-patogénico**

Os probióticos exibem atividade anti-patogénica através de vários mecanismos, muitas vezes com mais do que um em simultâneo. Bactérias probióticas, à semelhança das bactérias que habitam a flora intestinal, produzem substâncias que modificam o ambiente em que se encontram, como é o caso de ácidos orgânicos, bacteriocinas, etanol e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [68]. Ácidos orgânicos como os previamente mencionados SCFA e ácido láctico alteram o pH do meio, dificultando a proliferação de bactérias patogénicas como *Salmonella* spp. e *Clostridium difficile* [69]. A produção de bacteriocinas e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> afeta a permeabilidade das paredes celulares, levando à morte celular [70]. Além da produção de substâncias, bactérias com efeito probiótico podem aderir à mucosa intestinal e a células epiteliais, não só prevenindo e bloqueando a adesão de bactérias patogénicas, mas também ativando células imunológicas [71]. Por fim, os probióticos exibem atividade anti patogénica competindo por nutrientes no meio e tornando outros certos nutrientes, como o ferro, indisponíveis para outras bactérias [72].

### **3.3. Efeito anti-obesidade**

Vários estudos apontam para os benefícios do transplante de microbiota de um indivíduo no tratamento de muitas doenças ou condições, sendo que uma delas é a obesidade. Foi já demonstrado que o transplante da microbiota de ratos obesos para ratos gnotobióticos causa um aumento da lipogénese e da eficiência de extração de energia dos alimentos [67]. O estudo reportado por Kang *et al.* [73] demonstra que a introdução de um probiótico na alimentação de ratos com obesidade induzida por dieta saturada de hidratos de carbono é bem sucedida relativamente a um grupo de controlo. O probiótico demonstra efeito causando uma diminuição

dos níveis de leptina e aumentando a expressão de genes de oxidação de ácidos gordos. No entanto, o mesmo estudo mostra que este efeito só é observado quando a dose administrada é superior a 10<sup>9</sup> CFUs (Unidades Formadoras de Colónias), o que indica que o efeito probiótico para este fim não só é dependente da estirpe, como é dependente da dose, o que indica a necessidade de um aprofundamento deste tipo de estudos.

Outro estudo, por Kadooka *et al.* [74], releva que a introdução de um probiótico na dieta de adolescentes obesos tem um impacto positivo e promissor no controlo da obesidade tendo em conta parâmetros como a gordura visceral e subcutânea. No entanto, este mesmo estudo aponta resultados inconclusivos quanto ao efeito do probiótico nos níveis de adiponectina, o que reforça a ideia de que os efeitos dos probióticos para o tratamento da obesidade são promissores, mas os mecanismos ainda estão por estudar.

Kim *et al.* [75] reporta um estudo em que os ratos são alimentados com uma dieta rica em gorduras, demonstrando que a suplementação desta dieta com probióticos é muito eficaz na redução de acumulação de gordura e de aumento da massa corporal. Além disso, a utilização de um suplemento probiótico reduziu o dano do fígado, induzido pela dieta rica em gorduras, e permitiu baixar os níveis de leptina e da expressão de genes que regulam a inflamação de células adiposas.

Mais recentemente, dois estudos independentes [76, 77] sugerem que a chave para entender este mecanismo está no efeito anti-inflamatório dos probióticos, e no efeito regenerador da barreira epitelial do intestino.

### **3.4. Efeito anti-inflamatório**

A doença inflamatória intestinal é representada por um conjunto de condições inflamatórias do aparelho digestivo, e na sua grande maioria representada pela doença de Crohn e Colite ulcerativa. A doença de Crohn é caracterizada pela inflamação das mucosas presentes em todo o sistema gastrointestinal e cujos sintomas incluem dores abdominais, diarreia crónica, perda de peso, febre e fadiga [67]. Apesar de não haver tratamentos definitivos para tratar esta doença, existem várias metodologias para atrasar ou parar a sua propagação. A sua origem não está completamente definida, mas atribui-se o seu aparecimento a uma predisposição genética ou a uma alteração da microbiota [78]. A colite ulcerativa, por sua vez, afeta apenas a zona do colon e as regiões vizinhas e manifesta-se através do aparecimento de sangue na diarreia. A revisão feita

por Ford *et al* [79] compila a informação de vários artigos sobre o uso de probióticos neste tipo de condição e mostra que, apesar de não haver uma cura, os probióticos são usados com um grau de sucesso moderado sem efeitos secundários reportados.

## 4. Bactérias

Uma bactéria é um ser vivo unicelular procarionte, ou seja, não tem um núcleo definido. Apresenta um tamanho compreendido normalmente entre os 0.5 e os 50  $\mu m$  e várias formas entre as quais: esféricas, ou cocos, em forma de bastão ou bacilos, bastão curvo ou vibrio e em espiral ou espirilos, Figura 5.

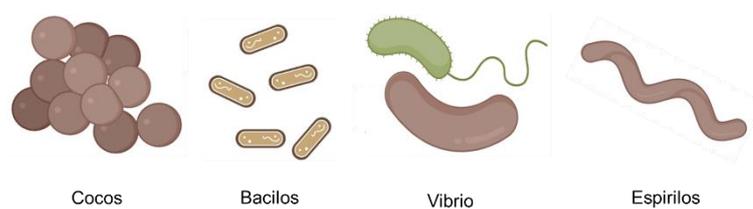


Figura 5 - Formatos de células bacterianas.

### 4.1. Membrana Plasmática

Além dos organelos básicos que constituem a célula da bactéria e que lhe atribuem funções como nutrição e motilidade, existe a membrana plasmática, uma barreira de proteção entre a célula e o ambiente que a rodeia. Esta membrana é constituída por fosfolípidos, moléculas anfifílicas, que orientam a sua cabeça polar na direção do meio aquoso que rodeia a célula e para o citoplasma, e as suas caudas apolares na direção das caudas de outros fosfolípidos para formar uma bicamada de proteção. Podem ainda fazer parte desta estrutura, proteínas integrais e periféricas, assim apelidadas dependendo da sua localização na membrana e que realizam processos fundamentais para a sobrevivência da célula, figura 6.

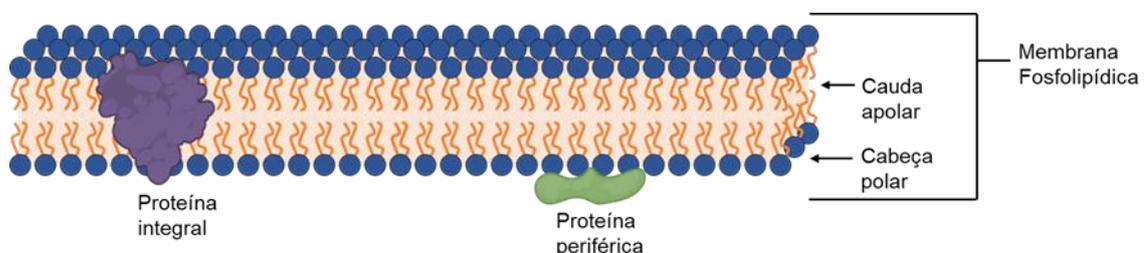


Figura 6 - Representação esquemática da membrana fosfolipídica

Apesar de todas as bactérias apresentarem uma membrana como acima representada, a distinção fundamental dá-se ao nível da parede celular. Existem dois tipos de bactéria com base

na parede celular, parede celular Gram positivo e Gram negativo [80]. Esta designação advém do teste de coloração de Gram que serve para separar estes dois grupos de bactérias.

A parede celular das bactérias contém um composto chamado peptidoglicano que apenas existe nas células procariontes. Este polissacarídeo é composto por unidades de N-glucosamina (NAG) e por unidades de ácido N-acetilmurâmico (NAM) alternadas em longas cadeias [81]. As cadeias estão ligadas entre si e um péptido que se liga às unidades de NAM.

Como ilustrado na Figura 7, a maior diferença entre bactérias Gram positivas e negativas é a complexidade da parede celular. Enquanto a parede celular de células Gram positivas é relativamente simples, sendo apenas constituída pela membrana e uma densa camada de peptidoglicano e ácido teicóico, as células Gram negativas apresentam uma estrutura mais elaborada.

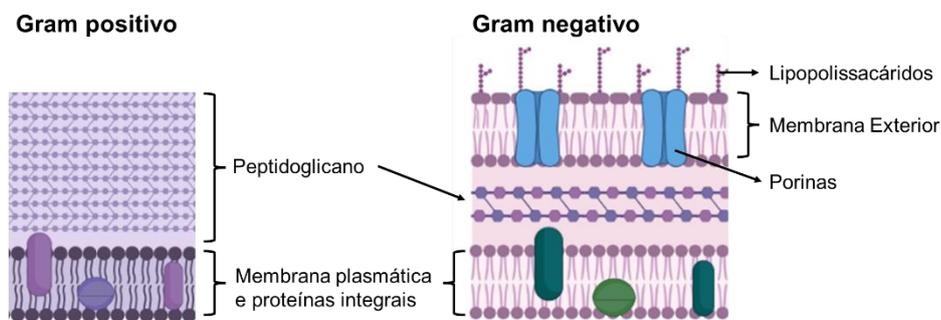


Figura 7 - Estrutura esquemática da parede celular de um organismo Gram positivo, à esquerda e Gram negativo, à direita.

#### 4.2. Parede celular de bactérias Gram positivas

Para a assimilação de nutrientes e dada a porosidade do peptidoglicano [82], as bactérias Gram positivo deixam os nutrientes passar através da malha de polissacárido que a rodeia, o que facilita o processo de alimentação, mas também pode ser prejudicial se esta permitir a assimilação de substâncias perigosas, como ácidos ou enzimas. No total, 50% do peso de uma bactéria Gram positivo é constituída por peptidoglicano.

O outro composto que constitui a parede celular, o ácido teicóico, desempenha funções estruturais na célula e permite à célula sobreviver a temperaturas elevadas e a concentrações salinas elevadas [81]. Este composto pode estar na forma livre entre as moléculas de peptidoglicano ou ligado diretamente à membrana celular, neste caso chamando-se de ácido lipoteicóico.

### 4.3. Parede celular de bactérias Gram negativas

Como representado na figura 7, as células Gram negativo apresentam uma estrutura muito mais complexa, que engloba uma segunda membrana lipídica, e entre as duas membranas, o periplasma, uma camada em gel que engloba proteínas e enzimas [80]. A camada exterior das bactérias Gram negativas difere ainda por apresentar lipopolissacarídeos, ou LPS, moléculas de grande dimensão que servem para dar estabilidade à camada exterior, bloquear fisicamente o acesso às partes interiores da célula e para sinalizarem uma resposta imune em caso de ataque [81].

Para assegurar que a célula tem acesso aos nutrientes que precisa, secreta enzimas que “partem” os nutrientes em moléculas mais pequenas que conseguem passar pelos LPS e utiliza porinas, proteínas que são responsáveis pela difusão destas moléculas mais pequenas, como açúcares ou aminoácidos [81].

### 4.4. Desenvolvimento bacteriano

Dada a facilidade de crescimento de bactérias em laboratório, assim como os seus diversos usos em vários ramos, os seus padrões de crescimento estão muito estudados. Ao longo do seu desenvolvimento e de uma forma geral, todas as bactérias passam por 4 fases de desenvolvimento: Fase de latência, fase exponencial, fase estacionária e fase de morte, Figura 8.

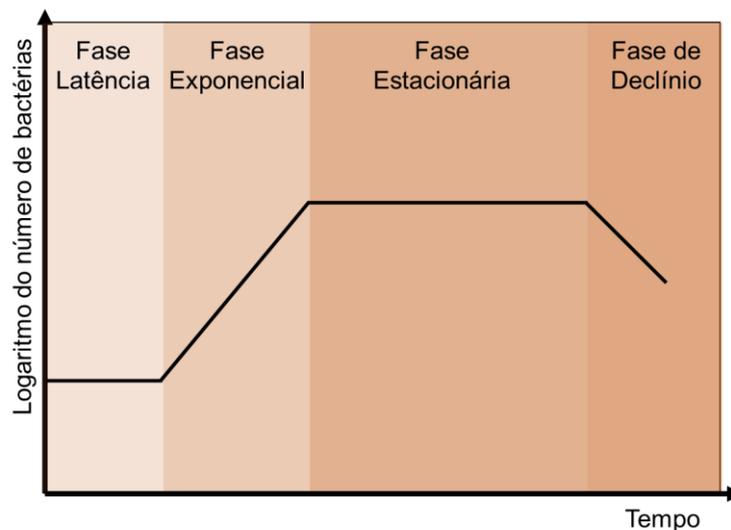


Figura 8 - Variação do número de colónias ao longo das 4 fases de crescimento

O padrão de crescimento de bactérias varia muito entre espécies e com as condições de cultura utilizadas, mas as 4 fases, de uma forma geral, mantêm-se.

#### 4.4.1. Fase de Latência

A fase de latência é a primeira fase de crescimento e é uma fase de adaptação ao meio, ou às condições do meio. Os tempos de duração desta fase variam muito dependendo da origem das células, da diferença para o meio de onde as células vieram ou do quão danificadas estas estão. Nesta fase as células sintetizam metabolitos que necessitam para processar os nutrientes do meio, o que significa que quando as células são passadas de um meio para outro igual, o tempo de latência é radicalmente mais curto. Se as células estiverem danificadas, têm de se reparar primeiro, o que aumenta o tempo da fase de latência [81].

#### 4.4.2. Fase Exponencial

Após a fase de latência, as células têm todas as condições para se desenvolverem e começam a crescer de forma exponencial. Durante esta fase, todas as células duplicam em número entre gerações, o que torna possível calcular o número de células ao longo do tempo durante esta fase. Por ser um período de rápido desenvolvimento, as células são muito saudáveis e por isso é normalmente desta fase que são utilizadas as células para trabalho científico. Existem ainda bioreatores ao nível industrial que são otimizados para manter um dado conjunto de células permanentemente na fase exponencial.

#### 4.4.3. Fase Estacionária

O crescimento exponencial não é sustentável durante muito tempo numa cultura fechada, devido a limitações nutricionais ou físicas, o que causa o número de células que morrem a igualar o número de células novas, entrando assim na fase estacionária. Esta fase caracteriza-se por uma mudança no formato e metabolismo das células, de forma a adaptarem-se às condições adversas e que permita que sobrevivam até as condições se tornarem mais favoráveis. Durante esta fase são produzidos metabolitos secundários e as células que têm esta capacidade, começam a produzir genes para a produção de esporos.

#### 4.4.4. Fase de Declínio

A última fase de crescimento caracteriza-se por um decréscimo exponencial do número de células viáveis. Apesar de grande parte das células morrerem, algumas podem entrar num estado vegetativo em que não se conseguem dividir, mas se as condições se tornarem favoráveis, podem voltar a entrar em multiplicação. As células durante este tempo tentam aumentar ao

máximo o seu tempo de vida, podendo adaptar-se para utilizarem os nutrientes provenientes de outras células que morreram.

#### **4.5. Fatores que afetam o crescimento**

Para um crescimento eficaz é necessário que haja as condições necessárias, e não só em termos nutricionais. Fatores como o pH, a temperatura, a presença ou não de oxigênio afetam o crescimento bacteriano, assim como o próprio fator de crescimento inerente de cada espécie. Além disso, a presença das fontes nutricionais adequadas não é suficiente, é necessário que as bactérias tenham as “ferramentas” adequadas para metabolizar estas substâncias e daí extrair energia. Vários estudos [83, 84] demonstram que na presença de várias fontes de carbono de complexidades diferentes, as espécies dão prioridade à mais simples e apenas após esta se esgotar começam a metabolizar outras fontes mais complexas.

Para sobreviverem a condições adversas, as bactérias podem evoluir para desenvolverem mecanismos para combater estas condições. Bactérias que se adaptaram a ambientes mais ácidos, com valores de pH entre os 0 e 5.5 usam mecanismos para manter o seu interior num pH perto de 7 como bombas de prótons que bombeiam ativamente  $H^+$  para o exterior. O mesmo ocorre com bactérias adaptadas para viver em valores de pH alcalinos, entre os 8.0 e os 11, que têm mecanismos semelhantes, mas para facilitar a passagem de  $H^+$  para dentro da célula.

De forma a tolerarem temperaturas extremas, as bactérias evoluíram para sintetizar enzimas ou proteínas que funcionem corretamente com a temperatura do seu local de origem. Bactérias mesófilas, que crescem de forma ótima em temperaturas próximas dos  $37^{\circ}C$ , são aquelas mais prováveis de serem encontradas em humanos e espaços partilhados pelos mesmos.

Bactérias psicrófilas preferem idealmente ambientes frios, podendo crescer numa temperatura até  $-20^{\circ}C$ . Para isto ser possível tiveram de evoluir enzimas que funcionem em ambientes frios e modificar a sua composição para manter o seu citoplasma líquido mesmo em condições extremas, usando uma maior percentagem de ácidos gordos de cadeia curta ou ácidos gordos insaturados na membrana celular.

Bactérias termófilas preferem ambientes mais quentes, podendo crescer até aos  $80^{\circ}C$ . Tal como as psicrófilas tiveram de evoluir para sintetizar enzimas e proteínas que sejam resistentes ao calor e que não desnaturem. A sua membrana celular é constituída por um maior grau de ácidos gordos saturados, aumentando o seu ponto de fusão.

As espécies podem ainda ser distinguidas pela sua capacidade ou não de sobreviverem em ambientes com oxigénio. Espécies denominadas de aeróbias necessitam obrigatoriamente de oxigénio, anaeróbias facultativas podem crescer com ou sem oxigénio, alterando o seu metabolismo, e espécies anaeróbias não crescem na presença de oxigénio, substância tóxica para elas.

Existem ainda outros mecanismos de propagação em ambientes adversos além dos descritos acima. A esporulação é um mecanismo através do qual, a bactéria cria um esporo, que consiste em material genético necessário para a formação de uma célula, mas sem qualquer metabolismo. Este corpo vegetativo consegue sobreviver em condições muito mais drásticas do que a célula conseguiria, permitindo que esta se desenvolva quando condições mais prosperas forem atingidas.

## **5. Prebióticos**

### **5.1. Definição**

Um prebiótico é definido como um substrato que é seletivamente utilizado pela microbiota do hospedeiro, conferindo efeitos benéficos para a saúde [85]. Esta definição foi introduzida para responder às lacunas introduzidas pela definição anterior, que apenas mencionava a microbiota intestinal. Estudos recentes sugerem que os prebióticos também podem ser administrados à microbiota que coloniza outras partes do corpo, como é caso da microbiota da pele ou do trato vaginal [85].

Apesar de frequentemente ser feita a ligação entre fibras alimentares e prebióticos, apenas uma parte dos prebióticos são fibras alimentares. Compostos como polifenóis e ácidos gordos polinsaturados não são metabolizados durante o processo de digestão do hospedeiro e é no colon que são processados pela microbiota, conferindo assim efeitos benéficos [85, 86]

Para classificar um composto como sendo um prebiótico é necessário que este seja resistente ao pH ácido do estômago, não seja hidrolisado por enzimas presentes em mamíferos, não seja absorvido no trato gastrointestinal, seja fermentado pela microbiota intestinal, que a presença deste composto favoreça seletivamente o crescimento/ desenvolvimento da microbiota e que este processo seja benéfico para a saúde do hospedeiro [87].

Os prebióticos podem ser divididos em várias categorias, sendo estes: hidratos de carbono, onde estão incluídos os frutanos, galacto-oligossacáridos e amido, polifenóis e ácidos gordos polinsaturados.

#### 5.1.1. Frutanos

Os frutanos são cadeias lineares de unidades de frutose que normalmente terminam com uma unidade de glucose. Dentro desta categoria, os graus de polimerização podem variar largamente. Nesta categoria os mais conhecidos são provavelmente a inulina e os FOS (fructooligossacarídeos). A diferença entre estes dois compostos é o grau de polimerização, ou seja, o número de unidades na sua cadeia. Os FOS apresentam uma cadeia mais curta, até cerca de 10 unidades, enquanto a inulina pode ir até 60 [88] São comuns em alimentos como a chicória, agave ou alcachofras.

#### 5.1.2. Galactooligossacáridos

Os galactooligossacáridos, ou GOS, são compostos por unidades de galactose e apresentam uma unidade de glucose terminal. Estão presentes naturalmente em alguns vegetais e no leite materno, mas em quantidades muito pequenas para ter efeito prebiótico, por isso são muitas vezes sintetizados recorrendo à ação de enzimas sobre a lactose [89].

#### 5.1.3. Amido

O amido naturalmente contém uma porção não digerível pelo organismo durante o processo de digestão, denominado por amido resistente. Dado que esta porção pode ser metabolizada pela microbiota conferindo efeitos benéficos para o hospedeiro, é considerado um prebiótico [90]. O consumo deste prebiótico leva à produção de elevadas quantidades de ácido butírico, composto benéfico para o trato digestivo.

#### 5.1.4. Polifenóis

Polifenóis são compostos orgânicos com vários grupos fenólicos. Podem ser estruturas mais ou menos complexas que são abundantes em verduras e frutas. Dado que os humanos apenas absorvem produtos do metabolismo bacteriano resultantes da fermentação de polifenóis [91], é possível considerar estes compostos como sendo prebióticos. A modulação da microbiota por parte destes compostos dá-se pela sua excelente atividade antimicrobiana, uma vez que são potentes inibidores do crescimento de bactérias patogénicas como *Staphylococcus aureus*,

*Salmonella typhimurium*, entre outros e têm um efeito menos letal em bactérias comensais ou até em espécies probióticas como *Lactobacillus* spp.[91]

#### 5.1.5. Ácidos gordos polinsaturados

Esta categoria de compostos está abundantemente presente em gorduras derivadas do peixe ou de sementes como as do girassol, como é o caso de ácidos gordos ómega-3 e ómega-6 (nomenclatura depende da posição da ligação insaturada na cadeia de carbono). Além dos efeitos benéficos conferidos por estes compostos por si só, existem estudos que comprovam a sua atividade prebiótica, tal como a sua capacidade de aumentar a adesão de certas espécies probióticas à mucosa intestinal ou a capacidade de modular a população de bactérias produtoras de SCFA [92].

### 5.2. Benefícios dos prebióticos

Uma vez que os prebióticos servem como fonte de energia para as espécies residentes no trato intestinal, o consumo destes compostos leva a um aumento da população das espécies, assim como da sua atividade. Como tal, existe um aumento da produção de metabolitos que têm efeito na saúde do consumidor. Tal como já foi mencionado, a produção de ácidos gordos de cadeia curta é muito importante para a saúde do consumidor, mas além dos efeitos diretos, existem também a influência destes ácidos no local. Uma mudança no pH é capaz de alterar a composição da microbiota [93] e afetar o rácio de espécies de bactérias que lá existem.

## 6. Encapsulação

A introdução de ingredientes com elevado valor nutricional é uma estratégia cada vez mais utilizada para cumprir as exigências atuais dos consumidores. Para ser possível cumprir os benefícios prometidos, por vezes é necessário proteger compostos mais sensíveis das condições de processamento e da própria digestão do consumidor. Uma das estratégias para tal é o encapsulamento, um método que passa por revestir ou incorporar o aditivo num material que permita que este mantenha a sua integridade por mais tempo.

A adição de probióticos a matrizes alimentares é uma estratégia que permite aos produtores aumentar o valor comercial e nutricional do seu produto. No entanto, esta adição apresenta inúmeras barreiras, tais como a fraca viabilidade das espécies probióticas a condições de processamento e de armazenamento, a baixa sobrevivência ao ácido e à bile e a possibilidade

da alteração significativa das características sensoriais do alimento. A encapsulação é, portanto, uma maneira eficaz de responder a todas estas questões, aumentando de uma forma geral o valor económico e nutricional do produto. Uma combinação dos materiais usados e a técnica empregada, tornam possível o desenho de uma cápsula que não só proteja o probiótico das condições de armazenamento e digestão como a sua libertação controlada no local alvo, neste caso o cólon.

A forma como a escolha do material e da técnica afetam o produto final é o tema que será abordado em detalhe neste capítulo.

## **6.1. Encapsulação à base de hidratos de carbono**

### 6.1.1. Encapsulação à base de alginato

O alginato é um biopolímero extraído de algas, aprovado pela FDA, Administração de Alimentos e Medicação, como GRAS (*Generally Regarded as Safe*), sendo muito utilizado para fins alimentares. Quimicamente, é composto por unidades monoméricas de ácido  $\beta$ -D-manurónico (bloco M) e de ácido  $\alpha$ -L-Gulurónico (bloco G) em sequências aleatórias que dão estrutura à alga [94]. Quando em contacto com uma solução de catiões bivalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ), os blocos G ligam-se a estes catiões, numa estrutura de caixa de ovo, formando uma malha polimérica resistente [94]. Devido às propriedades químicas de cada um dos blocos, o alginato apresenta características únicas para a encapsulação e libertação específica de compostos bioativos ou probióticos no trato intestinal. Quando exposto ao pH ácido do estômago, a malha não se danifica, mas na presença de pH neutro, a malha começa a expandir, acabando por dissolver completamente [95].

Uma das desvantagens da encapsulação é a porosidade da malha que se forma, levando a uma rápida desintegração na presença de excesso de iões monovalentes ou na presença de agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  [96].

### 6.1.2. Encapsulação à base de quitosano

O quitosano é um biopolímero extraído das cascas de crustáceos e como o alginato é reconhecido como sendo GRAS para fins alimentares. A sua estrutura é composta por resíduos de D-glucosamina e N-acetil-glucosamina [97]. Este polímero é biocompatível e solúvel a pH ácido e nestas condições apresenta-se com carga positiva, estabelecendo interações electrostáticas com polímeros aniónicos [96]. O uso exclusivo de quitosano para encapsulação de probióticos apresenta duas grandes desvantagens, o efeito anti-bacteriano do quitosano [98] e como

mencionado previamente, a sua solubilidade em pH ácido. Como tal, o quitosano é ideal para aplicações de “*coating*” ou proteção de cápsulas compostas por outros compostos, para prolongar a longevidade dos encapsulados quando armazenados em alimentos com pH neutro.

## **6.2. Encapsulação à base de proteínas do leite**

Apesar da encapsulação à base de polímeros ser eficaz na proteção e libertação de probióticos no trato intestinal, é possível melhorar a eficácia destes parâmetros através da adição de outros compostos, como é o caso da adição de proteínas ou de prebióticos. A suplementação com proteínas, mais especificamente com proteínas provenientes do leite, é um assunto muito estudado devido ao aumento da resistência das cápsulas durante o processo de digestão [99]. Um dos componentes maioritários da proteína do soro, a beta-lactoglobulina, é uma proteína que devido à sua estrutura resiste à sua dissociação pela enzima pepsina mas é lentamente digerida pela enzima tripsina, o que permite a libertação específica de compostos ou probióticos no intestino [99]. A adição de proteínas do leite a uma matriz de alginato por exemplo, permite a redução da porosidade das cápsulas, aumentando assim a sua resistência às condições adversas do estômago [100]. Uma estratégia também sugerida por outros autores é o uso de proteína do soro desnaturada para melhorar a proteção de probióticos durante processos de encapsulação mais agressivos ou durante a digestão [101]. Durante o processo de desnaturação formam-se pontes de enxofre e a estrutura da molécula “desenrola-se”, expondo os grupos apolares e melhorando a resistência à dissolução [102].

## **6.3. Encapsulação com prebióticos**

Por definição os prebióticos não são digeríveis pelo processo normal de digestão, o que os torna excelentes candidatos para melhorar as capacidades de resistência ao processo. Além disso, no caso de encapsulação de probióticos, a própria cápsula pode servir de alimento aos microrganismos, melhorando a longevidade do produto. Os prebióticos mais usados para este tipo de objetivo são o FOS, GOS, inulina e amido resistente [103, 104]. Além do aumento da eficiência de encapsulação [105, 106] e da resistência das cápsulas ao longo do trato digestivo [107], é possível ainda alcançar um efeito sinérgico, onde o efeito dos prebióticos e probióticos é aumentado devido à presença dos dois [108, 109].

## 6.4. Técnicas utilizadas

A escolha da técnica apropriada, assim como a escolha dos materiais, é fundamental para o sucesso da encapsulação. Esta escolha deve ser feita tendo em conta o produto final e a sua aplicação. Técnicas diferentes podem não ser apropriadas devido a condições de processamento muito agressivas, como é o caso *do spray drying* ou *freeze drying*, uma vez que ambas utilizam temperaturas extremas. Alguns dos parâmetros influenciados pela escolha da técnica passam pelo tamanho pretendido da cápsula, sabor ou textura na boca, funcionalidade biológica e estabilidade [110].

Especificamente para a encapsulação de probióticos, as técnicas mais comuns são a extrusão, emulsão, *spray drying*, *freeze drying* e o *eletrospinning* [111].

### 6.4.1. Emulsão

A emulsão é uma técnica de encapsulação baseada na imiscibilidade entre dois líquidos. O exemplo mais usado é a encapsulação através de um sistema água/óleo em que uma solução aquosa polimérica é inserida numa grande quantidade de um óleo e, com a ajuda de um surfactante, formam-se pequenas cápsulas que solidificam aquando da adição de um agente gelificante. A solução é mantida em constante agitação e é este parâmetro que vai definir o tamanho e forma das partículas criadas. As cápsulas formadas podem depois ser recolhidas por filtração ou centrifugação [112]. A maior vantagem deste tipo de técnica é a fácil aplicação em contexto industrial e o tamanho mínimo de partícula que é possível obter. No entanto, devido à natureza da técnica, é difícil obter partículas que sejam heterogéneas em termos de tamanho e formato. Pode ainda ser necessário um passo adicional de forma a remover vestígios de óleo que sobrem do processo de encapsulação [112, 113].

### 6.4.2. *Spray Drying*

O *spray drying* é uma técnica de encapsulação na qual uma solução é atomizada e evaporada através do contacto com ar quente. Para a utilização desta técnica é necessário que o reagente a encapsular seja dissolvido ou disperso numa solução normalmente aquosa. Esta solução passa por um *nozzle* ao mesmo tempo que ar a altas temperaturas, para que o solvente evapore e seja possível recolher as partículas através de um ciclone [114]. As maiores vantagens desta técnica é o facto de ser muito económica e apresentar apenas uma etapa de processamento [111], mas a utilização de altas temperaturas pode diminuir a viabilidade de certas espécies a

encapsular, tornando-a apenas viável em certos casos. Apesar disto, podem ser utilizados biopolímeros que protejam os probióticos, obtendo assim um produto final que é bastante estável.

#### 6.4.3. Liofilização

Liofilização, ou *freeze-drying*, é uma técnica que se baseia na passagem da água do estado sólido para o estado gasoso. Este fenómeno é alcançado através do congelamento e subsequente diminuição da pressão do material a liofilizar. É uma técnica muito usada porque permite a conservação de matérias normalmente abundantes em água durante elevados períodos de tempo [115]. Esta técnica apresenta a desvantagem de poder alterar as características das membranas celulares se for usada para a preservação/ encapsulação de probióticos, o que implica a utilização de substâncias que protejam as células, nomeadamente, crioprotetores [111, 116]. Além disto, é uma técnica muito dispendiosa em termos de equipamento e energia necessária, mas que apresenta excelentes resultados relativamente à viabilidade celular [117].

#### 6.4.4. Extrusão

A extrusão é um método físico de encapsulação que consiste na passagem de uma solução polimérica por um *nozzle* que permite a formação de partículas. No caso de encapsulação de probióticos, uma cultura bacteriana é incluída na solução polimérica de forma a preparar uma suspensão [118]. Para a formação de cápsulas, esta suspensão é colocada numa solução apropriada, denominada solução gelificante, que permite a formação de uma matriz rígida que proteja o probiótico. É possível controlar as características das cápsulas formadas através do *prilling*, um método que consiste na aplicação de uma frequência de vibração a um fluxo de modo a criar partículas com tamanhos muito consistentes. A extrusão apresenta inúmeras vantagens relativamente aos restantes métodos de encapsulação, nomeadamente: baixo custo de equipamento, possibilidade de trabalhar em ambiente anaeróbico, alta homogeneidade de partículas e condições de processamento suaves. No entanto, as partículas criadas são relativamente grandes, e o ritmo de produção é, em geral, mais baixo [111]. Os parâmetros de controlo deste método permitem um “*fine tuning*” das propriedades das cápsulas produzidas: a velocidade de fluxo aliada com a frequência e amplitude de vibração permitem controlar a homogeneidade, formato e de certa forma, o tamanho das cápsulas; a corrente permite a separação eficaz de todas as partículas, e o diâmetro do *nozzle* afeta o tamanho das cápsulas de uma forma mais básica-

## **II. Materiais e Métodos**

### **1. Preparação de meios de cultura**

Inicialmente foi preparado meio de cultura De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), adicionando 52.3 g·l<sup>-1</sup> de preparado em pó de MRS (Condalab, Espanha) em água destilada.

Para a preparação do meio de cultura líquido Tryptone-Glucose-Yeast extract (TGY), foram adicionados 5 g·l<sup>-1</sup> de triptona (Condalab, Espanha), 3 g·l<sup>-1</sup> de Extrato de Levedura (Condalab, Espanha), 1 g·l<sup>-1</sup> de glucose (Condalab, Espanha), 1 g·l<sup>-1</sup> de Fosfato de potássio (Panreac, EUA) em água destilada.

O meio de cultura sólido, TGY agar, foi preparado adicionando 20 g·l<sup>-1</sup> de agar (Biokar, França) a um meio de TGY previamente preparado. Após preparação, todos os meios foram autoclavados a 121°C. O meio sólido foi vertido enquanto ainda quente para placas de Petri e, após solidificação, foi armazenado a 4°C assim como os restantes meios.

### **2. Preparação de stocks de *Bacillus coagulans***

Esporos liofilizados de *Bacillus coagulans* BC4 10 MLD (Sacco, Itália), contendo cerca de 10<sup>10</sup> CFU g<sup>-1</sup> foram utilizados para preparação de um pré-inóculo em meio de cultura MRS. Foi adicionada 1 g de esporos a 4 ml de MRS num tubo falcon estéril, posteriormente incubado durante 48 horas num incubador orbital a 37°C com agitação de 150 rpm. De seguida, 40 µl foram transferidos para um tubo falcon estéril contendo 4 ml de MRS e re-incubados por mais 48 horas nas mesmas condições. Para preparações posteriores foram ainda preparados *cryovials*, adicionando 700 µl de pré-inóculo a 300 µl de glicerol (Sigma-Aldrich, EUA), perfazendo soluções de 30% glicerol (v/v). Os *cryovials* são depois armazenados a -80 °C até serem utilizados.

Após a obtenção dos pré-inóculos, foi utilizada uma ansa de inoculação de 10 µl para realizar um esfregaço em placas com TGY agar, esgotando o inóculo de modo a obter secções com colónias individualizadas. Por fim, a placa foi selada com película de parafina (Parafilm, EUA) e armazenada no frigorífico até um máximo de 1 mes. Antes de qualquer estudo posterior, as colónias eram verificadas de forma a garantir que não apresentavam aspeto baço ou que descolavam da placa, sinal de perda de viabilidade celular.

### **3. Curva de crescimento**

Uma colônia foi retirada com uma ansa de inoculação e colocada num tubo falcon estéril contendo 4 ml de MRS e incubado durante 48 horas num incubador orbital (37°C, 150 rpm). Após incubação, 0.5 ml deste pré-inoculo foram retirados e adicionados a um matraz rolhado de 250 ml, previamente esterilizado, contendo 50 ml de TGY, obtendo uma concentração final de inóculo de 1%. Os meios inoculados foram incubados durante 24 horas (37°C, 150 rpm).

Para a realização das curvas de crescimento foram retiradas alíquotas de 2 ml a cada 2 horas até atingir as 8 horas de crescimento e uma alíquota final ao fim de 24 horas de crescimento.

Para a quantificação por turbidimetria, 1 ml de cada alíquota foi colocado numa cuvete de plástico, e medida a sua absorvância ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ), tendo sido realizadas diluições quando necessário ( $OD_{600} > 1,0$ ).

Para a quantificação de CFUs 1 ml de cada alíquota foi diluído em série em 9 ml de Solução Tampão Fosfato (PBS) previamente esterilizado. O PBS (Biochrom GmbH, Alemanha) foi preparado a partir de uma solução 10x mais concentrada, diluindo apropriadamente com água Mili-Q. Após diluições apropriadas, 100  $\mu\text{l}$  de solução foram transferidos para placas contendo TGY agar e espalhados usando um espalhador em L estéril, realizando 2 repetições por diluição. As placas são armazenadas a 37°C durante 48 horas e posteriormente realizada a contagem de colônias.

### **4. Alteração da fonte de carbono nos meios de inóculo**

#### **4.1. Preparação de meios de cultura**

Foram preparados meios de cultura líquidos como descrito anteriormente, mas para o efeito foi usada uma formulação de MRS (em pó) sem adição de glucose (Condalab, Espanha), ao qual foram adicionados prebióticos em pó de modo a obter concentrações finais de 1 e 2% (p/v). Os prebióticos estudados foram a inulina (Sigma-Aldrich, EUA), fibrulina (Induxtra, Portugal) e FOS (Sigma-Aldrich, EUA). Adicionalmente foi ainda preparado um meio de controlo, com 1 e 2% de glucose. O mesmo procedimento é aplicado para a formulação de TGY, sendo que todos os meios foram autoclavados a 121 °C antes de serem utilizados.

## **4.2. Preparação de inóculos e curvas de crescimento**

Numa microplaca de 96 poços (TPP, Suíça) foram colocados 198 µl dos meios de cultura com prebiótico (1 e 2%) e 2 µl de pré-inóculo, de modo a obter uma concentração final de 1% de inóculo. As curvas de crescimento foram obtidas recorrendo a um leitor de placas (Biotek, EUA), com uma agitação de 150 rpm a 37°C. As medições de absorvância ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ), foram realizadas a cada 30 minutos durante 24 horas, em triplicado.

## **5. Encapsulação**

### **5.1. Preparação de soluções**

Para a preparação da solução polimérica foram preparadas 4 soluções individualmente, com 6 vezes a concentração final de forma facilitar a preparação das diferentes formulações. Sempre que possível foram mantidas condições estéreis. A solução de FOS 6% foi preparada adicionando a quantidade apropriada do reagente em pó, FOS de chicória (Sigma, EUA) a um goblé com água destilada. Para a solução ficar completamente translúcida, foi necessário colocar o goblé em banho-maria a 37°C com um agitador magnético. A solução de alginato 6% foi preparada adicionando a quantidade apropriada do reagente em pó, sal de sódio do ácido alginico (Aldrich, EUA) a um goblé com água destilada e deixado em agitação até dissolução total. A solução de proteína de soro foi preparada adicionando a quantidade apropriada do reagente, proteína de soro isolada (Bulk powders, Reino Unido) até perfazer uma solução de 15%. A solução foi colocada em banho-maria a 80°C durante 20 minutos e posteriormente centrifugada durante 3 minutos a 9000 rpm. No final deste procedimento, o sobrenadante é recolhido e utilizado para a preparação das cápsulas. Por fim, para a preparação da solução de probiótico, é adicionada a massa apropriada de esporos, a uma tina com água Mili-Q, colocada em agitação muito ligeira a 37°C. Após, 30 minutos, a solução é filtrada por filtros de seringa de 0.5 µm para garantir que o encapsulador não é entupido por partículas de dimensão maior.

Após preparação, as soluções são misturadas de acordo com as concentrações necessárias e usadas de imediato. São preparadas soluções com e sem FOS de forma a verificar a influência do prebiótico na viabilidade durante o trânsito intestinal.

## 5.2. Encapsulação

Para a encapsulação dos probióticos foi utilizado um encapsulador Buchi B395 Pro (Buchi, Suíça) mantendo sempre que possíveis condições estéreis, e quando não possível, desinfetando todo o material em contacto com soluções /equipamentos. As cápsulas foram produzidas utilizando um *noozle* de 120  $\mu\text{m}$ , velocidade de fluxo de  $2.3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , frequência de vibração de 2200 Hz, 4 m de amplitude e com uma diferença de potencial de 1200 mV. A solução de gelificação foi preparada adicionado cloreto de cálcio,  $\text{CaCl}_2$ , em água Milli-Q até perfazer uma concentração de 1.5% (p/v).

Para recolher as cápsulas produzidas e permitir a gelificação da matriz polimérica, uma tina larga de vidro com 110 ml de solução de  $\text{CaCl}_2$  1.5% é colocada por baixo do *noozle*, com agitação muito ligeira de forma a não deformar ou danificar as partículas, esquematizado na figura 9. Após 30 minutos, as cápsulas são recolhidas e armazenadas em solução  $\text{CaCl}_2$  num tubo *falcon* no frigorífico. Sempre que possível as cápsulas foram utilizadas imediatamente; caso contrário são armazenadas no frigorífico até serem utilizadas.

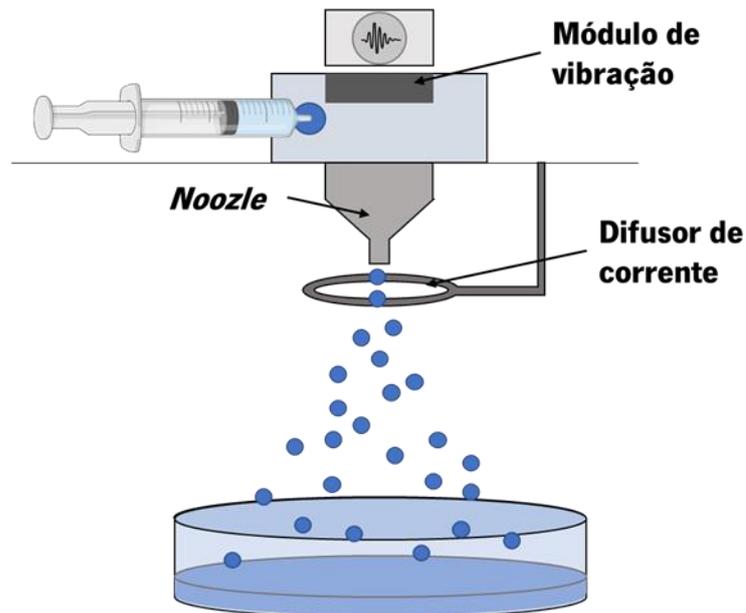


Figura 9 – Esquemática da montagem experimental do encapsulador.

## 5.3. Eficiência de encapsulação

Para determinar a eficiência de encapsulação, foi recolhida uma amostra da solução de probiótico preparada no subcapítulo 5.1, após a filtração. Após diluições seriadas apropriadas em PBS, é plaqueada em TGY agar para contagens de CFUs.

Posteriormente, uma amostra de 1 g de cápsulas são recolhidas e colocadas em PBS durante 30 minutos até dissolução total das cápsulas. Após diluições seriadas apropriadas em PBS, a amostra é plaqueada em TGY agar. Este procedimento é feito para as cápsulas com e sem FOS para verificar se a presença de FOS afeta de alguma forma a eficiência de encapsulamento.

## 6. Ensaio de digestão

O procedimento seguido para os ensaios de viabilidade durante a digestão, foi baseado no procedimento descrito pelo INFOGEST [119]. Antes de iniciar os ensaios, são preparadas todas as soluções, nomeadamente fluido salivar simulado, (SSF), fluido gástrico simulado (SGF) e fluido intestinal simulado (SIF). Estas soluções são misturas de soluções de sais preparadas previamente, de acordo com as quantidades descritas na Tabela 1. Antes dos ensaios, o pH das soluções é verificado para garantir que a solução está apta para usar com um medidor de pH (Mettler Toledo, EUA).

Tabela 1- Soluções salinas, concentrações e quantidades necessárias para fazer as soluções simulantes de fluido gástrico e intestinal.

	<b>SSF (pH 7)</b>	<b>SGF (pH 3)</b>	<b>SIF (pH 7)</b>
Solução Salina	Concentração final	Concentração final	Concentração final
	mmol·L <sup>-1</sup>	mmol·L <sup>-1</sup>	mmol·L <sup>-1</sup>
<b>KCl</b>	15.1	6.9	6.8
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	3.7	0.9	0.8
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	13.6	25	85
<b>NaCl</b>	-	47.2	38.4
<b>MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)</b>	0.15	0.12	0.33
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	0.06	0.5	-
<b>HCL</b>	1.1	15.6	8.4

Para o avaliar a viabilidade do probiótico em forma livre e encapsulada, é pesada 1 g de amostra e colocada em tubo falcon. Além disso, testou-se também a viabilidade de probiótico em forma vegetativa, após o crescimento do mesmo em meio líquido, suspendendo o probiótico comercial em 250 mL de meio, como descrito no ponto 3 desta secção e deixado em incubação durante 48 horas. Para recuperar a biomassa, após este período, o conteúdo é vertido para um tubo falcon e centrifugado a 9000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante é completamente removido e o *pellet* é ressuspendido em 1 ml PBS.

O tubo é então colocado num banho seco (Eppendorf, Alemanha) previamente aquecido a 37°C para os ensaios de digestão. Os ensaios estão divididos em 3 fases consecutivas, todas elas sob agitação moderada para garantir a homogeneidade do conteúdo de cada tubo (Figura 10). A primeira etapa, a fase oral, tem a duração de 2 minutos, enquanto as fases gástrica e intestinal têm a duração de 120 minutos.

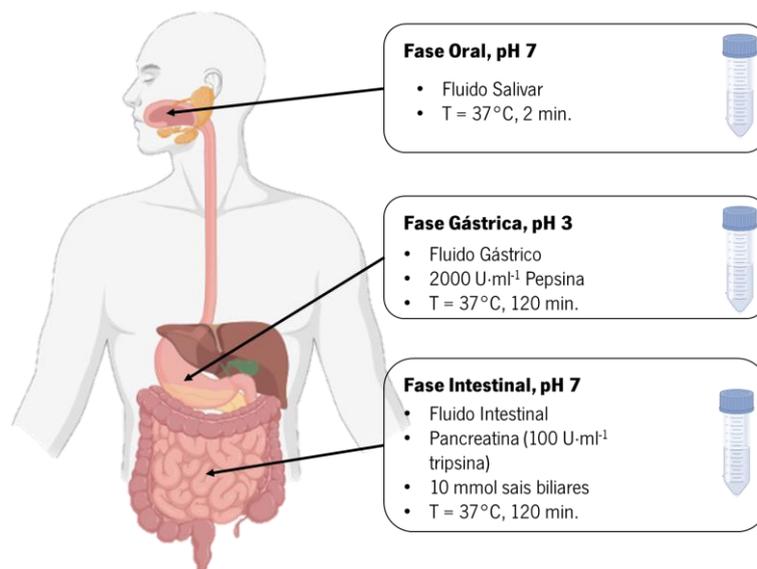


Figura 10 - Esquema da digestão *in vitro* descrita pelo protocolo do INFOGEST

### 6.1. Fase oral

A fase oral consiste em adicionar à amostra 0.8 ml de SSF, ajustar a concentração de CaCl<sub>2</sub> para 1.5 mmol·L<sup>-1</sup> usando uma solução de 0.3M CaCl<sub>2</sub> e ajustar o volume total para 2 ml usando água Milli-Q.

### 6.2. Fase Gástrica

A fase gástrica consiste em adicionar à amostra 1.6 ml de SGF, e ajustar o pH a 3.0 usando HCL 1M. Para evitar contaminação externa com o elétron de pH, foram usadas fitas de medição de pH. A concentração de CaCl<sub>2</sub> é ajustada a 0.15 mmol·L<sup>-1</sup> e de seguida é adicionada solução de pepsina, preparada adicionando pepsina comercial (*pepsin from porcine gastric mucosa* ≥2500 units/mg, Sigma-Aldrich, EUA) a água Milli-Q, para uma atividade final na mistura de 2.000 U·mL<sup>-1</sup>.

No fim da fase gástrica, são retiradas amostras de 0.5 ml para plaquear e posterior contagem de colónias

### 6.3. Fase Intestinal

Antes desta fase são preparados 2 reagentes necessários a solução de pancreatina e de sais biliares. A solução de sais biliares, é preparada adicionando sais biliares comerciais (*bile bovine*, Sigma-Aldrich, EUA) a SIF e misturando até total dissolução. A solução de pancreatina é preparada adicionando pancreatina comercial (*Pancreatin from porcine pancreas*, Sigma-Aldrich, EUA) a SIF. Esta solução é ultrassonicada durante 5 minutos e posteriormente centrifugada durante 5 minutos a 3000 RPM. Para os ensaios, é apenas usado o sobrenadante.

Para dar início à fase intestinal, são adicionados 1.5 ml de SIF e o pH é ajustado a 7.0 com solução de NaOH 1M. É adicionada a solução de sais biliares até uma concentração final de 10 mmol·L<sup>-1</sup> na mistura, seguido de um ajuste da concentração de CaCl<sub>2</sub> para 0.6 mmol·L<sup>-1</sup>. A solução de pancreatina é adicionada até uma atividade final de tripsina de 100 U·mL<sup>-1</sup> e o pH é ajustado a 7.0 se necessário. Após 2 horas, são retiradas amostras de 0.5 ml mais uma vez para plaquear.

## 7. Testes de inibição da enzima $\alpha$ -glucosidase

Os testes de inibição da enzima  $\alpha$ -glucosidase foram feitos com um *kit* para o efeito (PromoCell, Alemanha). Todos os procedimentos foram feitos de acordo com o protocolo sugerido pelo fornecedor.

As amostras [S] retiradas às 4, 12 e 24 horas de crescimento do probiótico em meios TGY e MRS suplementado com FOS 1% foram diluídas 10 vezes com a solução tampão do *kit*, assim como a Acarbose [IC], um composto com conhecida atividade inibitória da  $\alpha$ -glucosidase, que irá servir como controlo positivo. Foram preparados ainda poços com controlos da enzima [EC], solvente [SC] e branco [BC]. Nos poços [S] e [IC] foram colocados 10  $\mu$ l de cada uma das soluções respetivas. Nos poços [EC] e [BC] foi adicionado 10 e 20  $\mu$ l de solução tampão, respetivamente.

A solução de  $\alpha$ -glucosidase foi preparada diluindo a solução stock da enzima em solução tampão 20 vezes. Aos poços [S], [IC], [EC] e [SC] foram adicionados 10  $\mu$ l desta solução de enzima diluída, sendo o volume de todos os poços ajustado a 80  $\mu$ l com a solução tampão. A mistura é posta a repousar durante 20 minutos, protegida da luz e sob leve agitação.

A solução de substrato é diluída 15 vezes, e 20 µl são adicionados a todos os poços. A placa é imediatamente colocada no leitor de placas, de forma a registar a absorvância a 410nm durante uma hora, fazendo medições a cada minuto.

### **III. Resultados e Discussão**

#### **1. Escolha da melhor combinação meio *versus* prebiótico**

A seleção da melhor combinação meio *versus* prebiótico foi levada a cabo tendo parâmetros como a capacidade do *Bacillus coagulans* utilizar o prebiótico como fonte de carbono, o crescimento máximo e a latência de crescimento.

Para a seleção da melhor combinação foram selecionados dois meios e quatro dos prebióticos mais comumente utilizados na literatura, FOS, Inulina, Fibrulina e Pectina.

Numa microplaca de 96 poços foram colocados os meios com a quantidade de fonte de carbono escolhida e inoculados com 2% de pré-inoculo. Cada formulação de meio de cultura foi produzida 2 vezes, realizando 3 repetições em cada um para a obtenção das curvas de crescimento. Além disso, foram feitos ensaios de controlo, em que foi usado meio não inoculado, com o objetivo de perceber o efeito nas curvas de crescimento na ausência da variabilidade conferida pelo meio.

De forma a avaliar o efeito da concentração da fonte de carbono substituinte no crescimento dos microrganismos, foram selecionadas as concentrações de 1 e 2%, por serem os valores utilizados pelo grupo em trabalhos similares. Posteriormente, foi realizado um ajuste às curvas de crescimento, tendo por base a equação de Gompertz modificada por Zwietering [120] (Equação 1):

$$OD = OD_{max} \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{\mu \cdot e}{OD_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

Onde  $OD_{max}$  é a absorvância máxima, ou o ponto de maior densidade de células,  $\mu$  é a taxa de crescimento máximo,  $\lambda$  corresponde ao tempo de latência de crescimento e  $t$  ao tempo de crescimento.

##### **1.1. Substituição da fonte de carbono por Frutooligossacáridos (FOS)**

Numa primeira abordagem tivemos como objetivo a comparação do crescimento da espécie na presença de dextrose e de FOS. Começamos por avaliarmos o crescimento da *Bacillus*

*coagulans* em TGY e MRS sem qualquer substituição de forma a definir o comportamento base da curva de crescimento.

Na figura 11 **A** está representado o crescimento da bactéria em TGY com dextrose 1 e 2%, observa-se que a curva apresenta um formato expectável com todas as fases de crescimento bem definidas. Além disso, a fase exponencial é mais acentuada na presença de uma concentração superior de dextrose, tal como era expectável, pois tem disponível uma maior quantidade de fonte de carbono. Relativamente ao crescimento em MRS, figura 11 **B**, o crescimento também apresenta um comportamento típico, no entanto, o estudo foi realizado com a formulação típica de MRS, que por si só já contém 2% dextrose e por essa razão não foi realizado o ensaio com 1% de fonte de carbono. É de notar que o crescimento de *Bacillus coagulans* em MRS dava origem a meios mais túrbidos que o normal; apesar de não existir qualquer incompatibilidade entre o meio de cultura e a espécie descritas na literatura, todas as experiências de contagens resultavam em colónias muito difusas, impossibilitando a contagem.

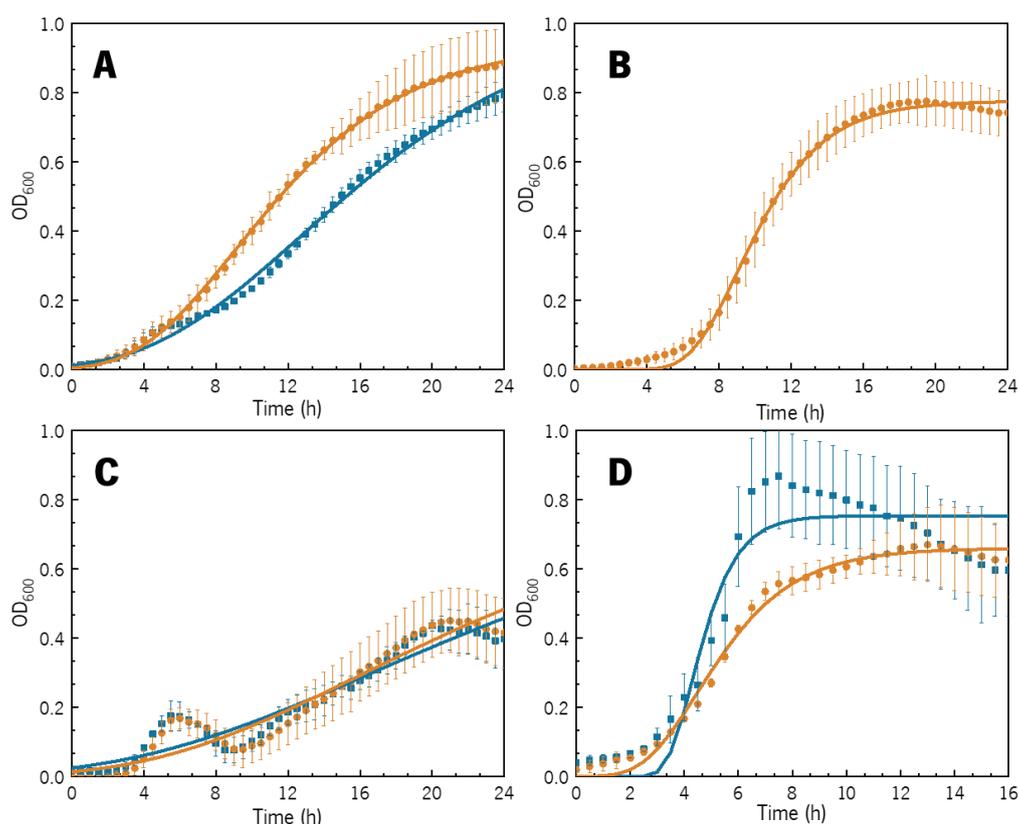


Figura 11- Curvas de crescimento bacteriano e respetivo ajuste: A) TGY Dextrose; B) MRS; C) TGY FOS e D) MRS FOS. Curvas a azul representam 1% fonte de carbono, a laranja 2% fonte de carbono.

A substituição da dextrose por FOS no meio TGY resultou numa curva de crescimento com um comportamento atípico, figura 11 **C**, com a presença de duas fases exponenciais distintas. Este comportamento pode ser explicado pelo facto de o FOS utilizado durante os estudos apresentar 90% de grau de pureza, o que significa existe uma percentagem de monossacáridos presente no reagente. Durante o crescimento a espécie dá prioridade à metabolização dos açúcares simples, e apenas quando esta se esgota, utiliza o FOS como fonte de energia. Esta adaptação caracteriza-se pela diminuição da população e consequente subida assim que a espécie começa a utilizar a fonte de carbono alternativa. Dados de literatura [121] descrevem o uso de *Bacillus coagulans* para a purificação de extratos de FOS naturais devido à sua capacidade de consumir seletivamente monossacáridos presentes em solução. Por outro lado, o crescimento em MRS/FOS (figura 11, **D**) apresenta um comportamento típico o que pode ser explicado pelo facto deste meio ser mais complexo do que o TGY, havendo fontes de carbono alternativas assim como fontes de azoto, como a peptona, extratos de leveduras e carne, que a espécie consegue utilizar, não havendo necessidade de uma adaptação tão drástica como a observada em TGY/FOS.

Verifica-se ainda que em MRS/FOS existe um crescimento aparentemente superior com 1% de FOS quando comparado com 2% de FOS, mas dado o desvio padrão dos dados apresentados, é impossível perceber se existe de facto um crescimento superior.

De uma forma geral, foi possível comprovar que esta espécie tem a capacidade de utilizar o FOS como fonte de carbono durante o crescimento, provando a sua adequabilidade para o fim proposto.

## **1.2. Substituição da fonte de carbono por pectina**

A introdução de outro polissacarídeo, neste caso a pectina, descrita como uma fibra prebiótica, foi uma outra abordagem testada neste trabalho, por forma a avaliar o seu efeito no crescimento da espécie. Na figura 12, está representado o crescimento do *Bacillus coagulans* em MRS com 1 e 2% de pectina assim como o ajuste efetuado. No entanto, tanto este estudo como com a utilização de TGY com pectina (não representado) foram descartados devido a problemas na dissolução do prebiótico nos meios de cultura, o que pode influenciar drasticamente os resultados pois são adquiridos por turbidimetria.

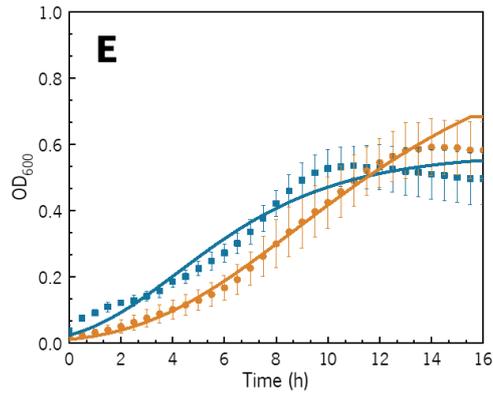


Figura 12 -Curva de crescimento bacteriano e respetivo ajuste E) MRS - Pectina; Curvas a azul representam 1% fonte de carbono, a laranja 2% fonte de carbono

### 1.3.Substituição da fonte de carbono por Fibrulina e Inulina

Por fim, a última abordagem estudada consistiu na substituição da fonte de carbono por fibrulina, figura 13, **F e G** e por inulina, figura 13, **H e I**. Aquando da utilização do meio de cultura TGY, existe um comportamento atípico, havendo uma fase de declínio que precede uma segunda fase exponencial. A explicação para o sucedido aqui é a mesma que no caso anterior, uma vez que o processo de extração do prebiótico leva à presença de monossacáridos na mistura.

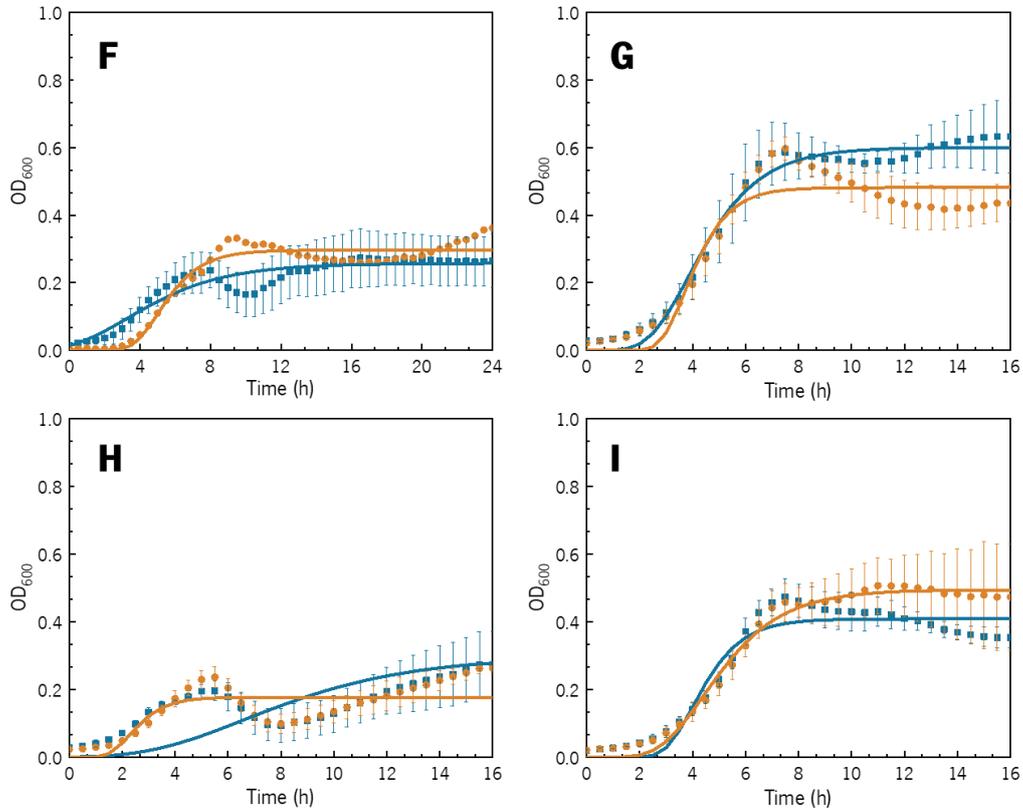


Figura 13 - Curvas de crescimento bacteriano e respetivo ajuste: F) TGY fibrulina; G) MRS fibrulina; H) TGY inulina; I) MRS inulina. Curvas a azul representam 1% fonte de carbono, a laranja 2% fonte de carbono.

Relativamente ao crescimento, o ponto máximo de crescimento foi bastante inferior comparativamente aos restantes apresentados neste trabalho, justificado por uma fase exponencial de curta duração comparativamente com as outras curvas apresentadas neste trabalho. Além disso, o crescimento em MRS apresenta uma fase de decaimento a um tempo menor, quando comparado com os restantes meios e fontes de carbono.

#### 1.4. Análise dos parâmetros do ajuste de cada um dos meios de cultura

O estudo da composição do meio de cultura foi avaliado, nomeadamente a escolha do prebiótico e a sua concentração com base nos parâmetros obtidos dos ajustes realizados, Tabela 2. A decisão foi tomada tendo em vista valores de  $OD_{max}$  e  $\mu_{max}$  o mais elevados possível em conjunto com valor de  $\lambda$  (Latência) o mais baixo possível. Por fim, o  $r^2$  serve apenas para verificar a proximidade do ajuste do modelo aos valores reais.

Tabela 2 - Dados obtidos do ajuste das curvas de crescimento obtidas com a substituição da fonte de carbono

<b>Meio e Fonte de Carbono</b>	<b><math>OD_{max}</math></b>	<b><math>\mu_{max}</math></b>	<b><math>\lambda</math></b>	<b><math>r^2</math></b>
<b>MRS</b>	0.776	0.109	6.433	0.9977
<b>TGY Dextrose 1%</b>	1.054	0.046	4.380	0.9963
<b>TGY Dextrose 2%</b>	0.949	0.065	3.749	0.9995
<b>TGY FOS 1%</b>	0.814	0.023	3.355	0.9208
<b>TGY FOS 2%</b>	0.791	0.026	4.584	0.9287
<b>MRS FOS 1%</b>	0.754	0.301	3.376	0.9294
<b>MRS FOS 2%</b>	0.660	0.123	2.519	0.9937
<b>TGY Fibrulina 1%</b>	0.257	0.030	0.176	0.9010
<b>TGY Fibrulina 2%</b>	0.296	0.079	3.643	0.9508
<b>MRS Fibrulina 1%</b>	0.600	0.148	2.368	0.9859
<b>MRS Fibrulina 2%</b>	0.481	0.196	2.825	0.9233
<b>TGY Inulina 1%</b>	0.300	0.031	3.000	<b>0.4990</b>
<b>TGY Inulina 2%</b>	0.178	0.088	1.526	<b>0.6026</b>
<b>MRS Inulina 1%</b>	0.409	0.146	2.985	0.9491
<b>MRS Inulina 2%</b>	0.495	0.111	2.778	0.9911

O crescimento realizado com MRS e com TGY Dextrose 1 e 2% são apresentados como meio referência, uma vez que a dextrose é a fonte de carbono normalmente presente nestes meios de cultura.

Como é possível observar pelos ajustes apresentados nas figuras 11, 12 e 13, vários meios de cultura apresentaram desvios a um crescimento com um comportamento típico o que levou a um  $r^2$  muito longe do ideal. No caso dos meios TGY/inulina e TGY/fibrulina, estes apresentavam um valor de  $r^2$  muito baixo e é possível observar que o crescimento nestes meios é bastante inferior comparando com os restantes realizados durante este estudo. De uma forma geral, a literatura descreve, com espécies isoladas [83] ou com uma mistura de espécies [84], que polissacáridos com cadeias mais longas, como é o caso da inulina e da fibrulina, implicam um maior esforço para serem usadas como fonte de carbono. Dado que o objetivo seria aumentar de forma substancial a quantidade de probiótico no intestino num curto espaço de tempo, eliminamos este prebiótico.

No caso do crescimento com FOS, tanto em TGY como em MRS, é possível observar uma redução da fase de latência, mais claramente presente no crescimento em MRS e ODmax elevados tanto em MRS como em TGY. Apesar do ajuste apresentar valores de  $r^2$  longe do ideal e da incerteza ser bastante significativa, decidimos escolher este prebiótico para os testes futuros.

De uma forma geral, todos os meios com TGY na sua constituição apresentaram um valor de crescimento máximo inferior comparativamente aos de MRS. No entanto, devido à simplicidade do meio TGY, este é mais adequado para uma potencial aplicação industrial; adicionalmente, a presença de duas fases exponenciais distintas no crescimento é algo que tínhamos interesse em estudar.

Desta forma, ambos os meios suplementados com FOS foram utilizados para ensaios de deteção de atividade antidiabética, descritos numa secção posterior.

## **2. Ensaios de encapsulação**

O passo seguinte neste estudo consistiu na encapsulação do probiótico usando na constituição da nanopartícula o prebiótico (FOS) anteriormente selecionado. Os materiais foram escolhidos para a formulação das cápsulas com base nos mais mencionados em literatura para aplicações similares, sendo escolhida uma concentração de 1% de alginato, 2.5% proteína de soro desnaturada, 0% e 1% de FOS. A proteína do soro é uma proteína globular e o processo de

desnaturação resulta numa alteração estrutural e das suas propriedades, expondo os grupos hidrofóbicos e favorecendo o aparecimento de ligações covalentes S-S. Estas mudanças resultam num melhoramento das suas propriedades mecânicas, tornando este material mais apropriado para encapsulação e proteção de probióticos [101]. Pelas razões acima mencionadas, e apesar da abordagem mais comum na literatura ser a utilização da proteína de soro sem tratamento prévio, neste trabalho foi utilizada proteína do soro desnaturada.

### **2.1. Efeito da velocidade de fluxo e corrente**

O próximo passo do desenho experimental passou por definir os parâmetros do encapsulador, de forma a encontrar os parâmetros ideais para a encapsulação. Dos vários parâmetros associados a este processo, começamos por estudar o efeito da velocidade de fluxo e da corrente aplicada às partículas no processo de encapsulação.

Ambos estes parâmetros foram estudados de forma empírica, sem confirmação dos resultados posteriormente por via de imagens microscópicas. A velocidade de fluxo definida como inicial nos estudos foi a recomendada pelo fabricante do aparelho para o *nozzle* escolhido, 1,5 ml·min<sup>-1</sup>. Com este valor selecionado era impossível obter um fluxo estável, devido a um defeito pré-existente no motor do aparelho, aliado à viscosidade da solução utilizada. Um fluxo instável dá origem a partículas altamente irregulares, pelo que quaisquer valores que produzissem instabilidade no fluxo eram descartados imediatamente. Todos os valores inferiores a 2.3 ml·min<sup>-1</sup> originavam incoerências no fluxo, e mesmo este valor aparentava colocar grande esforço no aparelho, devido à viscosidade do fluido; desta forma, este foi o valor escolhido, tomando sempre precauções de forma a não danificar o aparelho.

A corrente aplicada às partículas tem como objetivo separá-las durante o seu percurso até à solução gelificante. Desta forma a corrente era aumentada de forma controlada até ser possível ver um cone de separação, e este valor fixado durante o resto das experiências.

### **2.2. Efeito da vibração do *Nozzle***

A frequência de vibração do *nozzle* foi um dos parâmetros estudados no processo de encapsulação com o objetivo de avaliar qual o seu efeito no tamanho das cápsulas e na homogeneidade das mesmas. Na figura 14 (**A a D**) é possível observar imagens microscópicas das cápsulas obtidas com valores de frequências de vibrações de *nozzle* crescentes. -Na figura 14 **A**, é possível observar as cápsulas obtidas com a frequência de vibração de 1000 Hz, estas

apresentam uma grande heterogeneidade de tamanhos e de formatos, sendo que o formato de gota é o mais comum. O aumento para 1800Hz, figura 14 **B**, revelou não ser suficiente para corrigir qualquer um dos parâmetros acima referidos. Ao aumentar a frequência de vibração para 2000 Hz, figura 14 **C**, é possível perceber que, apesar do formato de gota ainda estar presente em algumas cápsulas, o tamanho destas diminuiu significativamente comparativamente com os ensaios anteriores. Por fim, foi utilizada a frequência máxima permitida pelo equipamento (2200 Hz), dando origem a cápsulas com um tamanho muito mais homogêneo, com um aspeto esférico. A falta de homogeneidade e o desvio do formato redondo das cápsulas obtidas, deve-se ao facto do motor que empurra o embolo da seringa ter alguns defeitos de funcionamento, o que leva a que pare em períodos aleatórios, resultando em cápsulas disformes.

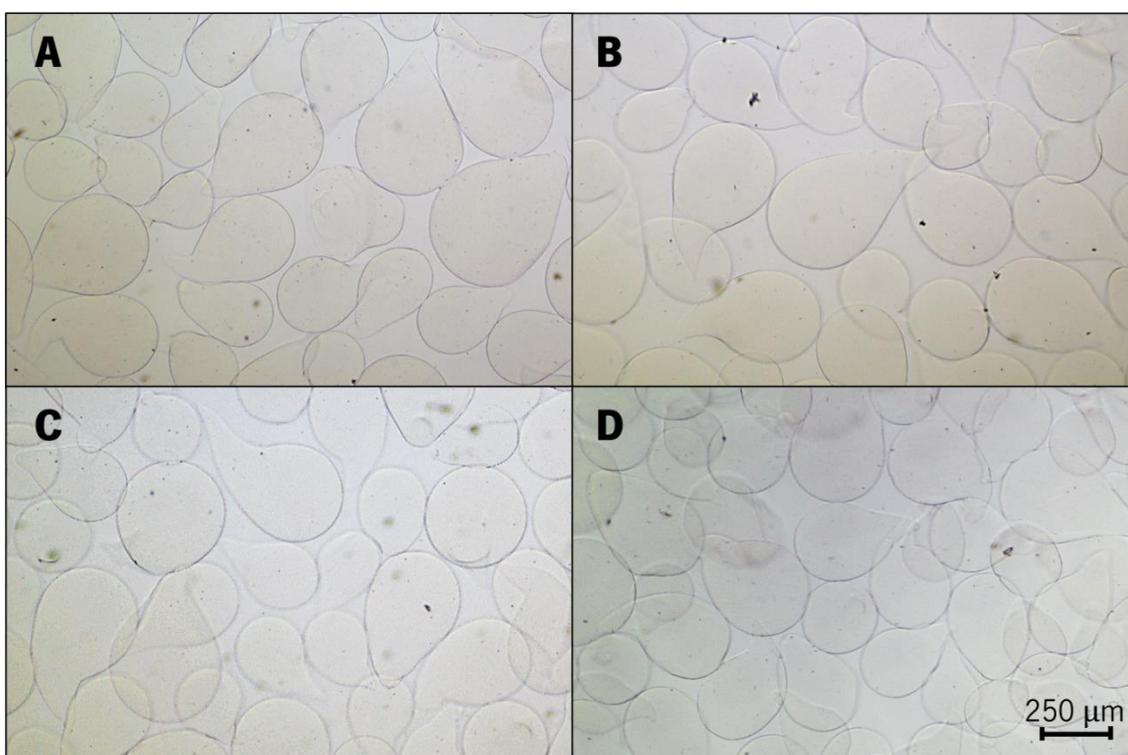


Figura 14 - Imagens de microscopia (*Nikon Ni-E Upright Microscope*, Japão) obtidas com a objetiva 5x das cápsulas produzidas. Todos os parâmetros foram fixados à exceção da frequência, sendo que: A) 1000 Hz; B) 1800 Hz; C) 2000 Hz D) 2200 Hz.

### **2.3. Tamanho e homogeneidade das partículas**

Além das conclusões empíricas retiradas pelas imagens de microscopia, foram ainda feitas medições de forma a calcular o índice de polidispersividade (PDI) das cápsulas, dada pela equação:

$$PDI = \left( \frac{\sigma}{D_p} \right)^2 \quad (2)$$

Onde  $\sigma$  representa o desvio padrão das medições e  $D_p$  representa a média do diâmetro das partículas. Este índice representa a homogeneidade das partículas, sendo que índices de 0.1 são característicos de populações homogêneas, enquanto que índices mais elevados representam populações mais polidispersas [122]. Na figura 15 estão representados os diâmetros de partículas em função da frequência de vibração do *nozzle*.

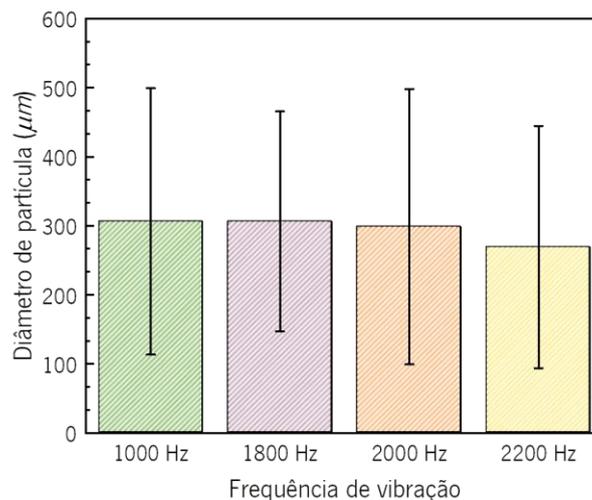


Figura 15- Influência da frequência de vibração do *nozzle* no diâmetro de partícula

Os resultados descritos para os diâmetros de partículas foram baseados numa população de 100 medições. É possível verificar que uma diferença significativa entre frequências de vibração não traduz um diâmetro de partícula inferior. Aplicando a equação 2 aos valores das medições é possível obter os valores de PDI de  $0.40 \pm 0.18$ ,  $0.27 \pm 0.16$ ,  $0.45 \pm 0.20$  e  $0.42 \pm 0.05$  para as frequências de 1000, 1800, 2000 e 2200 Hz respetivamente. Com base nestes resultados a escolha lógica seria selecionar a frequência de 1800 Hz para os ensaios de encapsulação, uma vez que este apresenta o PDI mais baixo. No entanto, é necessário ter em conta as imagens obtidas por microscopia, figura 14; o formato de “gota de água” predominante nos ensaios com as frequências de 1000, 1800 e 2000 Hz é algo que procuramos evitar. Em conclusão, decidimos avançar com uma frequência de vibração de 2200 Hz uma vez que este foi o valor que produziu as cápsulas com o formato mais perto do esférico que procurávamos.

### 3. Eficiência de encapsulação

A encapsulação do probiótico teve como objetivo garantir a sobrevivência dos probióticos ao processo digestivo a que estes estarão expostos em condições próximas das reais. Para a contagem das CFUs iniciais, a solução de esporos é plaqueada após a filtração e diluições seriadas adequadas. Depois do processo de encapsulação, uma massa conhecida de cápsulas é colocada numa solução de PBS a pH 7 onde as cápsulas se dissolvem completamente ao fim de 30 minutos, permitindo assim a contagem das CFUs. Na figura 16 estão representados os valores de CFU antes e depois do processo de encapsulação para três concentrações diferentes de esporos. É possível observar que o valor de CFU iniciais, após filtração, aumenta da concentração de 0.2 para 0.4 esporos por mL, no entanto, quando estamos perante um aumento superior a 50 % de esporos por mL (0.4 para 1) o valor de CFU iniciais são idênticos.

Durante o processo de filtração, a solução mais concentrada requeria significativamente mais esforço para ser filtrada, e após este processo a solução era idêntica, a olho nu (solução acastanhada), à solução de concentração antecedente.

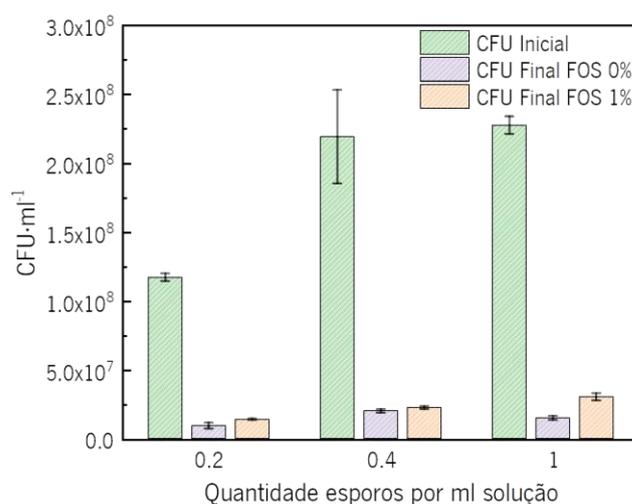


Figura 16 – Unidades formadoras de colônias de *Bacillus coagulans* por ml de solução polimérica, antes e depois do processo de encapsulação

No estudo da eficiência de encapsulação optou-se também por estudar o possível efeito da presença/ausência de FOS na formulação das cápsulas. Tal como é possível aferir com base na tabela 3, a incorporação de FOS como um constituinte não teve qualquer influência na eficiência de encapsulação do *Bacillus coagulans*, que foi sempre superior ao 85%-

Esta avaliação permitiu afirmar que, a maior eficiência de encapsulação foi obtida aquando do uso de 1 g de esporos por ml de solução polimérica.

Tabela 3 - Eficiência de encapsulação em função da quantidade de probiótico inicial e quantidade de FOS presente nas cápsulas

	<b>0.2</b>	<b>0.4</b>	<b>1</b>
<b>FOS 0%</b>	86.5 %±3.2%	87.6 %±2.0%	85.9 %±1.9%
<b>FOS 1%</b>	88.6 %±1.8%	88.2 %±3.1%	89.5 %±1.6%

#### **4. Viabilidade após digestão**

A viabilidade do *Bacillus coagulans* durante o seu percurso no trato gastrointestinal é um parâmetro muito relevante para a sua aplicação. De forma a avaliar a viabilidade das células durante o percurso no trato gastrointestinal, foram feitos testes de digestão simulada *in vitro*.

Para a realização dos testes de digestão, uma quantidade fixa de esporos, cápsulas com 0% e 1% de FOS e células no estado vegetativo foram submetidas ao processo de digestão utilizando soluções simuladoras de fluido salivar, gástrico e intestinal como descrito previamente. Este estudo permitiu averiguar a sobrevivência das células no seu estado mais vulnerável (células no estado vegetativo), da resistência dos esporos e da proteção adicional conferida pelo processo de encapsulação. Entre cada uma das fases da digestão foram retiradas amostras para plaquear, após respetivas diluições seriadas, tendo o cuidado de manter as condições estéreis sempre que possível. Por forma a garantir que a viabilidade dos probióticos não era afetada para além da inerente ao processo de digestão, nas fases de pH ácido, após a retirada dos mesmos o pH era neutralizado imediatamente.

Após recolhidas as amostras, estas foram colocadas em PBS durante algum tempo para permitir que as cápsulas sejam totalmente dissolvidas.

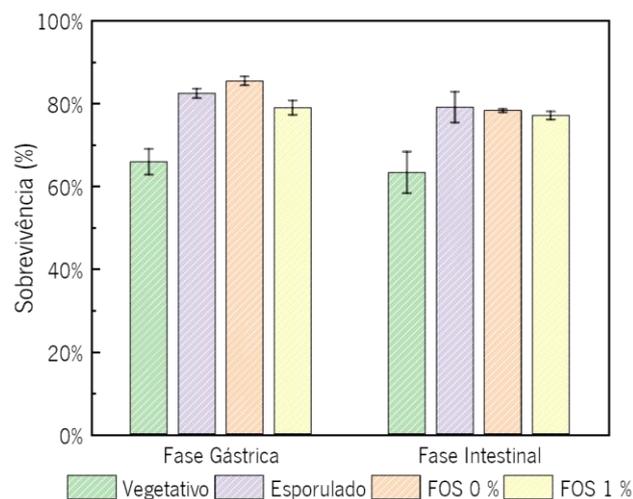


Figura 17 - Viabilidade das células em estado vegetativo, encapsuladas e esporos de *Bacillus coagulans* durante as fases de digestão.

Na figura 17, estão representados os resultados da viabilidade em função das duas fases da digestão. Como esperado, é possível verificar que as células em estado vegetativo apresentam a sobrevivência mais baixa de todas, seguidas dos esporos durante a fase gástrica. Dado que os esporos são um dos mecanismos de defesa desta espécie para enfrentar ambientes hostis e assim promover a sua sobrevivência isto era expectável. No entanto, as cápsulas sem FOS apresentaram uma sobrevivência superior às suas contrapartes com FOS o que não era esperado, dada a natureza não digerível destas fibras. É possível que ao incluir FOS na formulação das cápsulas, a malha polimérica criada pelo alginato seja interrompida, levando a uma maior permeabilidade por parte do ácido.

Relativamente à fase intestinal, as células em estado vegetativo continuam com a sobrevivência mais baixa, mas os esporos aparentam ter a mesma sobrevivência ao processo digestivo que as células encapsuladas. Os resultados aqui apresentados levam a crer que a encapsulação de células livres não apresenta vantagens comparativamente à inclusão de esporos da mesma espécie em alimentos, no que toca à sua sobrevivência ao processo de digestão. No entanto, isto não implica que a encapsulação seja um processo desnecessário; a sobrevivência de uma quantidade elevada de probiótico durante o processo de armazenamento e/ou processamento em alimentos não foi averiguada neste trabalho e será pertinente fazê-lo no futuro.

Na figura 18 estão representadas as cápsulas durante o processo de digestão. Durante a fase gástrica, **B**, as cápsulas contraem-se levemente sob a ação do pH reduzido, mas é possível

ver que as cápsulas se mantêm intactas. No final do processo de digestão, **C**, as cápsulas expandem ligeiramente, e é possível observar que perdem integridade física pelo esbatimento das bordas.

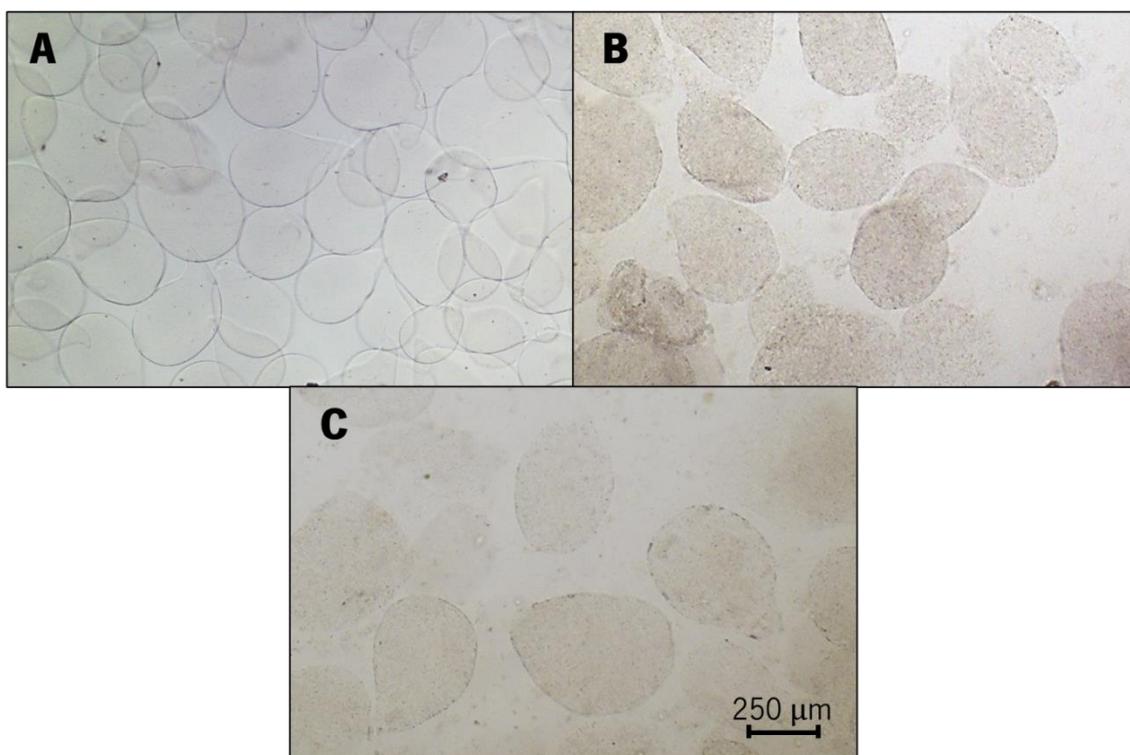


Figura 18 - Influência das diferentes fases da digestão no aspeto das cápsulas: A) Antes da digestão; B) Após 2h de fase gástrica; C) Após 2h de fase intestinal.

## 5. Testes de inibição da $\alpha$ -glucosidase

De forma a avaliar a presença de substâncias inibidoras da  $\alpha$ -glucosidase no meio de cultura do probiótico crescido em presença do prebiótico FOS, foi usado um *kit* para o mesmo efeito. A uma microplaca de 96 poços adicionaram-se amostras retiradas de pontos pré-definidos da curva de crescimento de *Bacillus coagulans* em TGY FOS 1% e MRS FOS 1%. Após diluições apropriadas como descritas no *kit*, é adicionada a  $\alpha$ -glucosidase e o substrato que liberta um cromóforo assim que é decomposto pela enzima. O cálculo da percentagem de inibição é feito de acordo com a Equação 2:

$$\% \text{ Inibição relativa} = \frac{\text{Declive de } [EC] - \text{Declive de } [S]}{\text{Declive de } [EC]} \times 100 \quad (3)$$

A resposta inibitória é obtida em função da diferença da absorvância registada a 410 nm, comparativamente à ação da enzima sem qualquer interferência, figura 19.

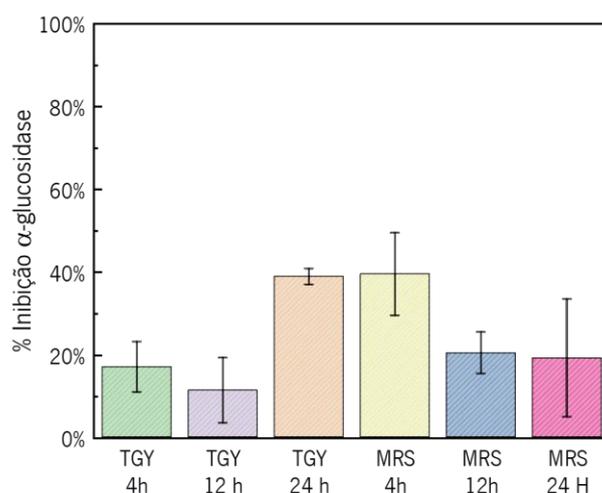


Figura 19 - Resposta inibitória da  $\alpha$ -glucosidase em diferentes pontos da curva de crescimento de *Bacillus coagulans*.

Para os testes foram escolhidos os pontos de crescimento relevantes, nomeadamente, as fases exponenciais anómalas identificadas na figura 11, **C** às 4, 12 e 24 horas de crescimento. Para a comparação de resposta inibitória foram escolhidas as mesmas condições de crescimento usando o MRS como meio de cultura, figura 11, **D**.

Relativamente aos dois primeiros pontos de crescimento em TGY FOS 1%, o probiótico apresenta atividade inibitória inferior a 20%, no entanto, na fase de decaimento, observa-se uma atividade superior a 40%. O contrário acontece com o crescimento em MRS FOS 1%, uma vez que a atividade inibitória é expressa na fase exponencial e decai durante o resto do crescimento. Com este estudo foi possível comprovar a presença de atividade inibitória da  $\alpha$ -glucosidase na fase terminal do crescimento em TGY e na fase inicial do crescimento em MRS quando ambos os meios são suplementados com FOS.

Apesar de existirem estudos que demonstram que algumas espécies de *Bacillus* [123] apresentam atividade inibitória de 91.5% e que até algumas estirpes de *Bacillus coagulans* [124] podem expressar elevadas atividades inibitórias. Este último caso, no entanto, apresenta-se apenas para uma estirpe que foi seletivamente mutada para o efeito.

#### **IV. Conclusão e Trabalho futuro**

A obesidade é uma condição caracterizada pelo excesso de massa corporal e pelo acumular de gordura excessiva, apresentando um risco para a saúde. É uma condição extremamente comum que promove o aparecimento de doenças responsáveis por milhões de mortes todos os anos. Esta condição normalmente é causada por uma alimentação pouco saudável rica em gorduras e açúcares que além da obesidade podem causar uma falta de equilíbrio na microbiota intestinal, também conhecido por disbiose. Esta condição está associada com a diminuição da proteção da barreira intestinal, aumento da inflamação gastrointestinal e endotoxemia metabólica. Além da disbiose, a obesidade também é responsável pelo aparecimento da diabetes, mais precisamente a diabetes do tipo 2, caracterizada pela resistência à insulina, levando à hiperglicemia.

Numa primeira parte, este trabalho focou-se no crescimento e cultura de uma espécie probiótica, *Bacillus coagulans*, num meio de cultura suplementado com uma fibra prebiótica, de forma a estudar a influência de diferentes meios e prebióticos no crescimento. Após este estudo, o próximo passo foi proteger o probiótico para eventuais condições de processamento/armazenamento e garantir que uma quantidade suficiente de células vivas chega ao intestino. Para isso uma formulação polimérica com prebiótico foi utilizada para sintetizar cápsulas.

Estas cápsulas foram sujeitas a testes de viabilidade durante o processo de digestão demonstrando que este processo é benéfico quando comparado com a digestão de células livres.

Finalmente, foram feitos testes de inibição da enzima  $\alpha$ -glucosidase nos quais foi possível detetar a presença de alguma atividade inibitória, revelando o potencial deste simbiótico para a modulação do metabolismo dos hidratos de carbono na dieta.

Apesar dos constrangimentos temporais e não só, incitados pela situação global de pandemia, grande parte do planeamento experimental foi cumprido, no entanto, certos detalhes ficaram aquém do planeado. O próximo passo seria testar o efeito do simbiótico desenvolvido neste trabalho na expressão de substâncias saciantes como é o caso da colecistoquinina (CCK), testar a biocompatibilidade das cápsulas *in vitro* e fazer um estudo mais detalhado da viabilidade das cápsulas quando expostas a matrizes alimentares durante longos períodos de armazenamento.

O trabalho desenvolvido durante esta tese mostra o potencial da encapsulação para a proteção de espécies probióticas, e as possibilidades que esta proteção oferece no que toca à saúde gastrointestinal do indivíduo. Além disto, a encapsulação demonstra grande potencial no que toca à libertação controlada de compostos no organismo.

## Referências bibliográficas

1. Organization, W.H. *Obesity and overweight*. 2020 1-04 [cited 2021 01-03]; Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
2. Chooi, Y.C., C. Ding, and F. Magkos, *The epidemiology of obesity*. *Metabolism*, 2019. **92**: p. 6-10.
3. Elagizi, A., et al., *An Overview and Update on Obesity and the Obesity Paradox in Cardiovascular Diseases*. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 2018. **61**(2): p. 142-150.
4. Federation, W.O. *Prevalence of Obesity*. 2020 [cited 2021 03-03]; Available from: <https://www.worldobesity.org/about/about-obesity/prevalence-of-obesity>.
5. Juul, F., et al., *Ultra-processed food consumption among US adults from 2001 to 2018*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2022. **115**(1): p. 211-221.
6. Arroyo, P.E., J. Liñan, and J.V. Martínez, *Who really values healthy food?* *British Food Journal*, 2020.
7. Church, T. and C.K. Martin, *The obesity epidemic: a consequence of reduced energy expenditure and the uncoupling of energy intake?* *Obesity*, 2018. **26**(1): p. 14-16.
8. Organization, W.H. *Global Health Observatory - Body Mass Index (BMI) data*. 2021 [cited 2021 05-03]; Available from: [https://www.who.int/data/gho/data/themes/theme-details/GHO/body-mass-index-\(bmi\)](https://www.who.int/data/gho/data/themes/theme-details/GHO/body-mass-index-(bmi)).
9. Oxlund, C.S., et al., *Body mass index, intensive blood pressure management, and cardiovascular events in the SPRINT Trial*. *The American journal of medicine*, 2019. **132**(7): p. 840-846.
10. Riis, J., et al., *Secular trends in risk of stroke according to body mass index and blood pressure, 1976–2017*. *Neurology*, 2019. **93**(14): p. e1397-e1407.
11. McTigue, K.M., et al., *Severe obesity, heart disease, and death among white, African American, and Hispanic postmenopausal women*. *Obesity*, 2014. **22**(3): p. 801-810.
12. Burke, G.L., et al., *The impact of obesity on cardiovascular disease risk factors and subclinical vascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*. *Archives of internal medicine*, 2008. **168**(9): p. 928-935.
13. Reis, J.P., et al., *Association between duration of overall and abdominal obesity beginning in young adulthood and coronary artery calcification in middle age*. *Jama*, 2013. **310**(3): p. 280-288.
14. Poorolajal, J. and E. Jenabi, *The association between body mass index and preeclampsia: a meta-analysis*. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2016. **29**(22): p. 3670-3676.
15. Shin, D. and W.O. Song, *Prepregnancy body mass index is an independent risk factor for gestational hypertension, gestational diabetes, preterm labor, and small-and large-for-gestational-age infants*. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2015. **28**(14): p. 1679-1686.
16. Ehrenthal, D.B., et al., *Prepregnancy body mass index as an independent risk factor for pregnancy-induced hypertension*. *Journal of Women's Health*, 2011. **20**(1): p. 67-72.
17. Chu, S.Y., et al., *Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus*. *Diabetes care*, 2007. **30**(8): p. 2070-2076.
18. Eckel, R.H., et al., *The metabolic syndrome*. *The lancet*, 2010. **375**(9710): p. 181-183.
19. O'Neill, S. and L. O'Driscoll, *Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies*. *Obesity reviews*, 2015. **16**(1): p. 1-12.
20. Gallagher, E.J. and D. LeRoith, *Epidemiology and molecular mechanisms tying obesity, diabetes, and the metabolic syndrome with cancer*. *Diabetes care*, 2013. **36**(Supplement 2): p. S233-S239.

21. Pothiwala, P., S.K. Jain, and S. Yaturu, *Metabolic syndrome and cancer*. Metabolic syndrome and related disorders, 2009. **7**(4): p. 279-288.
22. A. Loke, W. *Diabetes Fact Sheet*. 2021 [cited 2022 07/07]; Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
23. Zheng, Y., S.H. Ley, and F.B. Hu, *Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications*. Nature reviews endocrinology, 2018. **14**(2): p. 88-98.
24. Atkinson, M.A. and N.K. Maclaren, *The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus*. New England journal of medicine, 1994. **331**(21): p. 1428-1436.
25. Leroux-Stewart, J., R. Rabasa-Lhoret, and J. Chiasson,  *$\alpha$ -Glucosidase inhibitors*. Ther. Diabetes Mellit. Relat. Disorders, 2014. **416**.
26. Tremaroli, V. and F. Bäckhed, *Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 242-249.
27. Qin, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. nature, 2010. **464**(7285): p. 59-65.
28. Wang, B., et al., *The human microbiota in health and disease*. Engineering, 2017. **3**(1): p. 71-82.
29. Aagaard, K., et al., *The placenta harbors a unique microbiome*. Science translational medicine, 2014. **6**(237): p. 237ra65-237ra65.
30. DiGiulio, D.B., et al., *Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes*. American journal of reproductive immunology, 2010. **64**(1): p. 38-57.
31. Dominguez-Bello, M.G., et al., *Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(26): p. 11971-11975.
32. Fallani, M., et al., *Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics*. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 2010. **51**(1): p. 77-84.
33. Cheng, J., et al., *Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children*. The ISME journal, 2016. **10**(4): p. 1002-1014.
34. Miller, T.L. and M.J. Wolin, *Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora*. Applied and environmental microbiology, 1996. **62**(5): p. 1589-1592.
35. Topping, D.L. and P.M. Clifton, *Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides*. Physiological reviews, 2001.
36. Tan, J., et al., *The role of short-chain fatty acids in health and disease*. Advances in immunology, 2014. **121**: p. 91-119.
37. Claesson, M.J., et al., *Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly*. Nature, 2012. **488**(7410): p. 178-184.
38. Bäckhed, F., et al., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. Proceedings of the national academy of sciences, 2004. **101**(44): p. 15718-15723.
39. Bäckhed, F., et al., *Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(3): p. 979-984.
40. Luczynski, P., et al., *Growing up in a bubble: using germ-free animals to assess the influence of the gut microbiota on brain and behavior*. International Journal of Neuropsychopharmacology, 2016. **19**(8).
41. Louis, P. and H.J. Flint, *Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota*. Environmental microbiology, 2017. **19**(1): p. 29-41.

42. da Silva Miranda, P.M.G., *Diet-microbiota interaction in health and disease: a role of high salt diet in inflammatory bowel disease*. 2018.
43. Donohoe, D.R., et al., *The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon*. *Cell metabolism*, 2011. **13**(5): p. 517-526.
44. Canani, R.B., et al., *Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases*. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2011. **17**(12): p. 1519.
45. Kumar, J., K. Rani, and C. Datt, *Molecular link between dietary fibre, gut microbiota and health*. *Molecular Biology Reports*, 2020: p. 1-9.
46. Hill, M., *Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis*. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 1997. **6**: p. S43-5.
47. Magnúsdóttir, S., et al., *Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes*. *Frontiers in genetics*, 2015. **6**: p. 148.
48. Fukuda, S., et al., *Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate*. *Nature*, 2011. **469**(7331): p. 543-547.
49. Bohnhoff, M., B.L. Drake, and C.P. Miller, *Effect of streptomycin on susceptibility of intestinal tract to experimental Salmonella infection*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1954. **86**(1): p. 132-137.
50. Hammami, R., et al., *Anti-infective properties of bacteriocins: an update*. *Cellular and molecular life sciences*, 2013. **70**(16): p. 2947-2967.
51. Turovskiy, Y., K. Sutyak Noll, and M.L. Chikindas, *The aetiology of bacterial vaginosis*. *Journal of applied microbiology*, 2011. **110**(5): p. 1105-1128.
52. Kamada, N., et al., *Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota*. *Nature immunology*, 2013. **14**(7): p. 685-690.
53. Collins, S.M., M. Surette, and P. Bercik, *The interplay between the intestinal microbiota and the brain*. *Nature Reviews Microbiology*, 2012. **10**(11): p. 735-742.
54. Pizarroso, N.A., et al., *A Review on the Role of Food-Derived Bioactive Molecules and the Microbiota–Gut–Brain Axis in Satiety Regulation*. *Nutrients*, 2021. **13**(2): p. 632.
55. Bercik, P., et al., *The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice*. *Gastroenterology*, 2011. **141**(2): p. 599-609. e3.
56. Heijtz, R.D., et al., *Normal gut microbiota modulates brain development and behavior*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011. **108**(7): p. 3047-3052.
57. Sudo, N., et al., *Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice*. *The Journal of physiology*, 2004. **558**(1): p. 263-275.
58. Desbonnet, L., et al., *Microbiota is essential for social development in the mouse*. *Molecular psychiatry*, 2014. **19**(2): p. 146-148.
59. Myers, S.P. and J. Hawrelak, *The causes of intestinal dysbiosis: a review*. *Altern Med Rev*, 2004. **9**(2): p. 180-197.
60. Baumgart, D.C. and S.R. Carding, *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology*. *The Lancet*, 2007. **369**(9573): p. 1627-1640.
61. Pandey, K.R., S.R. Naik, and B.V. Vakil, *Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review*. *Journal of food science and technology*, 2015. **52**(12): p. 7577-7587.
62. Teneva-Angelova, T., et al., *Traditional Balkan fermented milk products*. *Engineering in Life Sciences*, 2018. **18**(11): p. 807-819.
63. Kaufmann, S.H., *Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff*. *Nature immunology*, 2008. **9**(7): p. 705-712.
64. Organization, W.H., *Food and Agriculture Organization of the United Nations (WHO/FAO)(2001) Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. *FAO Food and Nutrition Paper*, 2001. **85**.

65. FAO/WHO, *Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food*. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002.
66. Hill, C., et al., *Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic*. Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 2014.
67. Kerry, R.G., et al., *Benefaction of probiotics for human health: A review*. Journal of food and drug analysis, 2018. **26**(3): p. 927-939.
68. Islam, S.U., *Clinical uses of probiotics*. Medicine, 2016. **95**(5).
69. Kareem, K.Y., et al., *Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of Lactobacillus plantarum using reconstituted media supplemented with inulin*. Gut pathogens, 2014. **6**(1): p. 1-7.
70. Ammor, S., et al., *Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds*. Food control, 2006. **17**(6): p. 454-461.
71. Oelschlaeger, T.A., *Mechanisms of probiotic actions – A review*. International Journal of Medical Microbiology, 2010. **300**(1): p. 57-62.
72. Elli, M., et al., *Iron requirement of Lactobacillus spp. in completely chemically defined growth media*. Journal of applied microbiology, 2000. **88**(4): p. 695-703.
73. Kang, J.-H., et al., *Anti-obesity effect of Lactobacillus gasseri BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice*. PloS one, 2013. **8**(1): p. e54617.
74. Kadooka, Y., et al., *Regulation of abdominal adiposity by probiotics (Lactobacillus gasseri SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial*. European journal of clinical nutrition, 2010. **64**(6): p. 636-643.
75. Kim, S., et al., *Anti-obesity effects of Lactobacillus rhamnosus 4B15, and its synergy with hydrolysed lactose skim milk powder*. International Dairy Journal, 2021: p. 104997.
76. Wu, T.-R., et al., *Gut commensal Parabacteroides goldsteinii plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from Hirsutella sinensis*. Gut, 2019. **68**(2): p. 248-262.
77. Chunchai, T., et al., *Decreased microglial activation through gut-brain axis by prebiotics, probiotics, or synbiotics effectively restored cognitive function in obese-insulin resistant rats*. Journal of neuroinflammation, 2018. **15**(1): p. 1-15.
78. Torres, J., et al., *Crohn's disease*. The Lancet, 2017. **389**(10080): p. 1741-1755.
79. Ford, A.C., et al., *Systematic review with meta-analysis: the efficacy of prebiotics, probiotics, synbiotics and antibiotics in irritable bowel syndrome*. Alimentary pharmacology & therapeutics, 2018. **48**(10): p. 1044-1060.
80. Heritage, J., E.G.V. Evans, and R. Killington, *Introductory microbiology*. 1996: Cambridge University Press.
81. Bruslind, L., *General microbiology*. 2020.
82. Salton, M.R.J., G. Seltmann, and O. Holst, *The bacterial cell wall*. 2002: Springer Science & Business Media.
83. Rossi, M., et al., *Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures*. Applied and environmental microbiology, 2005. **71**(10): p. 6150-6158.
84. Stewart, M.L., D.A. Timm, and J.L. Slavin, *Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system*. Nutrition Research, 2008. **28**(5): p. 329-334.
85. Gibson Glen, R., et al., *„The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics“*. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol, 2017. **14**: p. 491-502.

86. Sanders, M.E., et al., *Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic*. Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 2019. **16**(10): p. 605-616.
87. Gibson, G.R., et al., *Dietary prebiotics: current status and new definition*. Food Sci Technol Bull Funct Foods, 2010. **7**(1): p. 1-19.
88. Niness, K.R., *Inulin and oligofructose: what are they?* The Journal of nutrition, 1999. **129**(7): p. 1402S-1406S.
89. Davani-Davari, D., et al., *Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications*. Foods, 2019. **8**(3): p. 92.
90. Fuentes-Zaragoza, E., et al., *Resistant starch as prebiotic: A review*. Starch-Stärke, 2011. **63**(7): p. 406-415.
91. Duda-Chodak, A., et al., *Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review*. European journal of nutrition, 2015. **54**(3): p. 325-341.
92. Parolini, C., *Effects of fish n-3 PUFAs on intestinal microbiota and immune system*. Marine Drugs, 2019. **17**(6): p. 374.
93. Duncan, S.H., et al., *The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota*. Environmental microbiology, 2009. **11**(8): p. 2112-2122.
94. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Alginate: properties and biomedical applications*. Progress in polymer science, 2012. **37**(1): p. 106-126.
95. Chuang, J.-J., et al., *Effects of pH on the shape of alginate particles and its release behavior*. International Journal of Polymer Science, 2017. **2017**.
96. Rodrigues, F.J., et al., *Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review*. Food Research International, 2020. **137**.
97. da Silva, S.B., D. de Souza, and L.D. Lacerda, *Food applications of chitosan and its derivatives*. Chitin and chitosan: Properties and applications, 2019: p. 315-347.
98. Goy, R.C., D.d. Britto, and O.B. Assis, *A review of the antimicrobial activity of chitosan*. Polímeros, 2009. **19**: p. 241-247.
99. Teng, Z., R. Xu, and Q. Wang, *Beta-lactoglobulin-based encapsulating systems as emerging bioavailability enhancers for nutraceuticals: a review*. Rsc Advances, 2015. **5**(44): p. 35138-35154.
100. Dehkordi, S.S., et al., *Optimization of alginate-whey protein isolate microcapsules for survivability and release behavior of probiotic bacteria*. Applied biochemistry and biotechnology, 2020. **190**(1): p. 182-196.
101. Rajam, R., et al., *Effect of whey protein–alginate wall systems on survival of microencapsulated Lactobacillus plantarum in simulated gastrointestinal conditions*. Journal of Functional Foods, 2012. **4**(4): p. 891-898.
102. Rajam, R. and C. Anandharamakrishnan, *Microencapsulation of Lactobacillus plantarum (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying*. LWT - Food Science and Technology, 2015. **60**(2): p. 773-780.
103. Terpou, A., et al., *Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value*. Nutrients, 2019. **11**(7).
104. Vazquez-Olivo, G., E.P. Gutiérrez-Grijalva, and J.B. Heredia, *Prebiotic compounds from agro-industrial by-products*. Journal of food biochemistry, 2019. **43**(6): p. e12711.
105. Yong, A., et al., *Microencapsulation of Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 with mannitol*. Asia-Pacific journal of molecular biology and biotechnology, 2020. **28**(2): p. 32-42.
106. Raddatz, G.C., et al., *Use of prebiotic sources to increase probiotic viability in pectin microparticles obtained by emulsification/internal gelation followed by freeze-drying*. Food Research International, 2020. **130**: p. 108902.

107. Valero-Cases, E. and M.J. Frutos, *Effect of different types of encapsulation on the survival of Lactobacillus plantarum during storage with inulin and in vitro digestion*. LWT - Food Science and Technology, 2015. **64**(2): p. 824-828.
108. De Vrese, M. and Schrezenmeir, *Probiotics, prebiotics, and synbiotics*. Food biotechnology, 2008: p. 1-66.
109. Markowiak, P. and K. Śliżewska, *Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health*. Nutrients, 2017. **9**(9): p. 1021.
110. Jafari, S.M., *An overview of nanoencapsulation techniques and their classification*. Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries, 2017: p. 1-34.
111. Frakolaki, G., et al., *A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods*. Critical reviews in food science and nutrition, 2021. **61**(9): p. 1515-1536.
112. Rathore, S., et al., *Microencapsulation of microbial cells*. Journal of Food Engineering, 2013. **116**(2): p. 369-381.
113. Burgain, J., et al., *Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications*. Journal of food engineering, 2011. **104**(4): p. 467-483.
114. Fang, Z. and B. Bhandari, *Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation*, in *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals*. 2012, Elsevier. p. 73-109.
115. Her, J.-Y., M.S. Kim, and K.-G. Lee, *Preparation of probiotic powder by the spray freeze-drying method*. Journal of Food Engineering, 2015. **150**: p. 70-74.
116. Dianawati, D., V. Mishra, and N.P. Shah, *Survival of microencapsulated probiotic bacteria after processing and during storage: a review*. Critical reviews in food science and nutrition, 2016. **56**(10): p. 1685-1716.
117. Capela, P., T. Hay, and N.P. Shah, *Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt*. Food Research International, 2006. **39**(2): p. 203-211.
118. Sagis, L.M., *Microencapsulation and microspheres for food applications*. 2015: Academic Press.
119. Brodkorb, A., et al., *INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion*. Nature protocols, 2019. **14**(4): p. 991-1014.
120. Zwietering, M., et al., *Modeling of the bacterial growth curve*. Applied and environmental microbiology, 1990. **56**(6): p. 1875-1881.
121. Fan, R., et al., *Purification of crude fructo-oligosaccharide preparations using probiotic bacteria for the selective fermentation of monosaccharide byproducts*. Frontiers in microbiology, 2021. **11**: p. 620626.
122. Mudalige, T., et al., *Characterization of nanomaterials: Tools and challenges*. Nanomaterials for food applications, 2019: p. 313-353.
123. Nguyen, T.C., et al., *Optimization and purification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from Bacillus subtilis yt20 isolated in Vietnam*. Vietnam Journal of Science and Technology, 2021. **59**(2): p. 179-188.
124. Rhee, H.I. and H.W. Kim, *NOVEL BACILLUS COAGULANS CC STRAIN PRODUCING  $\alpha$ -GLUCOSIDASE INHIBITOR*, B.-G. Wie, Editor. 2021: South-Korea.