



IARA FERREIRA RESENDE

**MICROENCAPSULAÇÃO DE LEVEDURAS COM
ATRIBUTOS PROBIÓTICOS E SUA APLICAÇÃO NO
TRATAMENTO DA DISBIOSE INDUZIDA POR
VANCOMICINA**

**LAVRAS-MG
2025**

IARA FERREIRA RESENDE

**MICROENCAPSULAÇÃO DE LEVEDURAS COM ATRIBUTOS PROBIÓTICOS E
SUA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA DISBIOSE INDUZIDA POR
VANCOMICINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Doutora.

Prof.^a Dr.^a Rosane Freitas Schwan
Orientadora

Dr. Dirceu de Sousa Melo
Dr.^a Pâmela Mynsen Machado Martins
Coorientadores

**LAVRAS–MG
2025**

**Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração
de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Resende, Iara Ferreira.

Microencapsulação de leveduras com atributos probióticos e sua aplicação no
tratamento da disbiose induzida por vancomicina / Iara Ferreira Resende. - 2025.
144 p. : il.

Orientadora: Rosane Freitas Schwan

Coorientador: Dirceu de Sousa Melo

Coorientadora: Pâmela Mynsen Machado Martins

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2025.

Bibliografia.

1. Probióticos. 2. TGI. 3. Leveduras. 4. Modelo animal. 5. Disbiose. I. Freitas
Schwan, Rosane . II. de Sousa Melo, Dirceu . III. Mynsen Machado Martins, Pâmela.
IV. Universidade Federal de Lavras. V. Título.

IARA FERREIRA RESENDE

**MICROENCAPSULAÇÃO DE LEVEDURAS COM ATRIBUTOS PROBIÓTICOS E
SUA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA DISBIOSE INDUZIDA POR
VANCOMICINA**

**MICROENCAPSULATION OF YEAST WITH PROBIOTIC ATTRIBUTES AND ITS
APPLICATION IN THE TREATMENT OF VANCOMYCIN-INDUCED DYSBIOSIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, área de concentração
em Microbiologia Agrícola, para obtenção do
título de Doutora.

APROVADA em 15 de abril de 2025

Dr.^a Rosane Freitas Schwan UFLA

Dr Disney Ribeiro Dias UFLA

Dr.^a Cintia Lacerda Ramos UFVJM

Dr.^a Nádia Nara Batista UFLA

Dr.^a Francesca Silva Dias Nobre UNIVASF

Dr.^a Elizabethe Adriana Esteves UFVJM

Prof.^a Dr.^a Rosane Freitas Schwan
Orientadora

Dr. Dirceu de Sousa Melo
Dr.^a Pâmela Mynsen Machado Martins
Coorientadores

**LAVRAS-MG
2025**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelos dias vividos e pela força diária para enfrentar todos os obstáculos, pelas oportunidades que me foram dadas e por me dar sabedoria e perseverança para superar os empecilhos que surgiam em meu caminho, me guiando na direção certa.

Agradeço aos meus pais, Isabel e José Diocésio e ao meu irmão, Higor por todo apoio, paciência, dedicação e amor, pelos conselhos e incentivos nas horas certas, sem vocês isso não seria possível.

À minha família em geral, que sempre torceu, orou por mim e sempre estiveram presentes em todos os momentos da vida, sendo eles bons ou ruins. Vocês todos são mais que especiais.

Ao meu esposo, Renan que sempre esteve ao meu lado, me amparando quando achava que as coisas não iam dar certo, que nunca deixou que eu desistisse por mais difícil que fosse. A pessoa que sempre acreditou e disse “você é capaz”.

Às minhas amigas Pâmela e Andreísa, que me ajudaram de toda forma possível durante o mestrado e doutorado, me apoiando e aconselhando sempre que precisava. Duas pessoas incríveis que tive o prazer de conhecer e que se tornaram grandes amigas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro, a Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao setor de Microbiologia Agrícola pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

À toda equipe da UFVJM, que me recebeu de braços abertos, e auxiliou durante os experimentos com os animais.

Ao Hygor, pela amizade que criamos nesse tempo de experimento, pelas boas risadas juntos, e por se disponibilizar a ficar 2 meses em diamantina preparando tudo para que pudéssemos conduzir as análises *in vivo*.

Ao Isaac, por toda ajuda na parte de análise histológica, por todas as dicas e conhecimentos compartilhados.

À minha orientadora, professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pelas diversas oportunidades e conhecimentos adquiridos ao longo desses anos.

Ao Dr. Dirceu de Sousa Melo, por toda ajuda durante a realização deste trabalho, pela orientação, paciência, amizade e por todos os ensinamentos.

Aos professores do programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola, por todo conhecimento transmitido não somente em relação à matéria, mas também em relação a crescimento pessoal.

Aos meus colegas de laboratório por tornarem os dias mais divertidos.

Às amigas da época do colégio, sempre presentes quando precisei de uma palavra de conforto e um ombro amigo.

À todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

MUITO OBRIGADA!

*“Ainda que a minha mente e o meu corpo enfraqueçam,
Deus é a minha força, ele é tudo o que sempre preciso.”*

(Salmos 73:26)

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo desenvolver um protocolo de microencapsulação de leveduras com atributos probióticos, com o intuito de aprimorar sua viabilidade e sua passagem pelo TGI e, posteriormente testar o produto no tratamento da disbiose induzida por antibiótico em camundongos BALB/c. O trabalho foi dividido em duas etapas. A primeira etapa objetivou-se na seleção do material de parede e condições para a microencapsulação de *Saccharomyces cerevisiae* (CCMA 0732) e *Pichia kluyveri* (CCMA 0615). As leveduras (10^8 UFC/mL) foram microencapsuladas separadamente por spray drying utilizando soro de leite em pó (WP - 15%, 20% e 30%) e alginato de sódio (ALG - 1%). As microcápsulas e a viabilidade celular foram caracterizadas durante dois meses de armazenamento (4 °C e 25 °C). As formulações selecionadas foram aplicadas na fermentação de bebida funcional probiótica, e avaliada a sobrevivência e viabilidade no trato gastrointestinal simulado (TGI). Os resultados mostraram que a viabilidade das leveduras microencapsuladas por secagem por atomização depende da espécie e da matriz encapsulante utilizada. Além disso, mostrou que *P. kluyveri* com 15% WP + 1% ALG manteve alta viabilidade sob condições simuladas do trato gastrointestinal, seja exposta independentemente (>84%) ou incorporada em uma matriz alimentar (>94%). A microencapsulação das leveduras mostrou ser uma ferramenta tecnológica que aumenta a sua viabilidade, melhora a aplicação biotecnológica e facilita a entrega eficiente de probióticos ao hospedeiro. A segunda etapa do estudo consistiu em testes *in vivo* em modelo de disbiose induzida por antibiótico vancomicina. Baseado nos resultado do primeiro estudo, levedura *P. kluyveri* microencapsulada com 15% WP foi selecionada para aplicação no modelo *in vivo*. Ao todo, 32 camundongos Balb/c machos foram divididos em três grupos experimentais, Controle (GC), Disbiose (GD) e Disbiose tratado com levedura (GY). Os grupos GD e GY foram submetidos a indução de disbiose com 100µl 10mg/mL de vancomicina por 14 dias por gavagem, enquanto GC recebeu salina. Na sequência, para GY a levedura microencapsulada foi administrada na concentração de 10^7 UFC/ml diluída em salina por gavagem, demais grupos receberam apenas salina. Em linhas gerais, o tratamento com antibiótico desencadeou uma série de manifestações deletérias, características da disbiose, tais como: aumento da população de enterobactérias nas fezes, aumento dos glóbulos brancos e linfócitos totais, e peso do baço, danos ao epitélio intestinal, com redução do tamanho das vilosidades, aumento de infiltrado inflamatório e células caliciformes. Já o tratamento com a levedura após o uso do antibiótico conseguiu atenuar, restabelecendo a maioria dos parâmetros avaliados para níveis semelhantes ao controle. Especificamente, sobre os dados de microbioma, observou-se que a vancomicina diminuiu a abundância de grupos como Bacillota e favoreceu Verrucomicrobiota e Patescibacteria, com maior abundância de gêneros potencialmente patogênicos, como *Agathobaculum* e *Lachnoclostridium*. A utilização de *P. kluyveri* CCMA 0615 favoreceu especificamente o filo Verrucomicrobiota, principalmente do gênero *Akkermansia*, *Blautia* e *Parabacteroides goldsteinii*, grupos microbianos reconhecidos como benéficos. Como conclusão, as descobertas sugerem que *P. kluyveri* CCMA 0615 microencapsulada pode ser uma candidata probiótica promissora para atenuar os distúrbios intestinais induzidos pelo uso de antibióticos e promover a saúde intestinal.

Palavras-chave: probióticos; TGI; leveduras; modelo animal; disbiose; alginato; microbioma; vancomicina; spray dryer.

ABSTRACT

This study aimed to develop a microencapsulation protocol for yeasts with probiotic attributes, to improve their viability and passage through the gastrointestinal tract (GIT) and subsequently test the product in the treatment of antibiotic-induced dysbiosis in BALB/c mice. The study was divided into two stages. The first stage aimed to select the cell wall material and conditions for the microencapsulation of *Saccharomyces cerevisiae* (CCMA 0732) and *Pichia kluyveri* (CCMA 0615). The yeasts (10^8 CFU/mL) were microencapsulated separately by spray drying using whey powder (WP - 15%, 20%, and 30%) and sodium alginate (ALG - 1%). The microcapsules and cell viability were characterized during two months of storage (4 °C and 25 °C). The selected formulations were applied to the fermentation of a probiotic functional beverage, and their survival and viability were evaluated in the simulated GIT. The results showed that the viability of spray-dried microencapsulated yeasts depends on the species and encapsulating matrix used. Furthermore, it was shown that *P. kluyveri* with 15% WP + 1% ALG maintained high viability under simulated GIT conditions: exposed independently (>84%) or incorporated into a food matrix (>94%). Yeast microencapsulation has proven to be a technological tool that enhances their viability, improves biotechnological applications, and facilitates the efficient delivery of probiotics to the host. The second stage of the study consisted of in vivo testing a model of vancomycin-induced dysbiosis. Based on the results of the first study, microencapsulated *P. kluyveri* yeast with 15% WP was selected for application in vivo model. A total of 32 male Balb/c mice were divided into three experimental groups: Control (CG), Dysbiosis (DG), and Yeast-Treated Dysbiosis (YG). The DG and YG groups underwent dysbiosis induction with 100 μ L vancomycin (10 mg/mL) for 14 days by gavage, while the CG received saline. Subsequently, the YG group received microencapsulated yeast at a concentration of 10^7 CFU/mL diluted in saline by gavage, while the other groups received saline alone. In general, antibiotic treatment triggered a series of deleterious manifestations characteristic of dysbiosis, such as increased Enterobacteriaceae population in feces, increased white blood cell and total lymphocyte counts, and spleen weight, damage to the intestinal epithelium with reduced villi size, and increased inflammatory infiltrate and goblet cells. Treatment with yeast after antibiotic use was successful in attenuating the disease, restoring most of the evaluated parameters to levels similar to the control. Specifically, regarding microbiome data, it was observed that vancomycin decreased the abundance of groups such as Bacillota and favored Verrucomicrobiota and Patescibacteria, with a greater abundance of potentially pathogenic genera such as *Agathobaculum* and *Lachnoclostridium*. The use of *P. kluyveri* CCMA 0615 specifically favored the Verrucomicrobiota phylum, mainly the genera *Akkermansia*, *Blautia*, and *Parabacteroides goldsteinii*, microbial groups recognized as beneficial. In conclusion, the findings suggest that microencapsulated *P. kluyveri* CCMA 0615 may be a promising probiotic candidate for mitigating antibiotic-induced intestinal disorders and promoting intestinal health.

Keywords: probiotics, GIT; yeast; animal model; dysbiosis; alginate; microbiome; vancomycin; spray dryer.

INDICADORES DE IMPACTO

A pesquisa intitulada “Microencapsulação de leveduras com atributos probióticos e sua aplicação no tratamento da disbiose induzida por vancomicina”, apresenta impactos relevantes nas dimensões tecnológica, científica, sanitária e social, com possibilidades claras de aplicação na saúde pública e na indústria de alimentos funcionais. Conduzida no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em colaboração com a Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), a pesquisa se insere em um contexto de busca por soluções alternativas e sustentáveis para distúrbios relacionados à microbiota intestinal, especialmente disbiose induzida pelo uso de antibióticos. No aspecto tecnológico, o estudo desenvolveu um protocolo eficiente e economicamente viável para a microencapsulação da levedura *Pichia kluyveri* CCMA 0615, utilizando a técnica de spray drying com matriz de soro de leite e alginato de sódio. A formulação obtida apresentou alta viabilidade celular tanto em condições simuladas do trato gastrointestinal (superior a 84%) quanto quando incorporada a matrizes alimentares (superior a 94%). Essa inovação biotecnológica tem potencial direto para aplicação em formulações alimentícias e farmacêuticas, contribuindo com o setor de tecnologia e produção, além de promover o aproveitamento de resíduos agroindustriais (como o soro de leite), alinhando-se à economia circular e ao consumo sustentável. No âmbito social e de saúde pública, os experimentos in vivo realizados com camundongos BALB/c evidenciaram que a administração da levedura microencapsulada após o tratamento com vancomicina foi capaz de atenuar os efeitos deletérios da disbiose, restabelecendo parâmetros histológicos, imunológicos e melhorando o aspecto microbiológico do intestino. Dentre os efeitos benéficos destacam-se a redução da inflamação intestinal, restauração da morfologia epitelial e modulação positiva do microbioma intestinal, com aumento de gêneros reconhecidamente benéficos como *Akkermansia*, *Blautia* e *Parabacteroides goldsteinii*. Esses resultados indicam o potencial do produto desenvolvido como alternativa terapêutica não farmacológica em contextos clínicos de disbiose, beneficiando em especial populações expostas ao uso prolongado de antibióticos, como pacientes imunocomprometidos, idosos e crianças. Com base nos resultados, os impactos do trabalho se enquadram em três áreas temáticas da Política Nacional de Extensão Universitária: Saúde (área 6), pelo desenvolvimento de estratégias para prevenção e recuperação da disbiose; Tecnologia e Produção (área 7), devido à criação de um novo insumo biotecnológico; e Meio Ambiente (área 5), por utilizar subprodutos industriais e incentivar práticas sustentáveis. Adicionalmente, a pesquisa está alinhada com os Objetivos de

Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas, contribuindo com os seguintes: ODS 3 (Saúde e bem-estar), ODS 9 (Indústria, inovação e infraestrutura), ODS 12 (Consumo e produção responsáveis) e, indiretamente, ODS 13 (Ação contra a mudança global do clima). Em síntese, a pesquisa conduzida demonstra elevado potencial de impacto social, científico e econômico, e oferece soluções práticas e inovadoras para questões de saúde intestinal, promovendo avanços no uso de leveduras como probióticos, contribuindo para o desenvolvimento sustentável e para a melhoria da qualidade de vida da população.

IMPACT INDICATORS

The research entitled “Microencapsulation of yeasts with probiotic attributes and their application in the treatment of vancomycin-induced dysbiosis” presents relevant impacts in the technological, scientific, health, and social dimensions, with clear possibilities of application in public health and in the functional food industry. Conducted within the scope of the Postgraduate Program in Agricultural Microbiology of the Federal University of Lavras (UFLA), in collaboration with the Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys (UFVJM), the research is part of a context of search for alternative and sustainable solutions for disorders related to the intestinal microbiota, especially dysbiosis induced using antibiotics. In the technological aspect, the study developed an efficient and economically viable protocol for the microencapsulation of the yeast *Pichia kluyveri* CCMA 0615, using the spray drying technique with a matrix of whey and sodium alginate. The formulation obtained showed high cell viability both in simulated gastrointestinal tract conditions (greater than 84%) and when incorporated into food matrices (greater than 94%). This biotechnological innovation has direct potential for application in food and pharmaceutical formulations, contributing to the technology and production sector, in addition to promoting the use of agro-industrial waste (such as whey), aligning with the circular economy and sustainable consumption. In the social and public health context, *in vivo* experiments carried out with BALB/c mice showed that the administration of microencapsulated yeast after treatment with vancomycin was able to attenuate the deleterious effects of dysbiosis, restoring histological and immunological parameters and improving the microbiological aspect of the intestine. Among the beneficial effects, the reduction of intestinal inflammation, restoration of epithelial morphology, and positive modulation of the intestinal microbiome stand out, with an increase in genera recognized as beneficial, such as *Akkermansia*, *Blautia*, and *Parabacteroides goldsteinii*. These results indicate the potential of the developed product as a non-pharmacological therapeutic alternative in clinical contexts of dysbiosis, especially benefiting populations exposed to prolonged use of antibiotics, such as immunocompromised patients, the elderly, and children. Based on the results, the impacts of the work fall into three thematic areas of the National Policy for University Extension: Health (area 6), through the development of strategies for the prevention and recovery of dysbiosis; Technology and Production (area 7), due to the creation of a new biotechnological input; and Environment (area 5), by using industrial by-products and encouraging sustainable practices. Additionally, the research is aligned with the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs), contributing to the following: SDG 3 (Good health

and well-being), SDG 9 (Industry, innovation and infrastructure), SDG 12 (Responsible consumption and production), and, indirectly, SDG 13 (Climate action). In summary, the research conducted demonstrates high potential for social, scientific, and economic impact, and offers practical and innovative solutions for intestinal health issues, promoting advances in the use of yeasts as probiotics, contributing to sustainable development, and improving the population's quality of life.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	14
1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Barreira intestinal.....	15
2.2	Microbiota do trato gastrointestinal	21
2.3	Disbiose	25
2.4	Disbiose induzida por antibióticos.....	26
2.5	Disbiose induzida por vancomicina	28
2.6	Probióticos	29
2.7	Probióticos e o sistema imunológico	32
2.8	Leveduras como probióticos	34
2.9	Microencapsulação de probióticos	37
	SEGUNDA PARTE	40
	ARTIGO 1 - Development and characterization of microencapsulated <i>Pichia kluyveri</i> CCMA 0615 with probiotic properties and its application in fermented beverages	41
	ARTIGO 2 - <i>Pichia kluyveri</i> CCMA 0615 MICROENCAPSULADA COMO ESTRATÉGIA PROBIÓTICA NO TRATAMENTO DA DISBIOSE INDUZIDA POR VANCOMICINA EM CAMUNDONGOS	75
	TERCEIRA PARTE	121
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	121
	REFERÊNCIAS	122

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal humana é uma comunidade complexa de microrganismos composta por vírus, protozoários, fungos e principalmente bactérias cujas funções, em condições de homeostase fisiológica, vão desde a manutenção da integridade e função da barreira epitelial do intestino, até efeitos sistêmicos com a modulação da resposta imunológica e do metabolismo energético do hospedeiro, produção de vitaminas e promoção da saúde neurológica (Aburto e Cryan, 2024; Ma et al., 2023). A funcionalidade da microbiota intestinal humana depende da sua composição e distribuição destes grupos, o que consiste principalmente de bactérias dos filos Bacillota, Bacteroidota e Actinomycetota (anteriormente conhecidos como Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria) (Arumugam et al., 2011; Oren, 2024). Grandes mudanças na proporção entre estes grupos ou a expansão de novos grupos bacterianos leva a alterações qualitativas e/ou quantitativas da microbiota normal de um organismo, o que é muitas vezes referido como disbiose (Hrncir, 2022).

A redução da diversidade microbiana, especialmente com diminuição da população de *Bacillota* e o crescimento de *Pseudomonadota* são características da mudança do perfil microbiano na disbiose (Hrncir, 2022). Diversos fatores tais como dieta, infecções por patógenos e uso de medicamentos, como os antibióticos podem induzir modificações no perfil da microbiota intestinal. No caso específico do uso de antibióticos, o impacto sobre a microbiota pode ser deletério e levar ao desenvolvimento do quadro de disbiose (Taitz et al., 2025).

O uso de probióticos tem demonstrado ser uma estratégia eficaz para atenuar as consequências da disbiose induzida pelo uso de antibióticos (Snigdha et al., 2022). Probióticos são microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (Hill et al., 2014). O consumo de probióticos vem sendo apontado como uma estratégia não farmacológica para aliviar distúrbios gastrointestinais (Vallejos; Bueno; Kalergis, 2025) e tratar infecções por patógenos como infecções por *Clostridium difficile* (Su et al., 2020), promover a saúde digestiva e mitigar quadros de disbiose, com restabelecimento do grupos microbianos e restauração da homeostase da mucosa intestinal (Yang et al., 2024). Os gêneros de microrganismos probióticos comumente usados são: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, e *Enterococcus*, algumas espécies de *Bacillus* e leveduras como *Saccharomyces boulardii* (Staniszewski e Kordowska-Wiater, 2021). Embora menos exploradas, as leveduras, apresentam potencial para tratar e atenuar perturbações da microbiota

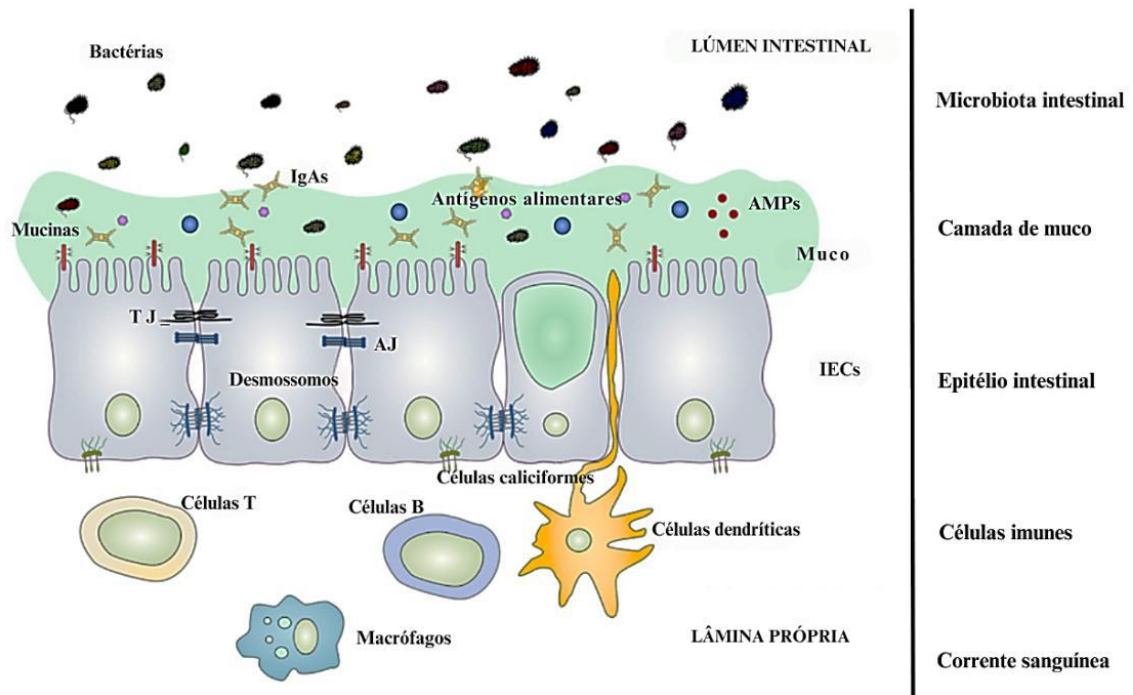
intestinal e suas repercussões sobre o intestino, como já evidenciado para a cepa comercial *Saccharomyces boulardii* (Fu et al., 2022; Heavey et al., 2024). Neste sentido, as cepas de leveduras *Saccharommyces cerevisiae* (CCMA 0732) e *Pichia kluyveri* (CCMA 0615) selecionadas em estudos anteriores para propriedades probióticas (Menezes et al., 2018, 2020a, 2020b) apresentam-se como novos organismos probióticos para o tratamento da disbiose induzida por antibióticos. O objetivo do presente estudo é desenvolver, com auxílio da técnica de spray drying, microcápsulas contendo levedura com atributos probióticos, aprimorando sua viabilidade e eficiência na entrega ao hospedeiro, e utilizá-la no tratamento da disbiose induzida por antibiótico vancomicina em camundongos BALB/c.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Barreira intestinal

O corpo humano possui diversos epitélios mucosos, incluindo a mucosa das vias aéreas, mucosa oral, mucosa gastrointestinal, mucosa urogenital e mucosa da pele, que juntos compõem o tecido linfoide associado à mucosa (MALT - Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) que atuam como barreiras diretas separando o meio interno do ambiente (Di Tommaso; Gasbarrini; Ponziani, 2021; Guo et al., 2023). Dentre estes tecidos mucosos, o GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue) trata-se de uma importante estrutura do sistema imunológico da mucosa intestinal, responsável por detectar e responder a antígenos presentes no lúmen intestinal, contribuindo para a tolerância imunológica a alimentos e microrganismos comensais, e para a defesa contra patógenos (Mowat e Agace, 2014). Na estrutura da mucosa intestinal, seus principais constituintes incluem a microbiota comensal, a camada de muco, o revestimento celular epitelial do intestino, o sistema imunológico associado à mucosa e a barreira vascular subjacente. Diante dessa arquitetura, uma gama diversificada de fatores microbianos, bioquímicos, secretomotores, neuroendócrinos e imunológicos (Figura 1) atuam em conjunto para preservar a homeostase intestinal (Di Tommaso; Gasbarrini; Ponziani, 2021).

Figura 1- Principais componentes reguladores da barreira intestinal.



Fonte: Adaptado de Vancamelbeke e Vermeire, (2017). AMP – Peptídeo antimicrobiano; sIgA – Imunoglobulina A secretora; IECs – Células epiteliais intestinais; TJ – Junção estreita; JA – Junção aderente.

A microbiota intestinal é considerada o primeiro nível da barreira intestinal (König et al., 2016). O intestino humano contém centenas de trilhões de bactérias benéficas, representando uma relação simbiótica decorrente de milhões de anos de coevolução. Essas bactérias fazem uma contribuição significativa para a saúde intestinal humana (Shahab e Shahab, 2022), contribuindo para funções fisiológicas como digestão e fermentação de carboidratos, produção de vitaminas (Grant et al., 2024; Mora-Flores et al., 2023), maturação de células epiteliais, angiogênese (Wang et al., 2024b) e desenvolvimento de linfócitos (Kamada e Núñez, 2013; Li et al., 2024b). A microbiota intestinal também é essencial para proteger os hospedeiros de infecções patogênicas. Por exemplo, a microbiota intestinal pode limitar a colonização luminal de patógenos bacterianos intestinais por meio da competição de nutrientes (Horrocks et al., 2023; Singh e Koo, 2024). Os microrganismos comensais intestinais também provocam respostas imunológicas protetoras contra parasitas por meio de células dendríticas (DCs) (Shvets et al., 2024). Na ausência de TLR11, as respostas imunes aos parasitas dependem da estimulação indireta de DCs fornecidas por microrganismos comensais. As bactérias intestinais ativam MyD88 via TLR2, TLR4 e TLR9 para gerar IL-12, que pode responder ao parasita (Aguirre-García et al., 2020; David, 2009; Raetz et al., 2013). Além disso, vários estudos indicaram que o microbiota intestinal está envolvido na regulação da homeostase

energética, como a síntese do peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) e o peptídeo YY (PYY) (Fujisaka; Watanabe; Tobe, 2023; Van Son et al., 2021; Zeng et al., 2024). No entanto, apesar da relação simbiótica entre os humanos e sua microbiota intestinal, os efeitos desses microrganismos nem sempre são benignos. Quando a inter-relação equilibrada entre o hospedeiro e o microbioma intestinal é destruída, resulta em um desequilíbrio (disbiose) que pode ocasionar o surgimento de doenças (Ali et al., 2025; Safarchi et al., 2025), assunto que será abordado em tópicos posteriores.

A camada de muco constitui o segundo principal componente físico da barreira intestinal. Produzida por células caliciformes secretoras especializadas no epitélio, esta camada reveste o tecido intestinal para fornecer lubrificação e proteção contra o material luminal, especialmente a microbiota (Di Tommaso; Gasbarrini; Ponziani, 2021). A homeostase do muco é crucial para a saúde e sua desregulação no intestino delgado ou no cólon causa ou se correlaciona com várias doenças. De fato, o acúmulo de muco e o crescimento excessivo de bactérias devido à perda de secreção de bicarbonato são evidentes na fibrose cística, e a perda de propriedades de barreira do muco e o aumento da carga bacteriana no epitélio do cólon se correlacionam com a doença inflamatória intestinal colite ulcerativa (CU) (Gustafsson et al., 2012; Johansson et al., 2014; Van der Post et al., 2019).

O muco é composto por um conjunto central de cerca de 30 proteínas, a maioria das quais produzidas por células caliciformes secretoras especializadas, incluindo mucina 2 (MUC2), acessório do canal de cloreto-1 (CLCA1), fragmento Fc da proteína de ligação de IgG (FCGBP) e proteína do grânulo de zimogênio 16 (ZG16) (Van der Post et al., 2019), bem como lipídios, íons e água (que compõe aproximadamente 95%) (Barmpatsalou et al., 2021).

A glicoproteína MUC2 é o principal componente estrutural e cria uma estrutura de andaime semelhante a uma rede do muco ao longo do trato gastrointestinal pela oligomerização de suas extremidades terminais (Godl et al., 2002; Lidell et al., 2003). MUC2 é uma proteína muito grande (> 5000 aminoácidos) com dois domínios PTS característicos da mucina, ricos em prolina, serina e treonina, que se torna fortemente *O*-glicosilada por glicosiltransferases na via secretora. Os glicanos adicionados compõem aproximadamente 80% do peso molecular na proteína madura (Lin; Li, 2021). Mais de 100 estruturas de glicano diferentes foram identificadas no MUC2 intestinal (Holmén Larsson et al., 2009). A distribuição de diferentes glicanos é específica da região e da espécie, adicionando camadas adicionais de complexidade à barreira do muco (Arike e Hansson, 2016; Holmén Larsson et al., 2013). Além de proteger a estrutura da proteína MUC2 da proteólise e dar ao MUC2 suas propriedades de gel pela ligação à água, os glicanos ligados ao MUC2 fornecem locais de adesão microbiana e uma fonte

nutricional na camada externa do muco (Paone e Cani, 2020). A composição de glicano no MUC2 pode, portanto, fornecer uma estratégia para o hospedeiro selecionar bactérias comensais, mas também pode ser utilizada por bactérias comensais e patogênicas (Coleman e Haller, 2021; Wei et al., 2023).

A degradação de glicanos de mucina dependente da microbiota, induzida por uma dieta pobre em fibras, aumenta a suscetibilidade à infecção por *Citrobacter rodentium* em camundongos (Neumann et al., 2021), indicando a importância da glicosilação de Muc2 na proteção contra bactérias patogênicas. Glicanos encurtados e menos complexos foram identificados em pacientes com colite ulcerativa ativa. No entanto, ainda não se sabe se as alterações observadas são causa ou efeito da inflamação, sendo necessárias investigações adicionais para elucidar esses mecanismos (Wei et al., 2023). Apenas algumas espécies bacterianas possuem a maquinaria enzimática para iniciar a degradação parcial ou total da mucina, incluindo *A. muciniphila*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *B. bifidum*, *Bacteroides fragilis*, *Ruminococcus gnavus* e *Ruminococcus torques*. Em condições fisiológicas, esses microrganismos especialistas em degradação de mucina vivem em coexistência mútua com o hospedeiro, e a taxa de degradação de muco é equilibrada com a taxa de síntese de muco, resultando em uma estrutura de muco dinâmica e estável que é de fundamental importância para nossa "saúde intestinal" (Ouwerkerk; De Vos; Belzer, 2013).

As propriedades e a espessura da camada de muco variam ao longo do trato gastrointestinal para facilitar a função fisiológica em cada local (Paone e Cani, 2020). O muco do intestino delgado foi descrito como frouxamente organizado para permitir a absorção eficiente de nutrientes ao longo de todo o comprimento das saliências das vilosidades (Moor et al., 2018). Para manter uma barreira protetora contra bactérias luminais e enzimas digestivas, o muco do intestino delgado é fortificado por peptídeos antimicrobianos secretados por células de Paneth residentes na base da cripta e enterócitos na base das vilosidades, IgA secretada por células B da lâmina própria e inibidores de enzimas endógenos (Macierzanka; Mackie; Krupa, 2019; Moor et al., 2018; Suriano et al., 2022).

Apenas uma fina camada de muco separadora cobre o cólon proximal de camundongos, e bactérias podem ser vistas em contato próximo com o epitélio (Bergstrom et al., 2020; Ermund et al., 2013; Kamphuis et al., 2017). Entretanto, os mecanismos que permitem a proximidade das bactérias ao epitélio no cólon proximal ainda precisam ser definidos (Bergstrom e Xia, 2022). À medida que o material luminal se solidifica durante seu transporte distal, uma barreira de muco separadora é formada, distanciando a matéria fecal e a microbiota do tecido subjacente (Bergstrom et al., 2020; Kamphuis et al., 2017). Assim, nas partes distais do cólon de humanos

e roedores, o epitélio é protegido por uma barreira de muco que separa fisicamente a microbiota luminal da superfície do tecido (Birchenough e Johansson, 2020; Johansson et al., 2008).

O epitélio intestinal, localizado abaixo do muco, também atua como uma barreira física essencial, revestindo internamente o lúmen intestinal e separando-o da lâmina própria. Ele é estruturado por células epiteliais intestinais organizadas em monocamada, justapostas e com funções específicas. São exemplos, as células caliciformes, os enterócitos/colonócitos, as células de Paneth, células enteroendócrinas e as células M (*Microfold*) (Bevins e Salzman, 2011; Di Sabatino et al., 2023; Diwakarla et al., 2017). As células caliciformes são responsáveis pela produção de muco (Lock et al., 2020); os enterócitos estão disponíveis em maior abundância e atuam colaborando com a absorção de nutrientes, produção de enzimas digestivas, peptídeos bioativos, dentre outros (Hickey et al., 2023; Stojanović et al., 2021); as células de Paneth, situadas nas criptas intestinais produzem substâncias antimicrobianas com efeito protetor do intestino (Ragab et al., 2024); as células enteroendócrinas produzem hormônios que controlam a motilidade intestinal (Yu et al., 2020) e as células M, por sua vez, auxiliam na captura de antígenos presentes no lúmen intestinal e no transporte desses antígenos para as células dendríticas, que os apresentará para os linfócitos T (Di Tommaso; Gasbarrini; Ponziani, 2021). Esta organização permite com o que o sistema imune associado a mucosa intestinal perceba os antígenos do lúmen, especialmente o perfil dos microrganismos que compõem a microbiota e antígenos alimentares, gere respostas adequadas e/ou tolerância imunológica (Di Tommaso; Gasbarrini; Ponziani, 2021).

A organização celular e integridade da barreira intestinal também é favorecida pela atuação de um complexo juncional de proteínas. As *tights junctions* estão posicionadas na região apical das células epiteliais e são formadas por proteínas transmembranas como as claudinas e ocludinas e por proteínas periféricas como as zônulas oclusivas (ZO-1, ZO-2 e ZO-3) que, juntas, conferem estabilidade e formam uma barreira seletiva que regula a passagem de substâncias, contribuindo com a homeostase tecidual (Arumugam; Saha; Nighot, 2025; Kaminsky; Al-Sadi; Ma, 2021). As caderinas e cateninas estabelecem junções aderentes e são importantes para a adesão, manutenção da polaridade celular e comunicação intercelular (Lessey et al., 2022). Já os desmossomos, junções celulares especializadas, são ricos em desmogleínas e desmocollinas. Essas proteínas estão conectadas a filamentos de queratina e conferem resistência mecânica, colaborando para a integridade estrutural do tecido (Kowalczyk e Green, 2013; Müller; Hatzfeld; Keil, 2021).

O sistema imunológico associado a mucosa intestinal é uma interface altamente especializada e multifuncional que integra diversos componentes celulares para manter a

homeostase da mucosa. Na superfície luminal, as células epiteliais intestinais, incluindo subconjuntos especializados como as células de Paneth, atuam não apenas como uma barreira física, mas também como participantes ativos na defesa do hospedeiro por meio da secreção de peptídeos antimicrobianos, incluindo defensinas e catelicidinas, que exercem efeitos bactericidas contra organismos patogênicos e controle da população bacteriana geral (Di Sabatino et al., 2023; Yang; Liu; Liu, 2025). O ambiente imunológico é ainda modulado por linfócitos intraepiteliais e células imunes residentes, que orquestram um equilíbrio preciso entre citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-17) e mediadores anti-inflamatórios (IL-10, TGF- β) (Hada e Xiao, 2025; Yan et al., 2025), a depender do cenário dos antígenos presentes no lúmen intestinal. Essa interação de citocinas é essencial para conter a ativação imunológica excessiva, mitigando assim o dano epitelial e promovendo a regeneração tecidual (Mowat e Agace, 2014). Na lâmina própria, o compartimento mais profundo da mucosa intestinal, reside uma rede complexa e heterogênea de células imunes. Esta rede inclui efetores-chave tanto do sistema imune inato (como macrófagos, células dendríticas e mastócitos) quanto do sistema imune adaptativo. Nessa região, encontra-se o tecido linfoide associado ao intestino (GALT) que é parte integrante do tecido linfoide associado às mucosas (MALT) (Sterling et al., 2022). O GALT, um dos maiores órgãos linfoides, está presente principalmente no trato intestinal e seus tecidos circundantes (Sterling et al., 2022). Histologicamente, os GALTs incluem placas de Peyer, placas de cripta, folículos linfoides isolados (ILFs) e linfonodos mesentéricos (MLNs) (Randall e Mebius, 2014; Sterling et al., 2022). O GALT também inclui células não imunes, como células M e células imunes, como células T CD⁺ ou auxiliares, células regulatórias (Treg), linfócitos T CD8⁺ ou citotóxicos e células B produtoras de IgA dimérica (Sterling et al., 2022; Yang; Liu; Liu, 2025). Células linfoides inatas (ILCs), fagócitos, células dendríticas e macrófagos são todos linfócitos mono-tradicionais (Min e Rhee, 2015). As células dendríticas do GALT desempenham um papel central na indução da resposta imune adaptativa, capturando antígenos no lúmen e apresentando-os aos linfócitos T CD4⁺ na placa de Peyer (Del Prete et al., 2023). Os linfócitos T ativados diferenciam-se em células efetoras, como os linfócitos T *helper* (Th1, Th2, Th17) e T regulatório, que coordenam a resposta imune celular e humoral. O perfil predominante dos linfócitos é fortemente influenciado pelo perfil da microbiota intestinal. Respostas do tipo Th1 e Th17 estão associadas a presenças de patógenos, com maior liberação de citocinas pró-inflamatórias, enquanto Th2 ocorre na presença de parasitas helmintos. Células Treg são induzidas por populações microbianas comensais específicas e levam a um microambiente de citocinas intestinal anti-inflamatório (Chen et al., 2019; Furusawa; Obata; Hase, 2015; Geuking e Burkhard, 2020; Shim et al., 2023). Os linfócitos B, por sua vez, se

diferenciam em plasmócitos produtores de IgA dimérica, que ao ser secretada na luz do intestino neutraliza patógenos e contribui para o controle das populações microbianas, eliminação de patógenos e manutenção da homeostase intestinal (Belz et al., 2020; Mörbe et al., 2021).

Estudos experimentais têm demonstrado que a microbiota intestinal é crucial para o desenvolvimento e a maturação dos GALTs (Bemark et al., 2024; Borbet et al., 2023; Wu et al., 2025). A microbiota intestinal desempenha um papel contínuo e dinâmico na ativação do GALT ao longo da vida, influenciando criticamente o perfil dos linfócitos T auxiliares, o microambiente de citocinas e a ativação de células B, sua troca de classe e a produção de IgA secretora. Essa interação microbiana-imune sustentada ressalta o papel essencial da microbiota na formação de respostas imunes adaptativas no ambiente intestinal (Bemark et al., 2024). Além disso, as interações diretas entre comunidades microbianas e células imunes dentro do GALT modulam diretamente a polarização para respostas do tipo Th1 ou Th2, o que é fundamental para o desenvolvimento e a regulação adequados da imunidade da mucosa (Wu et al., 2025). Pesquisas mostraram que tanto camundongos livres de germes (GF) quanto livres de patógenos específicos (SPF) apresentam desenvolvimento prejudicado do GALT (Borbet et al., 2023; Fernandez Trigo et al., 2024; Schwarzer et al., 2019). No entanto, se o sistema microbiano intestinal de camundongos GF for reconstruído por meio de transplante de microbiota, os camundongos podem regenerar GALT e seu sistema imunológico da mucosa é restaurado (Britton et al., 2020; Lundberg et al., 2020).

Portanto, é possível observar que a barreira intestinal é uma estrutura complexa e fundamental para a manutenção da saúde, já que atua como uma espécie de escudo, protegendo o organismo contra a entrada de substâncias nocivas, regulando a absorção de nutrientes, permitindo o desenvolvimento de tolerância alimentar, dentre outros. Assim, alterações na sua função estão associadas com o desenvolvimento de doenças (Dmytriv; Storey; Lushchak, 2024).

2.2 Microbiota do trato gastrointestinal

O trato gastrointestinal (TGI) é dividido em regiões anatômicas bem definidas que inclui o estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (cólon e ceco). Sua função é converter os alimentos em componentes que podem ser absorvidos pelo hospedeiro, além das implicações sobre outros sistemas, como imunológico e nervoso (Merchak et al., 2024; Pereira et al., 2024; Zhang e Artis, 2024). Estima-se que, durante a vida, cerca de 60 toneladas

de alimentos passam pelo intestino, juntamente com grandes quantidades de toxinas ambientais e microrganismos. Esses elementos externos participam do desenvolvimento da imunidade gastrointestinal e estabelecem sua comunidade microbiana única, o microbioma intestinal, que se refere ao conjunto principalmente de bactérias (98%) (Guo et al., 2022), mas também incluem archaea, fungos, protistas e vírus (Almeida et al., 2021).

Os filos bacterianos dominantes que habitam o intestino humano incluem Bacillota, Bacteroidota, Actinomycetota, Pseudomonadota, Fusobacteria e Verrucomicrobia, com Bacillota e Bacteroidota representando 90% da microbiota intestinal (Gallardo-Navarro et al., 2024; Vrancken et al., 2019). A tabela 1 mostra os principais grupos microbianos em uma microbiota intestinal de um indivíduo saudável e suas funções.

Tabela 1- Principais grupos microbianos em uma microbiota intestinal saudável (Continua).

Nível taxonômico	Táxons	Funções e associações de saúde	Referência
Filos	Bacillota	Filo dominante; inclui muitos produtores de AGCC como <i>Faecalibacterium</i> , <i>Roseburia</i> e <i>Ruminococcus</i> ; associados à coleta de energia e à saúde intestinal	(McCallum e Tropini, 2024)
	Bacteroidota	Inclui <i>Bacteroides</i> e <i>Prevotella</i> ; envolvidos no metabolismo de carboidratos e na modulação do sistema imunológico	(Tufail e Schmitz, 2024)
	Actinomycetota	Contém espécies de <i>Bifidobacterium</i> ; importantes para a colonização intestinal inicial e fermentação de oligossacarídeos	(Yüksel; Vorgen; Kort, 2024)
	Verrucomicrobiota	Inclui <i>Akkermansia muciniphila</i> ; associada à degradação da mucina e à manutenção da integridade da barreira intestinal	(Karcher et al., 2021)
Gêneros /Espécies	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Principal produtor de butirato; propriedades anti-inflamatórias; associado à prevenção da DII e distúrbios metabólicos	(Long et al., 2024)
	<i>Roseburia spp.</i>	Bactérias produtoras de butirato; contribuem para a saúde intestinal e o metabolismo energético	(Chong et al., 2025)
	<i>Ruminococcus bromii</i>	Especializado na degradação de amido resistente; auxilia no crescimento de outros micróbios benéficos	(Pilmis; Le Monnier; Zahar, 2020)
	<i>Bacteroides spp.</i>	Envolvido no metabolismo de carboidratos complexos; influencia o desenvolvimento do sistema imunológico	(Rajput et al., 2023)
	<i>Prevotella spp.</i>	Associado a dietas ricas em fibras; papel na fermentação de carboidratos; a	(Kumar; Sain;

	prevalência varia de acordo com a dieta e a geografia	Solanki, 2025)
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Fermenta oligossacarídeos para produzir acetato e lactato; importante para a saúde intestinal, especialmente em bebês	(De Bruyn et al., 2024)
<i>Akkermansia muciniphila</i>	Degrada a mucina; associado à melhoria da saúde metabólica e da função da barreira intestinal	(Karcher et al., 2021)
<i>Christensenella minuta</i>	Ligado à massa corporal magra; papel potencial no metabolismo energético e na saúde intestinal	(Akbuğa-Schön et al., 2024)
<i>Barnesiella spp.</i>	Contribui para a resistência à colonização contra patógenos; envolvido na modulação imunológica	(Zhang et al., 2025)
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	Produce equol a partir de isoflavonas de soja; benefícios potenciais no equilíbrio hormonal e efeitos antioxidantes	(Kumar et al., 2025)
<i>Oxalobacter formigenes</i>	Degrada oxalato; associado à redução do risco de formação de cálculos renais	(Kumar et al., 2025)

Fonte: Do autor (2025)

Embora ainda controverso, evidências apontam que a colonização do intestino pode iniciar antes mesmo do nascimento (Coscia et al., 2021). Estudos identificaram DNA microbiano em tecido placentário, líquido amniótico, sangue do cordão umbilical e mecônio, mesmo na ausência de infecção ou inflamação. Essas descobertas desafiam o paradigma do "útero estéril" e sugerem que a colonização microbiana pode começar antes do nascimento (Bolte; Moorshead; Aagaard, 2022; Collado et al., 2016; D'Argenio, 2018). No entanto, a origem desse microbioma fetal ainda é desconhecida. A teoria atualmente aceita é que os microrganismos que colonizam o feto podem se originar tanto da vagina por meio de colonização ascendente (Goldenberg et al., 2008a, 2008b; Romero et al., 2007; Steel et al., 2005), quanto da cavidade oral/intestino materno por meio da corrente sanguínea (via hematogênica) (Aagaard et al., 2014; Han et al., 2006; Jiménez et al., 2005, 2008). A microbiota detectada em ambientes fetais geralmente inclui bactérias dos filos Bacillota, Pseudomonadota, Bacteroidota e Fusobacteria (D'Argenio, 2018). Após o nascimento, temos o momento crítico, em que um ecossistema rico e dinâmico se desenvolve a partir do parto, contato com o leite materno e pele da mãe, além dos microrganismos do ambiente. A colonização da microbiota varia de acordo com o tipo de parto (Inchingolo et al., 2024). No que diz respeito ao parto natural, os recém-nascidos adquirem uma composição de microbiota mais diversa e com semelhanças à microbiota vaginal de sua mãe (Yao et al., 2021). De fato, uma análise do mecônio de recém-nascidos (Dominguez-Bello et al., 2010) revelou uma forte correlação entre a microbiota do trato digestivo do recém-nascido e as comunidades microbianas da vagina da

mãe: *Lactobacillus*, *Prevotella* e *Sneathia*. Ao contrário, os bebês nascidos por cesariana adquirem bactérias derivadas do ambiente hospitalar e da pele da mãe: *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* spp. (Azad et al., 2013; Dominguez-Bello et al., 2010; Inchingolo et al., 2024). A microbiota intestinal de recém-nascidos por cesariana é menos diversificada em termos de espécies de microrganismos do que a microbiota de bebês de parto natural e estas diferenças se estendem por fases mais tardias da vida (Pahirah et al., 2024).

Estima-se que em um adulto há 10^{14} UFC/mL de bactérias colonizando o trato gastrointestinal (Anlu et al., 2019). A concentração da microbiota aumenta ao longo do trato gastrointestinal, com a maior população colonizando o cólon. A microbiota gastrointestinal humana começa já na boca, que abriga uma contagem viável de $10^8 - 10^{10}$ UFC/g de saliva. Os números são reduzidos no estômago (cerca de 10^3 UFC/g de suco gástrico), duodeno e jejuno (conteúdo de $10^2 - 10^4$ UFC/g), e depois aumentam novamente no íleo e cólon (cerca de 10^{10} UFC/g de conteúdo e $10^{10} - 10^{12}$ UFC/g, respectivamente) (Hakansson e Molin, 2011; Ishizawa et al., 2024; Rinninella et al., 2019; Sekirov et al., 2010). Com mais de um trilhão de bactérias, a microbiota gastrointestinal representa 70% de toda a população de microrganismos comensais no corpo humano, sendo responsáveis pela produção de compostos bioativos, síntese de nutrientes, vitaminas e fatores tróficos. O microbioma intestinal em conjunto possui mais de três milhões de genes, produzindo milhares de metabólitos, enquanto o genoma humano consiste em aproximadamente 23.000 genes (Valdes et al., 2018). Além disso, os microrganismos presentes no TGI desempenham papel importante na digestão e metabolização de uma gama de compostos químicos, o que impacta na saúde intestinal e sistêmica, tendo implicações sobre imunidade, inflamação, metabolismo e no eixo intestino-cérebro (Aburto e Cryan, 2024; Ma et al., 2023).

Como visto acima, a microbiota presente no TGI exerce diversas funções importantes na saúde humana, incluindo a manutenção da homeostase intestinal. O TGI possui um ecossistema extremamente complexo que coexiste em equilíbrio com o hospedeiro, este oferece um ambiente rico em nutrientes à microbiota, que por sua vez, por meio da fermentação colônica de moléculas não digeríveis, produz diversos compostos bioativos, como os ácidos graxos de cadeia curta, além da interação direta com o epitélio, exercendo efeitos benéficos ao hospedeiro (Afzaal et al., 2022). Quando este equilíbrio é perturbado, ocorre o que naturalmente é referido como disbiose intestinal (Hrncir, 2022). O desequilíbrio na diversidade e abundância das populações microbianas e a mudança no perfil de metabólitos produzidos na fermentação colônica podem tornar a disbiose uma condição patológica de alta gravidade (Carding et al., 2015; Singh et al., 2021).

2.3 Disbiose

O microbioma intestinal tem recebido crescente atenção nas últimas décadas e os dados acumulados mostraram como as alterações intestinais estão envolvidas na patogênese de muitas doenças gastrointestinais (Shan; Lee; Chang, 2022). A disbiose refere-se a mudanças na composição e/ou função da estrutura da microbiota intestinal que levam a efeitos adversos na saúde do hospedeiro (Levy et al., 2017; Singh et al., 2021).

Em indivíduos saudáveis, a composição equilibrada das populações microbianas está em harmonia com o sistema imunológico da mucosa, o GALT (Bemark et al., 2024). No entanto, quando a microbiota intestinal é severamente perturbada, principalmente pelo aumento de moléculas imunogênicas como lipopolissacarídeo (LPS) e mudança do perfil dos metabólitos microbianos, podem desencadear-se respostas imunológicas locais e posteriormente sistêmicas (Tilg et al., 2020), tornando possível o surgimento de doenças associadas ao intestino. Doenças associadas ao intestino, como doença inflamatória intestinal (DII), obesidade e diabetes tipo 2, são frequentemente associadas a perturbações da microbiota intestinal, com redução da diversidade (Lavelle e Sokol, 2020) e ao desaparecimento de certos grupos bacterianos específicos, incluindo *Faecalibacterium* e *Akkermansia*, que são consideradas como promotoras de tolerância imunológica (Alameddine et al., 2019; Demirci et al., 2019; Ottman et al., 2017). A disbiose também foi associada como um fator de risco para síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, distúrbios psiquiátricos e doenças neurodegenerativas (Al-Rashidi, 2021; Durack e Lynch, 2019).

A doença inflamatória intestinal (DII) é um estado inflamatório crônico do trato gastrointestinal (TGI), caracterizado por alteração das estruturas da mucosa, frequentemente acompanhada de alterações da microbiota intestinal (Daliri et al., 2020; Khan et al., 2019). Inclui a doença de Crohn (DC) e colite ulcerativa, que afetam um número crescente de indivíduos em todo o mundo (Ni et al., 2017). O padrão de disbiose mais associado aos pacientes com DII é uma diminuição na diversidade de Bacillota, Bacteroidota, e um aumento relativo de espécies bacterianas pertencentes a Proteobacteria, especialmente *Enterobacteriaceae* (Qiu et al., 2022).

Características individuais, hábitos de vida e uso de medicações impactam diretamente sobre a microbiota intestinal, tais como a alimentação (Vernocchi; Del Chierico; Putignani, 2020), idade (Aleman e Valenzano, 2019), exercício físico (Allen et al., 2018; Zhao et al., 2018), uso de pré, pró e posbióticos (Ottaria et al., 2024; Scarpellini et al., 2021) e uso de

antibióticos (Haak et al., 2019) são outros fatores que podem impactar sobre modulação da microbiota intestinal e suas funções. Por exemplo, uma dieta rica em gordura, especialmente em termos de ácidos graxos saturados determina um desequilíbrio da comunidade microbiana, podendo até levar à disbiose (Vernocchi; Del Chierico; Putignani, 2020). Em relação a idade, a microbiota associada a jovens é enriquecida com táxons bacterianos que demonstram ter funções imunomoduladoras, como *Clostridiales* e *Bifidobacterium*, enquanto as comunidades bacterianas associadas a idosos são enriquecidas com patobiontes, por exemplo, *Enterobacteriaceae* (Quercia et al., 2014; Smith et al., 2017). Já em relação à atividade física, as evidências apontam para a promoção de maior diversidade microbiana, aumento de bactérias benéficas (como *Akkermansia* e *Faecalibacterium*), melhora da função da barreira intestinal, além de reduzir a inflamação sistêmica. Dessa forma, possui efeitos positivos sobre a microbiota em estados não saudáveis, como obesidade e diabetes, e em indivíduos saudáveis aprimorando sua diversidade e função (Choi et al., 2013; Evans et al., 2014; Lambert et al., 2015; Varghese et al., 2024).

Uma vez que um perfil microbiano diverso e estável parece proteger contra doenças, muitos esforços têm sido feitos para identificar microrganismos benéficos que possam contribuir para a melhora do perfil microbiano e de seus metabólitos e tratar quadros de disbiose. Nesse contexto, os probióticos surgem como a principal ferramenta não farmacológica para promover a saúde intestinal (Vallejos; Bueno; Kalergis, 2025).

2.4 Disbiose induzida por antibióticos

Os antibióticos são um agente terapêutico essencial comumente administrado aos pacientes para tratar diferentes infecções bacterianas. Entretanto, alguns antibióticos afetam não apenas os patógenos, mas também outros membros da microbiota, resultando em alterações de longo prazo no microbioma intestinal causando disbiose (Holmes et al., 2020; Ianiro; Tilg; Gasbarrini, 2016). O impacto dos antibióticos na microbiota depende de sua classe, duração, dosagem, frequência e idade no momento do tratamento (Vandenplas et al., 2020). A tabela 2 mostra diferentes classes dos antibióticos e seus efeitos sobre os táxons microbianos intestinais.

Tabela 2 - Efeito dos antibióticos sobre os táxons microbianos intestinais.

Classe de antibióticos	Exemplos	Espectro alvo	Principais grupos microbianos afetados	Mudanças microbianas observadas	Referência
Beta-lactâmicos	Amoxicilina, Ceftriaxona	Amplo (Gram+ e Gram-)	↓ <i>Clostridiales</i> , Bacteroides, <i>Bifidobacterium</i> ↑ <i>Enterococcus</i> , <i>Escherichia/Shigella</i>	Redução de produtores de AGCC (por exemplo, <i>Lachnospiraceae</i>); aumento de <i>Pseudomonadota</i>	(Li et al., 2025)
Macrolídeos	Azitromicina, Eritromicina	Principalmente Gram+	↓ <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> ↓ <i>Prevotella</i>	Diminuição acentuada de táxons benéficos; perturbação prolongada da microbiota	(Luchen et al., 2023)
Lincosamidas	Clindamicina	Anaeróbios, alguns Gram+	↓ Bacteroides, <i>Clostridium XIVa</i> , <i>Faecalibacterium</i>	Forte depleção de anaeróbios; alto risco de supercrescimento de <i>C. difficile</i>	(Pilmis; Le Monnier; Zahar, 2020)
Nitroimidazóis	Metronidazol	Anaeróbios estrictos	↓ Bacteroides, <i>Clostridium</i> , <i>Ackermansia muciniphila</i>	Degradação alterada de mucina e interações epiteliais	(Pilmis; Le Monnier; Zahar, 2020)
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino, Levofloxacino	Amplo, Foco Gram-	↓ Bacteroidota, Bacillota ↑ <i>Pseudomonadota</i>	Queda acentuada na diversidade; alguma recuperação após 1 mês, mas mudanças persistentes podem permanecer	(Levast et al., 2021)
Carbapenêmicos	Imipenem, Meropenem	Espectro muito amplo	Impacto geral leve; perda variável em Bacillota e Bacteroidota	Menor impacto devido à baixa excreção fecal; alguma depleção seletiva de anaeróbios	(Pilmis; Le Monnier; Zahar, 2020)

Fonte: Do autor (2025)

Vários estudos mostraram que a administração de antibióticos promove a disbiose intestinal (Guarner et al., 2024; Kesavelu e Jog, 2023; Neuman et al., 2018; Zhang et al., 2021), contribui para várias doenças relacionadas ao intestino, como diarreia associada a antibióticos e colite associada a *Clostridium difficile* (Rupnik; Wilcox; Gerding, 2009) e, curiosamente, pode afetar os resultados comportamentais (ou seja, aumento da prevalência de depressão e sintomas de autismo) (Clapp et al., 2017). Estudos mostraram que o uso de claritromicina e metronidazol durante uma semana pode causar distúrbios na comunidade microbiana da

garganta e do intestino, com potenciais consequências a longo prazo (Jakobsson et al., 2010). Os maiores impactos deletérios da terapia com antibióticos ocorrem quando os antibióticos são prescritos com alta frequência e no início da vida (Shao et al., 2017). Estudos relataram que o uso de antibióticos durante a infância é acompanhado por uma variedade de distúrbios imunomediados, como doença inflamatória intestinal (Yamamoto-Hanada et al., 2017). O uso de antibióticos de amplo espectro altera significativamente a composição e função da microbiota intestinal, reduzindo a diversidade em mais de 25% e cria um ambiente favorável para o estabelecimento de cepas resistentes (Lathakumari et al., 2024; Patangia et al., 2022). Um efeito preocupante a longo prazo do uso de antibióticos é seu potencial para selecionar genes resistentes a antibióticos (Vandenplas et al., 2020). Por exemplo, em um estudo clínico, voluntários saudáveis tratados com 150 mg de clindamicina relataram uma regulação positiva de genes de resistência a antibióticos entre *Bacteroides* que persistiu de 6 meses a 2 anos após a conclusão do tratamento (Card et al., 2015). Além disso, foi evidente uma perda considerável na diversidade microbiana intestinal. Como nem todos os antibióticos têm como alvo a mesma bactéria, é comum usar uma combinação de diferentes antibióticos, por exemplo, ampicilina, gentamicina, metronidazol, neomicina e vancomicina, para ampliar o espectro antimicrobiano para o tratamento de infecção bacteriana grave, alterando assim fortemente a comunidade microbiana do intestino (Holmes et al., 2020).

Como vimos, o uso indevido de antibióticos pode induzir não apenas a disbiose, mas também a ameaça de resistência aos antibióticos, o que leva à busca por outra classe de medicamentos antibacterianos, causando sérios riscos à saúde humana (Rosa et al., 2018).

2.5 Disbiose induzida por vancomicina

O tratamento com antibióticos resulta em alterações de curto e longo prazo da microbiota intestinal em camundongos e humanos (Lathakumari et al., 2024). A vancomicina, um antibiótico glicopeptídeo, é principalmente ativo contra as bactérias Gram-positivas (Liu et al., 2020). Focando nos blocos de construção da parede celular, a vancomicina pode inibir o crescimento bacteriano pela inibição da síntese de peptidoglicano, que é um dos principais componentes da parede celular de bactérias Gram-positivas (Hawkes, 2017). A parede celular bacteriana contém uma camada rígida de peptidoglicano com uma estrutura altamente reticulada composta por polímeros longos de ácido N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetilglucosamina (NAG). A vancomicina liga-se à D-alanil D-alanina, que inibe a glicosiltransferase (peptidoglicano sintase) e o transportador P-fosfolipídeo, impedindo assim

a síntese e polimerização de NAM e NAG dentro da camada de peptidoglicano. Essa inibição enfraquece as paredes celulares bacterianas e, em última análise, causa extravasamento de componentes intracelulares, resultando em morte celular bacteriana (Lee et al., 2019).

O uso de vancomicina causa redução da diversidade microbiana com uma diminuição de bactérias Gram-positivas (principalmente Bacillota - *Lactobacillus plantarum*, *Faecalibacterium prausnitzii* e *Anaerobutyricum hallii*) e um aumento compensatório de bactérias Gram-negativas (principalmente Proteobacteria - espécies *Escherichia coli*, *Haemophilus* e *Serratia*) (Khan et al., 2019; Vrieze et al., 2014). Reijnders et al., (2016), revelaram que uma diminuição acentuada da diversidade microbiana, diminuição da abundância relativa da maioria das bactérias Gram-positivas do grupo Bacillota e aumento de Proteobacteria Gram-negativas causadas pelo tratamento com vancomicina persistiram 56 dias após o término do uso do antibiótico. Em um estudo realizado por Isaac et al., (2017), os autores revelaram que a vancomicina desaparece com grande parte das OTUs bacterianas encontradas no TGI, incluindo todas as OTUs basais detectadas do filo Bacteroidetes. Além disso, vários gêneros bacterianos do filo Proteobacteria que foram associados a infecções humanas (*Klebsiella* e *Escherichia* / *Shigella*) aumentaram após o tratamento. Além das alterações dos grupos microbianos, a terapia oral com vancomicina pode predispor a outros distúrbios relacionados à microbiota, incluindo obesidade (Thuny et al., 2010), asma (Russell et al., 2012) e diabetes (Candon et al., 2015). O uso de vancomicina em modelos murinos mostrou uma infinidade de alterações na homeostase do hospedeiro. Ratos Wistar expostos à vancomicina apresentaram ceco mais pesado e com menor pH que os controles. Houve mudança na comunidade bacteriana no ceco, íleo e fezes. Notavelmente, a carga bacteriana anaeróbia foi aumentada, com menores diversidades α e β , caracterizadas por uma diminuição no filo Bacillota e um aumento em Proteobacteria e *Verrucomicrobiaceae* (Tulstrup et al., 2015).

Tendo em vista os riscos e malefícios da terapia com vancomicina sobre a microbiota intestinal, o uso de prebióticos e probióticos são terapias emergentes que podem ser uma intervenção potencial para abordar os efeitos prejudiciais da disbiose intestinal induzida por antibióticos (Lee et al., 2020).

2.6 Probióticos

O termo probiótico vem do grego remetendo à ideia de “a favor da vida”, e tem sido empregado de diversas maneiras ao longo dos anos, mas o conceito mais atual e utilizado é o

dado por Hill et al., (2014), em que definem probióticos como microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas.

Os primeiros estudos sobre as propriedades benéficas de alguns microrganismos foram conduzidos pelo cientista russo Ilyich Metchnikoff no início do século XX que demonstrou os benefícios de alimentos fermentados para o metabolismo humano (Metchnikoff, 1907; Penna et al., 2000). A utilização de microrganismos probióticos tem sido cada vez mais reconhecida como uma estratégia para melhorar a saúde humana e tratar doenças (Hill et al., 2023). Os probióticos podem ser administrados na forma de suplementos ou como parte de alimentos e bebidas fermentadas. Os mecanismos responsáveis pelos benefícios dos probióticos envolvem interações com a microbiota intestinal residente e interações diretas com o hospedeiro (Mazziotta et al., 2023; Youn et al., 2022). Dentre esses benefícios, destacam-se:

- a) **Manutenção do equilíbrio microbiano e proteção contra patógenos.** Os probióticos auxiliam na manutenção de um perfil saudável da microbiota intestinal, promovendo o crescimento de microrganismos benéficos e mitigando infecções intestinais por meio da competição com patógenos, produção de substâncias antimicrobianas e melhora da resposta imunológica do hospedeiro às infecções intestinais (Wang; Zhang; Zhang, 2021; Wieërs et al., 2020).
- b) **Melhoria da função intestinal.** Os probióticos, devido à sua capacidade de modular a função da barreira intestinal, promovem a redução da inflamação local, fortalecem a barreira epitelial e aprimoram a digestão e a absorção de nutrientes (Gou et al., 2022; Zheng et al., 2023).
- c) **Modulação do sistema imunológico.** Os probióticos podem estimular o sistema imunológico ao induzir a produção de citocinas, ativar células imunológicas, modular as respostas imune local e influenciar na imunidade sistêmica, principalmente mediado pela indução do perfil de linfócito T regulatórios (Treg) (Cristofori et al., 2021; Liu et al., 2022).
- d) **Modulação do metabolismo.** Os probióticos têm a capacidade de produzir metabólitos bioativos que aumentam a sensibilidade à insulina, ajudam a manter os níveis de glicose no sangue e reduzem os níveis de colesterol por meio dos efeitos positivos sobre o metabolismo intermediário do hospedeiro (Salles; Cioffi; Ferreira, 2020; Song et al., 2023).

Dentre os principais grupos de microrganismos estudados como probióticos, destacam-se os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e algumas espécies de *Bacillus* (Amer et al., 2017). Porém existem preocupações em relação ao uso de espécies de *Bacillus*, *Escherichia* e *Enterococcus* como probióticos, pelo fato desses gêneros apresentarem espécies patogênicas oportunistas (Hanchi et al., 2018; Piewngam et al., 2018; Vinayamohan et al., 2024).

Os efeitos dos probióticos são amplamente reconhecidos como cepa-específicos, uma vez que diferentes linhagens de uma mesma espécie podem apresentar variações genéticas que influenciam sua resistência às condições gastrointestinais, capacidade de adesão ao epitélio intestinal, modulação do sistema imunológico e produção de metabólitos bioativos (Mazziotta et al., 2023). Estudos demonstram que *Lactobacillus rhamnosus* GG possui proteínas específicas de adesão à mucosa intestinal, enquanto outras cepas da mesma espécie não apresentam essa característica (Segers e Lebeer, 2014). Da mesma forma, *Bifidobacterium breve* M-16V induz a produção de células T regulatórias (Tanaka e Nakayama, 2017), enquanto *Lactobacillus casei* Shirota promove uma resposta Th1 (Chiba et al., 2010), destacando a influência da cepa na modulação imunológica. Portanto, a seleção criteriosa da cepa probiótica é essencial para garantir efeitos benéficos específicos e sustentados no hospedeiro.

O efeito de um probiótico também é dose-dependente, pois a quantidade de células administradas influencia sua capacidade de colonização, modulação da microbiota intestinal e interação com o sistema imunológico (Hill et al., 2023). Estudos demonstram que diferentes concentrações de probióticos podem resultar em respostas variadas, sendo que doses mais altas ($>10^8$ UFC/mL) no geral promovem efeitos mais consistentes na restauração da microbiota e na imunomodulação (Ouweland, 2017). No entanto, a dose ideal pode variar de acordo com a cepa e o objetivo terapêutico, uma vez que algumas cepas exibem efeitos benéficos mesmo em baixas concentrações, enquanto outras necessitam de uma carga celular elevada para exercer impacto significativo (Marco et al., 2021). A legislação brasileira adota concentrações de 10^8 UFC/mL, mas valores abaixo podem ser aceitos desde que comprovada sua eficácia (Brasil, 2002).

As evidências dos benefícios dos probióticos são irrefutáveis e a grande maioria destas pesquisas baseia-se em probióticos bacterianos. Ainda menos estudadas, as leveduras também podem ser utilizadas como probióticos, e algumas cepas como as *Saccharomyces boulardii* e *Kluyveromyces fragilis* (B0399) já são distribuídas pela indústria farmacêutica como probióticos e seus efeitos benéficos amplamente comprovados (Chen et al., 2014; Czerucka; Piche; Rampal, 2007; Ranadheera; Baines; Adams, 2010). No entanto, comparado aos

probióticos bacterianos, as leveduras ainda carecem de mais estudos que explorem todo o seu potencial como probiótico e seus benefícios à saúde.

2.7 Probióticos e o sistema imunológico

A modulação do sistema imunológico é um dos temas mais comentados da atualidade. A principal função do sistema imunológico é nos defender contra patógenos, reconhecendo padrões moleculares estranhos (padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs) e de dano celular (padrões moleculares associados a danos - DAMPs). Dessa forma, o sistema imune intestinal desempenha um papel importante na manutenção da saúde e na patogênese de diversas doenças (Jenthó e Weis, 2021; Kroemer et al., 2024; Li; Wu, 2021).

Estudos demonstraram que os probióticos podem regular os sistemas imunológicos inato e adaptativo, exercendo seus efeitos sobre diversas células imunológicas, incluindo células dendríticas, linfócitos B e T e macrófagos (Petruzziello et al., 2019a). Esses microrganismos benéficos possuem uma ampla gama de efeitos benéficos na saúde intestinal e no sistema imunológico. Eles produzem compostos benéficos, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácido láctico, e aumentam a produção de peptídeos antimicrobianos como lactobina A, curvacina A, enterocina e pediocina no intestino. Esses peptídeos desempenham um papel crucial na defesa contra microrganismos patogênicos e ajudam a manter uma microbiota intestinal saudável, reduzir bactérias patogênicas e estimular o sistema imunológico (Anjana e Tiwari, 2022; Asefa et al., 2025; Gou et al., 2022; Mandal; Silva; Franco, 2014; Wang; Zhang; Zhang, 2021; Wieërs et al., 2020).

Os probióticos também podem modular a produção e a secreção de ácidos biliares, que não são apenas essenciais para a digestão e absorção de gorduras, mas também atuam como moléculas de sinalização em vários processos metabólicos. A desregulação do metabolismo do ácido biliar tem sido implicada em vários distúrbios metabólicos e inflamatórios, e a capacidade dos probióticos de modular esse processo tem potencial terapêutico (Li et al., 2022b; Sivamaruthi et al., 2020; Torres-Sánchez et al., 2022).

Além disso, os probióticos contribuem para o reforço da barreira intestinal, aumentando a expressão de proteínas de junção estreita, mucinas e antimicrobianos, promovendo assim a integridade da mucosa, limitando a translocação de substâncias nocivas e facilitando a absorção de nutrientes, especialmente no intestino delgado (Helmy et al., 2017; Mugwanda et al., 2023; Petruzziello et al., 2019b; Yoha et al., 2022). As vesículas extracelulares (VEs) produzidas por probióticos também têm atraído atenção significativa devido à sua potencial atividade biológica

e aplicações futuras. Essas vesículas servem como meio de transporte de diversas macromoléculas, incluindo lipídios, polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, e têm sido associadas a propriedades indutoras de saúde (Krzyżek et al., 2023). Pesquisas anteriores demonstraram que as VEs desempenham um papel na modulação das respostas inflamatórias e da função imunológica. Por exemplo, as VEs produzidos pelo probiótico *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 demonstraram mitigar a inflamação modulando a via NF- κ B e influenciando a atividade das células imunológicas (Rodvalho et al., 2020).

Estudos mostraram que *Faecalibacterium prausnitzii* possui capacidade de induzir a citocina anti-inflamatória IL-10 em células mononucleares do sangue periférico, o que provavelmente se deve em parte à sua produção de ácidos graxos de cadeia curta (Martín et al., 2017). Pesquisas conduzidas por Galdeano et al., (2015), investigaram a influência de *Lactobacillus casei* CRL 431 e *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1518 no sistema imunológico e descobriram que os probióticos estimulam receptores Toll-like e induzem a resposta imunológica. É conhecido que diversas cepas de probióticos podem induzir o perfil de células T regulatória produtoras de IL-10 anti-inflamatória o que contribui para a tolerância imunológica no intestino e redução da inflamação local e sistêmica (Galdeano et al., 2015; Petruzzello et al., 2019b; Hernández-Mendoza; González-Córdova; Martínez-Porchas, 2022).

As leveduras probióticas desempenham um papel multifacetado na regulação do sistema imunológico no intestino. Além da competição com bactérias patogênicas, elas interagem com células imunológicas, como células epiteliais e células dendríticas, que residem no revestimento intestinal (Smith et al., 2014, 2016). Essa interação estimula a produção de citocinas e outros mediadores imunológicos, como a interleucina (IL)-10 e o interferon (IFN)- γ , que aprimoram os mecanismos gerais de defesa do corpo contra patógenos invasores e reduzem a inflamação (Okada et al., 2021). Além disso, leveduras probióticas podem modular a atividade de células imunes envolvidas em processos inflamatórios crônicos, potencialmente aliviando os sintomas associados à doença inflamatória intestinal (DII) e outros distúrbios inflamatórios intestinais (Li et al., 2022a).

Estudos sugerem que leveduras probióticas podem regular negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), ao mesmo tempo que promovem a produção de mediadores anti-inflamatórios como IL-10 (Okada et al., 2021). Leveduras probióticas também parecem estar envolvidas na prevenção de alergias. A exposição precoce a certas cepas de *S. cerevisiae* pode desempenhar um papel na prevenção de alergias alimentares e asma em camundongos, influenciando o desenvolvimento do sistema imunológico (Fonseca et al., 2017; Miranda et al., 2020). Estudos em modelos animais sugerem

que leveduras probióticas podem regular o equilíbrio entre as respostas imunológicas Th1 e Th2, potencialmente levando o sistema imunológico a um estado menos alérgico. No entanto, mais ensaios em humanos são necessários para confirmar esse benefício (Sharma e Im, 2018).

Em resumo, os probióticos desempenham um papel significativo na manutenção do equilíbrio entre as respostas imunes inatas e adaptativas por meio de suas interações diretas e indiretas com células epiteliais, células dendríticas e linfócitos B e T (Hernández-Mendoza; González-Córdova; Martínez-Porchas, 2022). Além disso, os probióticos podem regular a expressão gênica e mediar a imunomodulação ao direcionar vias de sinalização específicas (Yan e Polk, 2011). Esses efeitos imunológicos dos probióticos destacam seu potencial como uma abordagem terapêutica valiosa, pois podem modular as respostas imunes, promover efeitos anti-inflamatórios e contribuir para o manejo geral de diversas doenças.

2.8 Leveduras como probióticos

Nas últimas décadas, pesquisadores começaram a explorar o potencial de cepas de leveduras que se mostraram particularmente promissoras no apoio à saúde intestinal (Gomaa, 2020). Embora as bactérias do ácido láctico (BAL) continuem a desempenhar um papel significativo, essas novas e interessantes oportunidades parecem ter um impacto positivo no futuro da saúde intestinal. As leveduras têm ganhado cada vez mais atenção como potenciais candidatas a probióticos nos últimos anos. Embora as bactérias dominem o mercado de probióticos há muito tempo, pesquisas sugerem que cepas específicas de leveduras possuem propriedades que podem ser benéficas para a saúde humana (Staniszewski e Kordowska-Wiater, 2021).

A maior parte dos microrganismos usados como probióticos, disponíveis comercialmente, são procariotos de origem humana. Apenas três leveduras (célula eucariótica) são utilizadas, *Saccharomyces boulardii*, *Kluyveromyces fragilis* (B0399) e *Saccharomyces cerevisiae* (Chen et al., 2014; Czerucka; Piche; Rampal, 2007; Shen et al., 2022). *K. fragilis* (B0399) é a primeira levedura probiótica aprovada que não pertence ao gênero *Saccharomyces* e foi aprovada como probiótico tanto para consumo humano (Quarella et al., 2016) quanto para alimentação animal (EFSA, 2004). *S. boulardii*, originalmente isolado de frutas tropicais do Sudeste Asiático no início do século 20 (Staniszewski e Kordowska-Wiater, 2021), já foi clinicamente comprovado para melhorar as condições diarreicas (por exemplo, associada a antibióticos, viajantes, aguda), síndrome do intestino irritável e infecção por *Helicobacter pylori* (McFarland; Evans; Goldstein, 2018).

As leveduras chamaram a atenção para a sua possível utilização como probióticos, devido à alta resistência a enzimas gastrointestinais, sais biliares, mudanças de pH, ácidos orgânicos e mudanças de temperatura (Sambrani et al., 2021). O risco de desenvolvimento de resistência a antimicrobianos por bactérias patogênicas, associadas com o tratamento antibiótico também é outro fator que torna a alternativa do uso de leveduras interessante como probióticos. Genes de resistência podem ser transferidos não só entre os membros da microbiota, mas também entre os probióticos e patógenos; genes de resistência a antibióticos já foram relatados em várias cepas de *Lactobacillus*. As leveduras probióticas não são afetadas por antibióticos (Shen et al., 2022) e a transferência de material genético não ocorre entre bactérias e leveduras, tornando-as seguras para uso durante o tratamento de pacientes com antibióticos (Czerucka; Piche; Rampal, 2007; Sambrani et al., 2021). Além disso, as leveduras probióticas estão gerando entusiasmo porque têm características interessantes do ponto de vista da aplicação. (a) Funcionalidade diversificada: pesquisas iniciais indicam que as leveduras probióticas podem ter uma gama mais ampla de funcionalidades em comparação com algumas cepas BAL. Por exemplo, algumas leveduras podem produzir compostos que não apenas beneficiam seu próprio crescimento, mas também estimulam o crescimento de bactérias benéficas no intestino (Gomaa, 2020). Esse efeito sinérgico pode levar a um microbioma intestinal mais eficiente e diverso. (b) Aplicações apropriadas: a descoberta de várias cepas de leveduras probióticas abre portas para o desenvolvimento de intervenções probióticas mais direcionadas. Diferentes cepas de leveduras podem ser eficazes para abordar problemas específicos de saúde intestinal, oferecendo uma abordagem mais personalizada para a suplementação de probióticos (Afzaal et al., 2022).

Vários estudos relatam evidências de que, além da levedura *S. boulardii*, outras espécies não-*Saccharomyces*, como *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii* (Psani e Kotzekidou, 2006), *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kudriavzevii* (Staniszewski e Kordowska-Wiater, 2021), *P. guilliermondii*, *Candida orthopsilosis* (Simões et al., 2021), *Pichia kluyveri* (Menezes et al., 2020b) possuem propriedades probióticas. A Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) conferiu exclusivamente o status de presunção qualificada de segurança (QPS) a certas leveduras, incluindo *K. marxianus* var. *lactis* e *K. marxianus* var. *fragilis*, que são consideradas adequadas para uso como “aditivos alimentares” (Arévalo-Villena et al., 2018). Estudos realizados por Alvarez et al., (2024), mostraram que as leveduras *Kluyveromyces marxianus*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Pichia manshurica* foram capazes de aderir efetivamente às células epiteliais intestinais Caco-2/TC-7, com taxas de

adesão variando de 33% a 100%. Além disso, foram capazes de reduzir a adesão e invasão de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em mais de 50%.

Menezes et al., (2020a), trabalhando com leveduras isoladas de alimentos fermentados brasileiros, verificou que a cepa *P. kluyveri* CCMA 0615 reduziu significativamente a adesão de *Listeria monocytogenes* às células Caco-2 em 14%, o que foi maior do que o probiótico comercial *S. boulardii*. Além disso, reduziu significativamente os níveis de infecção por *Escherichia coli* EPEC e *L. monocytogenes*.

No estudo realizado por Ochangco et al., (2016), relataram que cepas de *Debaryomyces hansenii* isoladas de queijo e peixe demonstraram capacidades probióticas ao resistir a estresses gastrointestinais, aderindo às células e provocando uma resposta anti-inflamatória aumentada em comparação com *S. cerevisiae* var. *boulardii*.

Oliveira et al., (2017), sugeriram que as leveduras *P. guilliermondii* 25A e *Candida norvegica* 7A, isoladas de azeitonas de mesa fermentadas, exibiram propriedades probióticas potenciais, devido à sua resistência às condições simuladas do trato digestivo, comparável à de *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Simões et al., (2021), também trabalhando com leveduras isoladas de azeitonas naturalmente fermentadas, relataram que duas leveduras (*C. orthopsilosis* CCMA 1748 e *P. guilliermondii* CCMA 1753) exibiram atividade antimicrobiana contra *Salmonella* Enteritidis. *C. orthopsilosis* CCMA 1748 foi capaz de reduzir a adesão de *Salmonella* às células intestinais em 67,9% em ensaios de exclusão.

Estudos conduzidos por Angulo et al., (2023), relataram que a administração de curto prazo (7 dias) de *D. hansenii* CBS 8339 a 10^8 UFC/dia modulou a resposta imunológica com redução da expressão de IFN- γ e aumento da produção de IgG em camundongos Balb/c após infecção por *Escherichia coli*. Adicionalmente, observaram que *D. hansenii* foi detectada nos intestinos no final do experimento, confirmando sua capacidade de se manter viável na passagem pelo gastrointestinal. A cepa *S. boulardii* CNCM I-745 foi estudada para uso como probiótico na medicina humana e é um dos probióticos recomendados para a prevenção e tratamento de diarreia relacionada a antibióticos, incluindo diarreia associada a *Clostridium difficile* (Czerucka; Rampal, 2019). Além disso, estudos pré-clínicos demonstraram um efeito benéfico contra muitos patógenos gastrointestinais, como *Salmonella enterica* var. Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* (cepas enteropatogênicas e enterohemorrágicas), *Vibrio cholerae*, *Rotavirus* e *Candida albicans* (Czerucka; Rampal, 2019; Sen; Mansell, 2020).

2.9 Microencapsulação de probióticos

Microrganismos probióticos para que exerçam seus efeitos potenciais necessitam ser entregues ao hospedeiro com alta viabilidade e precisam resistir às condições extremas do sistema gastrointestinal, como baixo pH, enzimas digestivas e sais biliares atingindo o cólon (Li et al., 2024a). A viabilidade no cólon permite que os probióticos colonizem temporariamente, interajam com a microbiota residente e influenciem funções metabólicas e imunológicas, promovendo equilíbrio microbiano e benefícios como modulação inflamatória, fortalecimento da barreira intestinal e competição com patógenos (Lopes et al., 2023). Estratégias como microencapsulação, uso de veículos alimentares protetores e formulações específicas são empregadas para aumentar a sobrevivência dos probióticos durante sua passagem pelo trato gastrointestinal e otimizar sua ação no cólon (Govaert et al., 2024; Sun et al., 2023, 2024).

A microencapsulação é um processo pelo qual microrganismos ou compostos bioativos são revestidos com materiais protetores ou suas misturas, protegendo, assim, o material do núcleo de estresses ambientais, como oxigênio, alta acidez e ação de enzimas podendo, por exemplo, ser usada para reduzir os efeitos prejudiciais da passagem pelo estômago (Kamble et al., 2024; Kiprono et al., 2024). Tanto células inteiras quanto moléculas bioativas, como antioxidantes, enzimas, polifenóis e micronutrientes, podem ser empacotadas dentro de materiais de parede para formar materiais encapsulados (Reque e Brandelli, 2021).

De acordo com o tamanho da partícula, a tecnologia de encapsulamento é chamada de microencapsulação (de 3 a 800 μm) ou nanoencapsulação (de 10 a 1000 nm). O uso de nano/microencapsulação pode ajudar as substâncias bioativas a serem entregues no local alvo, bem como a serem protegidas de ambientes adversos, melhorando assim sua biodisponibilidade (Huang; Yuan; Baojun, 2023). O encapsulamento de probióticos só é possível através da microencapsulação porque as bactérias são do tamanho de um micron, portanto, a nanotecnologia não é uma opção viável (partículas menores que 1 μm , enquanto as dimensões das células microbianas estão tipicamente na faixa de cerca de 1 a 10 μm) (Yao et al., 2020).

Atualmente, os métodos de encapsulamento de probióticos mais comuns são extrusão, emulsão, coacervação, liofilização e secagem por pulverização (spray drying) (Mahmoud et al., 2020). Muitos estudos têm sido realizados sobre microencapsulação para a preservação de microrganismos probióticos durante o armazenamento e processamento de alimentos (Poopan et al., 2025; Wang et al., 2024a), pois ambos são fatores que podem afetar a viabilidade do probiótico (Cabello-Olmo et al., 2020; Terpou et al., 2019). Diversos compostos podem ser

utilizados para encapsular microrganismos probióticos, como por exemplo, proteínas, polissacarídeos, açúcares e suas combinações ou até mesmo algumas matrizes alimentares líquidas (Chávez e Ledebor, 2007; Pispán; Hewitt; Stapley, 2013). No entanto, ao adicionar microrganismos probióticos aos alimentos, é importante considerar vários aspectos, como seus benefícios efetivos à saúde, propriedades sensoriais, vida de prateleira e sobrevivência do trato gastrointestinal (TGI), que devem ser cuidadosamente equilibrados, pois determinam a funcionalidade e aumentam a aceitação do consumidor desses produtos (Flach et al., 2018). Apesar da diversidade de compostos para ser utilizado como matriz encapsulante, os principais polímeros empregados para encapsulamento de probióticos são alginato, amido, quitosana, goma xantana, k-carragenina, acetato ftalato de celulose, gelatina e proteínas do leite (Mahmoud et al., 2020; Sarao e Arora, 2017; Xie et al., 2023).

O encapsulamento de probióticos pode promover sua viabilidade e funcionalidade em produtos alimentícios (Reque e Brandelli, 2021), além de proporcionar uma liberação controlada para aderir e colonizar efetivamente o intestino. Nesse sentido, os polímeros utilizados para microencapsulação devem ser capazes de resistir e proteger as células da acidez estomacal e liberá-las em condições neutras a alcalinas do intestino delgado (Chen et al., 2024; Coghetto; Brinques; Ayub, 2016; Yang et al., 2024).

Afzaal et al., (2019) estudaram a estabilidade e viabilidade de bactérias probióticas, livres e encapsuladas com alginato de sódio e carragenina, quando aplicadas em iogurte e em condições de TGI. Após 28 dias, as contagens de células viáveis no iogurte foram de 9,97 log a 6,12 log UFC/ml, e quando encapsuladas com alginato de sódio ou carragenina, as contagens viáveis variaram de 9,91 log e 9,89 log UFC/ml a 8,74 log e 8,39 log UFC/ml, respectivamente. No teste de simulação gastrointestinal *in vitro*, houve redução de 7 log para os probióticos livres, enquanto a redução foi de apenas 3 log para os encapsulados. A estabilidade e viabilidade do *L. casei* microencapsulado também foram verificadas após aplicação em sorvete e em condições simuladas de TGI (Afzaal et al., 2020). Os autores usaram dois hidrocolóides diferentes, alginato de cálcio e concentrado proteico de soro de leite, e observaram que a microencapsulação com esses hidrogéis melhorou significativamente a viabilidade das células probióticas em ambos os alimentos transportadores após 80 dias de armazenamento a -20°C, bem como em testes de TGI *in vitro*. O estudo realizado por Thinkohkaew et al., (2024) otimizou o encapsulamento de bactérias probióticas dentro de microcápsulas de alginato revestidas com quitosana. As microcápsulas otimizadas exibiram alta eficiência de encapsulamento, melhoraram a sobrevivência probiótica em ambientes gastrointestinais simulados e mantiveram a viabilidade acima de 8 log UFC/g após 30 dias de armazenamento.

Cerutti Martellet et al., (2023) investigaram a coencapsulação da levedura probiótica *K. marxianus* com o prebiótico Psyllium (*Plantago ovata*) usando soro de queijo como material de revestimento. A levedura encapsulada demonstrou alta viabilidade celular, resistência melhorada a condições gastrointestinais simuladas e uma taxa de adesão significativa às células Caco-2.

A microencapsulação é fundamental para melhorar a sobrevivência de microrganismos probióticos, protegendo-os contra as condições adversas do trato gastrointestinal e garantindo sua entrega eficaz ao intestino (Gharieb; Bresha; Omar, 2024). Além disso, a escolha da matriz encapsulante desempenha um papel importante na proteção desses microrganismos, permitindo sua liberação controlada no local adequado. Portanto, ao selecionar o material de parede apropriado, a microencapsulação aumenta a biodisponibilidade, estabilidade e propriedades funcionais dos probióticos. Isso garante seus benefícios à saúde enquanto melhora sua eficácia em produtos alimentícios, tornando-os mais viáveis para aplicações comerciais e terapêuticas (Zhou et al., 2023).

SEGUNDA PARTE

Artigo 1 - Redigido conforme norma do periódico científico - Versão publicada	
Título do artigo:	Development and characterization of microencapsulated <i>Pichia kluyveri</i> CCMA 0615 with probiotic properties and its application in fermented beverages
Autores:	Iara Ferreira Resende Pâmela Mynsen Machado Martins Dirceu de Sousa Melo Marciane Magnani Disney Ribeiro Dias Rosane Freitas Schwan
Periódico:	International Journal of Food Microbiology
ISSN	01681605
DOI	https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110967

**ARTIGO 1 - Development and characterization of microencapsulated *Pichia kluyveri*
CCMA 0615 with probiotic properties and its application in fermented beverages**

Iara Ferreira Resende^a, Pâmela Mynsen Machado Martins^b, Dirceu de Souza Melo^a, Marciane
Magnani^c, Disney Ribeiro Dias^b, Rosane Freitas Schwan^a

^a Federal University of Lavras, Biology Department, Lavras, MG, Brazil

^b Federal University of Lavras, Food Sciences Department, Lavras, MG, Brazil

^c Federal University of Paraiba, 50851-900, Joao Pessoa, PB, Brazil

*Corresponding author:

Federal University of Lavras, Department of Biology

Campus Universitário, 3037

CEP: 37200-900, Lavras, MG, Brazil

E-mail: rschwan@ufla.br

Tel: +55 35 38291614

Abstract

The study aimed to develop innovative microencapsulated formulations of strains with probiotic attributes, *Pichia kluyveri* CCMA 0615 and *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0732. The yeasts (8 log CFU/mL) were microencapsulated by spray drying technique using whey powder (WP - 15%, 20%, and 30%) and sodium alginate (ALG - 1%). The microcapsules and cell viability were characterized during two months of storage (4 °C and 25 °C). The selected formulations were applied to functional beverage fermentation, and viability and survival in the simulated gastrointestinal tract (GIT) were performed. The viability of yeasts microencapsulated by the spray drying method was shown to be dependent on the strain and encapsulating matrix used, ranging from 84-99%. *P. kluyveri* required refrigeration when storing microcapsules. In functional beverage fermentation, microencapsulated yeast maintained the same fermentative profile with carbohydrate consumption, production of lactic acid (0.30 to 1.10 g/L) and alcohol (0.2 to 1.61 g/L), and greater viability during storage. Finally, the microencapsulation of *P. kluyveri* with 15% WP + 1% ALG maintained high viability under GIT conditions, whether exposed independently (>84%) or incorporated into a food matrix (>94%). The study demonstrated that this innovative microencapsulation of probiotic yeasts increases their viability, improves biotechnological application, and facilitates efficient delivery of probiotics to the host.

Keywords: Non-*Saccharomyces*; Drying; Alginate; Whey.

1. Introduction

Probiotics are live microorganisms that provide health benefits to the host when administered in adequate amounts (Hill et al., 2014). Several studies consider a concentration of 10^6 CFU/mL or CFU/g as the minimum dose to obtain the beneficial effects by probiotics (Klajn et al., 2021; White and Hekmat, 2018). However, effective management of these microorganisms is challenging. Probiotics must withstand processing, storage, and gastrointestinal tract (GIT) adversities to provide benefits (Cassani et al., 2020; Feng et al., 2020). Microencapsulation emerges as a crucial tool in the preservation of probiotics. This technique encapsulates solid and liquid substances called 'core' (Sarao and Arora, 2017). In addition to protecting the material inside the shell, microencapsulation also allows its controlled release in specific locations in the host's GIT (Gharibzahedi and Smith, 2021).

Despite being less explored for probiotic activity, yeasts have therapeutic potential for treating intestinal infections and dysbiosis (Abid et al., 2022). Few studies have evaluated the microencapsulation of yeasts with probiotic attributes, especially non-*Saccharomyces* species, as *Pichia* genus (Arslan et al., 2015; Cerutti Martellet et al., 2023; Vanden Braber et al., 2020).

Saccharomyces and *Pichia* species share some biological traits but differ in key aspects. Both reproduce asexually via multilateral budding and can form pseudohyphae, but *S. cerevisiae* undergoes sexual reproduction by forming asci with globose or oval ascospores, while *Pichia* produces non-conjugated asci. Metabolically, *S. cerevisiae* ferments glucose, sucrose, and raffinose, whereas *Pichia* primarily ferments glucose and can form biofilm. These differences reflect their distinct ecological roles and biotechnological potential (Kurtzman et al., 2011; Vicente et al., 2021).

Previous studies show that the *Pichia kluyveri* CCMA 0615 has important probiotic attributes with the potential for application in human health (Menezes et al., 2018; Menezes, et al., 2020; Menezes et al., 2020). However, in its free form, it is susceptible to long-term storage,

low temperatures, and exposure to GIT conditions, thus affecting its viability (Ferreira et al., 2022). In addition, there are no studies on microencapsulation of *Pichia kluyveri* in the literature.

Therefore, the present study sought to develop a microencapsulation protocol using different encapsulating matrix for the non-*Saccharomyces* yeasts *P. kluyveri* CCMA 0615 and *S. cerevisiae* CCMA 0732, both of which have probiotic attributes. The viability, characteristics of the microcapsules, resistance to gastric conditions, and applicability in fermented beverages were evaluated, aiming to provide an effective strategy for the delivery of stable and functional probiotic yeasts. This research has the potential to significantly contribute to improving human health, inspiring further studies and applications in the field of probiotics.

2. Material and methods

2.1 Microorganisms and culture conditions

The *P. kluyveri* CCMA 0615 and *S. cerevisiae* CCMA 0732 strains from the Agricultural Microbiology Culture Collection (CCMA) of the University of Lavras, were chosen due to their well-documented probiotic attributes and biotechnological applications in previous studies (Menezes et al., 2018; Menezes, et al., 2020; Menezes et al., 2020). These strains have shown promising potential for application in human health. The yeasts were reactivated in liquid molasses medium [in g/L: molasses 137.5 (ECL Eireli – supplier Mellaço de Cana), calcium chloride 1.1 (Dinâmica), urea 2 (Ambion), polysorbate 80 0.5 (Dinâmica) and pH 3.5] until reaching a concentration of 10^8 CFU/mL. At each growth stage, the yeasts were incubated at 28 °C for 48 hours under shaking (120 rpm) (Martins et al., 2022b). At the end of growth, the stationary phase was reached. This stage of microbial growth was assessed using the growth curve (data not shown) and by monitoring the concentration of soluble solids (°Brix), measured with a refractometer (Lorben, Brazil), throughout all stages.

2.2 Definition of formulations and preparation of microencapsulating solutions

The concentrations of each encapsulating matrix to produce microcapsules were meticulously evaluated in preliminary tests (data not shown). The encapsulating matrices used were partially demineralized whey powder (40%) (WP) (Leitino - Minas Gerais, Brazil) and sodium alginate (ALG) (INLAB Confiança - São Paulo, Brazil). The treatments performed and the total soluble solids (% Ts) are presented below: 15% WP + *S. cerevisiae* CCMA0732 (44.80% Ts), 15% WP + 1% ALG + *S. cerevisiae* CCMA0732 (47.62% Ts), 20% WP + *S. cerevisiae* CCMA0732 (58.46% Ts), 30% WP + *S. cerevisiae* CCMA0732 (86.71% Ts), 15% WP + *P. kluyveri* CCMA0615 (46.04% Ts), 15% WP + 1% ALG + *P. kluyveri* CCMA0615 (48.86% Ts), 20% WP + *P. kluyveri* CCMA0615 (58.78% Ts), 30% WP + *P. kluyveri* CCMA0615 (87.02% Ts). The encapsulating matrix were homogenized in distilled water, pasteurized at 75 °C for 30 minutes, and quickly cooled (Andrade et al., 2019). Yeasts were added separately at a concentration of 10^7 CFU/mL. The feed solutions (300 mL) were mixed for 5 minutes using a magnetic stirrer and sent for spray drying.

2.3 Microencapsulation by spray drying

The yeasts were dried in a larger-scale spray dryer (model SD 5.0; Labmaq do Brasil, Ribeirão Preto, Brazil). Martins et al. (2022b) previously studied the drying parameters. The drying air inlet temperature was 87 °C. The feed solutions were kept under constant magnetic stirring and fed into the main chamber through a peristaltic pump, with a feed flow of 1.5 L/h, drying airflow of 1.5×10^5 L/h, and atomization air flow of 60 L/h. The resulting powder was collected at the base of the cyclone and stored in 250 g packages made of polyester, metallization, and polyethylene. Then, they were vacuum-sealed for further analysis. The experiment was carried out in triplicate.

2.4 Drying yield and cell viability

The drying process yield (% w/w) was calculated according to Eq. (1):

$$\text{Drying yield (\%)} = [W_p (1 - X_{w, \text{powder}}) / T_s] \times 100 \quad (1)$$

where W_p is the weight of the powder collected after drying, $X_{w, \text{powder}}$ is the fraction of water present in the powder, and T_s is the total dry solids in the feed (Chandrasekhar et al., 2016).

The cell viability of microencapsulated yeasts (CV) was evaluated after drying. Samples (1 g) were hydrated in 9 mL of peptone water [in g/L: peptone 1 (Himedia)], homogenized in a vortex, and then incubated for 30 min for cell hydration (Chandrasekhar et al., 2016). Serial dilution in triplicate and microdrop plating was performed in YEPG medium pH 3.5 [in g/L: yeast extract 10 (Himedia), glucose 20 (Dinâmica), peptone 20 (Himedia) and agar 20 (Himedia)] to quantification of microorganisms. The plates were incubated at 28 °C for 48 h. Then, the CV (%) was calculated according to Eq. (2):

$$CV (\%) = \{[(\log N \times W_p)/V]/\log N_o\} \times 100 \quad (2)$$

where 'N' is the number of viable cells (CFU/mL of wet material) in the powder, 'Wp' is the weight of the powder collected after drying, 'V' is the volume of the feed suspension, and 'No' is the number of viable cells (CFU/mL) in the initial suspensions.

2.5 Characterization of the encapsulating matrix and microcapsules

The water activity (a_w) was performed using a water activity meter (Aqualab 4TE, Decagon Devices, Pullman, Washington, USA). The gravimetric method was used to determine moisture content. Samples (3 g) were placed in a drying oven (105 °C) until constant weight (AOAC, 2005). Water solubility was measured according to Cano-Chauca et al. (2005). Samples (0.5 g) were placed in flasks containing 50 mL of distilled water and homogenized in an orbital shaker at 100 rpm for 30 min. Then, the solution was centrifuged at 1310 RCF for 5 min. The supernatant was dried in a drying oven (105 °C) until constant weight. Hygroscopicity was performed according to Braga et al. (2019). Samples (0.3 g) were placed in Petri dishes and stored in a glass desiccator without silica at 25°C, containing a saturated sodium chloride solution. After one week, hygroscopicity was measured and expressed as the grams of water absorbed by the sample per 100 g of dry solids.

2.6 Viability of microencapsulated cells during storage

The yeast's viability, *P. kluyveri*, and *S. cerevisiae* were monitored every 15 days during 60 days of storage at 4 °C and 25 °C. The microcapsules obtained were vacuum-packed and divided so each package was opened only once. Cell viability was performed according to topic 2.4. The treatments that received the best results at the end of storage were selected for the following stages.

2.7 Morphology and size of microcapsules

The morphology of the obtained microcapsules was evaluated using a scanning electron microscope (SEM) (model Jeol JSM 6360 LV) with an acceleration voltage of 20 kV. The analysis was carried out under a high vacuum and without tilt application. The microcapsules were assembled on aluminum bases (stubs) adhered by double-sided carbon adhesive tape. They were then coated with gold (3 nm) using a vacuum spray applicator (Andrade et al., 2019).

The size of the microcapsules was evaluated using ImageJ 2014 software (Rasban, National Institute of Health, USA) (Vanden Braber et al., 2020), in which the diameter of 300 particles per treatment was measured. In addition, the percentage of budding cells was evaluated. The microcapsules were diluted and observed under an optical microscope using a Neubauer counting chamber, where the total number of cells per quadrant and the number of budding cells were counted. The counting was performed in triplicate, with 1.000 cells counted for each replicate.

2.8 Evaluation of probiotic yeasts in fermented beverage

Fresh and microencapsulated yeasts with the selected treatments were added to a food matrix and exposed to refrigerated storage for 28 days. The functional beverage was made according to Ferreira et al. (2022). The substrate used consists of a preparation based on sunflower seeds (195 g/L), oats (85 g/L), and almonds (85 g/L). All components were soaked in filtered water overnight. The substrates were then blended with water until fully ground. The mixture was filtered through a double-layer cheesecloth and pasteurized at 80 °C for 40 minutes, followed by rapid cooling. Then, the yeasts were added separately at a 10^7 CFU/mL concentration. Fermentations were carried out in 500 mL flasks containing 300 mL of the beverage at 28 °C for 24 h. Samples were taken at 0 and 24 hours of fermentation to count the population through serial dilution, followed by microdrop plating on YEPG. The beverages were refrigerated at the end of fermentation (4 °C) for 28 days. Samples were taken at seven-day intervals to monitor the population. The experiment was carried out in triplicate.

2.9 Analysis of organic acids and carbohydrates

The organic acids and carbohydrates of the fermented beverage (beginning and end of fermentation) were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Samples

were centrifuged (8667 RCF) for 5 min at 4 °C. The supernatant was recovered and filtered with sterile syringe filters (pore size: 0.22 µm; Kasvi, Brazil). The acid samples were added with perchloric acid (1 µL) to equalize the pH of the sample with that of the mobile phase (pH 2.1), followed by centrifugation and filtration as described above. Analyzes were performed using an HPLC (model LC-10Ai; Shimadzu Corp., Tokyo, Japan) equipped with a dual detection system consisting of a UV-vis detector (SPD-10Ai; Shimadzu) and a UV index of refraction detector (RID- 10Ai). The Shimadzu ion exclusion column (Shim-pack SCR-101H, 7.9 mm × 30 cm) was used to determine carbohydrates (30 °C) and organic acids (50 °C) (Duarte et al., 2010). Ultrapure water was used as the mobile phase for carbohydrates, and for acids, acidified ultrapure water (pH 2.1) was used at a flow rate of 0.6 mL/min. The compounds were identified based on the retention time of the standards, and their concentrations were determined using the external calibration method. All samples were examined in triplicate.

2.10 Exposure of the fermented beverage and microcapsules to the simulated gastrointestinal tract

The fresh and microencapsulated yeasts were exposed to simulated gastrointestinal tract conditions according to the methodology proposed by Fonseca et al. (2022). In addition, these same samples were also added to a food matrix, which fermented for 24 hours, as described in section 2.8. For the microcapsules, the powders (concentration of 107 CFU/mL) were diluted in a buffer solution pH = 7.2 [in g/L: sodium chloride 82, disodium phosphate 10.5 and monosodium phosphate 3.55] as proposed by Naissinger et al. (2021). For the beverage, exposure to the simulated gastrointestinal tract occurred at the end of fermentation. Thus, 25 mL of each inoculum was placed in a sterile glass vial (250 mL). The experiment was performed consecutively, simulating the digestion process in the mouth, esophagus-stomach, duodenum, and ileum. Mechanical agitation was used to simulate intestinal peristalsis in an incubator

(Thermo Scientific, MaxQ 4000, USA) at 37 °C with rotation adjustment in each phase. The pH of the beverage was adjusted at each stage, simulating the passage through the GIT. After each stage of the gastrointestinal tract simulation, a 100 µL aliquot of the sample was removed from the system and subjected to serial dilution (10^{-1} to 10^{-5}). Subsequently, 10 µL of each dilution was plated in triplicate on agar using the micro drop inoculation technique. The plates were incubated at 28 °C for 24 h, and the number of colonies formed was counted. The results were expressed as log CFU/mL.

2.11 Statistical analysis

The experiment was carried out in a completely randomized design (DIC). The data were subjected to analysis of variance (ANOVA), and means were compared using the Scott-Knott test with significance at the $p < 0.05$ level. Data were analyzed using SISVAR software version 5.8 (Ferreira, 2014) and GraphPad Prism 10 (San Diego, California - USA). The Pearson correlation coefficient was used to calculate the correlations between HPLC data and yeast viability at the end of refrigerated storage (2020 version).

3. Results and discussion

3.1 Evaluation of the drying process

Spray drying is considered one of the fastest and most economical techniques for obtaining solid microparticles, widely used in the food and pharmaceutical industries for large-scale production (Cassani et al., 2020; Feng et al., 2020). However, the high temperature during the drying process is a factor that can lead to a reduction in the microorganism's viability. Adding encapsulating matrix such as alginate, gum arabic, maltodextrin, and milk protein derivatives is an alternative to protect and improve the survival of probiotics (Sarao and Arora, 2017).

Firstly, the viability of the yeasts after drying and the characteristics of the microcapsules were evaluated (Table 1). Yeast viability after drying varied from 84.5 to 98.99% for the different encapsulating matrix used. This high viability observed may be related to the low exit temperature obtained (54 - 64 °C) at which the microorganisms remain longer during drying. Martins et al., 2022b observed in the optimization that the outlet temperature is a determining factor for maintaining viability in spray drying.

For the yeasts used, in general, *S. cerevisiae* exhibited greater cell viability than *P. kluyveri*, with differences of up to 11.13%. This difference is associated with resistance to stress generated by drying, which varies at the species and strain level (Fu and Chen, 2011). During the dehydration process, several survival mechanisms are activated in yeast, mainly the maintenance of nucleic acid stability, preservation of membrane integrity, intracellular accumulation of protective substances, and the ability to quickly activate these defense mechanisms (Vanden Braber et al., 2020). At high temperatures, *S. cerevisiae* can activate heat shock responses, including cell wall restructuring. During heat stress, the content of β 1,6-glucan and chitin increases by 20% and 100%, respectively. With increased β 1,6-glucan synthesis, more cross-links between this polymer and chitin also occur, leading to greater cell wall rigidity during this stress (Schiavone et al., 2014; Verghese et al., 2012). Heat shock proteins, such as chaperones and proteases, are also produced in response to a sudden increase in ambient temperature. Chaperones help to fold proteins and repair misfolded, while proteases degrade denatured proteins, both leading to increased heat resistance of cells subjected to heat shock (Ecroyd et al., 2023; Mühlhofer et al., 2019). On the other hand, yeasts of the genus *Pichia* are more sensitive to temperature changes and require greater control over culture conditions (Darby et al., 2012).

Other factors, such as the growth phase and the composition of the culture medium, can also influence this resistance. Previous studies have shown that cells from the stationary phase

showed greater stress tolerance than the lag and exponential phases. During the budding process in the exponential phase, yeast is more susceptible to thermal stress. In the stationary phase, the resistance is a natural result of the stress response generated by the lack of nutrients and the accumulation of toxic metabolites (Fu and Chen, 2011; Meng et al., 2008). Under adverse conditions, cells accumulate compatible solutes such as non-reducing disaccharides, glycerol, and amino acids, which protect the cell against osmotic stress by balancing the osmotic difference between the interior and exterior of the cell membrane (Fu and Chen, 2011; Desmond et al., 2001). In the present work, sugarcane molasses, used as a yeast growth medium, contains a high sugar content, which significantly increases the osmotic pressure exerted on the cells, favoring the accumulation of compatible solutes (Gómez-Pastor et al., 2011).

About the previously selected encapsulating matrix, no significant changes were observed for the viability of *P. kluyveri*, only for *S. cerevisiae* when microencapsulated with 15% WP + 1% ALG, with a reduction of 5%.

The water content and the interaction of microcapsules with water determine the microorganism's viability (Moayyedi et al., 2018; Poddar et al., 2014). The a_w values of the microcapsules ranged from 0.32 to 0.36, and the moisture content ranged from 5.75% to 7.87%. Although the ideal values for storage are in the range of a_w of 0.2 and 0.3 and moisture content of 4%, studies have shown that microcapsules with water activities of 0.33 and moisture content between 7 and 10% were able to maintain the viability of probiotic microorganisms (Poddar et al., 2014; Arslan et al., 2015 and Loyeau et al., 2018). The correlation between a_w and moisture content influences microbiological and physicochemical parameters such as cell viability and enzymatic activity and, consequently, affects the stability of microcapsules (Schuck et al., 2012).

The microcapsules hygroscopicity ranged from 4.36 to 7.93 g/100 g. The values found allow them to be classified as non-hygroscopic powders, facilitating handling and contributing

to their stability (Schuck et al., 2012). Solubility ranged from 85.94 to 92.02%. This parameter is essential in powders incorporated into the aqueous phase, as in the food matrix evaluated in this study. High solubilities are desired because they contribute to the reactivation and homogenization of yeasts in the food matrix.

Regarding drying yield, values ranged from 51.54% to 82.49%. The 15% WP + 1% ALG encapsulating matrix showed the lowest yield with *S. cerevisiae* (58.60%) and *P. kluyveri* CCMA 0615 (51.54%). These results may have occurred due to the high hygroscopicity of the alginate, which makes it easier for its particles to adhere to the equipment wall, affecting the yield results (Ng and Sulaiman, 2018). In the present study, a significant difference in hygroscopicity was observed between sodium alginate (37.05 g/100 g) and whey powder (4.26 g/100 g) (Table 2), with sodium alginate classified as an extremely hygroscopic powder. This high hygroscopicity is a critical factor to consider in large-scale production.

3.2 Viability of microencapsulated cells during storage

The viability of microencapsulated yeasts was monitored over 60 days at room temperature (25 °C) and under refrigeration (4 °C) (Figure 1). In general terms, refrigeration proves to be a crucial factor in maintaining the viability of *P. kluyveri*, while for *S. cerevisiae*, viability remained above 80% for both conditions. A divergence was observed in the encapsulating matrix for the strains. For *P. kluyveri* (Figures 1a and 1c), treatments with 15% WP and 15% WP + 1% ALG had better results with viability above 65 and 85% at room and refrigerated temperatures, respectively, after 60 days of storage. Differently, for *S. cerevisiae* (Figure 1b and 1d), the highest concentrations of whey (20 and 30% WP) obtained the best result for both conditions, maintaining viability practically intact (> 98%), proving the robustness of this yeast and high resistance to the drying process.

These results indicate that *P. kluyveri* is more susceptible during storage. This behavior may be associated with the oxidation of membrane fatty acids and cell damage during the spray drying process (Ananta et al., 2005; Y.-C. Wang et al., 2004). The negative results for higher concentrations of whey may be related to the size of the particles formed. According to Santivarangkna et al. (2007), the increase in the concentration of encapsulating matrix generates larger particles and, consequently, increases the exposure time of these particles to the hot drying air. Thus, this greater exposure to high temperatures may have caused damage to *P. kluyveri* cells, accelerating the cell death process, as seen by the reduction in viability to values below 40% after 60 days for 20 and 30% WP.

Refrigerated storage and the choice of encapsulating matrix were critical for maintaining the viability of *P. kluyveri*. Thus, 15% WP and 15% WP + 1% ALG are the encapsulating matrices chosen for *P. kluyveri*, while for *S. cerevisiae*, 20% and 30% WP are the best options for preparing microcapsules. Therefore, these treatments were used in the following analyses.

3.3 Morphology and Particle Size

Next, the morphology of the microcapsules and the proportion of budding cells of the treatments chosen for each yeast was analyzed (Table 3). The microcapsules ranged from 4.22 to 5.13 μm , with the smallest size observed for *P. kluyveri* with 15% WP and the largest for *S. cerevisiae* with 30% WP. Martins et al. (2022a) observed that the more significant addition of solids leads to an increase in the microcapsule size, which can also be observed in this study, corroborating these findings. Particle size is an important physical property that directly influences the application of microcapsules (Moayyedi et al., 2018; Rajam and Anandharamakrishnan, 2015). In the food industry, smaller particles are preferred in formulations to ensure homogeneity and quality (Burgain et al., 2011). In this sense, the

microcapsule obtained from *P. kluyveri* presents both functional characteristics associated with the properties of yeast and technological characteristics for application in food.

Furthermore, the smaller size of the microcapsules may be associated with the developmental stage of the cells, as *P. kluyveri* exhibited a higher percentage of budding cells, approximately 50% greater than that of *S. cerevisiae*. This increased budding rate may be linked to the greater susceptibility of *P. kluyveri* to thermal stress, resulting in reduced viability after drying.

Figure 2 presented micrographs of the microencapsulated yeasts for the selected encapsulating matrix. All treatments presented irregular shapes and sizes, varying between smooth and rough surfaces. The images showed no visible cracks or fissures on the surface of the microcapsule, which confirmed good structural integrity and reduced air permeability, providing better protection to probiotic microorganisms (Rajam and Anandharamakrishnan, 2015).

3.4 Yeast viability in fermented beverage stored at 4 °C

Microcapsules were applied to ferment the functional beverage described by Ferreira et al. (2022), to evaluate the behavior of microencapsulated yeasts in a food. The viability of fresh and microencapsulated yeasts in the fermented beverage is shown in Figure 3. *P. kluyveri* (Figure 3a) showed greater viability after 28 days (~2-4%) for microencapsulated treatments than fresh yeast. However, for *S. cerevisiae*, the viability was similar between fresh and microencapsulated yeast with 30% WP. The greater viability of microencapsulated *P. kluyveri* may be associated with changes in the expression of genes activated by heat stress, which resulted in a transient increase in the proteasome, autophagy, and β -oxidation activity (Nakamura et al., 2008). Due to *S. cerevisiae's* natural characteristic of high tolerance, the effects on the expression of these genes may not have been observed in this study.

More viable cells for microencapsulated *P. kluyveri* at the end of the storage period represented a significant advantage justifying using the technique, considering that it is a yeast with probiotic attributes that must be in a population above 10^7 CFU/mL to exercise its benefits (Hill et al., 2014).

3.5 Analysis of organic acids, ethanol, and carbohydrates

Data on the concentration of carbohydrates, organic acids, and ethanol in the beverage after 24 hours of fermentation with fresh and microencapsulated yeast are shown in Table 4. In general, microencapsulation did not affect the fermentative profile of the yeasts. The consumption of carbohydrates was observed, emphasizing glucose, which was wholly consumed in all treatments. For *S. cerevisiae*, a high-performance fermenter, there was still significant consumption of sucrose, fructose, and citric acid. As products, the production of lactic acid (0.30 to 1.10 g/L) and ethanol (0.2 to 1.61 g/L) was observed. The consumption of citric acid by *S. cerevisiae* may have led to lactic acid production via the citrate lyase catalysis pathway (Papadimitriou et al., 2016; Ricci et al., 2019). Lactic acid exhibited a strong positive Pearson correlation coefficient (0.95), positively influencing the viability of this microorganism at the end of storage. Another factor affecting the yeast population was the negative correlation observed with fructose consumption, for *P. kluyveri* (-0.93) and *S. cerevisiae* (-0.99), which contributed to greater population growth. The significant consumption of fructose, along with glucose, is due to both being monosaccharides with single-bond chains, making them more easily utilized (Nelson and Cox, 2004).

Although the presence of ethanol was detected, the beverage is still considered non-alcoholic as it presents concentrations below 5 g/L (0.5% v/v) (Ignat et al., 2020).

Despite some differences in compound concentrations, microencapsulated yeast maintained similar behavior to fresh yeast. In industrial preparation, microencapsulated yeasts

must not lose their main biotechnological characteristics, which will influence the product's characteristics (Rapoport et al., 2019).

3.6 Probiotic viability in simulated gastrointestinal tract conditions

Surviving the adverse conditions found throughout the GIT, such as low pH and the presence of digestive enzymes, is the main obstacle for probiotics to reach the target site, the colon (Yao et al., 2020). In this way, the viability of the yeasts in the functional beverage, fresh and microencapsulated yeasts was evaluated when passing through the simulated GIT. The data are presented in Table 5. The viability at the end of the simulation in the functional beverage was satisfactory for all treatments, ranging from 83-94% for *P. kluyveri* and 87-92% for *S. cerevisiae*. On the other hand, in the absence of the beverage, the viability of fresh and microencapsulated yeasts was slightly lower. *P. kluyveri* presented viability ranging from 84-89%; for *S. cerevisiae*, the variation was 78-80%. The results show that using a food matrix can be a second protective barrier for probiotics, increasing their viability. *P. kluyveri* microencapsulated at 15% WP diluted in the functional beverage had the main critical point when exposed to low acidity in the stomach from pH 2.8 and in the passage through the duodenum and ileum with the increase in pH up to 6.5, added to the exposure to pancreatin and bile salts. Similar behavior was observed for *P. kluyveri* microencapsulated with 15% WP + 1% ALG when exposed to the GIT without the beverage.

Interestingly, *P. kluyveri* 15% WP + 1% ALG resisted the simulated GIT conditions, reaching 94.98% cell viability at the end of the test, showing that including alginate led to the more remarkable survival of *P. kluyveri*. Alginate demonstrates pH-responsive release behavior due to carboxyl groups (COOH) presence. In acidic environments, the conversion of -COO groups to -COOH occurs, resulting in contraction of the molecular chain and reduction in pore size, thus protecting the probiotics against gastric fluids. Under alkaline conditions, the

electrostatic repulsion between the -COO groups promote swelling of the microcapsule and, consequently, the opening of the pores, allowing the release of probiotic microorganisms throughout the small intestine (Mulia et al., 2020). Conversely, *P. kluyveri* microencapsulated with 15% whey powder, in the absence of a food matrix, demonstrated the ability to withstand the adverse conditions of the gastrointestinal tract (GIT), achieving 85% viability by the end of the test. This enhanced survival may be attributed to the buffering capacity of the wall material. Whey powder contains soluble proteins (de Souza et al., 2010), and according to Rodrigues et al. (2011), protein matrices provide a protective buffering effect, particularly under low pH conditions, which can stabilize membrane constituents and prevent cellular damage (Liu et al., 2019).

Concerning *S. cerevisiae*, microencapsulation with 20 and 30% WP has no impact, since both in the presence and absence of the food matrix, fresh yeast already presents high resistance to passing through the GIT. Syal and Vohra (2013) observed that strains of *S. cerevisiae* showed greater tolerance at acidic pHs (> 93%), while isolates of *Pichia* sp. were more sensitive after exposure to gastric conditions. This behavior is associated with the high fermentative capacity of *S. cerevisiae* and the ability to tolerate low pHs (Kourelis et al., 2010).

The findings indicate that probiotic yeasts' survival until they reach the colon depends on the strain used and the encapsulating matrix chosen to create the microcapsules. The combination of 15% whey and 1% alginate in the presence of the functional beverage proved to be the most efficient option in protecting *P. kluyveri* to guarantee the delivery of viable cells to the colon. On the other hand, in the absence of the food matrix, microencapsulation with 15% whey was more effective in protecting this yeast.

Non-saccharomyces yeasts, in general, are more sensitive to GIT conditions compared to *Saccharomyces* sp., such as *S. boulardii*, widely used to treat intestinal infections (Abid et al., 2022). However, non-*Saccharomyces* can also exert their effects as probiotics and

postbiotics. *Kluyveromyces fragilis* (B0399) is the only non-*Saccharomyces* yeast available as a probiotic for human and animal use (Probilife-NXT, 2024). The present study, with the microencapsulated preparation of *P. kluyveri*, brings a new possibility of a non-*Saccharomyces* strain to be tested in in-vivo models and prove its efficacy.

4. Conclusion

This study developed a microencapsulation protocol with various encapsulating matrix for the probiotic non-*Saccharomyces* yeasts *P. kluyveri* CCMA 0615 and *S. cerevisiae* CCMA 0732. The main findings were: I) the viability of yeasts microencapsulated by spray drying is dependent on the species and the encapsulating matrix used; II) when storing microcapsules, *P. kluyveri* demonstrated the need for refrigeration; III) when applied to the fermentation of a functional beverage, microencapsulated yeasts showed the same fermentative profile and greater viability during food storage; IV) when exposing yeasts to the GIT, microencapsulation of *P. kluyveri* with 15% WP + 1% ALG contributed significantly to maintaining viability (> 94%). According to our findings, microencapsulation protocol must be developed specifically for each species and, when appropriate, increases the viability of microorganisms, enhances their biotechnological application, and contributes to the more efficient delivery of these probiotics to the host. Concerning *P. kluyveri*, a more sensitive non-*Saccharomyces* yeast, microencapsulation makes its application as a probiotic viable. As a future perspective, the application of these microencapsulated yeasts in in-vivo models for treating intestinal infections and/or dysbiosis will prove these formulations' efficacy and health benefits.

Author contributions

Iara Ferreira Resende: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - review & editing, Visualization. **Pâmela Mynsen Machado Martins, Dirceu de Souza Melo:** Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision. **Disney Ribeiro Dias, Marciane Magnani:** Writing - review & editing. **Rosane Freitas Schwan:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interests

The authors confirm that they have no conflicts of interest concerning the work described in this manuscript.

Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Acknowledgments

The authors would like to thank the Agricultural Microbiology program at the Federal University of Lavras (UFLA) for technical support.

REFERENCES

- Abid, R., Waseem, H., Ali, J., Ghazanfar, S., Muhammad Ali, G., Elsbali, A.M., Alharethi, S.H., 2022. Probiotic Yeast *Saccharomyces*: Back to Nature to Improve Human Health. *J. Fungi* 8, 444. <https://doi.org/10.3390/jof8050444>
- Ananta, E., Volkert, M., Knorr, D., 2005. Cellular injuries and storage stability of spray-dried

- Lactobacillus rhamnosus* GG. Int. Dairy J. 15, 399–409.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.004>
- Andrade, D.P., Ramos, C.L., Botrel, D.A., Borges, S.V., Schwan, R.F., Ribeiro Dias, D., 2019. Stability of microencapsulated lactic acid bacteria under acidic and bile juice conditions. Int. J. Food Sci. Technol. 54, 2355–2362. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14114>
- AOAC, A. of O.A.C., 2005. Official Methods of Analysis, 18th ed, TrAC Trends in Analytical Chemistry. AOAC Intl, Gaithersburg. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(90\)87098-7](https://doi.org/10.1016/0165-9936(90)87098-7)
- Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., Topuz, A., 2015. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. LWT - Food Sci. Technol. 63, 685–690. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.034>
- Braga, A.B.A.C., Costa, C.J.M., Pomella, A.W.V., Ribeiro, E.J., Santos, L.D., Zotarelli, M.F., 2019. Evaluation of lethality temperature and use of different wall materials in the microencapsulation process of *Trichoderma asperellum* conidia by spray drying. Powder Technol. 347, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.02.037>
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J., 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. J. Food Eng. 104, 467–483. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>
- Cano-Chauca, M., Stringheta, P.C., Ramos, A.M., Cal-Vidal, J., 2005. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 6, 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>
- Cassani, L., Gomez-Zavaglia, A., Simal-Gandara, J., 2020. Technological strategies ensuring the safe arrival of beneficial microorganisms to the gut: From food processing and storage to their passage through the gastrointestinal tract. Food Res. Int. 129, 108852. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108852>
- Cerutti Martellet, M., Majolo, F., Cima, L., Goettert, M.I., Volken de Souza, C.F., 2023. Microencapsulation of *Kluyveromyces marxianus* and *Plantago ovata* in cheese whey particles: Protection of sensitive cells to simulated gastrointestinal conditions. Food Biosci. 52, 102474. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102474>
- Chandralekha, A., Tavanandi, A.H., Amrutha, N., Hebbar, H.U., Raghavarao, K.S.M.S., Gadre, R., 2016. Encapsulation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by spray drying for extension of shelf life. Dry. Technol. 34, 1307–1318. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1112808>
- Darby, R.A.J., Cartwright, S.P., Dilworth, M. V., Bill, R.M., 2012. Which Yeast Species Shall I Choose? *Saccharomyces cerevisiae* Versus *Pichia pastoris* (Review). pp. 11–23. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-770-5_2
- Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Collins, K., Paul Ross, R., 2001. Environmental adaptation of probiotic *lactobacilli* towards improvement of performance during spray drying. Int Dairy J 11, 801–808. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00121-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00121-2)
- de Souza, R.R., Bergamasco, R., da Costa, S.C., Feng, X., Faria, S.H.B., Gimenes, M.L., 2010. Recovery and purification of lactose from whey. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 49, 1137–1143. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2010.08.015>
- Duarte, W.F., Dias, D.R., Oliveira, J.M., Teixeira, J.A., de Almeida e Silva, J.B., Schwan, R.F., 2010. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. LWT - Food Sci. Technol. 43, 1564–1572. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.010>
- Ecroyd, H., Bartelt-Kirbach, B., Ben-Zvi, A., Bonavita, R., Bushman, Y., Casarotto, E., Cecconi, C., Lau, W.C.Y., Hibshman, J.D., Joosten, J., Kimonis, V., Klevit, R., Liberek, K., McMenimen, K.A., Miwa, T., Mogk, A., Montepietra, D., Peters, C., Te Rocchetti, M. resa, Saman, D., Sisto, A., Secco, V., Strauch, A., Taguchi, H., Tanguay, M., Tedesco, B., Toth, M.E., Wang, Z., Benesch, J.L.P., Carra, S., 2023. The beauty and complexity of the small heat shock proteins: a report on the proceedings of the fourth workshop on small heat shock proteins. Cell Stress Chaperones 28, 621–629. <https://doi.org/10.1007/s12192-023-01360-x>
- Feng, K., Huang, R., Wu, R., Wei, Y., Zong, M., Linhardt, R.J., Wu, H., 2020. A novel route for double-layered encapsulation of probiotics with improved viability under adverse conditions. Food Chem. 310, 125977. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125977>
- Ferreira, D.F., 2014. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. Ciência e Agrotecnologia 38, 109–112. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>

- Ferreira, I., de Sousa Melo, D., Menezes, A.G.T., Fonseca, H.C., de Assis, B.B.T., Ramos, C.L., Magnani, M., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2022. Evaluation of potentially probiotic yeasts and *Lactiplantibacillus plantarum* in co-culture for the elaboration of a functional plant-based fermented beverage. *Food Res. Int.* 160, 111697. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111697>
- Fonseca, H.C., Melo, D. de S., Ramos, C.L., Menezes, A.G.T., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2022. Sensory and flavor-aroma profiles of passion fruit juice fermented by potentially probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* CCMA 0743 strain. *Food Res. Int.* 152, 110710. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110710>
- Fu, N., Chen, X.D., 2011. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Res. Int.* 44, 1127–1149. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.053>
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Garre, E., Matallana, E., 2011. Recent advances in yeast biomass production, in: *Biomass—Detection, Production and Usage*.
- Gharibzadeh, S.M.T., Smith, B., 2021. Legume proteins are smart carriers to encapsulate hydrophilic and hydrophobic bioactive compounds and probiotic bacteria: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20, 1250–1279. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12699>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Ignat, M.V., Salanță, L.C., Pop, O.L., Pop, C.R., Tofană, M., Mudura, E., Coldea, T.E., Borșa, A., Pasqualone, A., 2020. Current Functionality and Potential Improvements of Non-Alcoholic Fermented Cereal Beverages. *Foods* 9, 1031. <https://doi.org/10.3390/foods9081031>
- Klajn, V.M., Ames, C.W., da Cunha, K.F., Lorini, A., Hackbart, H.C. dos S., Filho, P.J.S., Cruzen, C.E. dos S., Fiorentini, Â.M., 2021. Probiotic fermented oat dairy beverage: viability of *Lactobacillus casei*, fatty acid profile, phenolic compound content and acceptability. *J Food Sci Technol* 58, 3444–3452. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-04973-1>
- Kourelis, A., Kotzamanidis, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Scouras, Z.G., Tzanetakis, N., Yiangou, M., 2010. Preliminary probiotic selection of dairy and human yeast strains. *J. Biol. Res.* 13, 93–104.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier, Amsterdam.
- Liu, H., Cui, S.W., Chen, M., Li, Y., Liang, R., Xu, F., Zhong, F., 2019. Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59, 2863–2878. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1377684>
- Loyeau, P.A., Spotti, M.J., Vanden Braber, N.L., Rossi, Y.E., Montenegro, M.A., Vinderola, G., Carrara, C.R., 2018. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 using whey proteins and dextrans conjugates as wall materials. *Food Hydrocoll.* 85, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.051>
- Martins, P.M.M., Batista, N.N., Santos, L.D., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2022a. Microencapsulation by spray drying of coffee epiphytic yeasts *Saccharomyces cerevisiae* CCMA 0543 and *Torulaspora delbrueckii* CCMA 0684. *Brazilian J. Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00776-4>
- Martins, P.M.M., Batista, N.N., Santos, L.D., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2022b. Microencapsulation of epiphytic coffee yeasts by spray drying using different wall materials: Implementation in coffee medium. *Int. J. Food Microbiol.* 379, 109839. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109839>
- Menezes, A.G.T., Melo, D. de S., Ramos, C.L., Moreira, S.I., Alves, E., Schwan, R.F., 2020a. Yeasts isolated from Brazilian fermented foods in the protection against infection by pathogenic food bacteria. *Microb. Pathog.* 140, 103969. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.103969>
- Menezes, A.G.T., Ramos, C.L., Cenzi, G., Melo, D.S., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2020b. Probiotic Potential, Antioxidant Activity, and Phytase Production of Indigenous Yeasts Isolated from Indigenous Fermented Foods. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 12, 280–288. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-9518-z>
- Menezes, A.G.T., Ramos, C.L., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2018. Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. *Food Res. Int.* 111, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.065>

- Meng, X.C., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Daly, C., Ross, R.P., 2008. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem* 106, 1406–1416. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.076>
- Moayyedi, M., Eskandari, M.H., Rad, A.H.E., Ziaee, E., Khodaparast, M.H.H., Golmakani, M.-T., 2018. Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *J. Funct. Foods* 40, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.016>
- Mulia, K., Singarimbun, A.C., Krisanti, E.A., 2020. Optimization of Chitosan–Alginate Microparticles for Delivery of Mangostins to the Colon Area Using Box–Behnken Experimental Design. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 873. <https://doi.org/10.3390/ijms21030873>
- Mühlhofer, M., Berchtold, E., Stratil, C.G., Csaba, G., Kunold, E., Bach, N.C., Sieber, S.A., Haslbeck, M., Zimmer, R., Buchner, J., 2019. The Heat Shock Response in Yeast Maintains Protein Homeostasis by Chaperoning and Replenishing Proteins. *Cell Rep* 29, 4593–4607.e8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.109>
- Naissinger da Silva, M., Tagliapietra, B.L., Flores, V. do A., Pereira dos Santos Richards, N.S., 2021. In vitro test to evaluate survival in the gastrointestinal tract of commercial probiotics. *Curr Res Food Sci* 4, 320–325. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.006>
- Nakamura, T., Mizukami-Murata, S., Ando, A., Murata, Y., Takagi, H., Shima, J., 2008. Changes in Gene Expression of Commercial Baker's Yeast during an Air-Drying Process that Simulates Dried Yeast Production. *J. Biosci. Bioeng.* 106, 405–408. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.405>
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2004. *Lehninger's Principles of biochemistry*, 4 Edition. ed. W. H. Freeman.
- Ng, M.L., Sulaiman, R., 2018. Development of beetroot (*Beta vulgaris*) powder using foam mat drying. *LWT* 88, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.032>
- Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P.A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J.A., Linares, D.M., Ross, P., Stanton, C., Turroni, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., Kok, J., 2016. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80, 837–890. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00076-15>
- Poddar, D., Das, S., Jones, G., Palmer, J., Jameson, G.B., Haverkamp, R.G., Singh, H., 2014. Stability of probiotic *Lactobacillus paracasei* during storage as affected by the drying method. *Int. Dairy J.* 39, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.04.007>
- Probilife-NXT, 2024. *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399. URL <https://www.intralife.co/product/probilife-nxt/>
- Rajam, R., Anandharamakrishnan, C., 2015. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT - Food Sci. Technol.* 60, 773–780. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062>
- Rapoport, A., Golovina, E.A., Gervais, P., Dupont, S., Beney, L., 2019. Anhydrobiosis: Inside yeast cells. *Biotechnol. Adv.* 37, 51–67. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.003>
- Ricci, A., Cirilini, M., Maoloni, A., Del Rio, D., Calani, L., Bernini, V., Galaverna, G., Neviani, E., Lazzi, C., 2019. Use of Dairy and Plant-Derived *Lactobacilli* as Starters for Cherry Juice Fermentation. *Nutrients* 11, 213. <https://doi.org/10.3390/nu11020213>
- Rodrigues, D., Sousa, S., Rocha-Santos, T., Silva, J.P., Sousa Lobo, J.M., Costa, P., Amaral, M.H., Pintado, M.M., Gomes, A.M., Malcata, F.X., Freitas, A.C., 2011. Influence of l-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. *Int Dairy J* 21, 869–876. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.05.005>
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P., 2007. Alternative Drying Processes for the Industrial Preservation of Lactic Acid Starter Cultures. *Biotechnol. Prog.* 23, 302–315. <https://doi.org/10.1021/bp060268f>
- Sarao, L.K., Arora, M., 2017. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 344–371. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.887055>
- Schiavone, M., Vax, A., Formosa, C., Martin-Yken, H., Dague, E., François, J.M., 2014. A combined chemical and enzymatic method to determine quantitatively the polysaccharide components in the cell wall of yeasts. *FEMS Yeast Res* 14, 933–947. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12182>
- Schuck, P., Dolivet, A., Jeantet, R., 2012. *Analytical Methods for Food And Dairy Powders*. John

- Wiley & Sons.
- Syal, P., Vohra, A., 2013. PROBIOTIC POTENTIAL OF YEASTS ISOLATED FROM TRADITIONAL INDIAN FERMENTED FOODS. *Int. J. Microbiol. Res.* 5, 390–398. <https://doi.org/10.9735/0975-5276.5.2.390-398>
- Vanden Braber, N.L., Díaz Vergara, L.I., Rossi, Y.E., Aminahuel, C.A., Mauri, A.N., Cavaglieri, L.R., Montenegro, M.A., 2020. Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic *Kluyveromyces marxianus* VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. *LWT* 118, 108844. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108844>
- Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., Morano, K.A., 2012. Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76, 115–158. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05018-11>
- Vicente, J., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., Benito, S., 2021. High Potential of *Pichia kluyveri* and Other *Pichia* Species in Wine Technology. *Int J Mol Sci* 22, 1196. <https://doi.org/10.3390/ijms22031196>
- Wang, Y.-C., Yu, R.-C., Chou, C.-C., 2004. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *Int. J. Food Microbiol.* 93, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.001>
- White, J., Hekmat, S., 2018. Development of Probiotic Fruit Juices Using *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 Fortified with Short Chain and Long Chain Inulin Fiber. *Fermentation* 4, 27. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020027>
- Yao, M., Xie, J., Du, H., McClements, D.J., Xiao, H., Li, L., 2020. Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 19, 857–874. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12532>

Figure captions

Figure 1. Microbial population during 60 days of storage – a) population of *P. kluyveri* CCMA 0615 at room temperature. b) population of *S. cerevisiae* CCMA 0732 at room temperature. c) population of *P. kluyveri* CCMA 0615 at refrigeration temperature. d) population of *S. cerevisiae* CCMA 0732 at refrigeration temperature. Different lowercase letters denote differences ($p < 0.05$) between treatments at the same time. Different capital letters denote differences ($p < 0.05$) of the same treatment at different times according to the Scott Knott test.

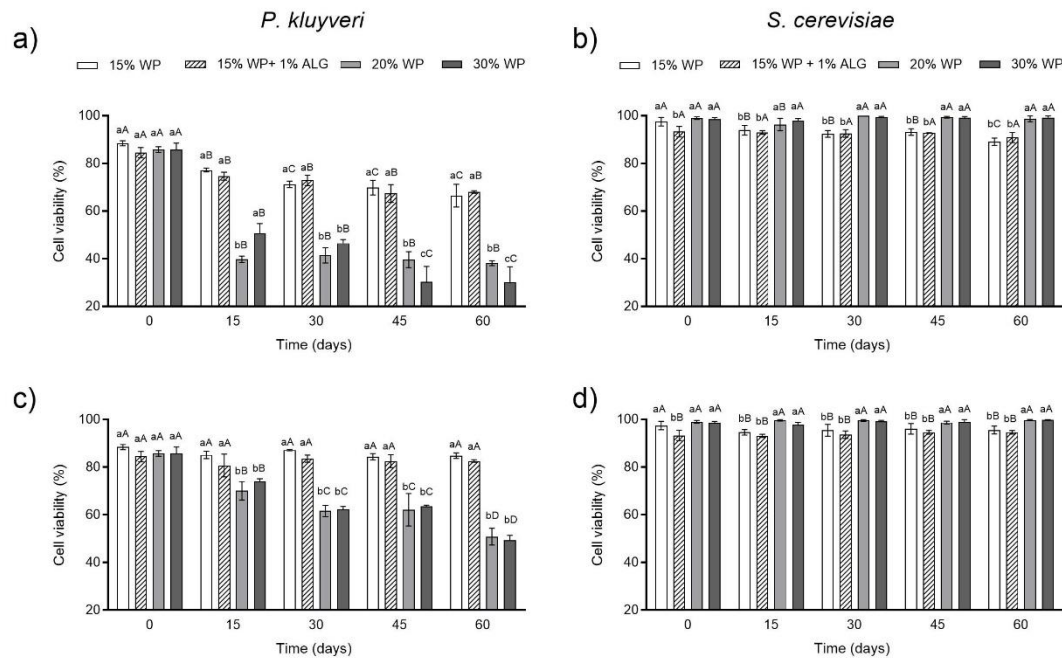


Figure 2. Scanning electron micrograph of microencapsulated yeasts. A.1) *P. kluyveri* CCMA 0615 + 15% WP. A.2) *P. kluyveri* CCMA 0615 + 15% WP + 1% ALG. B.1) *S. cerevisiae* CCMA 0732 + 20% WP. B.2) *S. cerevisiae* CCMA 0732 + 30% WP.

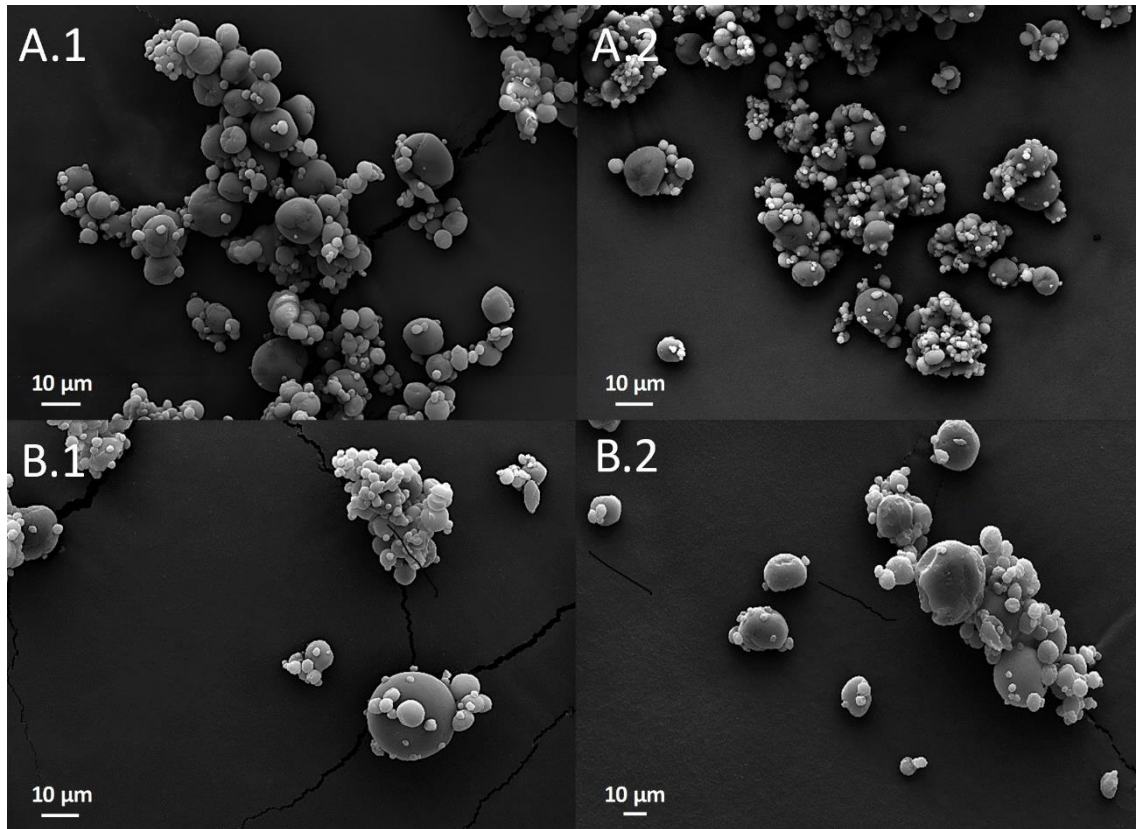
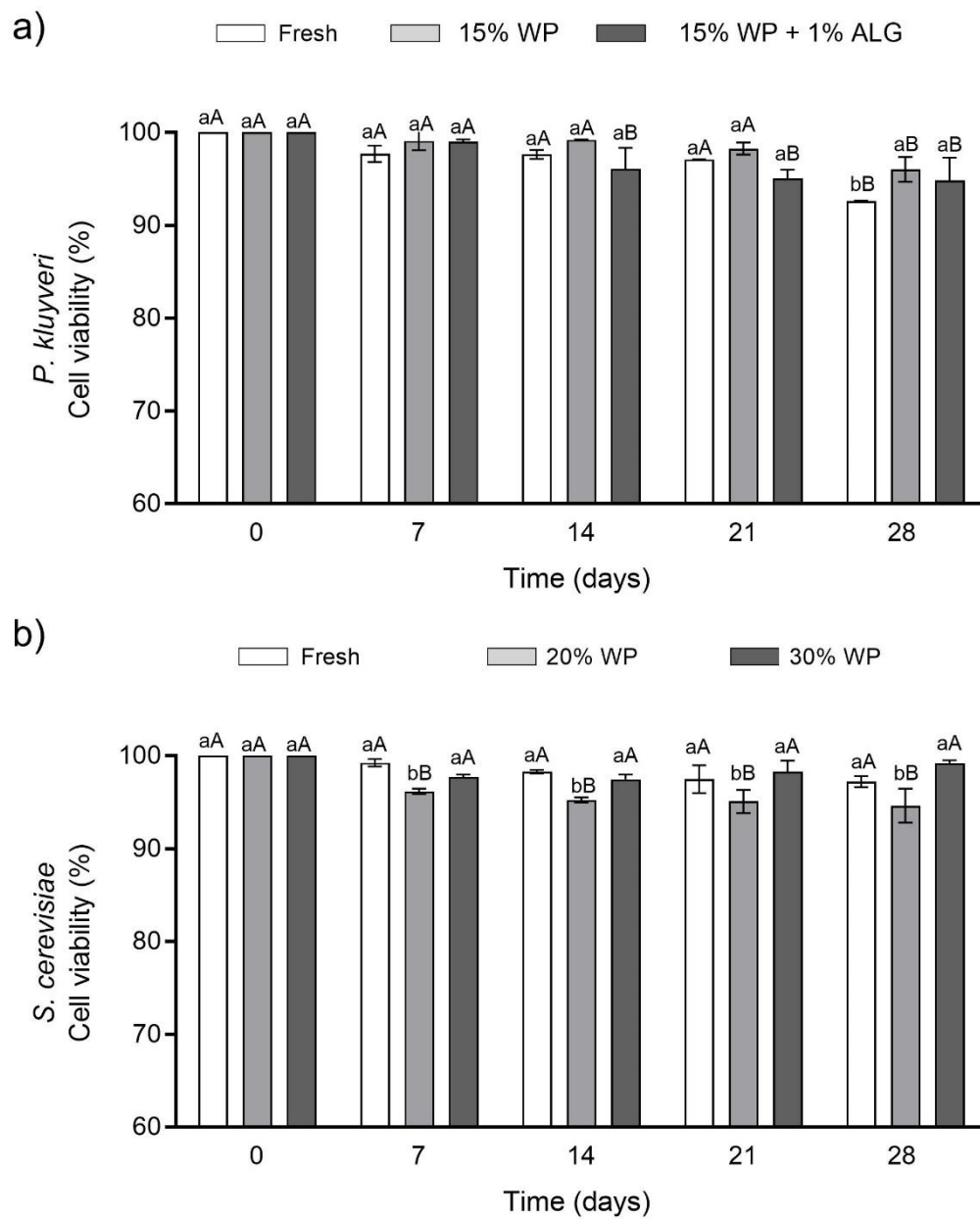


Figure 3. Viability of microencapsulated yeast in fermented beverages stored under refrigeration – a) population of *P. kluyveri* CCMA 0615. b) population of *S. cerevisiae* CCMA 0732. Different lowercase letters denote differences ($p < 0.05$) between treatments at the same time. Different capital letters denote differences ($p < 0.05$) of the same treatment at different times according to the Scott Knott test.



Tables

Table 1. Characterization of microcapsules obtained after drying yeast by spray drying with different encapsulating matrix.

Characterization of microcapsules after drying	Yeasts	Treatments			
		15% WP ¹	15% WP ¹ + 1% ALG ²	20% WP ¹	30% WP ¹
Powder yield (%)	<i>P. kluyveri</i> CCMA 0615	71.14 ±	51.54 ±	77.00 ±	80.94 ±
		5.70 aA	2.37 bA	8.02 aA	0.76 aA
	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732	74.15 ±	58.60 ±	79.08 ±	82.49 ±
		8.11 aA	1.87 bA	2.77 aA	4.18 aA
Cell viability after drying (%)	<i>P. kluyveri</i> CCMA 0615	88.45 ±	84.50 ±	85.77 ±	85.82 ±
		1.06 aB	2.18 aB	1.20 aB	4.69 aB
	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732	98.21 ±	93.31 ±	98.99 ±	98.53 ±
		1.81 aA	2.21 bA	0.57 aA	1.13 aA
Water activity	<i>P. kluyveri</i> CCMA 0615	0.35 ±	0.34 ±	0.36 ±	0.32 ±
		0.01 bA	0.00 bA	0.01 bA	0.02 aA
	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732	0.34 ±	0.33 ±	0.33 ±	0.32 ±
		0.00 aA	0.02 aA	0.02 aA	0.01 aA
Moisture content (%)	<i>P. kluyveri</i> CCMA 0615	7.87 ±	7.41 ±	7.46 ±	5.93 ±
		0.49 bB	0.24 bB	0.42 bA	0.71 aA
	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732	6.21 ±	5.75 ±	6.76 ±	6.16 ±
		0.14 aA	0.67 aA	0.75 aA	0.74 aA
Hygroscopicity (g/100 g)	<i>P. kluyveri</i> CCMA 0615	6.07 ±	7.93 ±	5.61 ±	5.87 ±
		0.79 aA	0.92 aA	0.75 aA	1.47 aA
	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732	7.25 ±	6.80 ±	4.36 ±	6.71 ±
		1.31 aA	1.48 aA	1.67 aA	2.85 aA
Solubility in water (%)	<i>P. kluyveri</i> CCMA 0615	87.49 ±	85.94 ±	89.42 ±	92.02 ±
		2.35 aA	2.85 aA	0.54 aA	0.59 aA
	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732	86.62 ±	86.92 ±	90.85 ±	87.18 ±
		3.40 aA	0.73 aA	0.74 aA	6.57 aA

Data are presented as mean ± standard deviation. Different lowercase letters in the same row denote a difference ($p < 0.05$) between treatments for the same yeast, different uppercase letters in the same column denote a difference ($p < 0.05$) between yeasts according to the Scott Knott test.

¹Whey powder

²Sodium alginate

Table 2. Characterization of encapsulating matrix used to microencapsulate yeasts during spray drying.

Encapsulating Matrix	Water activity	Moisture (%)	Solubility (%)	Hygroscopicity (g/100 g)
Whey powder	0.34 ± 0.00 b	5.86 ± 0.27 a	89.26 ± 0.81 a	4.26 ± 0.36 a
Sodium alginate	0.32 ± 0.00 a	6.04 ± 0.17 a	69.92 ± 2.05 b	37.05 ± 0.96 b

Data are presented as mean ± standard deviation. Different lowercase letters in the same column denote differences ($p < 0.05$) between encapsulating matrix according to the Scott Knott test.

Table 3. Particle size of microencapsulated yeast obtained after spray drying and percentage of budding cells.

Yeast	Treatments	Particle size D_{50} (μm)	Budding cells (%)
<i>P. kluyveri</i> CCMA 0615	15% WP ¹	4.22 ± 2.61 b	22.28 b
	15% WP ¹ + 1% ALG ²	4.82 ± 3.27 a	20.22 b
<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732	20% WP ¹	4.72 ± 3.55 a	10.17 a
	30% WP ¹	5.13 ± 3.37 a	9.75 a

Data are presented as mean ± standard deviation. Different lowercase letters in the same column denote differences ($p < 0.05$) between encapsulating matrix for the same yeast according to Scott Knott's test.

¹Whey powder

²Sodium alginate

Table 4. Concentration of carbohydrates, organic acids and alcohols in a fermented beverage with fresh and microencapsulated yeast.

Fermentation (hours)	Treatments	Compounds concentration (g/L)							
		Sucrose	Glucose	Fructose	Citric acid	Malic acid	Succinic acid	Lactic acid	Ethanol
0	Substrate	3.65±0.10	0.40±0.10	0.39±0.18	0.83±0.08	0.15±0.00	0.56±0.02	ND	ND
24	Fresh <i>P. kluyveri</i> CCMA 0615	2.47±0.01a	NDa	0.14±0.01a	0.78±0.01b	0.08±0.00a	0.06±0.08b	0.30±0.00c	0.20±0.17b
	<i>P. kluyveri</i> CCMA 0615 + 15% WP ¹	2.58±0.15a	NDa	0.22±0.02b	0.82±0.03a	NDb	0.59±0.00a	0.85±0.09a	0.29±0.02b
	<i>P. kluyveri</i> CCMA 0615 + 15% WP ¹ + 1% ALG ²	2.75±0.21a	NDa	0.30±0.07c	0.75±0.03b	NDb	0.46±0.04a	0.67±0.01b	0.80±0.63a
	Fresh <i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732	0.86±0.08a	NDa	0.10±0.03b	0.02±0.01a	0.13±0.03a	0.47±0.06a	0.70±0.05b	1.52±0.49a
	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732 + 20% WP ¹	1.13±0.10c	NDa	NDa	0.06±0.04a	NDb	0.51±0.01a	1.10±0.15a	1.61±0.13a
	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732 + 30% WP ¹	1.02±0.03b	NDa	NDa	NDb	NDb	0.49±0.00a	0.70±0.04b	1.56±0.47a

Data are presented as mean. The statistic was used to compare the averages between the same yeast strain in the fresh and microencapsulated state. a–b for each column, mean values with different letters are significant at $p \leq 0.05$ by analysis of variance.

¹Whey powder

²Sodium alginate

ND = not detected

Table 5. Conditions used during simulated digestion and percentages of viable cells.

Simulated <i>in vitro</i> TGI - Functional fermented beverage										
Stage	Enzyme solution	Agitation (rpm)	pH	Exposure time (min)	Viable cell count (%)					
					Fresh <i>P. kluyveri</i> CCMA 0615	<i>P. kluyveri</i> CCMA 0615 + 15% WP ¹	<i>P. kluyveri</i> CCMA 0615 + 15% WP ¹ + 1% ALG ²	Fresh <i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732 + 20% WP ¹	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732 + 30% WP ¹
Before the simulation	-	-	-	-	100 ± 0.00 aA	100 ± 0.00 aA	100 ± 0.00 aA	100 ± 0.00 aA	100 ± 0.00 aA	100 ± 0.00 aA
Mouth	Amylase	200	6.9	2	99.89 ± 5.15 aA	98.22 ± 11.94 aA	99.66 ± 2.08 aA	99.96 ± 0.57 aA	99.98 ± 0.81 aA	99.55 ± 1.71 aA
Esophagus-Stomach	Pepsin	130	5.5	10	99.85 ± 2.53 aA	97.14 ± 9.70 aA	99.56 ± 0.62 aA	99.58 ± 2.72 Aa	99.28 ± 0.73 aA	98.91 ± 4.05 aA
			4.6	10	99.85 ± 3.39 aA	97.30 ± 11.95 aA	99.57 ± 0.00 aA	99.56 ± 0.06 aA	97.98 ± 1.08 aB	98.48 ± 0.98 aA
			3.8	10	99.86 ± 2.68 aA	96.59 ± 13.61 aA	99.56 ± 0.62 aA	99.81 ± 0.27 aA	98.73 ± 1.11 aA	98.77 ± 1.02 aA
			2.8	20	99.83 ± 3.18 aA	96.81 ± 15.85 aA	99.47 ± 2.89 aA	97.86 ± 1.06 aB	97.85 ± 2.04 aB	97.03 ± 0.89 aB
			2.3	20	96.50 ± 1.61 aA	95.42 ± 6.48 aA	99.42 ± 1.94 aA	97.32 ± 1.66 aB	97.28 ± 2.35 aB	97.02 ± 1.86 aB

			2.0	20	95.77 ± 2.96 aA	92.28 ± 17.36 aA	99.40 ± 1.89 aA	97.15 ± 0.54 aB	97.47 ± 0.28 aB	93.47 ± 0.27 bC
Duodenum	Pancreatin + Bile salts	45	5.0	30	89.68 ± 8.82 a B	90.97 ± 23.57 aA	98.18 ± 5.11 aA	92.86 ± 0.28 bC	95.17 ± 1.88 aC	91.62 ± 1.47 bD
Ileum	-	45	6.5	60	86.69 ± 3.92 bB	83.66 ± 13.77 bA	94.98 ± 1.17 aA	92.53 ± 0.43 aC	87.81 ± 1.57 bD	91.05 ± 0.24 aD

Simulated *in vitro* TGI – Isolated microcapsule

Stage	Enzyme solution	Agitation (rpm)	pH	Exposure time (min)	Viable cell count (%)					
					Fresh <i>P. kluyveri</i> CCMA 0615	<i>P. kluyveri</i> CCMA 0615 + 15% WP ¹	<i>P. kluyveri</i> CCMA 0615 + 15% WP ¹ + 1% ALG ²	Fresh <i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732 + 20% WP ¹	<i>S. cerevisiae</i> CCMA 0732 + 30% WP ¹
Before the simulation	-	-	-	-	100 ± 0.00 aA	100 ± 0.00 aA	100 ± 0.00 aA	100 ± 0.00 aA	100 ± 0.00 aA	100 ± 0.00 aA
Mouth	Amylase	200	6,9	2	98.31 ± 1.11 aA	98.35 ± 1.12 aA	98.58 ± 8.89 aA	98.73 ± 0.18 aA	80.81 ± 1.27 cB	91.10 ± 4.89 bB
Esophagus-Stomach	Pepsin	130	5,5	10	97.11 ± 1.69 aA	94.33 ± 6.26 aB	94.43 ± 8.59 aB	98.03 ± 0.82 aA	80.80 ± 3.84 cB	89.49 ± 2.61 bB
			4,6	10	96.03 ± 2.32 aA	91.59 ± 2.53 aC	93.71 ± 8.89 aB	97.71 ± 0.74 aA	80.16 ± 4.33 c	88.07 ± 2.59 bC
			3,8	10	95.47 ± 0.51 aA	89.90 ± 0.85 aC	93.49 ± 9.21 aB	96.81 ± 0.65 aA	77.01 ± 0.64 cC	87.00 ± 2.65 bC

			2,8	20	95.21 ± 1.68 aA	89.41 ± 2.71 bC	89.98 ± 6.77 bC	93.07 ± 0.91 aB	76.39 ± 1.71 cC	86.08 ± 2.40 bC
			2,3	20	94.37 ± 2.48 aA	89.20 ± 5.14 bC	89.61 ± 1.55 bC	93.02 ± 1.23 aB	74.75 ± 3.03 cC	85.62 ± 2.40 bC
			2,0	20	92.03 ± 0.82 aB	88.64 ± 2.64 aC	88.48 ± 5.20 aC	92.22 ± 1.63 aB	61.81 ± 0.44 cD	84.08 ± 3.85 bD
Duodenum	Pancreatin + Bile salts	45	5,0	30	90.40 ± 0.08 aB	86.99 ± 0.31 aC	85.04 ± 1.41 aD	86.90 ± 1.79 aC	57.18 ± 0.31 cE	80.88 ± 3.90 bE
Ileum	-	45	6,5	60	89.22 ± 0.46 aB	85.00 ± 0.62 aC	84.48 ± 0.71 aD	80.85 ± 0.97 aD	54.03 ± 1.23 bF	78.78 ± 3.46 aE

Data are presented as mean ± standard deviation. Statistics were used to compare the means of the same yeast strain with different encapsulating matrix. Different lowercase letters on the same line denote a difference ($p < 0.05$) between treatments at the same time. Different capital letters in the same column denote differences ($p < 0.05$) of the same treatment at different times according to the Scott Knott test.

¹Whey powder

²Sodium alginate

Artigo 2 - Elaborado conforme a norma NBR 6022	
Título do artigo:	<i>Pichia kluyveri</i> CCMA 0615 microencapsulada como estratégia probiótica no tratamento da disbiose induzida por vancomicina em camundongos
Autores:	Iara Ferreira Resende Dirceu de Sousa Melo Pâmela Mynsen Machado Martins Hygor Lendell Silva de Souza Victor Hugo Buttrós Isaac Filipe Moreira Konig Nayara Martins Zille de Miranda Cíntia Lacerda Ramos Elizabethe Adriana Esteves Disney Ribeiro Dias Rosane Freitas Schwan

**ARTIGO 2 - *Pichia kluyveri* CCMA 0615 MICROENCAPSULADA COMO
ESTRATÉGIA PROBIÓTICA NO TRATAMENTO DA DISBIOSE INDUZIDA POR
VANCOMICINA EM CAMUNDONGOS**

**MICROENCAPSULATED *Pichia kluyveri* CCMA 0615 AS A PROBIOTIC
STRATEGY IN THE TREATMENT OF VANCOMYCIN-INDUCED DYSBIOSIS IN
MICE**

Iara Ferreira Resende

<https://orcid.org/0000-0002-7664-7711>

Dirceu de Sousa Melo

<https://orcid.org/0000-0002-7593-7514>

Resumo

A utilização de antibióticos pode resultar em graves alterações na microbiota intestinal. No entanto, uma forma de reverter quadros de disbiose induzidas por este fármaco é o uso dos probióticos. O presente estudo tem como objetivo tratar disbiose induzida por antibiótico em camundongos BALB/c utilizando a cepa potencial probiótica *Pichia kluyveri* CCMA 0615 microencapsulada. A levedura foi microencapsulada com 15% de soro de leite em pó utilizando um protocolo de secagem já estabelecido e avaliado em estudos anteriores. Os testes *in vivo* foram realizados utilizando camundongos BALB/c. Foram utilizados 32 animais que ficaram mantidos em sistema de gaiolas com iluminação controlada (ciclo claro-escuro de 12 horas) e temperatura (22 ± 1 °C). Os animais foram divididos em três grupos, parte dos animais foram submetidos a indução de disbiose com 100µl 10mg/mL de vancomicina. O experimento teve duração de 28 dias, sendo necessária uma semana para a aclimação dos animais às condições experimentais. A levedura foi administrada na concentração de 10^7 UFC/ml diluída em salina por via intragástrica (gavagem). As populações de enterobactérias, bactérias totais e da levedura inoculada foram avaliadas, assim como o perfil da microbiota após indução de disbiose e tratamento com a levedura potencialmente probiótica. Além disso, foram avaliados os possíveis benefícios à saúde do animal, através da análise histológicas do intestino, parâmetros inflamatórios e bioquímicos sanguíneos. A vancomicina alterou não somente características físicas dos órgãos dos animais como também parâmetros hematológicos, imunológicos e fisiologia. Os dados mostram aumento no peso do baço e redução no peso do rim. Os níveis de glóbulos brancos (WBC), linfócitos e células caliciformes foram correlacionados com o aumento de grupos patogênicos provocados pelo antibiótico. A análise de microbioma mostrou que a vancomicina diminuiu a abundância de grupos como Bacillota e favoreceu Verrucomicrobiota e Patescibacteria, com maior abundância de gêneros potencialmente patogênicos, como *Agathobaculum* e *Lachnoclostridium*. A utilização da cepa potencial probiótica *P. kluyveri* CCMA 0615 também favoreceu microrganismos do filo Verrucomicrobiota, principalmente do gênero *Akkermansia*, *Blautia* e *Parabacteroides goldsteinii*, restabelecendo grupos microbianos benéficos, porém com uma composição única e diferente do controle. Além disso, os animais tratados com antibiótico apresentaram lesões na superfície do epitélio intestinal, como redução das vilosidades no íleo e redução da altura e diâmetro da cripta no cólon. Entretanto, *P. kluyveri* CCMA 0615, por mecanismos diretos de interação com o epitélio intestinal e/ou por modulação da microbiota, foi capaz de restabelecer esses parâmetros alterados a valores semelhantes ao grupo controle. Essas descobertas sugerem que *P. kluyveri* CCMA 0615 pode ser um candidato probiótico promissor para atenuar os distúrbios intestinais induzidos pelo uso de antibióticos e promover a saúde intestinal.

Palavras-chave: não-*Saccharomyces*; vancomicina; microbioma.

Abstract

The use of antibiotics can result in serious changes in the intestinal microbiota. However, one way to reverse dysbiosis induced by this drug is the use of probiotics. The present study aims to treat antibiotic-induced dysbiosis in BALB/c mice using the potential probiotic strain *Pichia kluyveri* CCMA 0615 microencapsulated. The yeast was microencapsulated with 15% whey powder using a drying protocol already established and evaluated in previous studies. In vivo tests were performed using BALB/c mice. Thirty-two animals were kept in cages with controlled lighting (12-hour light-dark cycle) and temperature (22 ± 1 °C). The animals were divided into three groups, some of the animals were subjected to dysbiosis induction with 100µl 10mg/mL vancomycin. The experiment lasted 28 days, with one week required for the animals to acclimate to the experimental conditions. The yeast was administered at a concentration of 10^7 CFU/ml diluted in saline via intragastric gavage. The populations of enterobacteria, total bacteria and inoculated yeast were evaluated, as well as the microbiota profile after induction of dysbiosis and treatment with the potentially probiotic yeast. In addition, the possible benefits to the animal's health were evaluated through histological analysis of the intestine, inflammatory parameters and blood biochemical parameters. Vancomycin altered not only the physical characteristics of the animals' organs but also hematological, immunological and physiological parameters. The data show an increase in spleen weight and a reduction in kidney weight. The levels of white blood cells (WBC), lymphocytes and goblet cells were correlated with the increase in pathogenic groups caused by the antibiotic. Microbiome analysis showed that vancomycin decreased the abundance of groups such as Bacillota and favored Verrucomicrobiota and Patescibacteria, with a greater abundance of potentially pathogenic genera, such as *Agathobaculum* and *Lachnoclostridium*. The use of the potential probiotic strain *P. kluyveri* CCMA 0615 also favored microorganisms of the Verrucomicrobiota phylum, mainly of the genera *Akkermansia*, *Blautia* and *Parabacteroides goldsteinii*, reestablishing beneficial microbial groups, but with a unique composition different from the control. In addition, animals treated with antibiotics presented lesions on the surface of the intestinal epithelium, such as reduced villi in the ileum and reduced crypt height and diameter in the colon. However, *P. kluyveri* CCMA 0615, through direct mechanisms of interaction with the intestinal epithelium and/or by modulating the microbiota, was able to restore these altered parameters to values similar to the control group. These findings suggest that *P. kluyveri* CCMA 0615 may be a promising probiotic candidate to attenuate antibiotic-induced intestinal disorders and promote intestinal health.

Keywords: non-*Saccharomyces*; vancomycin; microbiome.

1 Introdução

A microbiota intestinal é considerada um microecossistema dinâmico e complexo que compreende trilhões de microrganismos incluindo bactérias, fungos, arqueas, vírus e protistas (Huang; Wu; Yang, 2021). A maior parte (98%) da comunidade microbiana intestinal conhecida é representada por bactérias pertencentes aos filos Bacillota, Bacteroidota, Pseudomonadota e Actinomycetota, anteriormente conhecidos como Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacterias e Actinobacteria, respectivamente (Guo et al., 2022; Oren, 2024).

Estudos mostram que a microbiota intestinal desempenha um papel fundamental sobre a saúde, como manutenção da homeostase intestinal (Blaak et al., 2020), modulação do sistema imunológico e regulação do metabolismo energético (Wang et al., 2023). Entretanto, quando o ecossistema da microbiota é severamente perturbado, pode desencadear a condição denominada disbiose (Baldelli et al., 2021). A disbiose envolve a redução da diversidade microbiana, perda de microrganismos benéficos e aumento de microrganismos potencialmente patogênicos, impactando negativamente a homeostase intestinal e a resposta imunológica (Gibson et al., 2017; Kesavelu e Jog, 2023). Assim, a disbiose está intimamente ligada a distúrbios gastrointestinais e ao desenvolvimento de doenças inflamatórias (Carías Domínguez et al., 2025).

O uso de antibióticos perturba fortemente a homeostase da microbiota intestinal, podendo resultar em disbiose e comprometer a saúde do hospedeiro (Taitz et al., 2025). Além disso, seu uso indiscriminado favorece o surgimento de resistência bacteriana, representando um grave risco para a saúde coletiva (Dahiya e Nigam, 2023; Ramirez et al., 2020). Estudos mostraram que a terapia com antibióticos está associada a reduções massivas na riqueza e diversidade das comunidades microbianas (Haak et al., 2019) e a um risco aumentado a doenças intestinais inflamatórias, como a síndrome do intestino irritável (SII) (Klem et al., 2017). Manter a homeostase intestinal é de grande importância, tendo em vista o seu impacto sobre a saúde do indivíduo e o uso de antibióticos deve ser minimizado (Carías Domínguez et al., 2025). Nesse contexto, os probióticos têm ganhado muita atenção como uma ferramenta não farmacológica no tratamento de infecções e outros distúrbios intestinais (Dieterich; Schink; Zopf, 2018).

A maioria dos probióticos comerciais consiste em bactérias benéficas que dão suporte à saúde intestinal. No entanto, leveduras também possuem propriedades probióticas. *Saccharomyces boulardii*, conhecida comercialmente como Floratil®, é amplamente estudada e utilizada por suas características probióticas, particularmente no tratamento de infecções por

patógenos intestinais e doenças intestinais inflamatórias (Abid et al., 2022). Embora se conheça os benefícios de *S. boulardii*, o conhecimento e aplicação de outras cepas de levedura com potencial probiótico permanece limitada. Atualmente, *Kluyveromyces fragilis* (B0399) é a única levedura probiótica não-*Saccharomyces* disponível comercialmente (Probilife-NXT, 2025).

Diante disso, pesquisas que visam selecionar e desenvolver produtos contendo novas leveduras podem diversificar as opções de probióticos disponíveis, podendo oferecer benefícios específicos e direcionados para diversas condições de saúde. Pesquisas anteriores evidenciaram que *Pichia kluyveri* CCMA 0615 possui propriedades interessantes, que a tornam candidata promissora para aplicação como probiótico (Menezes et al., 2018, 2020a, 2020b). No intuito de superar a susceptibilidade durante o armazenamento refrigerado e sobrevivência às condições adversas do TGI, Resende et al., (2025), propôs um protocolo de microencapsulação para *P. kluyveri* CCMA 0615, obtendo resultados promissores, melhorando as propriedades de entrega deste novo probiótico em possíveis aplicações em modelos *in vivo*.

Considerando os avanços na caracterização da cepa *P. kluyveri* CCMA 0615 e os resultados promissores obtidos Resende et al., (2025), torna-se pertinente investigar o seu desempenho em modelos *in vivo*. Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a eficácia da nova levedura com atributos probióticos, *P. kluyveri* CCMA 0615, na sua forma microencapsulada, no tratamento da disbiose induzida por antibiótico vancomicina em camundongos BALB/c.

2 Material e Métodos

2.1 Microrganismos e condições de cultura

A levedura *P. kluyveri* CCMA 0615 foi fornecida pela Coleção de Culturas de Microbiologia Agrícola (CCMA) da Universidade de Lavras (Minas Gerais, Brasil). A escolha do microrganismo foi baseada em suas características tecnológicas probióticas avaliadas em estudos anteriores (Menezes et al., 2020b). A levedura foi reativada em meio líquido de melaço [em g/L: melaço 137.5 (ECL Eireli – fornecedor Mellaço de Cana), cloreto de cálcio 1.1 (Dinâmica), ureia 2 (Ambion), polissorbato 80 0.5 (Dinâmica) e pH 3.5] e incubadas a 28 °C por 48 horas sob agitação (120 rpm) até atingir a concentração de 10⁸ UFC/mL (Martins et al., 2022).

2.2 Microencapsulação por spray drying

P. kluyveri CCMA 0615 foi microencapsulada com 15% de soro de leite (Leitino - Minas Gerais, Brasil) utilizando spray dryer de maior escala (modelo SD 5.0; Labmaq do Brasil, Ribeirão Preto, Brasil) conforme descrito por Resende et al., (2025). Obteve-se um pó com população de 10^8 UFC/mL, a qual era monitorada diariamente por plaqueamentos antes de fornecer as doses para os animais. As doses eram preparadas imediatamente antes da administração diluindo 1g da levedura microencapsulada em 9 mL de solução tampão salina fosfato estéril [em g/L: NaH_2PO_4 2.56 (Synth, Diadema, Brasil), NaHPO_4 11.78 (Synth, Diadema, Brasil) e NaCl 87.60 (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), obtendo uma população de 10^7 UFC/mL.

2.3 Animais e condições experimentais

Protocolos experimentais foram realizados de acordo com o *Guide for the Care e Use of Laboratory Animals* publicado pelo *US National Institutes of Health (NIH Publication, 1996)*. O trabalho foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Uso Animal / Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina - MG, Brasil (CEUA nº 1412221123). Foram utilizados 32 camundongos BALB/c machos, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte – MG, Brasil. Os animais foram mantidos em sistema de gaiolas com iluminação controlada (ciclo claro-escuro de 12 horas) e temperatura (22 ± 1 °C). Água filtrada e dieta comercial (Nuvital, Nuvilab, Curitiba, Brasil) foram administrados *ad libitum* aos animais. Os animais foram aclimatados às condições experimentais 2 semanas antes de iniciar o estudo.

2.4 Delineamento experimental

O experimento foi realizado utilizando 32 camundongos, divididos nos seguintes grupos: grupo controle (CG), que recebeu apenas solução tampão salina fosfato estéril [em g/L: NaH_2PO_4 2.56 (Synth, Diadema, Brasil), NaHPO_4 11.78 (Synth, Diadema, Brasil) e NaCl 87.60 (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA)]; grupo antibiótico (DG), que recebeu 100µl na concentração de 10mg / mL de vancomicina por 14 dias e grupo tratado com a levedura CCMA 0615 (YG), que recebeu vancomicina na mesma concentração e tempo do grupo DG e foram tratados por mais 14 dias com a levedura microencapsulada com atributos probióticos, na concentração de 10^7 UFC/mL em um volume de 100µl. A administração de solução tampão, vancomicina e

solução com a levedura foi feita por via intragástrica (gavagem). O protocolo experimental teve duração total de 28 dias (14 dias para indução de disbiose + 14 dias de tratamento).

2.5 Ingestão alimentar e ganho de peso

A ingestão alimentar e peso corporal foram avaliados semanalmente. O peso da ração e o peso corporal dos animais foram aferidos em balança semi-analítica. O ganho de peso (WG) e a ingestão alimentar (FI) foram calculados da seguinte forma:

$$WG(g) = \text{peso corporal final (g)} - \text{peso corporal inicial (g)}.$$

$$FI(g) \text{ do período} = \text{Peso da ração ofertada} - \text{peso sobras}.$$

2.6 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose

Os animais foram mantidos em jejum por 6 horas e a glicose foi administrada intraperitonealmente (1g/Kg de massa corporal). Os níveis de glicose no sangue foram determinados por um pequeno corte na extremidade da cauda do camundongo, imediatamente antes (0 min) e após receber a glicose nos tempos de 15, 30, 60 e 120 min. Os níveis de glicose no sangue foram determinados usando um ACCU-CHEK (Advantage Glucose Analyzer, Roche Diagnostics Corporation, IN, EUA) de acordo com Villas Boas et al., (2020). A área sob a curva de glicose (AUC) foi calculada usando a regra trapezoidal (software Prisma 9.0).

2.7 Coleta de fezes

Amostras de fezes frescas de cada grupo foram coletadas assepticamente em gaiola metabólica após higienização a cada dois dias durante o período de administração do antibiótico e no período de tratamento com a levedura, sendo armazenadas diretamente em freezer -80 e/ou em glicerol 40% para análises posteriores (Hasan e Yang, 2023).

2.7.1 Enumeração de microrganismos nas fezes

As populações de bactérias totais, levedura e enterobactérias foram determinadas por meio de plaqueamento em ágar MRS (suplementado com 4 mL/L de nistatina), ágar YEPG pH = 3.5 [em g/L: extrato de levedura 10 (Himedia, Mumbai, Índia), glicose 20 (Synth, Diadema, Brasil), peptona 20 (Himedia, Mumbai, Índia) e ágar 20 (Himedia, Mumbai, Índia)], e ágar eosina azul de metileno (EMB) [em g/L: 35.96 (Himedia, Mumbai, Índia)], respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C (bactérias totais e enterobactérias) e 28 °C (levedura) por

48 h. Após o período de incubação, as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram enumeradas. Os dados foram expressos como log UFC/mL.

2.7.2 Identificação das leveduras nas fezes por MALDI-TOF

A identificação por MALDI-TOF, foi realizada para confirmar se a levedura presente nas fezes realmente era *P. kluyveri* CCMA 0615. A extração das proteínas do microrganismo isolado foi feita de acordo com protocolo de extração com ácido fórmico da Bruker. A levedura foi cultivada durante 18h em YEPG. 1µL do sobrenadante da extração foi adicionado na MALDI-TOF placa de aço inoxidável, após a secagem, 1µL de solução matriz de CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) preparada previamente para uma concentração final de 10mg CHCA/mL [etanol/acetonitrila/ácido trifluoroacético (10%), 1:1:1]. A amostra permaneceu em temperatura ambiente até secagem completa e foi analisada por MALDI-TOF MS (UltrafleXtreme MALDI-TOF MS—Bruker Daltonics; Bremen, Germany). O isolado foi analisado em triplicata para avaliar a qualidade e reprodutibilidade dos espectros. O espectro de massa foi analisado usando o software Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics).

2.7.3 Quantificação de ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta nas fezes

A quantificação de ácidos orgânicos (ácidos acético, propiônico, butírico e láctico) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), seguindo os protocolos adaptados de Rawat et al., (2014) e Wijayanti e Wikandari, (2023). As soluções padrão (0,001–0,050 mg/mL) foram preparadas a partir de uma solução estoque de 0,100 mg/mL e passaram pelas mesmas etapas de filtração e preparação das amostras para calibração. Amostras secas das fezes (0.5 g) foram dissolvidas em água ultrapura (10 mL), homogeneizadas por vórtice e deixadas em repouso por 30 minutos. Após essa etapa, a solução foi filtrada (filtro: diâmetro de 42 mm e poros de 2 µm), centrifugada (8000 rpm, 20 min) e o sobrenadante foi coletado. Aliquotas de 1 mL do sobrenadante foram diluídas em 10 mL de água ultrapura, seguida por filtração mais fina (filtro: diâmetro de 47 mm e poros de 0.45 µm). Tanto as amostras quanto os padrões (100 µL) foram analisados utilizando um HPLC (modelo LC-10Ai; Shimadzu Corp., Tóquio, Japão) equipado com um sistema de detecção duplo consistindo em um detector UV-vis (SPD-10Ai; Shimadzu) e um detector de índice de refração UV (RID-10Ai). Os ácidos foram analisados utilizando a coluna de exclusão iônica Shimadzu (Shim-pack SCR —101H, 7,9 mm × 30 cm) a uma temperatura de forno de 55 °C. Água ultrapura acidificada (pH 2,1) foi utilizada como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min. A identificação dos compostos foi

realizada com base nos tempos de retenção dos padrões. Todas as amostras foram examinadas em triplicata.

2.8 Eutanásia e coleta de amostras

Os animais foram eutanasiados no último dia de experimento após jejum de 8 horas. No momento da eutanásia os animais foram anestesiados com ketamina (150 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), seguido por decapitação de acordo com Pereira et al., (2015). A coleta do sangue foi realizada em tubos contendo EDTA. Aliquotas de sangue total e plasma foram utilizadas para análises hematológicas, parâmetros bioquímicos e inflamatórios. O intestino delgado e cólon, fígado, baço, rim e linfonodos mesentéricos foram coletados, seus pesos totais e relativizados calculados. Os órgãos foram fragmentados e armazenados congelados a -80 °C para análises posteriores ou fixados em formalina tamponada a 10% para análise histológica.

2.9 Obtenção do lavado intestinal

A coleta do conteúdo do cólon foi feita de acordo com Yin et al., (2013) com pequenas modificações. Foi realizada uma cuidadosa lavagem do lúmen com 5 mL de PBS estéril com auxílio de uma seringa. O lavado obtido foi homogeneizado em vórtex por 1 min, centrifugado a 5000 rpm por 10 min e separado em alíquotas para armazenamento em -80 °C para análises posteriores.

2.10 Parâmetros hematológicos

A análise hematológica foi realizada nas amostras de sangue total. Foi realizada a contagem global e diferencial de leucócitos, determinadas as concentrações de hemoglobina, hematócrito e plaquetas por meio de contador hematológico (Mindray®, modelo bc-5380).

2.11 Parâmetros bioquímicos séricos

Amostras de sangue total foram submetidas a centrifugação a 1800 rpm para obtenção do plasma e mantido a -80 °C até o momento das análises. O plasma foi utilizado para a avaliação do colesterol total e triglicerídeos, utilizando kits enzimáticos comerciais (Labtest Diagnóstica LTDA, Brasil) seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante.

As amostras de plasma também foram utilizadas para a dosagem de CRP e LPS e as amostras de lavado intestinal para a quantificação da IgA pelo método de ELISA- *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, com kit de reagentes para detecção quantitativa em camundongos

(AFG Bioscience, Viena, Austria), conforme instruções do fabricante. A quantificação de IgA foi corrigida pelo método de Bradford (Quatro G Biotecnologia – Porto Alegre – RS, Brasil). As leituras das absorvâncias foram feitas no espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific), no comprimento de onda 450 nm. Posteriormente, foi calculada a concentração de CRP, LPS e IgA conforme as absorvâncias encontradas para a curva padrão de cada um dos compostos. Os dados foram expressos em ng/mL.

2.12 Análise histológica do cólon e íleo

Cólon e íleo foram utilizados para confeccionar as lâminas histológicas de acordo com Cotter e Loda, (2017). Após a eutanásia, os tecidos foram imediatamente fixados em formol a 10%. Após fixação os tecidos foram submetidos à desidratação com gradiente crescente de álcool (70, 80, 85, 90, 95 e 100%). Em seguida, submetidos ao processo de diafanização, no qual o álcool presente nos tecidos é substituído por xilol, e logo em seguida, o processo de impregnação, em que o xilol é substituído por parafina fundida em estufa a 60 °C. Posteriormente foram confeccionados os blocos com os tecidos incluídos na parafina. Os cortes teciduais (4 µm) foram realizados utilizando um micrótomo e coradas usando um protocolo padrão de hematoxilina e eosina (HE), e azul de alciano. As imagens foram adquiridas usando um microscópio trinocular Olympus CX31 (Olympus Optical Ltda. Brasil, São Paulo, SP, Brasil) e câmera (SC30 Color CMOS Camera for Light Microscopy, Olympus Optical Ltda. Brasil, São Paulo, SP, Brasil) Parâmetros como altura e diâmetro da cripta, altura e diâmetro da vilosidade, número de células caliciformes, área do infiltrado linfóide foram avaliados com o auxílio do software ImageJ 2014 (Rasban, National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA).

2.13 Microscopia eletrônica de varredura do cólon e íleo

Amostras do cólon e íleo foram retiradas e fixadas imediatamente em solução karnovisk (pH 7.2) por 24 h a 4 °C. Os tecidos foram lavados em tampão cacodilato e em seguida desidratados em um gradiente de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%). Após a desidratação, foram secos criticamente em dióxido de carbono líquido (Baltec, modelo CPD 030, Balzers, AG, Liechtenstein). As amostras foram revestidas com ouro (Baltec, modelo SCD 050, Balzers, AG, Liechtenstein) e examinadas utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (SEM; model EVO 040, Carl Zeiss, Germany).

2.14 Análise de microbioma

2.14.1 Coleta cecal

O conteúdo cecal foi coletado e armazenado em criotubos esterilizados. Todos os passos de manipulação das amostras cecal foram feitos com instrumentos descontaminados e tomando-se o máximo de cuidado possível para evitar contaminação cruzada.

2.14.2 Extração de DNA

As extrações de DNA do conteúdo cecal foram feitas utilizando o QIAmp DNA Stool Mini Kit da marca QIAGEN, específico para extração de DNA fecal, seguindo as especificações do fabricante. A concentração e a pureza do DNA extraído foram verificadas usando um espectrofotômetro Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). As amostras de DNA extraído foram armazenadas à -20 °C para posterior uso na análise de microbioma.

2.14.3 Sequenciamento

O sequenciamento do gene 16S rRNA foi conduzido utilizando a plataforma Illumina NextSeq 2000, com geração de leituras pareadas de 2×300 pb, direcionado à região hipervariável V3–V4 do gene 16S rRNA. A amplificação das amostras foi realizada com os primers específicos 341F (CCTAYGGGRBGCASCAG) e 806R (GGACTACNNGGGTATCTAAT), ambos a 10 μ M. Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados utilizando partículas magnéticas AMPure XP Beads (Beckman Coulter) para remoção de primers e fragmentos indesejados. Na segunda PCR, foram adicionados os adaptadores e índices específicos por meio do kit Nextera XT Index (Illumina), permitindo a identificação de cada amostra no sequenciamento. Os produtos amplificados na segunda PCR foram novamente purificados com AMPure XP Beads, garantindo a pureza das bibliotecas. Após a purificação, as bibliotecas foram quantificadas por NanoDrop e equalizadas para a mesma concentração, sendo posteriormente reunidas em um pool equimolar, composto por 5 μ L de cada amostra. O pool final foi quantificado por qPCR, utilizando o KAPA Library Quantification Kit (Roche), para determinação precisa da concentração em nanomolar (nM) e realização das diluições necessárias para o carregamento na plataforma de sequenciamento.

2.14.4 Análise bioinformática do microbioma

O conjunto de dados do microbioma foi obtido após o processamento de leituras brutas com o pacote DADA2 R, resultando em uma tabela OTU com 97% de similaridade, juntamente

com taxonomia e metadados. A classificação taxonômica foi realizada usando o banco de dados SILVA. Os dados foram analisados usando R (versão 4.3.0) com os pacotes phyloseq, tidyverse, vegan (Oksanen et al., 2015), SpiecEasi (Kurtz et al., 2017) e microeco (Liu et al., 2021a). A tabela OTU foi filtrada para leituras baixas com um limite de soma de 100.

A composição da comunidade microbiana foi visualizada usando gráficos de barras de abundância relativa. As contagens de OTU foram agregadas no nível do filo, transformadas em abundâncias relativas dentro das amostras e plotadas usando ggplot2 (Wickham, 2011), com uma paleta de cores personalizada aplicada aos filos. As amostras foram agrupadas por condições de tratamento: controle, tratamento com antibióticos e levedura microencapsulada após o tratamento com antibióticos para comparação.

A diversidade e a estrutura da comunidade foram avaliadas usando Análise de Correspondência Destendenciada (DCA) e PERMANOVA. A função decorana de vegan foi aplicada para avaliar a ordenação, e PERMANOVA foi realizada com a função adonis2 para quantificar o efeito dos grupos de tratamento na composição da comunidade microbiana. Os resultados foram visualizados com gráficos de dispersão, incluindo elipses de confiança e anotações para estatísticas F e valores de p.

A análise de rede foi conduzida para explorar associações microbianas usando o algoritmo SparCC implementado no SpiecEasi. Táxons com abundâncias ≥ 500 foram retidos para a construção da rede. Correlações com valores absolutos $\geq 0,8$ foram incluídas na matriz de adjacência, que foi convertida em um objeto igraph para visualização. A abundância média transformada em CLR, tamanhos de nós em escala e cores de nós representaram gêneros taxonômicos. As bordas foram coloridas com base em sinais de correlação, com correlações positivas e negativas indicadas por verde e rosa, respectivamente. As métricas de rede, incluindo grau médio, densidade e coeficiente de agrupamento, foram calculadas e anotadas no gráfico de rede.

A análise LEfSe foi realizada usando o pacote microeco para identificar biomarcadores que diferenciaram os grupos de tratamento. Os resultados foram visualizados com gráficos de barras LDA com limite de 3,5 LDA-score, e um mapa de calor foi produzido representando os 20 gêneros mais abundantes, destacando padrões taxonômicos entre as amostras.

2.15 Análise estatística

Todos os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA one-way) e as médias foram comparadas por meio

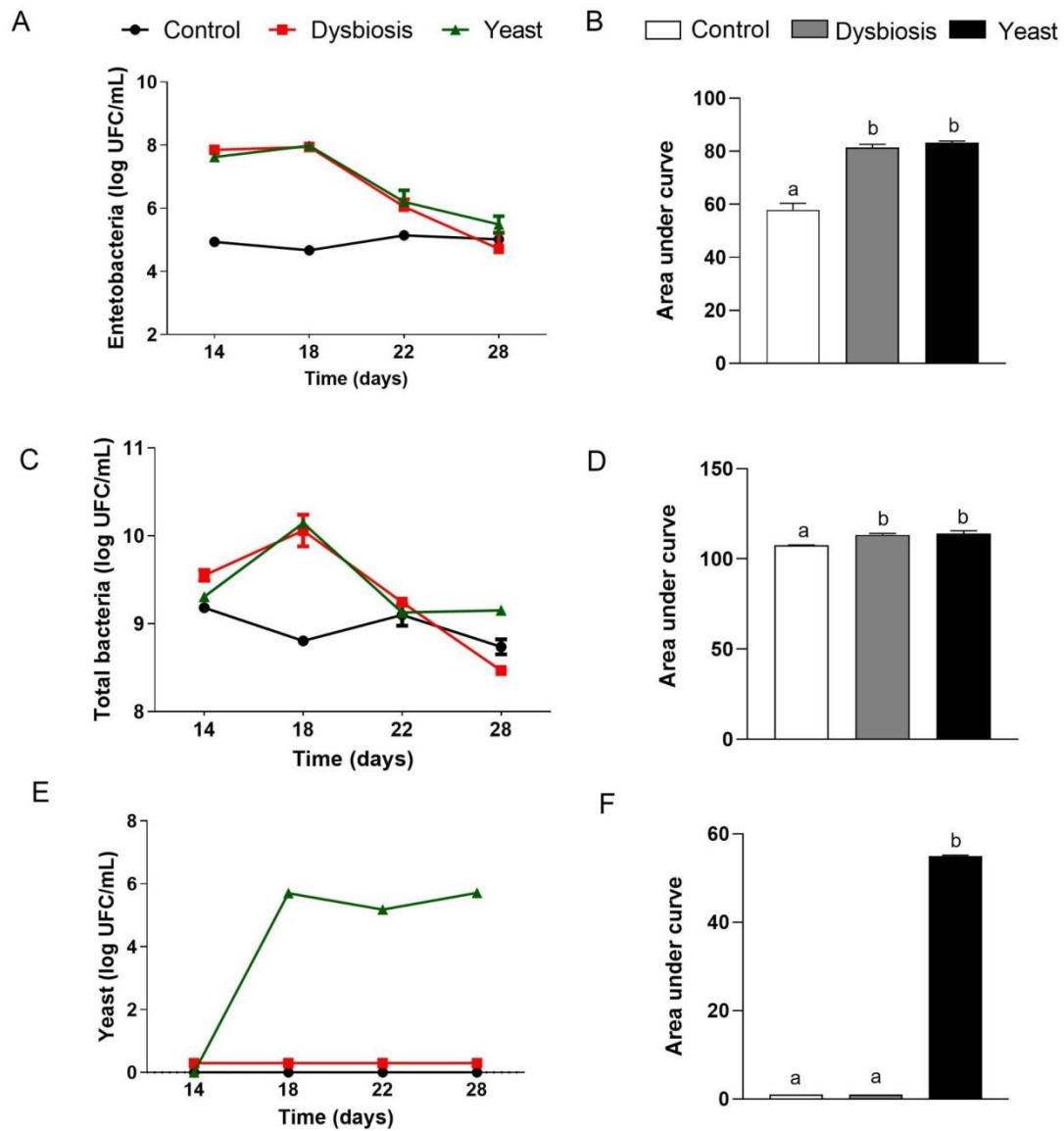
do teste de Tukey com nível de significância de $p < 0.05$. Para os dados ao longo do tempo foram realizadas análises de área sob a curva. O software Prisma 9.0 foi utilizado para todas as análises.

3 Resultados

3.1 Contagem populacional dos microrganismos nas fezes

O plaqueamento foi realizado no intuito de verificar se a população de enterobactérias aumentava conforme administrada a vancomicina, visando confirmar a indução de disbiose. Além disso, as populações de bactérias totais e leveduras também foram monitoradas (Figura 1). A população de enterobactérias (Fig 1 A e B) aumentou com a administração do antibiótico, atingindo valores de 10^8 log UFC/mL ao fim do tratamento, enquanto no controle essa população se manteve em torno de 10^4 log UFC/mL. Após a interrupção da administração do antibiótico, a população de enterobactérias dos grupos GD e YG seguiu a tendência de retorno à normalidade, atingindo valores semelhantes ao controle CG após 2 semanas. Já para a população de bactérias totais (Fig 1 C e D) foi observado comportamento contrário ao das enterobactérias, apresentando queda com a administração da vancomicina e aumento bastante pronunciado logo após a interrupção do tratamento, seguida de normalização após 2 semanas. Em linhas gerais, as populações bacterianas foram fortemente afetadas pelo uso do antibiótico, permanecendo mais elevadas após o tratamento, tendo em vista os dados de área sob a curva, com retorno aos níveis do controle após as 2 semanas.

Figura 1 - Contagem populacional dos microrganismos nas fezes.



Diferentes letras minúsculas denotam diferença ($p < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Tukey. A e B - população de enterobactérias; C e D - população de bactérias totais; E e F - população de leveduras.

Em relação à população de leveduras (Fig 1 E e F), para os grupos CG e DG não foi possível determinar a contagem de células devido à baixa população, com valores abaixo de 10^2 log UFC/mL. Para o grupo YG, o qual recebeu a *P. kluyveri* microencapsulada na população 10^7 log UFC/mL, encontrou-se uma população nas fezes na ordem de 10^6 log UFC/mL, demonstrando uma alta viabilidade durante a passagem pelo TGI do animal. A levedura observada no plaqueamento das fezes foi isolada e submetida a uma identificação por MALDI-

TOF. A análise confirmou com *score* de 2.071 para *P. kluyveri*. Confirmando que a levedura presente nas fezes do grupo YG se trata realmente da levedura administrada na forma microencapsulada.

3.2 Parâmetros corporais, hematológicos e bioquímicos dos animais experimentais

As características corporais, hematológicas e bioquímicas dos grupos são apresentadas na Tabela 1. Para a maioria dos parâmetros avaliados, os resultados foram semelhantes entre os tratamentos. Dentre as alterações, é possível observar que a vancomicina resultou em um aumento do peso do baço, diminuição do peso do rim, aumento da contagem de leucócitos totais e linfócitos no grupo GD. No entanto, YG, tratado com a levedura, foi capaz de restabelecer a condição do baço e linfócitos a valores semelhantes ao controle CG. Estes achados indicam impacto da disbiose sobre parâmetros imunológicos e um possível efeito restaurador da levedura.

Tabela 1 - Visão geral dos parâmetros fisiológicos, hematológicos e bioquímicos dos grupos experimentais

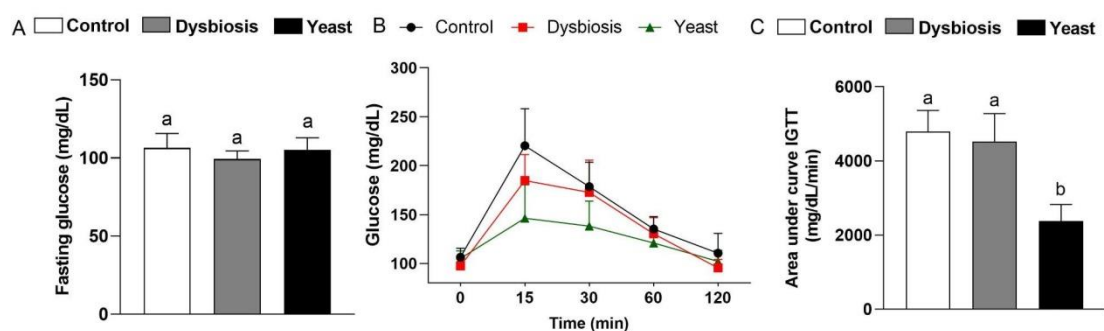
Variáveis	Grupos experimentais		
	Controle	Disbiose	Levedura
Peso corporal inicial (g)	23.59 ± 1.48 a	23.22 ± 1.57 a	23.63 ± 2.32 a
Peso corporal final (g)	24.31 ± 1.98 a	23.98 ± 1.82 a	25.23 ± 1.84 a
Ingestão (g)	15.08 ± 3.16 a	14.48 ± 3.96 a	15.88 ± 3.19 a
Fígado (mg/g)	52.83 ± 3.46 a	49.68 ± 3.79 a	48.38 ± 4.04 a
Baço (mg/g)	3.69 ± 0.56 a	4.18 ± 0.30 b	3.42 ± 0.29 a
Rim (mg/g)	8.21 ± 0.55 a	7.37 ± 0.70 b	7.33 ± 0.56 b
Gordura visceral (g)	0.25 ± 0.13 a	0.23 ± 0.07 a	0.23 ± 0.06 a
Índice de adiposidade (mg/g)	1.05 ± 0.5 a	0.95 ± 0.29 a	0.92 ± 0.26 a
WBC (10 ³ /μL)	5.17 ± 1.88 a	6.79 ± 1.57 b	6.94 ± 1.76 b
Neutrófilos %	5.72 ± 1.20 a	4.87 ± 0.87 a	5.63 ± 0.50 a
Linfócitos %	79.49 ± 4.02 a	84.06 ± 4.69 b	79.12 ± 3.07 a
Monócitos %	12.70 ± 2.04 a	10.66 ± 2.52 a	12.23 ± 1.65 a

Eosinófilos %	0.29 ± 0.27 a	0.25 ± 0.33 a	0.38 ± 0.34 a
Basófilos %	0.46 ± 0.13 a	0.56 ± 0.16 a	0.46 ± 0.18 a
RBC (10 ⁶ /μL)	9.48 ± 3.21 a	10.05 ± 2.93 a	10.50 ± 2.50 a
Hemoglobina (g/dL)	14.22 ± 4.25 a	14.56 ± 4.07 a	15.08 ± 3.31 a
Hematócrito %	44.14 ± 15.31 a	45.87 ± 14.41 a	47.53 ± 11.72 a
Plaquetas (10 ³ /μL)	399.2 ± 121.2 a	415.7 ± 145.5 a	491.5 ± 140.0 a
Colesterol (mg/dL)	88.44 ± 17.85 a	93.35 ± 15.74 a	105.7 ± 15.91 a
Triglicerídeos (mg/dL)	109.4 ± 53.54 a	90.22 ± 58.56 a	102.6 ± 51.87 a

Média ± desvio padrão. Diferentes letras minúsculas na mesma linha denotam diferença ($p < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Tukey. WBC - Glóbulos Brancos; RBC - Glóbulos Vermelhos.

De maneira interessante, a glicemia de jejum foi semelhante entre os grupos, porém os resultados do teste de tolerância intraperitoneal à glicose, mostram que o tratamento com a levedura foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina visto pelos menores valores glicêmicos ao longo do tempo e redução de 52% da área sob a curva (YG, 2380 ± 1095 , $p = 0.0138$), quando comparado ao CG (4788 ± 1526) e DG (4958 ± 1789) (Figura 2).

Figura 2 – Avaliação da homeostase glicêmica



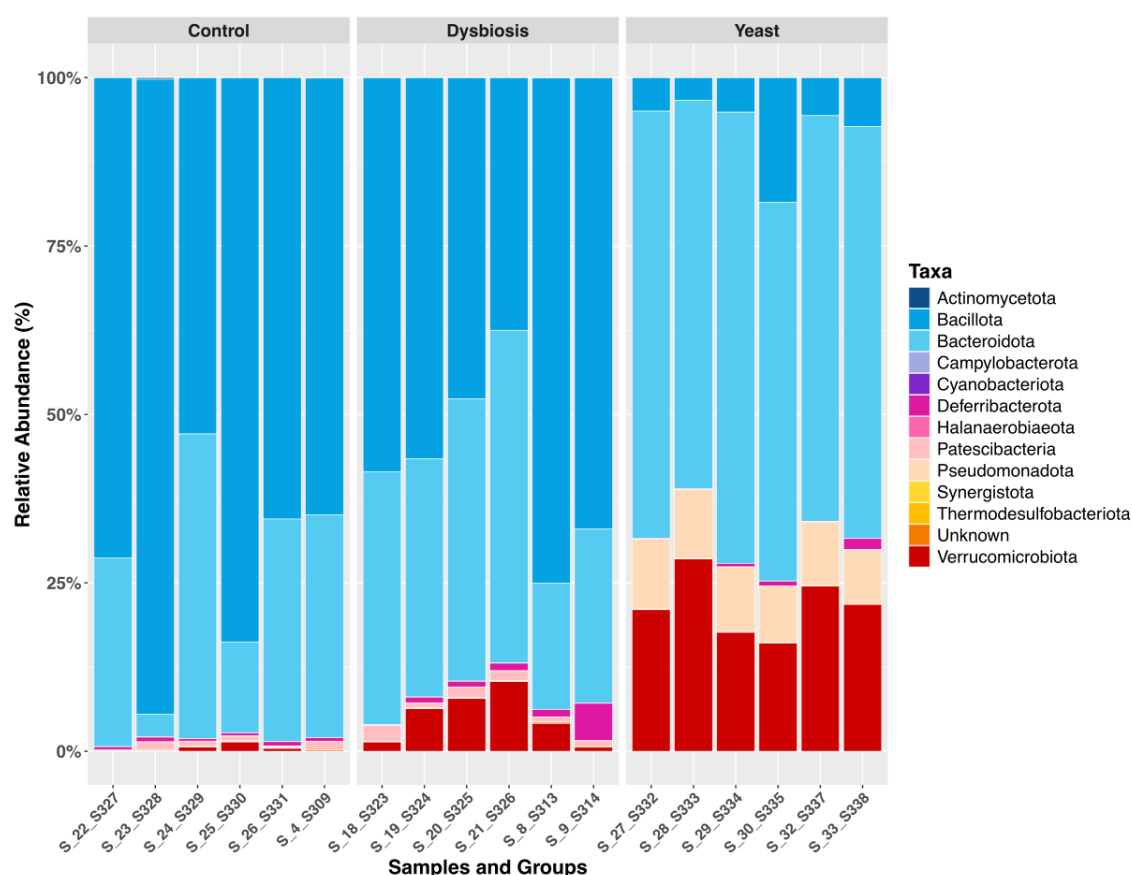
Glicemia de jejum (A) e teste de tolerância à intraperitoneal à glicose (IPGTT), B e C. Diferentes letras minúsculas denotam diferença ($p < 0.05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Tukey.

3.3 Alteração da microbiota intestinal por antibiótico

A análise da composição dos grupos microbianos com abundância relativa dos filos variou entre os grupos (Figura 3). No grupo controle, as comunidades microbianas foram

dominadas por Bacillota e Bacteroidota, com composição estável e representação menor de outros filos. No grupo disbiose, houve uma redução acentuada na diversidade microbiana, caracterizada por um declínio em Bacillota e aumento da abundância relativa de Verrucomicrobiota e Patescibacteria. Filos menores, como Deferribacterota, também aumentaram neste grupo em comparação com o controle, indicando uma mudança significativa na composição microbiana após a exposição ao antibiótico. O grupo tratado com a levedura exibiu composição diferente tanto de CG, quanto de GD. A administração de *P. kluyveri* levou a um aumento pronunciado de Verrucomicrobiota, Pseudomonadota e Bacteroidota, e uma diminuição drástica de Bacillota, dominante nos outros grupos.

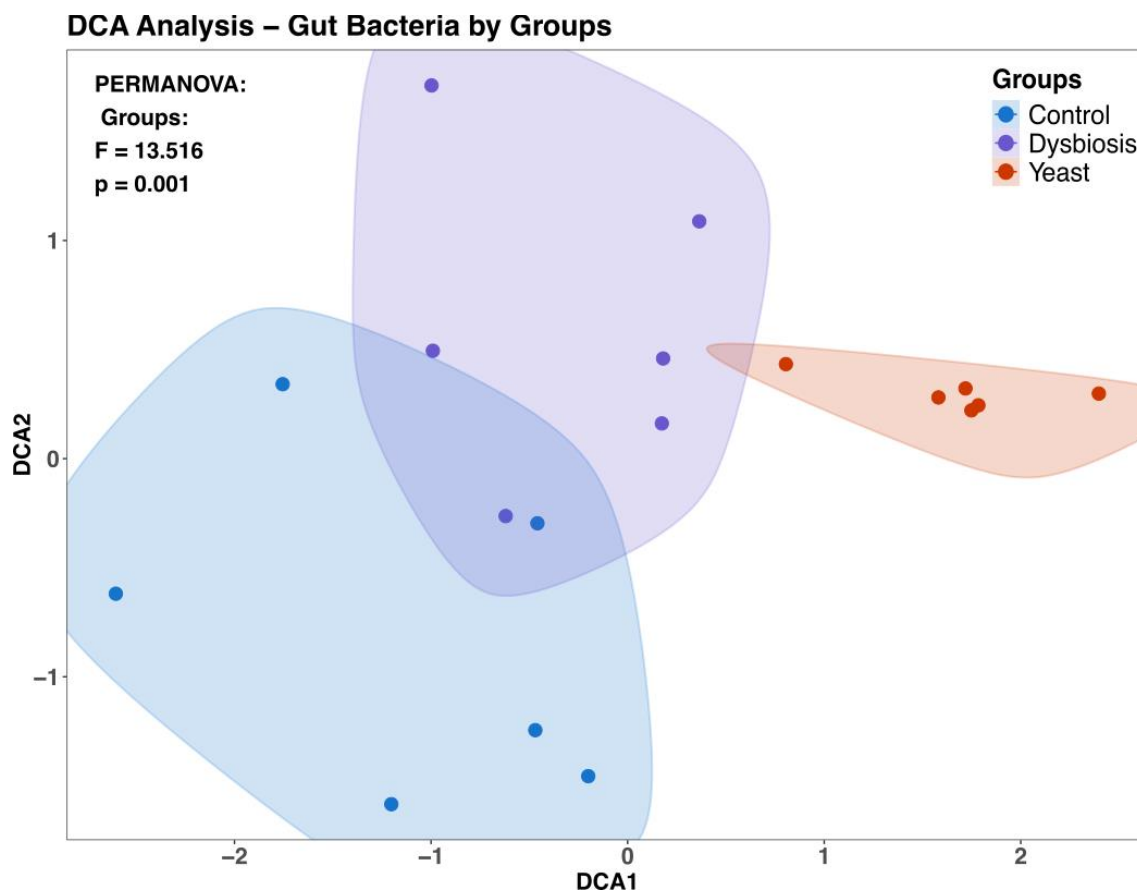
Figura 3 - Abundância relativa de filos microbianos em todos os grupos de tratamento.



O gráfico de barras representa a abundância relativa de filos microbianos em amostras agrupadas por condições de tratamento: Controle, Disbiose e Levedura. Cada barra corresponde a uma amostra, e as cores indicam diferentes filos microbianos, conforme mostrado na legenda.

A análise de correspondência destendenciada (DCA) revelou um agrupamento distinto de comunidades bacterianas intestinais entre os grupos (Figura 4). Controle e disbiose exibiram distribuições sobrepostas, mas separadas, enquanto o grupo tratado com levedura formou um cluster distinto, indicando uma mudança notável na composição microbiana.

Figura 4 - Análise de Correspondência Destendenciada (DCA) de comunidades bacterianas intestinais em grupos tratados e de controle.



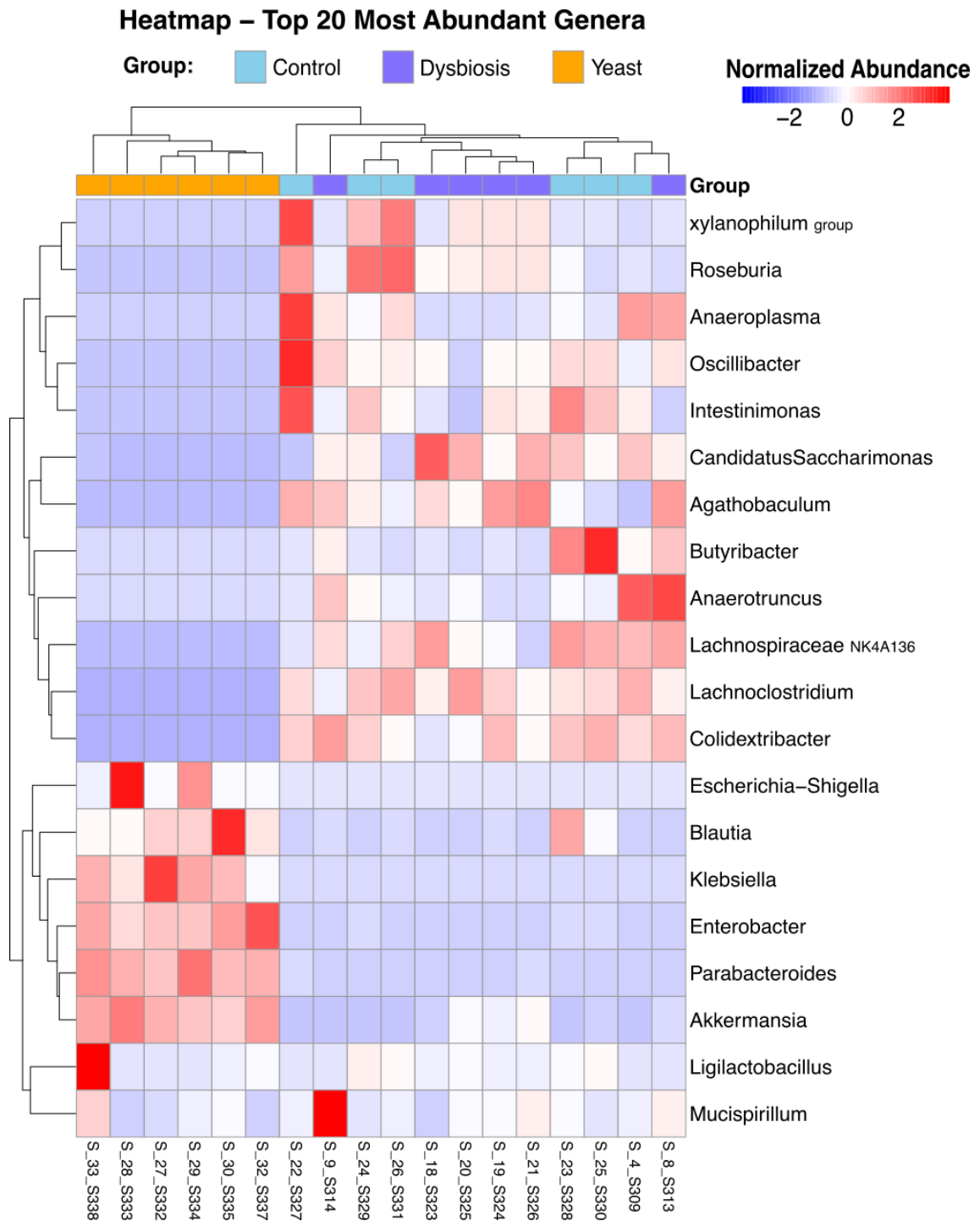
O gráfico mostra a separação de comunidades bacterianas com base em tratamentos experimentais: Controle, Disbiose e Levedura. Cada ponto representa uma amostra, com cores indicando grupos de tratamento. Elipses de confiança destacam o agrupamento de amostras dentro de cada grupo. Os resultados da PERMANOVA ($F = 13,516$, $p = 0,001$) indicam diferenças significativas na composição microbiana entre os grupos.

O teste PERMANOVA confirmou diferenças significativas na estrutura da comunidade microbiana entre os grupos ($F = 13,516$, $p = 0,001$). O grupo controle apresentou maior dispersão, sugerindo uma comunidade microbiana mais diversificada, enquanto o grupo disbiose foi mais compacto, refletindo a diversidade reduzida após o tratamento com antibióticos. O grupo tratado com levedura foi distinto dos outros grupos, sugerindo que a levedura com atributos probióticos induziu uma composição microbiana única.

A análise do mapa de calor dos 20 gêneros bacterianos mais abundantes revelou diferenças distintas na composição microbiana entre os grupos (Figura 5). O agrupamento hierárquico aplicado a amostras e gêneros destaca padrões de abundância microbiana. O gradiente de cores varia de azul (baixa abundância) a vermelho (alta abundância), com

agrupamento aplicado a linhas e colunas para destacar semelhanças na composição microbiana. As amostras do grupo de leveduras exibiram um padrão de agrupamento distinto, com abundâncias relativas aumentadas de *Akkermansia*, *Blautia*, *Klebsiella* e *Parabacteroides* em comparação com os outros grupos. Em contraste, o grupo de disbiose mostrou um aumento acentuado em gêneros potencialmente patogênicos, como *Agathobaculum* e *Lachnoclostridium*, juntamente com uma redução geral em bactérias benéficas, como *Akkermansia*. Isso sugere que o tratamento com antibióticos levou a um estado disbiótico caracterizado por uma super-representação de bactérias potencialmente oportunistas. O grupo controle exibiu uma composição a nível de gênero relativamente semelhante à disbiose, com representação moderada de múltiplos gêneros, incluindo *Roseburia* e o grupo *xylanophilum*. O que indica que após 2 semanas da interrupção do tratamento com o antibiótico a microbiota tende a retornar às condições de normalidade.

Figura 5 - Mapa de calor dos 20 gêneros mais abundantes em todos os grupos de tratamento.

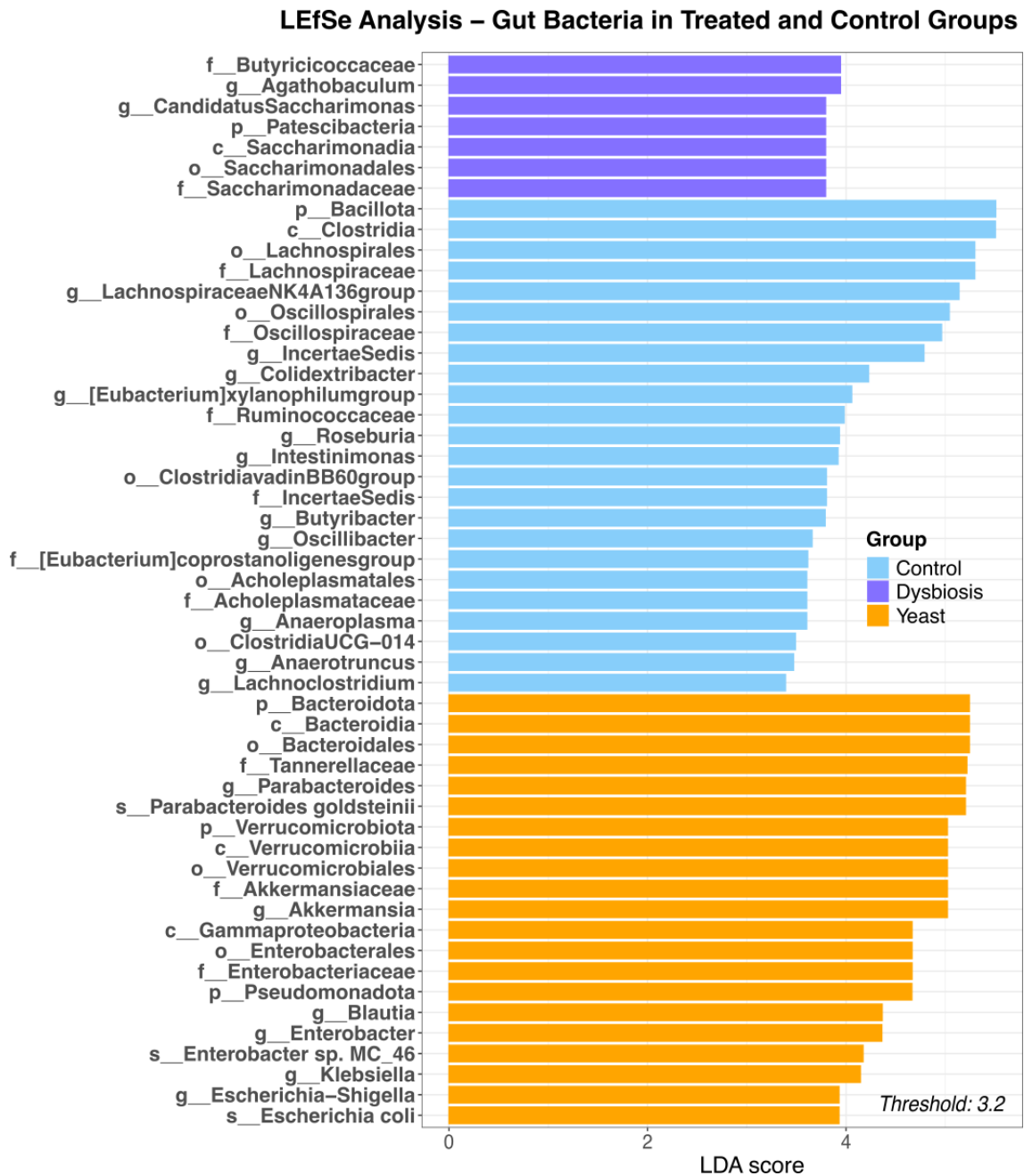


O mapa de calor ilustra a abundância relativa dos 20 gêneros bacterianos mais abundantes em amostras agrupadas por tratamento: Controle, Disbiose e Levedura. As linhas representam gêneros bacterianos e as colunas representam amostras individuais agrupadas por condição experimental. O gradiente de cores varia de azul (baixa abundância) a vermelho (alta abundância), com agrupamento aplicado a linhas e colunas para destacar similaridades na composição microbiana.

A análise de tamanho de efeito (LEfSe) da Análise Discriminante Linear (LDA) identificou táxons bacterianos que foram significativamente associados a cada grupo de tratamento: controle, disbiose e levedura (Figura 6). Os biomarcadores identificados foram filtrados para escores LDA acima do limite de 3.2, destacando táxons diferencialmente abundantes em cada grupo. O grupo controle foi caracterizado por um enriquecimento de Bacillota, particularmente Clostridia, com representantes notáveis, incluindo *Lachnospirales*, *Lachnospiraceae* e *Oscillospiraceae*. Gêneros como *Colidextribacter*, grupo [Eubacterium] *xylanophilum*, *Roseburia*, *Intestinimonas*, *Butyribacter* e *Oscillibacter* também foram significativamente associados ao grupo controle.

No grupo disbiose, os biomarcadores incluíram membros do filo Patescibacteria, particularmente *Candidatus Saccharimonas*, *Saccharimonadia*, *Saccharimonadales* e *Saccharimonadaceae*, sugerindo que o tratamento com vancomicina favoreceu esses táxons. Além disso, as famílias *Agathobaculum* e *Butyricicoccaceae* foram enriquecidas neste grupo.

Figura 6 - Análise LEfSe de taxa bacteriana intestinal em grupos tratados e de controle.



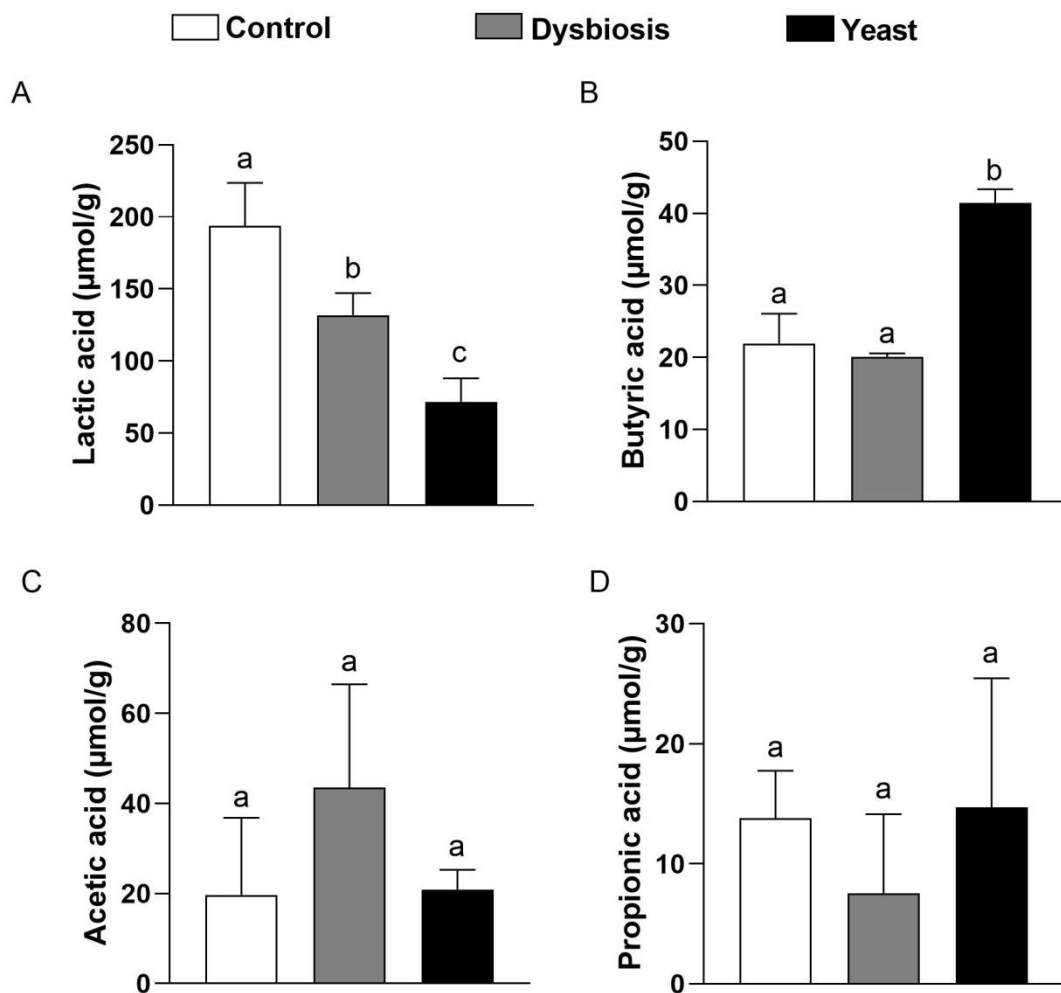
A figura mostra as pontuações da Análise Discriminante Linear (LDA) para taxa bacteriana significativamente associada a cada grupo de tratamento: Controle, Disbiose e Levedura. As barras representam taxa com uma pontuação LDA acima do limite de 3.2

O grupo tratado com levedura enriqueceu Bacteroidota e Verrucomicrobiota, aumentando notavelmente *Parabacteroides*, *Parabacteroides goldsteinii* e *Akkermansia*. Além disso, membros da classe *Gammaproteobacteria*, incluindo *Enterobacterales*, *Enterobacteriaceae* e os gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia-Shigella*, foram significativamente associados a este grupo.

3.4 Quantificação de ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta

A quantificação dos ácidos láctico, butírico, acético e propiônico são apresentados na Figura 7. Em resumo, observou-se que o grupo GC apresentou a maior (0.1028 ± 0.02 , $p = 0.0001$) quantidade de ácido láctico quando comparado com os grupos DG (0.0771 ± 0.01) e YG (0.0420 ± 0.01). Em relação ao ácido butírico, o grupo YG foi o que apresentou as maiores concentrações (41.46 ± 1.87 , $p = 0.0001$). No que se refere aos ácidos acético e propiônico, ambos não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

Figura 7 - Quantificação de ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta.

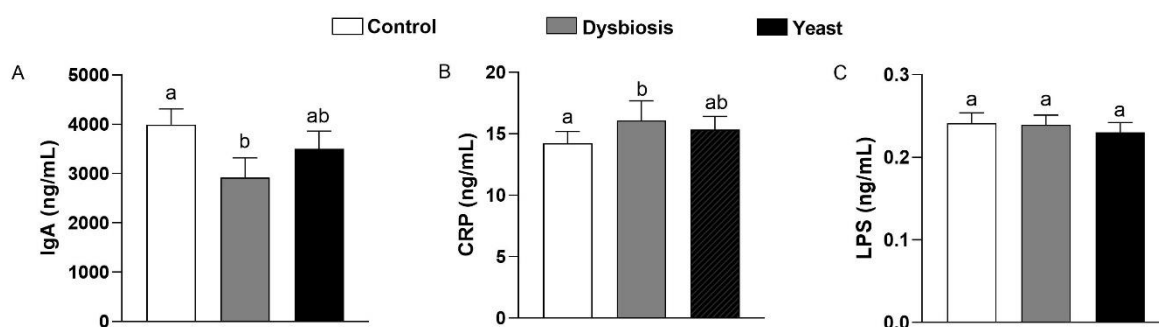


Diferentes letras minúsculas denotam diferença ($p < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Tukey. A - ácido láctico; B - ácido butírico; C - ácido acético; D - ácido propiônico.

3.5 Quantificação de IgA, CRP e LPS

Os níveis de imunoglobulina A (IgA), proteína C reativa (CRP) e lipopolissacarídeos (LPS) são apresentados na Figura 8. Em resumo, observou-se que o uso da vancomicina resultou em maiores níveis de CRP (16.08 ± 1.59 , $p = 0.0406$) e menores níveis de IgA (2769 ± 1098 , $p = 0.0141$). No entanto, o grupo YG apresentou valores semelhantes ao controle tanto para IgA quanto para CRP. LPS não apresentou variação.

Figura 8 – Quantificação de IgA, CRP e LPS.

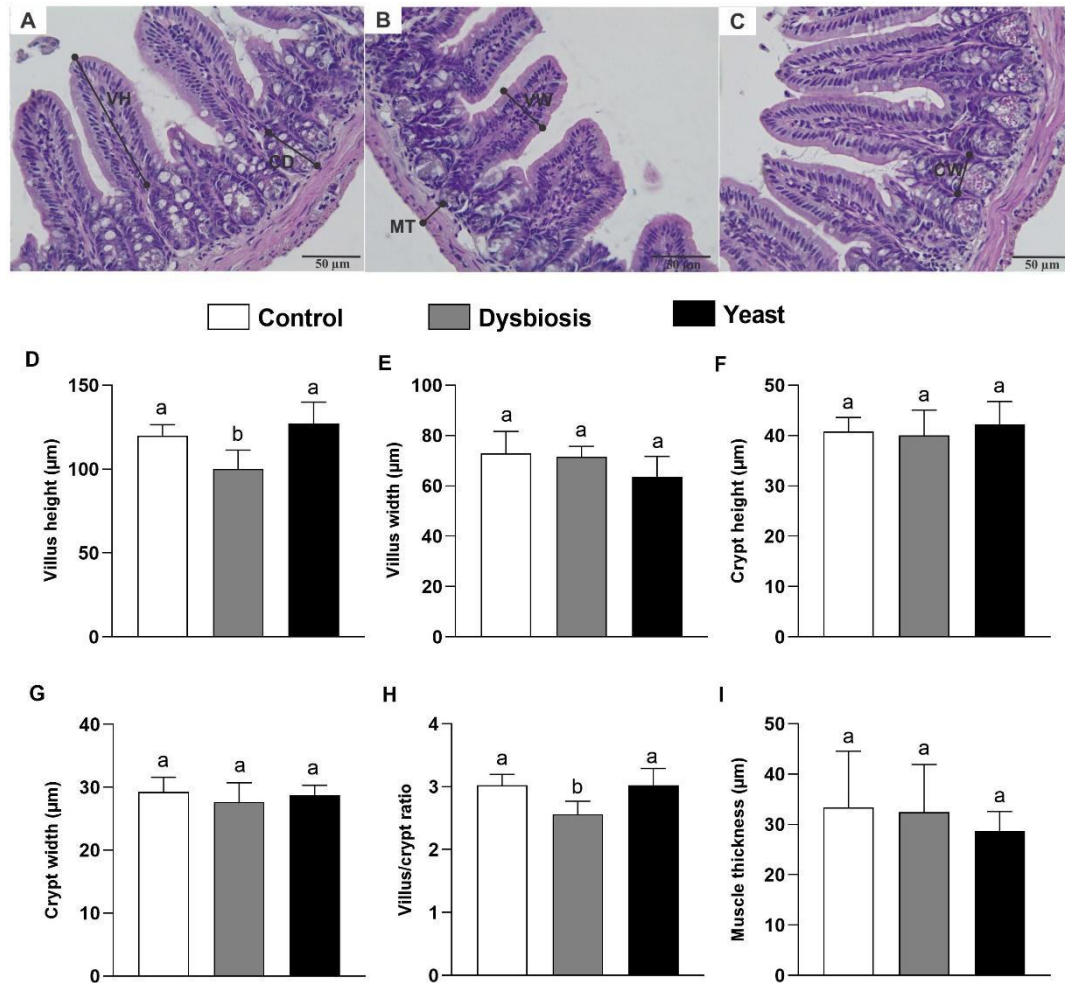


Diferentes letras minúsculas denotam diferença ($p < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Tukey. A - quantificação de IgA; B - quantificação de CRP; C - quantificação de LPS.

3.6 Alterações histológicas após exposição ao antibiótico

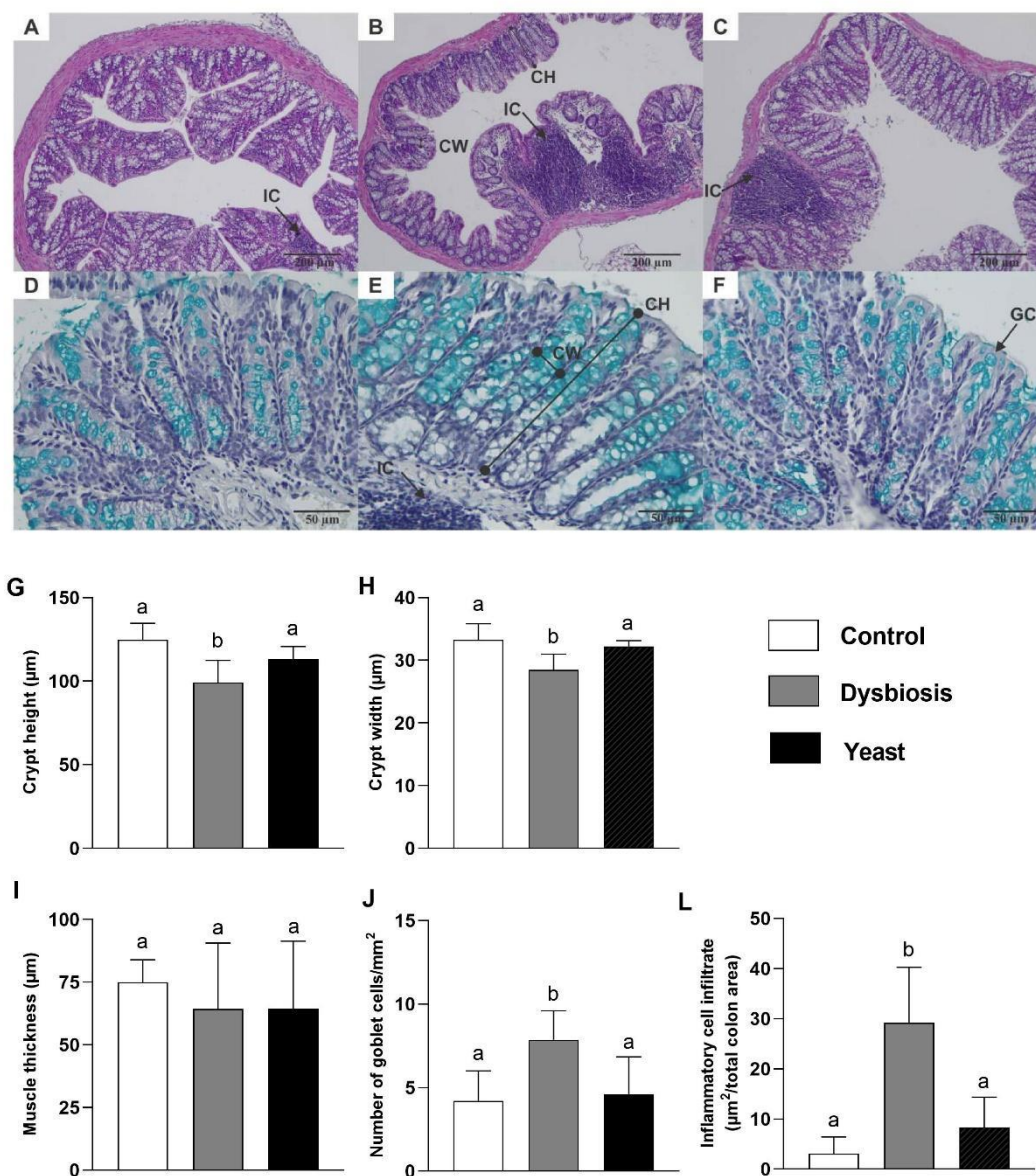
As avaliações morfofuncionais do íleo e cólon são apresentadas nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Os parâmetros avaliados para o íleo foram altura e diâmetro da vilosidade e da cripta e espessura da musculatura lisa. Além disso, foi calculada a relação vilosidade/cripta. O uso da vancomicina ocasionou a diminuição do tamanho das vilosidades do íleo (100.1 ± 11.29 , $p = 0.0011$) (Fig 9 A e D). Apesar da altura e diâmetro da cripta não apresentarem variação entre os grupos, a relação vilosidade/cripta evidenciou menores valores para DG (2.56 ± 0.20 , $p = 0.0069$). A espessura da musculatura circular do íleo também não apresentou variação entre os grupos. Já os parâmetros avaliados para o cólon foram altura e diâmetro da cripta, altura do músculo, número de células caliciformes e área de infiltrado linfóide. Altura (99.13 ± 13.34 , $p = 0.0006$) e diâmetro (28.44 ± 2.54 , $p = 0.0010$) da cripta apresentaram redução com a administração de vancomicina. Além disso, também foi observado aumento no número de células caliciformes (7.87 ± 1.73 , $p = 0.0088$) e aumento da área do infiltrado linfóide (29.23 ± 24.71 , $p = 0.0191$) para o grupo GD. No entanto, a levedura foi capaz de restaurar o tecido às condições normais encontradas no controle, regulando o número de células caliciformes e reduzindo a área do infiltrado linfóide.

Figura 9 – Avaliação de lesões físicas no epitélio intestinal (íleo).



Diferentes letras minúsculas denotam diferença ($p < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Tukey. A - controle; B - disbiose; C - tratado com levedura.

Figura 10 – Avaliação de lesões físicas no epitélio intestinal (cólon), área de infiltrado linfóide e quantificação de células caliciformes.

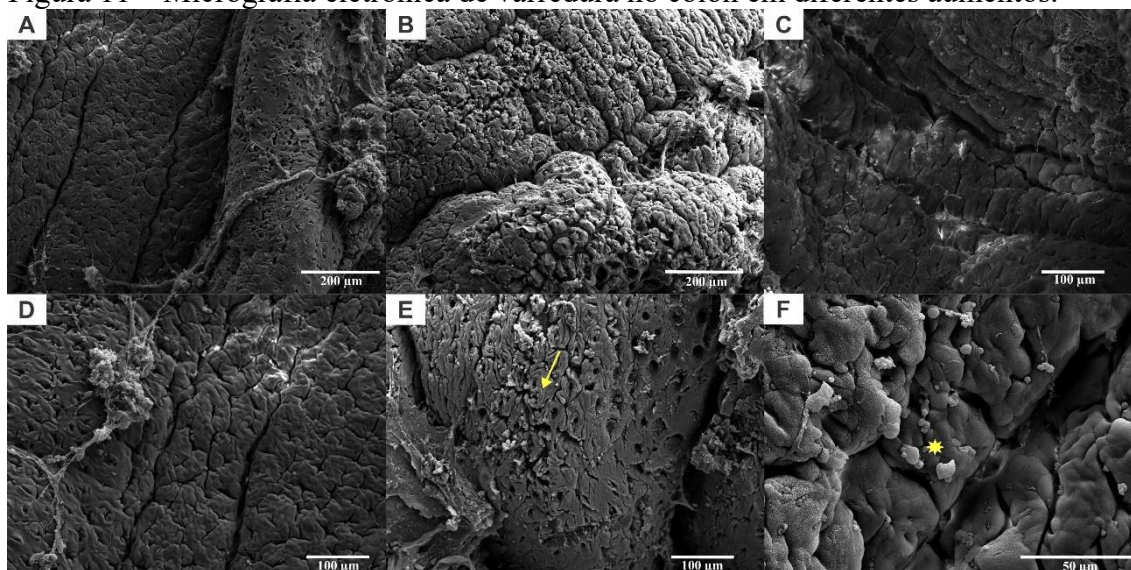


Diferentes letras minúsculas denotam diferença ($p < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Tukey. A - controle; B - disbiose; C - tratado com levedura.

Além das imagens histológicas convencionais, também foram realizadas micrografias eletrônicas de varredura para observações ultraestruturais da superfície do epitélio do cólon (Figura 11). No grupo CG é possível identificar um epitélio preservado, com integridade estrutural e morfologia intacta, sem sinais de alterações (Fig 11 A e D). Enquanto o grupo DG, observa-se desorganização da superfície do epitélio, caracterizada pela irregularidade do tecido

destacados pelas setas (Fig 11 B e E). Já para o grupo YG, verifica-se o restabelecimento da organização epitelial, com a estrutura da superfície retornando a um padrão semelhante ao do grupo controle (Fig 11 C e F). Além disso, a adesão de células de levedura ao epitélio é visível, destacada pelo asterisco, indicando uma possível interação direta e potencialmente benéfica com o tecido colônico.

Figura 11 – Micrografia eletrônica de varredura no cólon em diferentes aumentos.



A e D: grupo controle; B e E: grupo disbiose; C e F: grupo levedura.

4 Discussão

O uso de antibióticos por um longo período pode causar desequilíbrio na microbiota intestinal levando a disbiose e resultar em condições patológicas (Cui et al., 2020; Overeem; Van Soest; Blankenstein, 2008) como doença inflamatória intestinal, obesidade, resistência à insulina e distúrbios alérgicos (Munyaka; Khafipour; Ghia, 2014; Pascal et al., 2018). Os probióticos apresentam-se como uma estratégia não farmacológica para tratamento de disfunções da microbiota intestinal, podendo substituir a terapia com antibióticos e ainda tratar os seus efeitos deletérios (Łukasik et al., 2024). Os probióticos conseguem modular a microbiota, melhoram a integridade da barreira intestinal e estimulam positivamente a imunidade intestinal e sistêmica (Wang et al., 2021). O presente trabalho teve como objetivo tratar disbiose induzida por vancomicina utilizando a nova cepa com atributos probióticos, *P. kluyveri* CCMA 0615, na sua forma microencapsulada. A escolha da vancomicina foi baseada no seu modo de ação. Este antibiótico inibe a síntese da parede celular de bactérias Gram-positivas (Chang et al., 2017), levando assim ao choque osmótico e à lise celular desses

microrganismos (Dinu et al., 2020). A redução da população de Gram-positivos favorece ao desbalanço da microbiota, com o aumento de bactérias Gram-negativas, o que predispõe o aparecimento de microrganismos patogênicos, caracterizando a disbiose e tornando o ambiente intestinal mais imunogênico, devido à alta carga de lipopolissacarídeo (Brenchley e Serrano-Villar, 2024).

Como esperado, no presente estudo, observou-se um aumento significativo da população de enterobactérias com a administração da vancomicina por duas semanas, confirmando a indução de disbiose pelo modelo. Estudos mostram que o uso da vancomicina pode alterar a composição da microbiota intestinal, alterando sua funcionalidade e aumentando o risco do aparecimento de microrganismos potencialmente patogênicos, resultando em disbiose (Brenchley e Serrano-Villar, 2024). Portanto, tendo em vista os indícios da indução da disbiose, investigou-se a repercussão dessa condição sobre a saúde intestinal e geral destes animais e a capacidade da levedura *P. kluyveri* CCMA 0615 em tratar/atenuar estes efeitos deletérios.

Em relação aos parâmetros fisiológicos do animal, observou-se que a vancomicina aumentou o peso do baço, a contagem de leucócitos totais e linfócitos. É possível que estas alterações possam estar relacionadas a respostas imunológicas promovidas pela alteração da microbiota intestinal. Já a redução do peso do rim está possivelmente relacionada à nefrotoxicidade da vancomicina, efeito já conhecido e demonstrado em diferentes estudos (Finch et al., 2017; Pais et al., 2020).

O baço é um órgão linfoide secundário e responde à presença de antígenos na circulação sanguínea, promovendo a ativação e expansão clonal de linfócitos. Esse processo ocorre por meio de um aumento na população de células reticuloendoteliais dentro do baço e, como resultado, a atividade imunológica aumentada pode estar associada ao aumento do volume do órgão (Suttorp e Classen, 2021). Além do efeito sobre o baço, o aumento na contagem de leucócitos totais e linfócitos, reforçam a existência de uma resposta imunológica à disbiose. Diferentes subconjuntos e funções de células imunes podem ser alterados pela disbiose intestinal induzida por antibióticos (Sato et al., 2016). A perturbação da microbiota causada pelo fármaco, afeta a produção de compostos bioativos pela microbiota e maior presença de moléculas imunogênicas, o que leva a alteração do microambiente de citocinas no intestino e consequentemente impacta no sistema imune local e sistêmico (Scott et al., 2018). De maneira interessante, a utilização da levedura com propriedades probióticas levou a normalização, com retorno do baço e linfócitos a condição basal. Este efeito pode estar associado a modulação da microbiota pós disbiose e por mecanismos de interação direta com o epitélio intestinal.

Outra evidência interessante do efeito da levedura foi observada no ensaio de tolerância à glicose. Este teste é uma ferramenta de diagnóstico utilizada para avaliar a capacidade do corpo de metabolizar glicose, indicando a sensibilidade do indivíduo a insulina, auxiliando assim no diagnóstico de condições como diabetes (Jagannathan et al., 2020). No presente estudo, a administração da levedura *P. kluyveri* levou a uma melhora da sensibilidade à insulina no animal, visto a redução do índice glicêmico ao longo do tempo. Este resultado aponta para a capacidade antiglicemiante e antidiabética da levedura. O mecanismo associado possivelmente envolve a modulação da microbiota com presença de grupos microbianos que promovem a regulação do metabolismo energético, tais como o gênero *Akkermansia*. Estudos realizados por Yoon et al., (2021), mostraram que *A. muciniphila* aumenta a secreção de GLP-1 em camundongos, o que é crucial para a regulação do metabolismo da glicose, pois o GLP-1 melhora a captação de glicose pelas células e reduz a secreção de glucagon. Os autores também observaram que os camundongos alimentados com dieta rica em gordura que foram tratados com *A. muciniphila* apresentaram uma tolerância à glicose significativamente melhorada. Em outro estudo conduzido por Zhang et al., (2021a), os autores observaram que uma menor abundância de *A. muciniphila* estava associada ao aumento da resistência à insulina e ao comprometimento do metabolismo da glicose.

Os resultados observados sobre os parâmetros fisiológicos e imunológicos indicam a presença da disbiose causada pela vancomicina e algum efeito modulador da levedura. Portanto, para elucidar os impactos sobre a microbiota intestinal investigou-se por meio da análise de microbioma do conteúdo cecal o perfil microbiano para os diferentes tratamentos. Como mencionado anteriormente, a vancomicina altera a microbiota intestinal e favorece o crescimento de Gram-negativos, o que inclui muitos patógenos oportunistas (Dinu et al., 2020). A análise de microbioma mostrou que o grupo disbiose apresentou maior abundância de gêneros potencialmente patogênicos, como *Agathobaculum* e *Lachnoclostridium*, juntamente com uma redução geral em microrganismos benéficos do filo Bacteroidota e do gênero *Akkermansia*. Além desses grupos, também foi confirmada a presença de *Candidatus saccharimonas*, caracterizando o grupo disbiose. *C. saccharimonas* está frequentemente aumentado em condições inflamatórias intestinais, como doença de Crohn e colite ulcerativa, sugerindo ser um marcador importante da condição de disbiose (Cruz et al., 2020). Algumas pesquisas apontam um aumento de *C. saccharimonas* em indivíduos com obesidade e diabetes tipo 2, o que pode indicar um envolvimento na regulação do metabolismo energético e inflamação de baixo grau associada a essas doenças (Ouyang et al., 2024; Ye et al., 2024). Em relação ao grupo tratado com a levedura, apresentou maiores abundâncias dos grupos

Verrucomicrobiota, Pseudomonadota e Bacteroidota, caracterizado pelo aumento de microrganismos do gênero *Blautia*, *Akkermansia* e por *Parabacteroides goldsteinii*. *P. goldsteinii* é uma espécie de bactéria Gram-negativa que pertence ao filo Bacteroidota. Essa bactéria comensal é encontrada principalmente no trato gastrointestinal de mamíferos, incluindo seres humanos, e desempenha um papel importante na saúde digestiva (Lai et al., 2022). Estudos mostram que a associação negativa de *P. goldsteinii* com índices de obesidade e inflamação, como níveis elevados de glicose e TNF- α , sugere-se que essa bactéria pode ser um regulador chave da homeostase metabólica e inflamatória no organismo. Além disso, sua capacidade de reduzir a inflamação hepática e melhorar a permeabilidade intestinal em modelos animais reforça seu potencial terapêutico (Cui et al., 2022; Lai et al., 2022).

No que se refere aos microrganismos dos gêneros *Blautia* e *Akkermansia*, os efeitos benéficos são dependentes das espécies (Chanda; Jiang; Liu, 2024; Yang et al., 2020b). *A. muciniphila* é uma bactéria degradadora de mucina e a principal representante do filo Verrucomicrobiota. Ela reside na camada de muco do intestino grosso, onde está envolvida na manutenção da integridade intestinal (Karcher et al., 2021) através da restauração da espessura da camada de muco, proteínas “tight junction” e produção de antimicrobianos e bioativos específicos com propriedades anti-inflamatórias (Ioannou et al., 2025; Plovier et al., 2017). Estudos mostram que a abundância *Akkermansia* no trato intestinal é inversamente correlacionada a vários estados de doença, ou seja, organismos que apresentam algum tipo de doença ou patologia intestinal podem exibir populações menores de microrganismos desse gênero (Geerlings et al., 2018; He et al., 2024).

Blautia é um gênero de bactérias anaeróbicas, pertencente ao filo Bacillota, que habitam naturalmente a microbiota intestinal humana. Estudos recentes, embora ainda um pouco controversos, destacam seu potencial benéfico (Chanda; Jiang; Liu, 2024; Sakaguchi et al., 2024). Os estudos sugerem que as espécies do gênero *Blautia* possuem potencial probiótico devido à sua capacidade de produzir bacteriocinas, que inibem bactérias patogênicas, e seu papel na saúde metabólica, incluindo associações com redução do acúmulo de gordura visceral (Liu et al., 2021b). A pesquisa realizada por Holmberg et al., (2024), demonstrou que *Blautia coccoides* ajuda a manter a função do muco colônico em dietas com baixo teor de fibras, secretando ácidos graxos de cadeia curta, que estimulam o crescimento do muco e melhoram a integridade da barreira intestinal. Em outro estudo conduzido por Shibata et al., (2023), os resultados mostram que a administração de *B. hansenii* reduziu o acúmulo de gordura visceral e melhorou a homeostase da glicose, sugerindo seu papel potencial no combate à obesidade.

A presença de enterobactérias como *Escherichia coli* e gêneros como *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia-Shigella*, ainda são visíveis no microbioma do grupo tratado com a levedura, indicando possível resquício do perfil Gram-negativo da disbiose que ainda está no processo para ser completamente resolvida. *E. coli* e outros membros do gênero *Klebsiella*, apesar de serem reconhecidas por suas cepas patogênicas, são considerados microrganismos comensais e comumente presentes na microbiota intestinal humana (Da Silva et al., 2023; Hudson et al., 2022). Além disso, algumas cepas de *E. coli* podem exibir propriedades benéficas. A pesquisa realizada por Chen et al., (2023), mostrou o papel da *E. coli* comensal na promoção da recuperação das células epiteliais do cólon. O estudo descobriu que os efeitos benéficos estão relacionados à ativação do receptor de peptídeo formil 2 (Fpr2) nas células epiteliais, sugerindo um mecanismo pelo qual a *E. coli* comensal contribui para a saúde intestinal. Em outro estudo realizado por Da Silva et al., (2023), os pesquisadores conduziram uma análise detalhada da cepa comensal de *E. coli* CEC15, avaliando seu potencial como probiótico. O estudo destacou a capacidade da CEC15 de modular a microbiota intestinal, fornecer efeitos protetores e anti-inflamatórios e reforçar a barreira intestinal. Essas descobertas sugerem que a CEC15 pode ser eficaz contra condições como a mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil.

No que se refere ao filo Bacteroidota, anteriormente conhecido como Bacteroidetes (Oren, 2024), este filo compreende uma porção significativa da microbiota intestinal tanto em humanos quanto em camundongos. Essas bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos e anaeróbicas, desempenham papéis cruciais no metabolismo de fibras, na produção de metabólitos benéficos e na regulação da resposta imunológica (Tufail e Schmitz, 2024). Estudos laboratoriais revelaram que algumas cepas do gênero *Bacteroides*, como por exemplo *B. caccae*, *B. intestinalis* e *B. fragilis*, possuem propriedades anti-inflamatórias e na manutenção da barreira epitelial (Hiippala et al., 2020; Li et al., 2023). Esses resultados provam que o tratamento com antibióticos perturba a estrutura da comunidade microbiana, reduzindo a diversidade e favorecendo táxons reconhecidamente associados a condições patológicas. A introdução da levedura com atributos probióticos parece mitigar algumas dessas mudanças, promovendo a recuperação de grupos microbianos importantes, além de promover o crescimento de outros grupos benéficos que não estão presentes no tratamento controle, demonstrando um perfil microbiano único.

Em síntese, a levedura demonstrou ser capaz de influenciar positivamente a microbiota intestinal, o que pode ter repercussões também sobre o sistema imunológico e na estrutura física do epitélio intestinal. Tendo em vista o impacto da levedura sobre a composição da microbiota,

investigou-se os ácidos graxos produzidos pela microbiota e os impactos sobre o sistema imune e epitélio intestinal.

Em relação aos ácidos orgânicos presentes nas fezes, o ácido láctico encontrado em cada grupo experimental está de acordo com as proporções de microrganismos do filo Bacillota, uma vez que CG foi o grupo que apresentou as maiores abundâncias, enquanto o grupo YG demonstrou redução drástica na abundância desse filo. O filo Bacillota inclui a ordem Lactobacillales, comumente referida como bactérias do ácido láctico (LAB), que abrange gêneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Pediococcus*. Esses gêneros de LAB são caracterizados por seu metabolismo fermentativo, convertendo açúcares principalmente em ácido láctico (Tang; Huang; Yao, 2023). Portanto, a menor concentração de ácido láctico no tratamento com a levedura vai de encontro a menor abundância do filo Bacillota.

Já para o ácido butírico, as maiores concentrações foram observadas para o grupo YG podem estar relacionadas ao aumento da abundância de microrganismos dos gêneros *Blautia* e *Akkermansia*. Algumas espécies de *Blautia*, como *B. hansenii* e *B. producta*, são conhecidas por produzirem ácido butírico (Mao et al., 2023; Ozato et al., 2022). Estudos realizados por Sanna et al., (2019), relataram que o ácido butírico produzido por microrganismos intestinais como *A. muciniphila* poderia promover células β para secretar insulina e então regular a glicose no sangue. O ácido butírico é um ácido graxo de cadeia curta (SCFA) produzido principalmente no cólon por meio da fermentação de fibras alimentares pela microbiota intestinal, que desempenha um papel crucial na manutenção da saúde gastrointestinal e tem sido associado a vários benefícios sistêmicos (Jackson et al., 2024). Seus efeitos benéficos abrangem desde a restauração e manutenção da integridade da mucosa intestinal até a modulação de processos inflamatórios, promovendo uma resposta anti-inflamatória que pode prevenir doenças inflamatórias intestinais e câncer. Além de servir como fonte de energia para as células epiteliais intestinais, o butirato influencia a regulação da apoptose, facilitando a eliminação de células danificadas ou anormais (Chen e Vitetta, 2020; Maiuolo et al., 2024; Sun et al., 2024; Xu et al., 2017).

As mudanças na composição da microbiota promovida pela levedura *P. kluyveri* com aumento dos grupos *Blautia*, *Akkermansia* e *Parabacteroides*, com destaque para *P. goldsteinii*, juntamente ao aumento da produção de butirato podem explicar a melhora na sensibilidade à insulina visto pela redução dos índices glicêmico após a administração da glicose intraperitoneal. Estes achados em conjunto apontam para um potencial desta levedura em aplicações terapêuticas que visam a prevenção e tratamento de distúrbios metabólicos, como a obesidade e diabetes.

No que diz respeito a variáveis imunológicas, verificou-se que a disbiose induzida pelo antibiótico levou a redução da IgA secretória presente no lavado intestinal e aumento dos níveis da CRP no sangue. Ambos são componentes essenciais do sistema imunológico, cada um desempenhando papéis distintos. IgA é crucial para a imunidade da mucosa intestinal e neutralização de patógenos (Ding et al., 2022), enquanto CRP é um participante-chave na resposta de fase aguda à inflamação, atuando como um biomarcador e mediador de respostas imunológicas. Ambas as moléculas estão envolvidas em interações complexas que contribuem para os mecanismos de defesa do corpo contra infecções e condições inflamatórias (Zhou et al., 2024). O aumento nos níveis de CRP observados neste trabalho podem ser correlacionados ao crescimento abundante de enterobactérias durante o tratamento com vancomicina. Este desequilíbrio na microbiota pode ter resultado em um estado pró-inflamatório no intestino ocasionando elevados níveis de CRP circulatórios (Liu et al., 2020).

Ao induzir uma disbiose intestinal é esperado que os níveis de IgA aumentem para combater a ameaça, no entanto o grupo DG apresentou redução na secreção dessa imunoglobulina no lúmen intestinal. Estudos realizados por Ray et al., (2021), também verificaram baixos níveis de IgA ao administrar vancomicina em modelo animal. A utilização da vancomicina, um antibiótico de amplo espectro, leva a redução crítica da diversidade bacteriana, especialmente eliminando bactérias Gram-positivas, como algumas espécies-chaves do filo Bacteroidota (Taitz et al., 2025). O que compromete a defesa da mucosa intestinal e torna o intestino mais suscetível a infecções. Espécies de *Bacteroides* são importantes para a modulação do sistema imunológico levando à indução da secreção de IgA (Rajput et al., 2023). O estímulo à secreção de IgA intestinal se dá por meio de interações específicas com o sistema imunológico da mucosa. Espécies como *Bacteroides fragilis* produzem polissacarídeo capsular A (PSA), que interage com receptores do tipo Toll (TLR2) em células dendríticas. Essa interação promove a ativação de células T reguladoras, levando à produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10), e à mudança de isotipo de linfócitos B em células produtoras de IgA (Tufail e Schmitz, 2024). A IgA secretora desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase intestinal, revestindo microrganismos comensais e impedindo a colonização por patógenos (Yang et al., 2020a).

Os animais tratados com a levedura apresentaram perfis de IgA e CRP semelhantes ao controle. O uso de microrganismos probióticos pode contribuir para modulação do sistema imune, promovendo a mudança do microambiente de citocinas, a diferenciação de células TCD4⁺ para perfil Treg em detrimento de respostas Th1, Th2 e Th17 (Cristofori et al., 2021; Liu et al., 2022; Yousefi et al., 2019). Pesquisas realizadas por Okada et al., (2021),

investigaram os efeitos da levedura probiótica *Zygosaccharomyces sapae* cepa I-6 sobre as mudanças fenotípicas em células dendríticas intestinais e seu potencial anti-inflamatório em modelos de colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS). Os resultados mostraram que a levedura apresentou um potencial significativo na modulação da resposta imunológica e na redução da inflamação intestinal. A cepa I-6 induziu uma produção elevada de interleucina-10 (IL-10) em células dendríticas, mediada por receptores TLR2 e Dectin-1, e apresentou notáveis efeitos anti-inflamatórios em um modelo de colite induzida por DSS, evidenciados pela diminuição dos sintomas inflamatórios e alterações morfofuncionais do intestino.

A disbiose intestinal é frequentemente associada a alterações morfofuncionais do epitélio intestinal, impactando diretamente a permeabilidade da barreira epitelial e desencadeando respostas inflamatórias (Zhao et al., 2023). Diversas alterações foram observadas nas análises histológicas para GD, como redução da altura das vilosidades para o íleo, redução da altura e do diâmetro da cripta, aumento de células caliciformes e infiltrados linfóides no cólon. Estudos realizados por Zhang et al., (2021b), investigaram o impacto da disbiose induzida por antibióticos na microbiota intestinal de camundongos adultos e sua relação com alergias alimentares. O estudo descobriu que a disbiose causava danos na barreira intestinal, caracterizados por atrofia das vilosidades, erosão da mucosa e infiltração de células inflamatórias. Além disso, houve uma redução significativa nas proteínas de junção estreita, incluindo ZO-1, claudina-1 e ocludina, juntamente com a secreção diminuída de IgA secretora (sIgA). Essas alterações aumentaram a permeabilidade intestinal e a suscetibilidade a moléculas imunogênicas.

O aumento no número de células caliciformes (goblet cells) pode estar intimamente relacionado com o crescimento favorecido de grupos potencialmente patogênicos após o uso da vancomicina, uma vez que são células produtoras de muco que auxiliam na proteção do epitélio intestinal. Muc2, o principal componente estrutural da barreira de muco do epitélio intestinal, é fortemente glicosilado com açúcares que se ligam aos microrganismos, impedindo a interação direta com as células epiteliais do hospedeiro (Lock et al., 2020). Acredita-se também que a expressão e ativação de certos receptores Toll Like nos enterócitos, envolvidos na inflamação (como o TLR4, fortemente associado a respostas pró-inflamatórias) influencie a diferenciação celular e promova o aumento e leve a alterações no número de células caliciformes no cólon (Dheer et al., 2016). Na maioria das infecções intestinais, a indução de células caliciformes e a síntese e secreção de mucina ocorrem frequentemente durante a fase aguda (Kim e Khan, 2013). Enquanto, na infecção crônica resulta na depleção de células caliciformes e alteração quantitativa e qualitativa nas camadas de muco, como frequentemente observado em doenças

inflamatórias intestinais devido à síntese e secreção alteradas de mucinas, e às glicosidases e proteases microbianas (Grondin et al., 2020). No presente estudo, o aumento das células caliciformes em GD, indica a condição aguda do processo inflamatório local, confirmado pela maior área de infiltrado, induzido pela microbiota disbiótica.

De maneira interessante, e seguindo os achados anteriores, todos os parâmetros morfológicos do íleo e cólon foram restabelecidos evidenciando a capacidade da *P. kluyveri* CCMA 0615 de promover a recuperação da mucosa intestinal, retornando as variáveis a valores semelhantes ao controle, ou seja, restabelecendo a homeostase do epitélio intestinal. A presença de probióticos pode ter efeito trófico no intestino, dessa forma, esses microrganismos podem melhorar a taxa de proliferação de enterócitos, levando a reconstituição das estruturas afetadas e consequentemente ao fortalecimento da barreira intestinal (Matei-Lațiu et al., 2023). Leveduras probióticas, através da modulação da microbiota, favorecem o crescimento de bactérias que fermentam fibras alimentares no intestino, levando à produção de SCFAs benéficos como butirato, acetato e propionato que servem como fonte de energia para as células intestinais, promovendo a saúde do revestimento intestinal e a absorção de nutrientes (Browne e Horgan, 2024; Den Besten et al., 2013; Li et al., 2023; Tan; Macia; Mackay, 2023). Estudos mostram que vesículas extracelulares derivadas de *A. muciniphila* contendo diversos bioativos e moléculas LPS modificadas interagem diretamente com as células epiteliais intestinais por meio da interação com receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), Toll-like (TLRs) e receptores nucleares NOD (NLRs). Estes compostos ativam vias intracelulares no enterócitos que envolvem principalmente MyD88, NF- κ B e MAPKs, que culminam na produção de citocinas que regulam a resposta inflamatória local e estimulando a expressão de proteínas que compõem as junções estreitas, como a ocludina e a claudina reforçando a barreira epitelial, diminuindo a sua permeabilidade (Chelakkot et al., 2018; Díaz-Garrido et al., 2021; Melo-Marques et al., 2024). Estudos realizados por Lin et al., (2024), mostraram que *P. goldsteinii* produzem polissacarídeos zwitteriônicos (ZPS) e outra proteínas bioativas como β -N-acetil-hexosaminidase e proteína da membrana externa A1 (OmpA1). Estudos sugerem vários mecanismos possíveis, sejam eles diretos ou indiretos, pelos quais *P. kluyveri* exerce seus benefícios à saúde intestinal e geral. Uma característica fundamental de *P. kluyveri* é sua capacidade de produzir subprodutos de fermentação como acetato de isoamila, etanol e ácidos orgânicos. Esses compostos contribuem para diminuir o pH intestinal, criando um ambiente que promove o crescimento de bactérias benéficas tolerantes a ácidos como *Blautia* e *Parabacteroides* (Liu et al., 2018; Miguel et al., 2024). Pesquisas também mostraram que *P. kluyveri* é capaz de produzir galactooligossacarídeos (GOS) a partir da lactose, que servem

como nutrientes seletivos para microrganismos benéficos. Ao promover a proliferação de bactérias benéficas, os GOS ajudam a estabelecer condições favoráveis para sua colonização (Fai et al., 2014). Além disso, foi demonstrado que *P. kluyveri* ao interagir com macrófagos induz a expressão de TLR2, que é associado a um microambiente de citocinas anti-inflamatório. A condição de baixo grau de inflamação no intestino é uma condição essencial para a colonização e estabilidade de *Akkermansia*, conhecida por ser altamente sensível à condição inflamatória do hospedeiro (Xu et al., 2023). Algumas cepas de *P. kluyveri* produzem proteínas "killers" antimicrobianas capazes de inibir patógenos oportunistas (Labani et al., 2015). *C. albicans* é uma levedura patogênica oportunista que, embora normalmente resida como um comensal no corpo humano, pode causar infecções em condições específicas, especialmente de baixa imunidade (Wang; Wang; Tang, 2023), outro mecanismo importante associado a *P. kluyveri* é a capacidade de autoagregação e de co-agregação com patógenos, que pode proteger o epitélio e permitir a recuperação de grupos comensais ao evitar sua competição com patógenos intestinais (Yildiran; Başığit Kiliç; Karahan Çakmakçi, 2019). No trabalho de Menezes et al., (2020b), mostram que *P. kluyveri* CCMA 0615 possui capacidade de coagregação com o enteropatógeno *Escherichia coli* EPEC CDC 055. Em outro estudo, Menezes et al., (2020a) demonstrou em modelo *in vitro*, utilizando células intestinais Caco-2, que a levedura foi capaz de competir por sítios de adesão na superfície das células intestinais e reduzir a invasão dos patógenos *E. coli* EPEC CDC 055 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, demonstrando uma atividade protetora contra infecção/invasão de patógenos. Em resumo, este estudo demonstrou que a administração de *P. kluyveri* na forma microencapsulada foi uma abordagem probiótica eficaz para mitigar os efeitos adversos do uso prolongado de antibióticos. A microencapsulação por *spray drying* permitiu o desenvolvimento de um produto estável e tecnicamente viável para aplicações industriais, garantindo a sobrevivência da levedura durante o armazenamento, sua passagem pelo trato gastrointestinal e sua liberação com alta viabilidade no cólon. *P. kluyveri* CCMA 0615, anteriormente reconhecida apenas por seu potencial probiótico com base em estudos *in vitro*, foi validada como um probiótico funcional neste estudo *in vivo*. Esses achados abrem novas perspectivas para o uso terapêutico dessa levedura na promoção da saúde humana, com investigações futuras focadas em seu papel no tratamento de doenças metabólicas, como obesidade e diabetes.

5 Conclusão

O estudo demonstrou que o antibiótico vancomicina induz disbiose em camundongos BALB/c, levando a alterações na composição da microbiota intestinal, parâmetros fisiológicos, imunológicos e na estrutura intestinal. A vancomicina reduziu grupos bacterianos benéficos como Bacillota enquanto aumentou a abundância de Verrucomicrobiota e Patescibacteria, incluindo gêneros potencialmente patogênicos. A levedura probiótica *P. kluyveri* CCMA 0615 não apenas mitigou efetivamente esses efeitos negativos após o uso da vancomicina, como também melhorou a sensibilidade à insulina, indicando seu potencial para regular o metabolismo da glicose. Além disso, *P. kluyveri* foi capaz de produzir subprodutos de fermentação benéficos, como o ácido butírico, criando um ambiente intestinal favorável ao crescimento de microrganismos benéficos como *Akkermansia*, *Blautia* e *Parabacteroides goldsteinii*, e inibindo a colonização de patógenos. Esses achados sugerem que *P. kluyveri* CCMA 0615 pode ser uma abordagem terapêutica valiosa para mitigar os efeitos adversos relacionados ao uso prolongado de antibióticos, destacando seu potencial como probiótico na promoção da saúde intestinal e, possivelmente, na prevenção de complicações associadas a distúrbios metabólicos. Pesquisas futuras devem explorar seus mecanismos de ação, otimizar sua formulação para aplicações humanas e avaliar sua eficácia em ensaios clínicos, abrindo caminho para seu uso potencial em terapias destinadas a restaurar a saúde intestinal após tratamentos com antibióticos e em distúrbios metabólicos como na obesidade e diabetes.

REFERÊNCIAS

- ABID, Rameesha *et al.* Probiotic Yeast *Saccharomyces*: Back to Nature to Improve Human Health. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 5, p. 444, 24 abr. 2022.
- BALDELLI, Valerio *et al.* The Role of *Enterobacteriaceae* in Gut Microbiota Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 697, 27 mar. 2021.
- BLAAK, E. E. *et al.* Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. **Beneficial Microbes**, v. 11, n. 5, p. 411–455, 1 set. 2020.
- BRENCHLEY, Jason M.; SERRANO-VILLAR, Sergio. From dysbiosis to defense: harnessing the gut microbiome in HIV/SIV therapy. **Microbiome**, v. 12, n. 1, p. 113, 21 jun. 2024.
- BROWNE, Niall; HORGAN, Karina. The Impact of a Proprietary Blend of Yeast Cell Wall, Short-Chain Fatty Acids, and Zinc Proteinate on Growth, Nutrient Utilisation, and Endocrine Hormone Secretion in Intestinal Cell Models. **Animals**, v. 14, n. 2, p. 238, 12 jan. 2024.
- CARÍAS DOMÍNGUEZ, Ailim Margarita *et al.* Intestinal Dysbiosis: Exploring Definition, Associated Symptoms, and Perspectives for a Comprehensive Understanding — a Scoping Review. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 17, n. 1, p. 440–449, 5 fev. 2025.
- CHANDA, Warren; JIANG, He; LIU, Shuang-Jiang. The Ambiguous Correlation of Blautia with Obesity: A Systematic Review. **Microorganisms**, v. 12, n. 9, p. 1768, 26 ago. 2024.
- CHANG, James D. *et al.* Peptidoglycan O-acetylation increases in response to vancomycin treatment in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 46500, 13 abr. 2017.
- CHELAKKOT, Chaithanya *et al.* *Akkermansia muciniphila*-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 2, p. e450–e450, 23 fev. 2018.
- CHEN, Jiezhong; VITETTA, Luis. The Role of Butyrate in Attenuating Pathobiont-Induced Hyperinflammation. **Immune Network**, v. 20, n. 2, 2020.
- CHEN, Keqiang *et al.* The beneficial effects of commensal *E. coli* for colon epithelial cell recovery are related with Formyl peptide receptor 2 (Fpr2) in epithelial cells. **Gut Pathogens**, v. 15, n. 1, p. 28, 15 jun. 2023.
- COTTER, Maura Bríd; LODA, Massimo. Introduction to Histology. *In*: **Pathology and Epidemiology of Cancer**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 11–26.
- CRISTOFORI, Fernanda *et al.* Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 26 fev. 2021.
- CRUZ, Bruna Cristina dos Santos *et al.* Use of the synbiotic VSL#3 and yacon-based concentrate attenuates intestinal damage and reduces the abundance of *Candidatus*

Saccharimonas in a colitis-associated carcinogenesis model. **Food Research International**, v. 137, p. 109721, nov. 2020.

CUI, Mingxiao *et al.* Beneficial effects of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gelidium pacificum* Okamura on mice with antibiotic-associated diarrhea. **Food & Function**, v. 11, n. 5, p. 4625–4637, 2020.

CUI, Yanlong *et al.* Roles of intestinal *Parabacteroides* in human health and diseases. **FEMS Microbiology Letters**, v. 369, n. 1, 29 ago. 2022.

DA SILVA, Tales Fernando *et al.* Comprehensive probiogenomics analysis of the commensal *Escherichia coli* CEC15 as a potential probiotic strain. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 364, 27 nov. 2023.

DAHIYA, Divakar; NIGAM, Poonam Singh. Antibiotic-Therapy-Induced Gut Dysbiosis Affecting Gut Microbiota—Brain Axis and Cognition: Restoration by Intake of Probiotics and Synbiotics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 3074, 4 fev. 2023.

DEN BESTEN, Gijs *et al.* The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 9, p. 2325–2340, set. 2013.

DHEER, Rishu *et al.* Intestinal Epithelial Toll-Like Receptor 4 Signaling Affects Epithelial Function and Colonic Microbiota and Promotes a Risk for Transmissible Colitis. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 3, p. 798–810, mar. 2016.

DÍAZ-GARRIDO, Natalia; BADIA, Josefa; BALDOMÀ, Laura. Microbiota-derived extracellular vesicles in interkingdom communication in the gut. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 10, n. 13, 4 nov. 2021.

DIETERICH, Walburga; SCHINK, Monic; ZOPF, Yurdagül. Microbiota in the Gastrointestinal Tract. **Medical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 116, 14 dez. 2018.

DING, Li *et al.* Advances in IgA glycosylation and its correlation with diseases. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, 27 set. 2022.

DINU, Vlad *et al.* The antibiotic vancomycin induces complexation and aggregation of gastrointestinal and submaxillary mucins. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 960, 22 jan. 2020.

FAI, Ana Elizabeth Cavalcante *et al.* Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 343–350, out. 2014.

FINCH, Natalie A. *et al.* A Quasi-Experiment To Study the Impact of Vancomycin Area under the Concentration-Time Curve-Guided Dosing on Vancomycin-Associated Nephrotoxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 12, dez. 2017.

GEERLINGS, Sharon Y. *et al.* *Akkermansia muciniphila* in the Human Gastrointestinal Tract: When, Where, and How? **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 75, 23 jul. 2018.

GIBSON, Glenn R. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 14 ago. 2017.

GRONDIN, Jensine A. *et al.* Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning From Clinical and Experimental Studies. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 4 set. 2020.

GUO, Xiaohua *et al.* Interactive Relationships between Intestinal Flora and Bile Acids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8343, 28 jul. 2022.

HAAK, Bastiaan W. *et al.* Long-term impact of oral vancomycin, ciprofloxacin and metronidazole on the gut microbiota in healthy humans. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 3, p. 782–786, 1 mar. 2019.

HASAN, Nihal; YANG, Hongyi. Evaluation of microbial and vancomycin treatments in ulcerative colitis in murine models. **PLOS ONE**, v. 18, n. 5, p. e0285613, 11 maio 2023.

HE, Kairu *et al.* *Akkermansia muciniphila*: A Potential Target for the Prevention of Diabetes. **Foods**, v. 14, n. 1, p. 23, 25 dez. 2024.

HIIPPALA, Kaisa *et al.* Isolation of Anti-Inflammatory and Epithelium Reinforcing *Bacteroides* and *Parabacteroides* Spp. from A Healthy Fecal Donor. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 935, 27 mar. 2020.

HOLMBERG, Sandra M. *et al.* The gut commensal *Blautia maintains* colonic mucus function under low-fiber consumption through secretion of short-chain fatty acids. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 3502, 25 abr. 2024.

HUANG, Kun; WU, Lili; YANG, Yunsheng. Gut microbiota: An emerging biological diagnostic and treatment approach for gastrointestinal diseases. **JGH Open**, v. 5, n. 9, p. 973–975, 21 set. 2021.

IOANNOU, Athanasia *et al.* *Akkermansia muciniphila*: biology, microbial ecology, host interactions and therapeutic potential. **Nature Reviews Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 162–177, 15 mar. 2025.

JACKSON, Rachel *et al.* Protein combined with certain dietary fibers increases butyrate production in gut microbiota fermentation. **Food & Function**, v. 15, n. 6, p. 3186–3198, 2024.

JAGANNATHAN, Ram *et al.* <p>The Oral Glucose Tolerance Test: 100 Years Later</p>. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. Volume 13, p. 3787–3805, out. 2020.

KARCHER, Nicolai *et al.* Genomic diversity and ecology of human-associated *Akkermansia* species in the gut microbiome revealed by extensive metagenomic assembly. **Genome Biology**, v. 22, n. 1, p. 209, 14 dez. 2021.

- KESAVELU, Dhanasekhar; JOG, Pramod. Current understanding of antibiotic-associated dysbiosis and approaches for its management. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 10, 24 jan. 2023.
- KIM, Janice; KHAN, Waliul. Goblet Cells and Mucins: Role in Innate Defense in Enteric Infections. **Pathogens**, v. 2, n. 1, p. 55–70, 4 fev. 2013.
- KLEM, Fabiane *et al.* Prevalence, Risk Factors, and Outcomes of Irritable Bowel Syndrome After Infectious Enteritis: A Systematic Review and Meta-analysis. **Gastroenterology**, v. 152, n. 5, p. 1042–1054.e1, abr. 2017.
- KURTZ, Z. *et al.* SpieEasi: Sparse inverse covariance for ecological statistical inference. R package version, 1(2). 2017.
- LABBANI, Fatima-Zohra Kenza *et al.* A novel killer protein from *Pichia kluyveri* isolated from an Algerian soil: purification and characterization of its in vitro activity against food and beverage spoilage yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 4, p. 961–970, 25 abr. 2015.
- LAI, Chih-Ho *et al.* Gut Commensal *Parabacteroides goldsteinii* MTS01 Alters Gut Microbiota Composition and Reduces Cholesterol to Mitigate Helicobacter pylori-Induced Pathogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 30 jun. 2022.
- LI, Rui-Ding *et al.* Longevity-Associated Core Gut Microbiota Mining and Effect of Mediated Probiotic Combinations on Aging Mice: Case Study of a Long-Lived Population in Guangxi, China. **Nutrients**, v. 15, n. 7, p. 1609, 26 mar. 2023.
- LIN, Tzu-Lung *et al.* Characterization and Safety Evaluation of Autoclaved Gut Commensal *Parabacteroides goldsteinii* RV-01. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 23, p. 12660, 25 nov. 2024.
- LIU, Chi *et al.* *microeco* : an R package for data mining in microbial community ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 97, n. 2, 26 jan. 2021a.
- LIU, Huifan *et al.* Artificial simulation of salivary and gastrointestinal digestion, and fermentation by human fecal microbiota, of polysaccharides from *Dendrobium aphyllum*. **RSC Advances**, v. 8, n. 25, p. 13954–13963, 2018.
- LIU, Lei *et al.* Vancomycin exposure caused opportunistic pathogens bloom in intestinal microbiome by simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME). **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114399, out. 2020.
- LIU, Wenyun *et al.* Modulation of adipose tissue metabolism by microbial-derived metabolites. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 9 dez. 2022.
- LIU, Xuemei *et al.* *Blautia* —a new functional genus with potential probiotic properties? **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2021b.
- LOCK, Jaclyn Y. *et al.* Impact of Developmental Age, Necrotizing Enterocolitis Associated Stress, and Oral Therapeutic Intervention on Mucus Barrier Properties. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6692, 21 abr. 2020.

- ŁUKASIK, J. *et al.* Systematic review: effect of probiotics on antibiotic-induced microbiome disruption. **Beneficial Microbes**, v. 15, n. 5, p. 431–447, 5 jul. 2024.
- MAIUOLO, Jessica *et al.* The Postbiotic Properties of Butyrate in the Modulation of the Gut Microbiota: The Potential of Its Combination with Polyphenols and Dietary Fibers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 13, p. 6971, 26 jun. 2024.
- MAO, Bingyong *et al.* Potential Probiotic Properties of *Blautia producta* Against Lipopolysaccharide-Induced Acute Liver Injury. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 15, n. 3, p. 785–796, 15 jun. 2023.
- MARTINS, Pâmela Mynsen Machado *et al.* Microencapsulation of epiphytic coffee yeasts by spray drying using different wall materials: Implementation in coffee medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 379, p. 109839, out. 2022.
- MATEI-LAȚIU, Maria-Cătălina *et al.* Intestinal Dysbiosis in Rats: Interaction between Amoxicillin and Probiotics, a Histological and Immunohistochemical Evaluation. **Nutrients**, v. 15, n. 5, p. 1105, 23 fev. 2023.
- MELO-MARQUES, Inês; CARDOSO, Sandra Morais; EMPADINHAS, Nuno. Bacterial extracellular vesicles at the interface of gut microbiota and immunity. **Gut Microbes**, v. 16, n. 1, 31 dez. 2024.
- MENEZES, Aline Galvão Tavares *et al.* Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. **Food Research International**, v. 111, p. 187–197, 2018.
- MENEZES, Aline Galvão Tavares *et al.* Yeasts isolated from Brazilian fermented foods in the protection against infection by pathogenic food bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 140, p. 103969, mar. 2020a.
- MENEZES, Aline Galvão Tavares *et al.* Probiotic Potential, Antioxidant Activity, and Phytase Production of Indigenous Yeasts Isolated from Indigenous Fermented Foods. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 1, p. 280–288, 26 mar. 2020b.
- MIGUEL, Gabriela A. *et al.* Amino acid preference and fermentation performance of *Pichia kluyveri* strains in a synthetic wort. **LWT**, v. 199, p. 116059, maio 2024.
- MUNYAKA, Peris Mumbi; KHAFIPOUR, Ehsan; GHIA, Jean-Eric. External Influence of Early Childhood Establishment of Gut Microbiota and Subsequent Health Implications. **Frontiers in Pediatrics**, v. 2, 9 out. 2014.
- OKADA, Yoshikiyo *et al.* Novel probiotic yeast from Miso promotes regulatory dendritic cell IL-10 production and attenuates DSS-induced colitis in mice. **Journal of Gastroenterology**, v. 56, n. 9, p. 829–842, 2 set. 2021.
- OKSANEN, Jari *et al.* **vegan: Community Ecology Package. CRAN: Contributed Packages**, 6 set. 2015.

OREN, Aharon. On validly published names, correct names, and changes in the nomenclature of phyla and genera of prokaryotes: a guide for the perplexed. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 10, n. 1, p. 20, 11 mar. 2024.

OUYANG, Linqi *et al.* A multi-omics study reveals the therapeutic effect of *Linderae Radix* water extract on irritable bowel syndrome (IBS-D). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 328, p. 118050, jun. 2024.

OVEREEM, Karlijn; VAN SOEST, Geertje; BLANKENSTEIN, Nettie. Antibiotic-associated diarrhoea. **British Journal of General Practice**, v. 58, n. 549, p. 283.3-284, 1 abr. 2008.

OZATO, Naoki *et al.* Two *Blautia* Species Associated with Visceral Fat Accumulation: A One-Year Longitudinal Study. **Biology**, v. 11, n. 2, p. 318, 16 fev. 2022.

PAIS, Gwendolyn M. *et al.* Vancomycin-Induced Kidney Injury: Animal Models of Toxicodynamics, Mechanisms of Injury, Human Translation, and Potential Strategies for Prevention. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 40, n. 5, p. 438–454, 4 maio 2020.

PASCAL, Mariona *et al.* Microbiome and Allergic Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 17 jul. 2018.

PEREIRA, Wagner de Fátima *et al.* Increased Migratory and Activation Cell Markers of Peripheral Blood Lymphocytes in an Experimental Model of Nephrotic Syndrome. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, n. 1, 7 jan. 2015.

PLOVIER, Hubert *et al.* A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. **Nature Medicine**, v. 23, n. 1, p. 107–113, 28 jan. 2017.

PROBILIFE-NXT. **Probilife-NXT, 2025. *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399.** Disponível em: <<https://www.intralife.co/product/probilife-nxt/>>. Acesso em: 9 mar. 2025.

RAJPUT, Mrigendra *et al.* Determining the association between gut microbiota and its metabolites with higher intestinal Immunoglobulin A response. **Veterinary and Animal Science**, v. 19, p. 100279, mar. 2023.

RAMIREZ, Jaime *et al.* Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 24 nov. 2020.

RAWAT, AJAY SINGH *et al.* Quantitative Determination of Acetic Acid in Gefitinib by Reverse Phase HPLC. **Chemical Science Transactions**, 8 jun. 2014.

RAY, Pratikshya *et al.* Vancomycin-Induced Changes in Host Immunity and Behavior: Comparative Genomic and Metagenomic Analysis in C57BL/6 and BALB/c Mice. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 66, n. 11, p. 3776–3791, 1 nov. 2021.

RESENDE, Iara Ferreira *et al.* Development and characterization of microencapsulated *Pichia kluyveri* CCMA 0615 with probiotic properties and its application in fermented beverages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 427, p. 110967, jan. 2025.

SAKAGUCHI, Masato *et al.* The gut microbiota genus *Blautia* is associated with skeletal muscle mass reduction in community-dwelling older Japanese adults: the Wakayama Study. **European Geriatric Medicine**, v. 16, n. 1, p. 23–32, 11 dez. 2024.

SANNA, Serena *et al.* Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. **Nature Genetics**, v. 51, n. 4, p. 600–605, 18 abr. 2019.

SATO, Hirokazu *et al.* Antibiotics Suppress Activation of Intestinal Mucosal Mast Cells and Reduce Dietary Lipid Absorption in Sprague-Dawley Rats. **Gastroenterology**, v. 151, n. 5, p. 923–932, nov. 2016.

SCOTT, Nicholas A. *et al.* Antibiotics induce sustained dysregulation of intestinal T cell immunity by perturbing macrophage homeostasis. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 464, 24 out. 2018.

SHIBATA, Masaki *et al.* Mouse Model of Anti-Obesity Effects of *Blautia hansenii* on Diet-Induced Obesity. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 45, n. 9, p. 7147–7160, 26 ago. 2023.

SUN, Jinzhe *et al.* Butyrate as a promising therapeutic target in cancer: From pathogenesis to clinic (Review). **International Journal of Oncology**, v. 64, n. 4, p. 44, 29 fev. 2024.

SUTTROP, Meinolf; CLASSEN, Carl Friedrich. Splenomegaly in Children and Adolescents. **Frontiers in Pediatrics**, v. 9, 9 jul. 2021.

TAITZ, Jemma J. *et al.* Antibiotic-mediated dysbiosis leads to activation of inflammatory pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 9 jan. 2025.

TAN, Jian Kai; MACIA, Laurence; MACKAY, Charles R. Dietary fiber and SCFAs in the regulation of mucosal immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 151, n. 2, p. 361–370, fev. 2023.

TANG, Huang; HUANG, Wanqiu; YAO, Yu-Feng. The metabolites of lactic acid bacteria: classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota. **Microbial Cell**, v. 10, n. 3, p. 49–62, 6 mar. 2023.

TUFAIL, Muhammad Aammar; SCHMITZ, Ruth A. Exploring the Probiotic Potential of *Bacteroides* spp. Within One Health Paradigm. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 8 out. 2024.

VILLAS BOAS, Gustavo Roberto *et al.* Aqueous extract from *Mangifera indica* Linn. (*Anacardiaceae*) leaves exerts long-term hypoglycemic effect, increases insulin sensitivity and plasma insulin levels on diabetic Wistar rats. **PLOS ONE**, v. 15, n. 1, p. e0227105, 8 jan. 2020.

WANG, Fei; WANG, Zetian; TANG, Jianguo. The interactions of *Candida albicans* with gut bacteria: a new strategy to prevent and treat invasive intestinal candidiasis. **Gut Pathogens**, v. 15, n. 1, p. 30, 27 jun. 2023.

WANG, Lijie *et al.* The interplay between herbal medicines and gut microbiota in metabolic diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 24 mar. 2023.

WANG, Nana *et al.* Alleviation Effects of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* XLTG11 on Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. **Microorganisms**, v. 9, n. 10, p. 2093, 3 out. 2021.

WICKHAM, Hadley. ggplot2. **WIREs Computational Statistics**, v. 3, n. 2, p. 180–185, 4 mar. 2011.

WIJAYANTI, Avissa Auryn; WIKANDARI, Prima Retno. Potency of fermented jicama extract cultured with *Lactobacillus plantarum* B1765 for producing short chain fatty acid. **Jurnal Pijar Mipa**, v. 18, n. 5, p. 822–828, 30 set. 2023.

XU, Sha *et al.* Butyrate induces apoptosis by activating PDC and inhibiting complex I through SIRT3 inactivation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. 1, p. 16035, 10 fev. 2017.

XU, Yali *et al.* *Akkermansia muciniphila* Alleviates Persistent Inflammation, Immunosuppression, and Catabolism Syndrome in Mice. **Metabolites**, v. 13, n. 2, p. 194, 28 jan. 2023.

YANG, Chao *et al.* Fecal IgA Levels Are Determined by Strain-Level Differences in *Bacteroides ovatus* and Are Modifiable by Gut Microbiota Manipulation. **Cell Host & Microbe**, v. 27, n. 3, p. 467–475.e6, mar. 2020a.

YANG, Meng *et al.* Beneficial Effects of Newly Isolated *Akkermansia muciniphila* Strains from the Human Gut on Obesity and Metabolic Dysregulation. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1413, 14 set. 2020b.

YE, Jianming *et al.* Phage cocktail alleviated type 2 diabetes by reshaping gut microbiota and decreasing proinflammatory cytokines. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 9, 30 dez. 2024.

YILDIRAN, Hatice; BAŞYİĞİT KILIÇ, Gül den; KARAHAN ÇAKMAKÇI, Aynur Gül. Characterization and comparison of yeasts from different sources for some probiotic properties and exopolysaccharide production. **Food Science and Technology**, v. 39, n. suppl 2, p. 646–653, dez. 2019.

YIN, Li-Tian *et al.* Intranasal Immunisation with Recombinant *Toxoplasma gondii* Actin Partly Protects Mice against Toxoplasmosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e82765, 27 dez. 2013.

YOON, Hyo Shin *et al.* *Akkermansia muciniphila* secretes a glucagon-like peptide-1-inducing protein that improves glucose homeostasis and ameliorates metabolic disease in mice. **Nature Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 563–573, 5 abr. 2021.

YOUSEFI, Bahman *et al.* Probiotics importance and their immunomodulatory properties. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 6, p. 8008–8018, 14 jun. 2019.

ZHANG, Jing *et al.* Decreased Abundance of *Akkermansia muciniphila* Leads to the Impairment of Insulin Secretion and Glucose Homeostasis in Lean Type 2 Diabetes. **Advanced Science**, v. 8, n. 16, 4 ago. 2021a.

ZHANG, Qiuyu *et al.* Antibiotic-Induced Gut Microbiota Dysbiosis Damages the Intestinal Barrier, Increasing Food Allergy in Adult Mice. **Nutrients**, v. 13, n. 10, p. 3315, 23 set. 2021b.

ZHAO, Min'an *et al.* Immunological mechanisms of inflammatory diseases caused by gut microbiota dysbiosis: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 164, p. 114985, ago. 2023.

ZHOU, Hai-Hong *et al.* C-reactive protein: structure, function, regulation, and role in clinical diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 14 jun. 2024.

TERCEIRA PARTE

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microbiota intestinal exerce funções cruciais na manutenção da homeostase e na prevenção de distúrbios inflamatórios. A disbiose, resultante de desequilíbrios microbianos, está associada a diversas patologias intestinais. Diante disso, os probióticos surgem como uma abordagem terapêutica promissora, destacando-se pela capacidade de modular positivamente a microbiota e fortalecer a barreira intestinal. Embora as bactérias probióticas sejam amplamente estudadas, leveduras, especialmente as não *Saccharomyces*, têm despertado interesse devido ao seu potencial funcional. A eficácia desses microrganismos está relacionada à sua resistência às condições do trato gastrointestinal e à manutenção da viabilidade, o que pode ser favorecido por tecnologias como a microencapsulação. Nesse contexto, esta pesquisa destaca o potencial de leveduras probióticas não *Saccharomyces* microencapsuladas, particularmente *P. kluyveri* CCMA 0615, em aplicações biotecnológicas e terapêuticas. As descobertas demonstram que a microencapsulação aumenta a viabilidade da levedura, apoia seu uso em bebidas funcionais e garante sua sobrevivência através do trato gastrointestinal. Esses resultados ressaltam a importância de adaptar protocolos de microencapsulação para cepas probióticas específicas para otimizar sua estabilidade e eficácia. Além disso, *P. kluyveri* CCMA 0615 mostra-se promissora na mitigação da disbiose induzida por antibióticos em camundongos Balb/c, promovendo populações microbianas benéficas e restaurando a integridade intestinal. Estudos futuros devem se concentrar em aplicações *in vivo*, elucidação de mecanismos e validação clínica para estabelecer essas leveduras como terapias probióticas viáveis para a restauração da saúde intestinal.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, Kjersti *et al.* The Placenta Harbors a Unique Microbiome. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 237, 21 maio 2014.
- ABURTO, María R.; CRYAN, John F. Gastrointestinal and brain barriers: unlocking gates of communication across the microbiota–gut–brain axis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 21, n. 4, p. 222–247, 14 abr. 2024.
- AFZAAL, Muhammad *et al.* Functional exploration of free and encapsulated probiotic bacteria in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 12, p. 3931–3940, 7 dez. 2019.
- AFZAAL, Muhammad *et al.* Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 1649–1656, 17 mar. 2020.
- AFZAAL, Muhammad *et al.* Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 26 set. 2022.
- AGUIRRE-GARCÍA, M. Magdalena *et al.* TLR-Mediated Host Immune Response to Parasitic Infectious Diseases. *In: Toll-like Receptors*. [S.l.]: IntechOpen, 2020.
- AKBUĞA-SCHÖN, Tanja *et al.* The keystone gut species *Christensenella minuta* boosts gut microbial biomass and voluntary physical activity in mice. **mBio**, v. 15, n. 2, 14 fev. 2024.
- ALAMEDDINE, Joudy *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* Skews Human DC to Prime IL10-Producing T Cells Through TLR2/6/JNK Signaling and IL-10, IL-27, CD39, and IDO-1 Induction. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 6 fev. 2019.
- ALEMAN, Francisco Daniel Davila; VALENZANO, Dario Riccardo. Microbiome evolution during host aging. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 7, p. e1007727, 25 jul. 2019.
- ALI, Aya Y. *et al.* Gut microbiota dysbiosis and associated immune response in systemic lupus erythematosus: impact of disease and treatment. **Gut Pathogens**, v. 17, n. 1, p. 10, 18 fev. 2025.
- ALLEN, JACOB M. *et al.* Exercise Alters Gut Microbiota Composition and Function in Lean and Obese Humans. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 50, n. 4, p. 747–757, abr. 2018.
- ALMEIDA, Joana I. *et al.* Hallmarks of the human intestinal microbiome on liver maturation and function. **Journal of Hepatology**, out. 2021.
- AL-RASHIDI, Hanan E. Gut microbiota and immunity relevance in eubiosis and dysbiosis. **Saudi Journal of Biological Sciences**, out. 2021.
- ALVAREZ, Silvia Cristina Vergara *et al.* Probiotic Potential of Yeasts Isolated from Fermented Beverages: Assessment of Antagonistic Strategies Against *Salmonella enterica* Seroovar Enteritidis. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 12, p. 878, 17 dez. 2024.

AMER, Muhammad *et al.* Probiotics and their use in inflammatory bowel disease. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 24, p. 16–23, 2017.

ANGULO, Miriam *et al.* Probiotic *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 yeast enhanced immune responses in mice. **3 Biotech**, v. 13, n. 1, p. 28, 28 jan. 2023.

ANJANA; TIWARI, Santosh Kumar. Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 16 maio 2022.

ANLU, Wang *et al.* Using herbal medicine to target the “microbiota-metabolism-immunity” axis as possible therapy for cardiovascular disease. **Pharmacological Research**, v. 142, p. 205–222, abr. 2019.

ARÉVALO-VILLENA, María *et al.* Probiotic capability in yeasts: Set-up of a screening method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, n. March 2017, p. 657–665, 2018.

ARIKE, Liisa; HANSSON, Gunnar C. The Densely O-Glycosylated MUC2 Mucin Protects the Intestine and Provides Food for the Commensal Bacteria. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 16, p. 3221–3229, ago. 2016.

ARUMUGAM, Manimozhiyan *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174–180, 12 maio 2011.

ARUMUGAM, Priya; SAHA, Kushal; NIGHOT, Prashant. Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier Regulation by Novel Pathways. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 31, n. 1, p. 259–271, 6 jan. 2025.

ASEFA, Zerihun *et al.* Postbiotics and their biotherapeutic potential for chronic disease and their feature perspective: a review. **Frontiers in Microbiomes**, v. 4, 3 mar. 2025.

AZAD, Meghan B. *et al.* Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. **Canadian Medical Association Journal**, v. 185, n. 5, p. 385–394, 19 mar. 2013.

BARMPATSALOU, Vicky *et al.* Physiological properties, composition and structural profiling of porcine gastrointestinal mucus. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 169, p. 156–167, dez. 2021.

BELZ, Gabrielle T. *et al.* Tissue-resident lymphocytes: weaponized sentinels at barrier surfaces. **F1000Research**, v. 9, p. 691, 9 jul. 2020.

BEMARK, Mats *et al.* Gut-associated lymphoid tissue: a microbiota-driven hub of B cell immunity. **Trends in Immunology**, v. 45, n. 3, p. 211–223, mar. 2024.

BERGSTROM, Kirk *et al.* Proximal colon–derived O-glycosylated mucus encapsulates and modulates the microbiota. **Science**, v. 370, n. 6515, p. 467–472, 23 out. 2020.

BERGSTROM, Kirk; XIA, Lijun. The barrier and beyond: Roles of intestinal mucus and mucin-type O-glycosylation in resistance and tolerance defense strategies guiding host-microbe symbiosis. **Gut Microbes**, v. 14, n. 1, 31 dez. 2022.

BEVINS, Charles L.; SALZMAN, Nita H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 356–368, 22 maio 2011.

BIRCHENOUGH, George M. H.; JOHANSSON, Malin E. V. Forming a mucus barrier along the colon. **Science**, v. 370, n. 6515, p. 402–403, 23 out. 2020.

BOLTE, Erin E.; MOORSHEAD, David; AAGAARD, Kjersti M. Maternal and early life exposures and their potential to influence development of the microbiome. **Genome Medicine**, v. 14, n. 1, p. 4, 11 jan. 2022.

BORBET, Timothy C. *et al.* Disruption of the early-life microbiota alters Peyer's patch development and germinal center formation in gastrointestinal-associated lymphoid tissue. **iScience**, v. 26, n. 6, p. 106810, jun. 2023.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N ° 02 de 07 de janeiro de 2002: Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos emitidos com alegação de propriedades funcionais e de saúde. Diário Oficial da Repúbl.** Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/alegacoes-de-propriedade-funcional-aprovadas_anvisa.pdf/view>. Acesso em: 12 jan. 2022.

BRITTON, Graham J. *et al.* Defined microbiota transplant restores Th17/ROR γ ⁺ regulatory T cell balance in mice colonized with inflammatory bowel disease microbiotas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 35, p. 21536–21545, 18 set. 2020.

CABELLO-OLMO, Miriam *et al.* Influence of Storage Temperature and Packaging on Bacteria and Yeast Viability in a Plant-Based Fermented Food. **Foods**, v. 9, n. 3, p. 302, 7 mar. 2020.

CANDON, Sophie *et al.* Antibiotics in Early Life Alter the Gut Microbiome and Increase Disease Incidence in a Spontaneous Mouse Model of Autoimmune Insulin-Dependent Diabetes. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0125448, 13 maio 2015.

CARD, Roderick M. *et al.* Impact of Ciprofloxacin and Clindamycin Administration on Gram-Negative Bacteria Isolated from Healthy Volunteers and Characterization of the Resistance Genes They Harbor. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4410–4416, ago. 2015.

CARDING, Simon *et al.* Dysbiosis of the gut microbiota in disease. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 26, 2 fev. 2015.

CERUTTI MARTELLET, Mônica *et al.* Microencapsulation of *Kluyveromyces marxianus* and *Plantago ovata* in cheese whey particles: Protection of sensitive cells to simulated gastrointestinal conditions. **Food Bioscience**, v. 52, p. 102474, abr. 2023.

CHÁVEZ, B. E.; LEDEBOER, A. M. Drying of Probiotics: Optimization of Formulation and Process to Enhance Storage Survival. **Drying Technology**, v. 25, n. 7–8, p. 1193–1201, ago. 2007.

CHEN, Chen *et al.* Advances in oligosaccharides and polysaccharides with different structures as wall materials for probiotics delivery: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 277, p. 134468, out. 2024.

CHEN, Liang *et al.* Microbiota Metabolite Butyrate Differentially Regulates Th1 and Th17 Cells' Differentiation and Function in Induction of Colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 25, n. 9, p. 1450–1461, 20 ago. 2019.

CHEN, Pei *et al.* Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 65–72, jan. 2014.

CHIBA, Yukihide *et al.* Well-controlled proinflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic *Lactobacillus casei*. **Immunology**, v. 130, n. 3, p. 352–362, 9 jul. 2010.

CHOI, Jeong June *et al.* Exercise Attenuates PCB-Induced Changes in the Mouse Gut Microbiome. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 6, p. 725–730, jun. 2013.

CHONG, Serena *et al.* A systematic review on gut microbiota in type 2 diabetes mellitus. **Frontiers in Endocrinology**, v. 15, 17 jan. 2025.

CLAPP, Megan *et al.* Gut Microbiota's Effect on Mental Health: The Gut-Brain Axis. **Clinics and Practice**, v. 7, n. 4, p. 987, 15 set. 2017.

COGHETTO, Chaline Caren; BRINQUES, Graziela Brusch; AYUB, Marco Antônio Záchia. Probiotics production and alternative encapsulation methodologies to improve their viabilities under adverse environmental conditions. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 8, p. 929–943, 16 nov. 2016.

COLEMAN, Olivia I.; HALLER, Dirk. Microbe–Mucus Interface in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. **Cancers**, v. 13, n. 4, p. 616, 4 fev. 2021.

COLLADO, Maria Carmen *et al.* Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 23129, 22 mar. 2016.

COSCIA, Alessandra *et al.* When a Neonate Is Born, So Is a Microbiota. **Life**, v. 11, n. 2, p. 148, 16 fev. 2021.

CRISTOFORI, Fernanda *et al.* Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 26 fev. 2021.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, n. 6, p. 767–778, 19 jul. 2007.

CZERUCKA, Dorota; RAMPAL, Patrick. Diversity of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 mechanisms of action against intestinal infections. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 18, p. 2188–2203, 14 maio 2019.

DALIRI, Eric Banan-Mwine *et al.* Health Impact and Therapeutic Manipulation of the Gut Microbiome. **High-Throughput**, v. 9, n. 3, p. 17, 29 jul. 2020.

D'ARGENIO, Valeria. The Prenatal Microbiome: A New Player for Human Health. **High-Throughput**, v. 7, n. 4, p. 38, 11 dez. 2018.

DAVID, Rachel. Help from “friendly” bacteria. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 10, p. 675–675, 18 out. 2009.

DE BRUYN, Florac *et al.* Combining *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* and human milk oligosaccharides synergistically increases short chain fatty acid production ex vivo. **Communications Biology**, v. 7, n. 1, p. 943, 4 ago. 2024.

DEL PRETE, Annalisa *et al.* Dendritic cell subsets in cancer immunity and tumor antigen sensing. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 20, n. 5, p. 432–447, 22 mar. 2023.

DEMIRCI, M. *et al.* Reduced *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* levels in the gut microbiota of children with allergic asthma. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 47, n. 4, p. 365–371, jul. 2019.

DI SABATINO, Antonio *et al.* Role of mucosal immunity and epithelial–vascular barrier in modulating gut homeostasis. **Internal and Emergency Medicine**, v. 18, n. 6, p. 1635–1646, 4 set. 2023.

DI TOMMASO, Natalia; GASBARRINI, Antonio; PONZIANI, Francesca Romana. Intestinal Barrier in Human Health and Disease. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 23, p. 12836, 6 dez. 2021.

DIWAKARLA, S. *et al.* Heterogeneity of enterochromaffin cells within the gastrointestinal tract. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 29, n. 6, 9 jun. 2017.

DMYTRIV, Tetiana R.; STOREY, Kenneth B.; LUSHCHAK, Volodymyr I. Intestinal barrier permeability: the influence of gut microbiota, nutrition, and exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 15, 8 jul. 2024.

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**, v. 107, n. 26, p. 11971–11975, 29 jun. 2010.

DURACK, Juliana; LYNCH, Susan V. The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 1, p. 20–40, 7 jan. 2019.

EFSA. Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the safety of the micro-organism product Turval B0399® for use as feed additive for weaned piglets. **EFSA Journal**, v. 2, n. 3, p. 28, mar. 2004.

ERMUND, Anna *et al.* Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, n. 5, p. G341–G347, 1 set. 2013.

EVANS, Christian C. *et al.* Exercise Prevents Weight Gain and Alters the Gut Microbiota in a Mouse Model of High Fat Diet-Induced Obesity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e92193, 26 mar. 2014.

FERNANDEZ TRIGO, Nerea *et al.* The protective effect of the intestinal microbiota in type-1 diabetes in NOD mice is limited to a time window in early life. **Frontiers in Endocrinology**, v. 15, 26 set. 2024.

FLACH, Joost *et al.* The underexposed role of food matrices in probiotic products: Reviewing the relationship between carrier matrices and product parameters. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 15, p. 2570–2584, 13 out. 2018.

FONSECA, Vanessa M. B. *et al.* Oral administration of *Saccharomyces cerevisiae* <scp>UFMG</scp> A-905 prevents allergic asthma in mice. **Respirology**, v. 22, n. 5, p. 905–912, 6 jul. 2017.

FU, Hongbo *et al.* Effectiveness and Safety of *Saccharomyces boulardii* for the Treatment of Acute Gastroenteritis in the Pediatric Population: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2022, p. 1–10, 20 set. 2022.

FUJISAKA, Shiho; WATANABE, Yoshiyuki; TOBE, Kazuyuki. The gut microbiome: a core regulator of metabolism. **Journal of Endocrinology**, v. 256, n. 3, 1 mar. 2023.

FURUSAWA, Yukihiro; OBATA, Yuuki; HASE, Koji. Commensal microbiota regulates T cell fate decision in the gut. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 1, p. 17–25, 15 jan. 2015.

GALDEANO, C. Maldonado; *et al.* Stimulation of Innate Immune Cells Induced by Probiotics: Participation of Toll-Like Receptors. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 06, n. 01, 2015.

GALLARDO-NAVARRO, Oscar *et al.* Higher-order interactions and emergent properties of microbial communities: The power of synthetic ecology. **Heliyon**, v. 10, n. 14, p. e33896, jul. 2024.

GEUKING, Markus B.; BURKHARD, Regula. Microbial modulation of intestinal T helper cell responses and implications for disease and therapy. **Mucosal Immunology**, v. 13, n. 6, p. 855–866, nov. 2020.

GHARIEB, Salwa; BRESHA, Gaber; OMAR, Omar. Co-effect of microencapsulation and prebiotics on the survivability of some lactic acid bacteria in simulating gastrointestinal tract and storage conditions. **Journal of Modern Research**, v. 6, n. 1, p. 34–41, 1 jan. 2024.

GODL, Klaus *et al.* The N Terminus of the MUC2 Mucin Forms Trimers That Are Held Together within a Trypsin-resistant Core Fragment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 49, p. 47248–47256, dez. 2002.

GOLDENBERG, Robert L. *et al.* Epidemiology and causes of preterm birth. **The Lancet**, v. 371, n. 9606, p. 75–84, jan. 2008a.

GOLDENBERG, Robert L. *et al.* The Alabama Preterm Birth Study: Umbilical cord blood *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* cultures in very preterm newborn infants. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 198, n. 1, p. 43.e1–43.e5, jan. 2008b.

GOMAA, Eman Zakaria. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 113, n. 12, p. 2019–2040, 2 dez. 2020.

GOU, Hong-Zhong *et al.* How do intestinal probiotics restore the intestinal barrier? **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 14 jul. 2022.

GOVAERT, Marlies *et al.* Survival of Probiotic Bacterial Cells in the Upper Gastrointestinal Tract and the Effect of the Surviving Population on the Colonic Microbial Community Activity and Composition. **Nutrients**, v. 16, n. 16, p. 2791, 21 ago. 2024.

GRANT, Erica T. *et al.* Dietary fibers boost gut microbiota-produced B vitamin pool and alter host immune landscape. **Microbiome**, v. 12, n. 1, p. 179, 23 set. 2024.

GUARNER, Francisco *et al.* Gut dysbiosis mediates the association between antibiotic exposure and chronic disease. **Frontiers in Medicine**, v. 11, 6 nov. 2024.

GUO, Xiaohua *et al.* Interactive Relationships between Intestinal Flora and Bile Acids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8343, 28 jul. 2022.

GUO, Yuling *et al.* Crosstalk between the gut microbiota and innate lymphoid cells in intestinal mucosal immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 25 maio 2023.

GUSTAFSSON, Jenny K. *et al.* An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 302, n. 4, p. G430–G438, fev. 2012.

HAAK, Bastiaan W. *et al.* Long-term impact of oral vancomycin, ciprofloxacin and metronidazole on the gut microbiota in healthy humans. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 3, p. 782–786, 1 mar. 2019.

HADA, Akanksha; XIAO, Zhengguo. Ligands for Intestinal Intraepithelial T Lymphocytes in Health and Disease. **Pathogens**, v. 14, n. 2, p. 109, 23 jan. 2025.

HAKANSSON, Asa; MOLIN, Goran. Gut Microbiota and Inflammation. **Nutrients**, v. 3, n. 6, p. 637–682, 3 jun. 2011.

HAN, Yiping W. *et al.* Transmission of an Uncultivated *Bergeyella* Strain from the Oral Cavity to Amniotic Fluid in a Case of Preterm Birth. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1475–1483, abr. 2006.

HANCHI, Hasna *et al.* The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 3 ago. 2018.

HAWKES, Nigel. Modifications to vancomycin raise hope for combating antibiotic resistance. **BMJ**, p. j2661, 31 maio 2017.

HEAVEY, Mairead K. *et al.* Targeted delivery of the probiotic *Saccharomyces boulardii* to the extracellular matrix enhances gut residence time and recovery in murine colitis. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 3784, 6 maio 2024.

HELMY, Yosra A. *et al.* In Vitro Evaluation of the Impact of the Probiotic *E. coli* Nissle 1917 on *Campylobacter jejuni*'s Invasion and Intracellular Survival in Human Colonic Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 22 ago. 2017.

HERNÁNDEZ-MENDOZA, Adrián; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, Aarón F.; MARTÍNEZ-PORCHAS, Marcel. Influence of Probiotics on the Animal Gut Microbiota and Their Impact on the Bioavailability of Toxic Agents: An Opinion Paper. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 18 abr. 2022.

HICKEY, John W. *et al.* Organization of the human intestine at single-cell resolution. **Nature**, v. 619, n. 7970, p. 572–584, 20 jul. 2023.

HILL, Colin *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 10 ago. 2014.

HILL, Colin *et al.* Positive Health Outcomes Associated with Live Microbe Intake from Foods, Including Fermented Foods, Assessed using the NHANES Database. **The Journal of Nutrition**, v. 153, n. 4, p. 1143–1149, abr. 2023.

HOLMÉN LARSSON, Jessica M. *et al.* A complex, but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn. **Glycobiology**, v. 19, n. 7, p. 756–766, jul. 2009.

HOLMÉN LARSSON, Jessica M. *et al.* Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. III. Gastrointestinal Muc5ac and Muc2 mucin O-glycan patterns reveal a regiospecific distribution. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, n. 5, p. G357–G363, 1 set. 2013.

HOLMES, Aleah *et al.* Gut dysbiosis and age-related neurological diseases; an innovative approach for therapeutic interventions. **Translational Research**, v. 226, p. 39–56, dez. 2020.

HORROCKS, Victoria *et al.* Role of the gut microbiota in nutrient competition and protection against intestinal pathogen colonization. **Microbiology**, v. 169, n. 8, 25 ago. 2023.

HRNCIR, Tomas. Gut Microbiota Dysbiosis: Triggers, Consequences, Diagnostic and Therapeutic Options. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, p. 578, 7 mar. 2022.

HUANG, Kehao; YUAN, Yingzhi; BAOJUN, Xu. A Critical Review on the Microencapsulation of Bioactive Compounds and Their Application. **Food Reviews International**, v. 39, n. 5, p. 2594–2634, 4 jul. 2023.

IANIRO, Gianluca; TILG, Herbert; GASBARRINI, Antonio. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. **Gut**, v. 65, n. 11, p. 1906–1915, nov. 2016.

INCHINGOLO, Francesco *et al.* The Impact of Cesarean Section Delivery on Intestinal Microbiota: Mechanisms, Consequences, and Perspectives—A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 2, p. 1055, 15 jan. 2024.

ISAAC, Sandrine *et al.* Short- and long-term effects of oral vancomycin on the human intestinal microbiota. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 1, p. 128–136, jan. 2017.

ISHIZAWA, Kota *et al.* Sequential Sampling of the Gastrointestinal Tract to Characterize the Entire Digestive Microbiome in Japanese Subjects. **Microorganisms**, v. 12, n. 7, p. 1324, 28 jun. 2024.

JAKOBSSON, Hedvig E. *et al.* Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9836, 24 mar. 2010.

JENTHO, Elisa; WEIS, Sebastian. DAMPs and Innate Immune Training. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 22 out. 2021.

JIMÉNEZ, Esther *et al.* Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section. **Current Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 270–274, 20 out. 2005.

JIMÉNEZ, Esther *et al.* Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Research in Microbiology**, v. 159, n. 3, p. 187–193, abr. 2008.

JOHANSSON, Malin E. V. *et al.* The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 39, p. 15064–15069, 30 set. 2008.

JOHANSSON, Malin E. V. *et al.* Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. **Gut**, v. 63, n. 2, p. 281–291, fev. 2014.

KAMADA, Nobuhiko; NÚÑEZ, Gabriel. Role of the Gut Microbiota in the Development and Function of Lymphoid Cells. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 4, p. 1389–1395, 15 fev. 2013.

KAMBLE, Meenatai *et al.* Effect of gastrointestinal resistant encapsulate matrix on spray dried microencapsulated *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG powder and its characterization. **Food Research International**, v. 192, p. 114804, set. 2024.

KAMINSKY, Lauren W.; AL-SADI, Rana; MA, Thomas Y. IL-1 β and the Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 25 out. 2021.

KAMPHUIS, J. B. J. *et al.* Mucus organisation is shaped by colonic content; a new view. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8527, 17 ago. 2017.

KARCHER, Nicolai *et al.* Genomic diversity and ecology of human-associated *Akkermansia* species in the gut microbiome revealed by extensive metagenomic assembly. **Genome Biology**, v. 22, n. 1, p. 209, 14 dez. 2021.

KESAVELU, Dhanasekhar; JOG, Pramod. Current understanding of antibiotic-associated dysbiosis and approaches for its management. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 10, 24 jan. 2023.

KHAN, Israr *et al.* Alteration of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease (IBD): Cause or Consequence? IBD Treatment Targeting the Gut Microbiome. **Pathogens**, v. 8, n. 3, p. 126, 13 ago. 2019.

KIPRONO, Sabella *et al.* Microencapsulation of Probiotics and Its Application as Co-Delivery Systems: Review of Literature. **ES Food & Agroforestry**, 2024.

KÖNIG, Julia *et al.* Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 7, n. 10, p. e196, out. 2016.

KOWALCZYK, Andrew P.; GREEN, Kathleen J. Structure, Function, and Regulation of Desmosomes. *In: [S.l.: S.n.]*. p. 95–118, 2013.

KROEMER, Guido *et al.* The danger theory of immunity revisited. **Nature Reviews Immunology**, v. 24, n. 12, p. 912–928, 7 dez. 2024.

KRZYŻEK, Paweł *et al.* Extracellular Vesicles of Probiotics: Shedding Light on the Biological Activity and Future Applications. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 522, 4 fev. 2023.

KUMAR, Navin; SAIN, Swagata; SOLANKI, Bhawna. Deciphering Microbial Carbohydrate Metabolism: Unveiling Mechanistic Insights Into Type 2 Diabetes. **Advanced Gut & Microbiome Research**, v. 2025, n. 1, 10 jan. 2025.

KUMAR, Suresh *et al.* Unveiling roles of beneficial gut bacteria and optimal diets for health. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, 18 fev. 2025.

LAMBERT, Jennifer E. *et al.* Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 40, n. 7, p. 749–752, jul. 2015.

LATHAKUMARI, Rahul Harikumar *et al.* Antibiotics and the gut microbiome: Understanding the impact on human health. **Medicine in Microecology**, v. 20, p. 100106, jun. 2024.

LAVELLE, Aonghus; SOKOL, Harry. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 4, p. 223–237, 19 abr. 2020.

LEE, Juneyoung *et al.* Gut Microbiota–Derived Short-Chain Fatty Acids Promote Poststroke Recovery in Aged Mice. **Circulation Research**, v. 127, n. 4, p. 453–465, 31 jul. 2020.

LEE, Terence *et al.* Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 16, p. 36–47, mar. 2019.

LESSEY, Lindyann R. *et al.* Adherens junction proteins on the move—From the membrane to the nucleus in intestinal diseases. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 5 out. 2022.

LEVAST, Benoît *et al.* Impact on the Gut Microbiota of Intensive and Prolonged Antimicrobial Therapy in Patients With Bone and Joint Infection. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 5 mar. 2021.

LEVY, Maayan *et al.* Dysbiosis and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 219–232, 6 abr. 2017.

LI, Bei *et al.* *Saccharomyces boulardii* alleviates DSS-induced intestinal barrier dysfunction and inflammation in humanized mice. **Food & Function**, v. 13, n. 1, p. 102–112, 2022a.

LI, Chengcheng *et al.* Intestinal Delivery of Probiotics: Materials, Strategies, and Applications. **Advanced Materials**, v. 36, n. 32, 4 ago. 2024a.

LI, Danyang; WU, Minghua. Pattern recognition receptors in health and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 291, 4 ago. 2021.

LI, Lingfeng *et al.* Regulation of gut microbiota-bile acids axis by probiotics in inflammatory bowel disease. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 23 set. 2022b.

LI, Siqi *et al.* The Potential Impact of Antibiotic Exposure on the Microbiome and Human Health. **Microorganisms**, v. 13, n. 3, p. 602, 5 mar. 2025.

LI, Zehua *et al.* Critical role of the gut microbiota in immune responses and cancer immunotherapy. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 17, n. 1, p. 33, 14 maio 2024b.

LIDELL, Martin E. *et al.* The recombinant C-terminus of the human MUC2 mucin forms dimers in Chinese-hamster ovary cells and heterodimers with full-length MUC2 in LS 174T cells. **Biochemical Journal**, v. 372, n. 2, p. 335–345, 1 jun. 2003.

LIN, Yu-Lin; LI, Yan. The Biological Synthesis and the Function of Mucin 2 in *Pseudomyxoma peritonei*. **Cancer Management and Research**, v. Volume 13, p. 7909–7917, out. 2021.

LIU, Lei *et al.* Vancomycin exposure caused opportunistic pathogens bloom in intestinal microbiome by simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME). **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114399, out. 2020.

LIU, Wenyun *et al.* Modulation of adipose tissue metabolism by microbial-derived metabolites. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 9 dez. 2022.

LOCK, Jaclyn Y. *et al.* Impact of Developmental Age, Necrotizing Enterocolitis Associated Stress, and Oral Therapeutic Intervention on Mucus Barrier Properties. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6692, 21 abr. 2020.

LONG, Qichen *et al.* Gut microbiota and metabolic biomarkers in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. **Hepatology Communications**, v. 8, n. 3, mar. 2024.

LOPES, Sílvia André *et al.* Delivery Strategies of Probiotics from Nano- and Microparticles: Trends in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease—An Overview. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 11, p. 2600, 8 nov. 2023.

LUCHEN, Charlie C. *et al.* Impact of antibiotics on gut microbiome composition and resistome in the first years of life in low- to middle-income countries: A systematic review. **PLOS Medicine**, v. 20, n. 6, p. e1004235, 27 jun. 2023.

LUNDBERG, Randi *et al.* Human microbiota-transplanted C57BL/6 mice and offspring display reduced establishment of key bacteria and reduced immune stimulation compared to mouse microbiota-transplantation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 7805, 8 maio 2020.

MA, Teng *et al.* Targeting gut microbiota and metabolism as the major probiotic mechanism - An evidence-based review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 138, p. 178–198, ago. 2023.

MACIERZANKA, Adam; MACKIE, Alan R.; KRUPA, Lukasz. Permeability of the small intestinal mucus for physiologically relevant studies: Impact of mucus location and ex vivo treatment. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 17516, 26 nov. 2019.

MAHMOUD, Mona *et al.* Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. **Heliyon**, v. 6, n. 3, p. e03541, mar. 2020.

MANDAL, Santi M.; SILVA, Osmar N.; FRANCO, Octavio L. Recombinant probiotics with antimicrobial peptides: a dual strategy to improve immune response in immunocompromised patients. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 8, p. 1045–1050, ago. 2014.

MARCO, Maria L. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 3, p. 196–208, 4 mar. 2021.

MARTÍN, Rebeca *et al.* Functional Characterization of Novel *Faecalibacterium prausnitzii* Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of *F. prausnitzii* as a Next-Generation Probiotic. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 30 jun. 2017.

MAZZIOTTA, Chiara *et al.* Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. **Cells**, v. 12, n. 1, p. 184, 2 jan. 2023.

MCCALLUM, Giselle; TROPINI, Carolina. The gut microbiota and its biogeography. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 105–118, 22 fev. 2024.

MCFARLAND, Lynne V.; EVANS, Charlesnika T.; GOLDSTEIN, Ellie J. C. Strain-Specificity and Disease-Specificity of Probiotic Efficacy: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Medicine**, v. 5, 7 maio 2018.

MENEZES, Aline Galvão Tavares *et al.* Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. **Food Research International**, v. 111, p. 187–197, 2018.

MENEZES, Aline Galvão Tavares *et al.* Yeasts isolated from Brazilian fermented foods in the protection against infection by pathogenic food bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 140, p. 103969, mar. 2020a.

MENEZES, Aline Galvão Tavares *et al.* Probiotic Potential, Antioxidant Activity, and Phytase Production of Indigenous Yeasts Isolated from Indigenous Fermented Foods. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 1, p. 280–288, 26 mar. 2020b.

MERCHAK, Andrea R. *et al.* Thinking outside the brain: Gut microbiome influence on innate immunity within neurodegenerative disease. **Neurotherapeutics**, v. 21, n. 6, p. e00476, out. 2024.

METCHNIKOFF, T. **The Prolongation of Life**. London, UK: [S.n.], 1907.

MIN, Yang Won; RHEE, Poong-Lyul. The Role of Microbiota on the Gut Immunology. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 5, p. 968–975, maio 2015.

MIRANDA, V. C. *et al.* Effect of *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 in a murine model of food allergy. **Beneficial Microbes**, v. 11, n. 3, p. 255–268, 11 maio 2020.

MOOR, Andreas E. *et al.* Spatial Reconstruction of Single Enterocytes Uncovers Broad Zonation along the Intestinal Villus Axis. **Cell**, v. 175, n. 4, p. 1156–1167.e15, nov. 2018.

MORA-FLORES, Lorena P. *et al.* The Role of Carbohydrate Intake on the Gut Microbiome: A Weight of Evidence Systematic Review. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1728, 30 jun. 2023.

MÖRBE, Urs M. *et al.* Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. **Mucosal Immunology**, v. 14, n. 4, p. 793–802, jul. 2021.

MOWAT, Allan M.; AGACE, William W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667–685, 19 out. 2014.

MUGWANDA, Kanganwiro *et al.* Recent advances in genetic tools for engineering probiotic lactic acid bacteria. **Bioscience Reports**, v. 43, n. 1, 31 jan. 2023.

- MÜLLER, Lisa; HATZFELD, Mechthild; KEIL, René. Desmosomes as Signaling Hubs in the Regulation of Cell Behavior. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 23 set. 2021.
- NEUMAN, Hadar *et al.* Antibiotics in early life: dysbiosis and the damage done. **FEMS Microbiology Reviews**, 25 jun. 2018.
- NEUMANN, Mareike *et al.* Deprivation of dietary fiber in specific-pathogen-free mice promotes susceptibility to the intestinal mucosal pathogen *Citrobacter rodentium*. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2021.
- NI, Josephine *et al.* Gut microbiota and IBD: causation or correlation? **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 10, p. 573–584, 19 out. 2017.
- OCHANGCO, Honeylet Sabas *et al.* In vitro investigation of *Debaryomyces hansenii* strains for potential probiotic properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 9, p. 141, 18 set. 2016.
- OKADA, Yoshikiyo *et al.* Novel probiotic yeast from Miso promotes regulatory dendritic cell IL-10 production and attenuates DSS-induced colitis in mice. **Journal of Gastroenterology**, v. 56, n. 9, p. 829–842, 2 set. 2021.
- OLIVEIRA, Tatiane *et al.* Probiotic potential of indigenous yeasts isolated during the fermentation of table olives from Northeast of Portugal. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 44, p. 167–172, dez. 2017.
- OREN, Aharon. On validly published names, correct names, and changes in the nomenclature of phyla and genera of prokaryotes: a guide for the perplexed. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 10, n. 1, p. 20, 11 mar. 2024.
- OTTMAN, Noora *et al.* Pili-like proteins of *Akkermansia muciniphila* modulate host immune responses and gut barrier function. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0173004, 1 mar. 2017.
- OTTRIA, Roberta *et al.* Pre- to Postbiotics: The Beneficial Roles of Pediatric Dysbiosis Associated with Inflammatory Bowel Diseases. **Microorganisms**, v. 12, n. 8, p. 1582, 2 ago. 2024.
- OUWEHAND, A. C. A review of dose-responses of probiotics in human studies. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 2, p. 143–151, 26 abr. 2017.
- OUWERKERK, Janneke P.; DE VOS, Willem M.; BELZER, Clara. Glycobiome: Bacteria and mucus at the epithelial interface. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 27, n. 1, p. 25–38, fev. 2013.
- PAHIRAH, Nichapat *et al.* Comparison of Gut Microbiomes Between Neonates Born by Cesarean Section and Vaginal Delivery: Prospective Observational Study. **BioMed Research International**, v. 2024, n. 1, 28 jan. 2024.
- PAONE, Paola; CANI, Patrice D. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? **Gut**, v. 69, n. 12, p. 2232–2243, dez. 2020.

PATANGIA, Dhatri V. *et al.* Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. **MicrobiologyOpen**, v. 11, n. 1, 13 fev. 2022.

PENNA, Francisco José *et al.* Up-to-date clinical and experimental basis for the use of probiotics. **Journal of Pediatrics**, v. 76, p. 209–217, 2000.

PEREIRA, Hugo *et al.* The gut microbiota-immune-brain axis in a wild vertebrate: dynamic interactions and health impacts. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 10 set. 2024.

PETRUZZIELLO, C. *et al.* The efficacy of a mix of three probiotic strains in reducing abdominal pain and inflammatory biomarkers in acute uncomplicated diverticulitis. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 23, n. 20, p. 9126–9133, out. 2019a.

PETRUZZIELLO, Carmine *et al.* Supplementation with *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 4659 in patients affected by acute uncomplicated diverticulitis: a randomized double-blind placebo controlled trial. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 34, n. 6, p. 1087–1094, 22 jun. 2019b.

PIEWNGAM, Pipat *et al.* Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference. **Nature**, v. 562, n. 7728, p. 532–537, 10 out. 2018.

PILMIS, Benoit; LE MONNIER, Alban; ZAHAR, Jean-Ralph. Gut Microbiota, Antibiotic Therapy and Antimicrobial Resistance: A Narrative Review. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 269, 17 fev. 2020.

PISPAN, S.; HEWITT, C. J.; STAPLEY, A. G. F. Comparison of cell survival rates of *E. coli* K12 and *L. acidophilus* undergoing spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 362–369, out. 2013.

POOPAN, Benjamaporn *et al.* Freeze drying microencapsulation using whey protein, maltodextrin and corn powder improved survivability of probiotics during storage. **Food Science and Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 959–970, 12 mar. 2025.

PSANI, M.; KOTZEKIDOU, P. Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1329–1336, 2006.

QIU, Peng *et al.* The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 22 fev. 2022.

QUARELLA, Sara *et al.* Draft Genome Sequence of the Probiotic Yeast *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399. **Genome Announcements**, v. 4, n. 5, 27 out. 2016.

QUERCIA, Sara *et al.* From lifetime to evolution: timescales of human gut microbiota adaptation. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 4 nov. 2014.

RAETZ, Megan *et al.* Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-Dependent IL-12 Response to *Toxoplasma gondii* Profilin. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 9, p. 4818–4827, 1 nov. 2013.

RAGAB, Mohab *et al.* Azathioprine promotes intestinal epithelial cell differentiation into Paneth cells and alleviates ileal Crohn's disease severity. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 12879, 5 jun. 2024.

RAJPUT, Mrigendra *et al.* Determining the association between gut microbiota and its metabolites with higher intestinal Immunoglobulin A response. **Veterinary and Animal Science**, v. 19, p. 100279, mar. 2023.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 1–7, jan. 2010.

RANDALL, T. D.; MEBIUS, R. E. The development and function of mucosal lymphoid tissues: a balancing act with micro-organisms. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 3, p. 455–466, maio 2014.

REIJNDERS, Dorien *et al.* Effects of Gut Microbiota Manipulation by Antibiotics on Host Metabolism in Obese Humans: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 1, p. 63–74, jul. 2016.

REQUE, Priscilla Magro; BRANDELLI, Adriano. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 1–10, ago. 2021.

RINNINELLA, Emanuele *et al.* What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 14, 10 jan. 2019.

RODOVALHO, Vinícius de Rezende *et al.* Extracellular Vesicles Produced by the Probiotic *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 Mitigate Inflammation by Modulating the NF-κB Pathway. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 7 jul. 2020.

ROMERO, Roberto *et al.* The Role of Inflammation and Infection in Preterm Birth. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 25, n. 1, p. 021–039, jan. 2007.

ROSA, Caio Pupin *et al.* Antibiotic-induced dysbiosis effects on the murine gastrointestinal tract and their systemic repercussions. **Life Sciences**, v. 207, p. 480–491, ago. 2018.

RUPNIK, Maja; WILCOX, Mark H.; GERDING, Dale N. Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 526–536, jul. 2009.

RUSSELL, Shannon L. *et al.* Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. **EMBO reports**, v. 13, n. 5, p. 440–447, 16 maio 2012.

SAFARCHI, Azadeh *et al.* Understanding dysbiosis and resilience in the human gut microbiome: biomarkers, interventions, and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, 4 mar. 2025.

SALLES, Bárbara Izabel Moraes; CIOFFI, Débora; FERREIRA, Sandra Roberta G. Probiotics supplementation and insulin resistance: a systematic review. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 12, n. 1, p. 98, 11 dez. 2020.

SAMBRANI, Roshanak *et al.* Recent advances in the application of probiotic yeasts, particularly *Saccharomyces*, as an adjuvant therapy in the management of cancer with focus on colorectal cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 1, p. 951–960, 3 jan. 2021.

SARAO, Loveleen Kaur; ARORA, M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 344–371, 22 jan. 2017.

SCARPELLINI, Emidio *et al.* From Pre- and Probiotics to Post-Biotics: A Narrative Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 1, p. 37, 21 dez. 2021.

SCHWARZER, Martin *et al.* Germ-Free Mice Exhibit Mast Cells With Impaired Functionality and Gut Homing and Do Not Develop Food Allergy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 12 fev. 2019.

SEGERS, Marijke E.; LEBEER, Sarah. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. Suppl 1, p. S7, 2014.

SEKIROV, Inna *et al.* Gut Microbiota in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 859–904, jul. 2010.

SEN, Swastik; MANSELL, Thomas J. Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. **Fungal Genetics and Biology**, v. 137, p. 103333, abr. 2020.

SHAHAB, Maryam; SHAHAB, Nimra. Coevolution of the Human Host and Gut Microbiome: Metagenomics of Microbiota. **Cureus**, 24 jun. 2022.

SHAN, Yue; LEE, Mirae; CHANG, Eugene B. The Gut Microbiome and Inflammatory Bowel Diseases. **Annual Review of Medicine**, v. 73, n. 1, p. 455–468, 27 jan. 2022.

SHAO, Xiaoqing *et al.* Antibiotic Exposure in Early Life Increases Risk of Childhood Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, 20 jul. 2017.

SHARMA, Garima; IM, Sin-Hyeog. Probiotics as a Potential Immunomodulating Pharmabiotics in Allergic Diseases: Current Status and Future Prospects. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 10, n. 6, p. 575, 2018.

SHEN, Yong *et al.* Evaluation of the Potential Probiotic Yeast Characteristics with Anti-MRSA Abilities. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 28 abr. 2022.

SHIM, Ju A. *et al.* The role of gut microbiota in T cell immunity and immune mediated disorders. **International Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1178–1191, 2023.

SHVETS, Yuliia *et al.* Microbiota substances modulate dendritic cells activity: A critical view. **Heliyon**, v. 10, n. 5, p. e27125, mar. 2024.

SIMÕES, L. A. *et al.* Probiotic properties of yeasts isolated from Brazilian fermented table olives. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 4, p. 1983–1997, 23 out. 2021.

SINGH, Rajan *et al.* Gut Microbial Dysbiosis in the Pathogenesis of Gastrointestinal Dysmotility and Metabolic Disorders. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 27, n. 1, p. 19–34, 30 jan. 2021.

SINGH, Saloni; KOO, Ok Kyung. A Comprehensive Review Exploring the Protective Role of Specific Commensal Gut Bacteria against Salmonella. **Pathogens**, v. 13, n. 8, p. 642, 31 jul. 2024.

SIVAMARUTHI, Bhagavathi Sundaram *et al.* The influence of probiotics on bile acids in diseases and aging. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 128, p. 110310, ago. 2020.

SMITH, Ida M. *et al.* Yeast Modulation of Human Dendritic Cell Cytokine Secretion: An In Vitro Study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96595, 9 maio 2014.

SMITH, Ida M. *et al.* *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces boulardii* Induce Distinct Levels of Dendritic Cell Cytokine Secretion and Significantly Different T Cell Responses In Vitro. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0167410, 29 nov. 2016.

SMITH, Patrick *et al.* Regulation of life span by the gut microbiota in the short-lived African turquoise killifish. **eLife**, v. 6, 22 ago. 2017.

SNIGDHA, Shikha *et al.* Probiotics: Potential novel therapeutics for microbiota-gut-brain axis dysfunction across gender and lifespan. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 231, p. 107978, mar. 2022.

SONG, Xiaoran *et al.* Role of intestinal probiotics in the modulation of lipid metabolism: implications for therapeutic treatments. **Food Science and Human Wellness**, v. 12, n. 5, p. 1439–1449, set. 2023.

STANISZEWSKI, Adam; KORDOWSKA-WIATER, Monika. Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts—Characteristics and Food Application. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1306, 7 jun. 2021.

STEEL, Jennifer H. *et al.* Bacteria and Inflammatory Cells in Fetal Membranes Do Not Always Cause Preterm Labor. **Pediatric Research**, v. 57, n. 3, p. 404–411, mar. 2005.

STERLING, Kathryn G. *et al.* Mucosal Immunity and the Gut-Microbiota-Brain-Axis in Neuroimmune Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 13328, 1 nov. 2022.

STOJANOVIĆ, Ozren *et al.* Dietary excess regulates absorption and surface of gut epithelium through intestinal PPAR α . **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 7031, 2 dez. 2021.

SU, Grace L. *et al.* AGA Clinical Practice Guidelines on the Role of Probiotics in the Management of Gastrointestinal Disorders. **Gastroenterology**, v. 159, n. 2, p. 697–705, ago. 2020.

SUN, Chenyuan *et al.* Advances in probiotic encapsulation methods to improve bioactivity. **Food Bioscience**, v. 52, p. 102476, abr. 2023.

SUN, Rui *et al.* Colonic long-term retention and colonization of probiotics by double-layer chitosan/tannic acid coating and microsphere embedding for treatment of ulcerative colitis and radiation enteritis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 280, p. 135757, nov. 2024.

SURIANO, Francesco *et al.* Diet, microbiota, and the mucus layer: The guardians of our health. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 13 set. 2022.

TAITZ, Jemma J. *et al.* Antibiotic-mediated dysbiosis leads to activation of inflammatory pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 9 jan. 2025.

TANAKA, Masaru; NAKAYAMA, Jiro. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. **Allergology International**, v. 66, n. 4, p. 515–522, out. 2017.

TERPOU, Antonia *et al.* Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1591, 13 jul. 2019.

THINKOHKAEW, Korlid *et al.* Microencapsulation of probiotics in chitosan-coated alginate/gellan gum: Optimization for viability and stability enhancement. **Food Hydrocolloids**, v. 151, p. 109788, jun. 2024.

THUNY, Franck *et al.* Vancomycin Treatment of Infective Endocarditis Is Linked with Recently Acquired Obesity. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. e9074, 10 fev. 2010.

TILG, Herbert *et al.* The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 1, p. 40–54, 6 jan. 2020.

TORRES-SÁNCHEZ, Alfonso *et al.* Exploring Next Generation Probiotics for Metabolic and Microbiota Dysbiosis Linked to Xenobiotic Exposure: Holistic Approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 12917, 26 out. 2022.

TUFAIL, Muhammad Aammar; SCHMITZ, Ruth A. Exploring the Probiotic Potential of *Bacteroides* spp. Within One Health Paradigm. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 8 out. 2024.

TULSTRUP, Monica Vera-Lise *et al.* Antibiotic Treatment Affects Intestinal Permeability and Gut Microbial Composition in Wistar Rats Dependent on Antibiotic Class. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0144854, 21 dez. 2015.

VALDES, Ana M. *et al.* Role of the gut microbiota in nutrition and health. **BMJ**, p. k2179, 13 jun. 2018.

VALLEJOS, Omar P.; BUENO, Susan M.; KALERGIS, Alexis M. Probiotics in inflammatory bowel disease: microbial modulation and therapeutic prospects. **Trends in Molecular Medicine**, jan. 2025.

VAN DER POST, Sjoerd *et al.* Structural weakening of the colonic mucus barrier is an early event in ulcerative colitis pathogenesis. **Gut**, v. 68, n. 12, p. 2142–2151, dez. 2019.

VAN SON, Jamie *et al.* The Role of the Gut Microbiota in the Gut–Brain Axis in Obesity: Mechanisms and Future Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 2993, 15 mar. 2021.

VANCAMELBEKE, Maaïke; VERMEIRE, Séverine. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 9, p. 821–834, 2 set. 2017.

VANDENPLAS, Yvan *et al.* Factors affecting early-life intestinal microbiota development. **Nutrition**, v. 78, p. 110812, out. 2020.

VARGHESE, Sanish *et al.* Physical Exercise and the Gut Microbiome: A Bidirectional Relationship Influencing Health and Performance. **Nutrients**, v. 16, n. 21, p. 3663, 28 out. 2024.

VERNOCCHI, Pamela; DEL CHIERICO, Federica; PUTIGNANI, Lorenza. Gut Microbiota Metabolism and Interaction with Food Components. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 3688, 23 maio 2020.

VINAYAMOHAN, Poonam *et al.* Efficacy of Probiotics in Reducing Pathogenic Potential of Infectious Agents. **Fermentation**, v. 10, n. 12, p. 599, 24 nov. 2024.

VRANCKEN, Gino *et al.* Synthetic ecology of the human gut microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 754–763, 2 dez. 2019.

VRIEZE, Anne *et al.* Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. **Journal of Hepatology**, v. 60, n. 4, p. 824–831, abr. 2014.

WANG, Kuiyou *et al.* Microfluidic Strategies for Encapsulation, Protection, and Controlled Delivery of Probiotics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 72, n. 27, p. 15092–15105, 10 jul. 2024a.

WANG, Xinzhou; ZHANG, Peng; ZHANG, Xin. Probiotics Regulate Gut Microbiota: An Effective Method to Improve Immunity. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 6076, 8 out. 2021.

WANG, Yan *et al.* Angiogenesis, a key point in the association of gut microbiota and its metabolites with disease. **European Journal of Medical Research**, v. 29, n. 1, p. 614, 23 dez. 2024b.

WEI, Juan *et al.* Muc2 mucin o-glycosylation interacts with enteropathogenic *Escherichia coli* to influence the development of ulcerative colitis based on the NF- κ B signaling pathway. **Journal of Translational Medicine**, v. 21, n. 1, p. 793, 8 nov. 2023.

WIEËRS, Grégoire *et al.* How Probiotics Affect the Microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 15 jan. 2020.

WU, Qingwei *et al.* Interacting roles of gut microbiota and T cells in the development of autoimmune hepatitis. **Frontiers in Immunology**, v. 16, 26 maio 2025.

XIE, Aijun *et al.* Polysaccharides, proteins, and their complex as microencapsulation carriers for delivery of probiotics: A review on carrier types and encapsulation techniques. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, p. 124784, jul. 2023.

YAMAMOTO-HANADA, Kiwako *et al.* Influence of antibiotic use in early childhood on asthma and allergic diseases at age 5. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 119, n. 1, p. 54–58, jul. 2017.

YAN, Fang; POLK, D. B. Probiotics and immune health. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 27, n. 6, p. 496–501, nov. 2011.

YAN, Ruochen *et al.* Intestinal tissue-resident memory T cells: Characteristics, spatial heterogeneity, age-related dynamics, and roles in disease regulation. **Journal of Advanced Research**, mar. 2025.

YANG, Sen; LIU, Hanmin; LIU, Yang. Advances in intestinal epithelium and gut microbiota interaction. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, 4 mar. 2025.

YANG, Shoufeng *et al.* Encapsulation techniques, action mechanisms, and evaluation models of probiotics: Recent advances and future prospects. **Food Frontiers**, v. 5, n. 3, p. 1212–1239, 27 maio 2024.

YAO, Mingfei *et al.* Progress in microencapsulation of probiotics: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 2, p. 857–874, 11 mar. 2020.

YAO, Yao *et al.* The Role of Microbiota in Infant Health: From Early Life to Adulthood. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 7 out. 2021.

YOHA, K. S. *et al.* Targeted Delivery of Probiotics: Perspectives on Research and Commercialization. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, n. 1, p. 15–48, 27 fev. 2022.

YOUN, Hye-Young *et al.* Effect of postbiotics derived from kefir lactic acid bacteria-mediated bioconversion of citrus pomace extract and whey on high-fat diet-induced obesity and gut dysbiosis. **Food Research International**, v. 162, p. 111930, dez. 2022.

YU, Yanbo *et al.* Enteroendocrine Cells: Sensing Gut Microbiota and Regulating Inflammatory Bowel Diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 26, n. 1, p. 11–20, 1 jan. 2020.

YÜKSEL, Ecem; VORAGEN, Alphons G. J.; KORT, Remco. The pectin metabolizing capacity of the human gut microbiota. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–23, 12 set. 2024.

ZENG, Yuan *et al.* Crosstalk between glucagon-like peptide 1 and gut microbiota in metabolic diseases. **mBio**, v. 15, n. 1, 16 jan. 2024.

ZHANG, Qiuyu *et al.* Antibiotic-Induced Gut Microbiota Dysbiosis Damages the Intestinal Barrier, Increasing Food Allergy in Adult Mice. **Nutrients**, v. 13, n. 10, p. 3315, 23 set. 2021.

ZHANG, Wen; ARTIS, David. Stressing out the intestinal microbiota via a brain-neuroglandular circuit. **Cell Research**, 26 nov. 2024.

ZHANG, Ye *et al.* Gut Commensal *Barnesiella Intestinihominis* Ameliorates Hyperglycemia and Liver Metabolic Disorders. **Advanced Science**, v. 12, n. 8, 31 fev. 2025.

ZHAO, Xia *et al.* Response of Gut Microbiota to Metabolite Changes Induced by Endurance Exercise. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 20 abr. 2018.

ZHENG, Yanfei *et al.* Probiotics fortify intestinal barrier function: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 24 abr. 2023.

ZHOU, Rui *et al.* The effects of microcapsules with different protein matrixes on the viability of probiotics during spray drying, gastrointestinal digestion, thermal treatment, and storage. **eFood**, v. 4, n. 4, 12 ago. 2023.