PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL

KAROLINNY CRISTINY DE OLIVEIRA VIEIRA

ANÁLISE DA INTERAÇÃO PÓS-BIÓTICO COM BIOSSENSOR E EFEITOS DE NANOCOMPOSTO PROBIÓTICO NA INFLAMAÇÃO INTESTINAL

Presidente Prudente - SP
2025

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL

KAROLINNY CRISTINY DE OLIVEIRA VIEIRA

ANÁLISE DA INTERAÇÃO PÓS-BIÓTICO COM BIOSSENSOR E EFEITOS DE NANOCOMPOSTO PROBIÓTICO NA INFLAMAÇÃO INTESTINAL

Tese de Doutorado apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia e Saúde Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora:
Profª. Drª Lizziane Kretli Winkelströter Eller

Presidente Prudente - SP
2025

636.089 Vieira, Karolinny Cristiny de Oliveira.
V657a Análise da interação pós-biótico com biossensor e efeitos de nanocomposto probiótico na inflamação intestinal / Karolinny Cristiny de Oliveira Vieira. – Presidente Prudente, 2025.
79 f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal) – Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2025.
Bibliografia.
Orientador: Lizziane Kretli Winkelströter Eller.

1. Biossensor. 2. Nanocomposto. 3. Inflamação intestinal. I. Título.

Catalogação na fonte: Michele Mologni – CRB 8-6204

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ANÁLISE DA INTERAÇÃO PÓS-BIÓTICO COM BIOSENSOR E EFEITOS DE NANOCOMPOSTO PROBIÓTICO NA INFLAMAÇÃO INTESTINAL"
AUTOR(A): KAROLINNY CRISTINY DE OLIVEIRA VIEIRA
ORIENTADOR(A): Profa. Dra. LIZZIANE KRETLI WINKELSTRÖTER ELLER

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR(A) em FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL
Área de Concentração FISIOPATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LIZZIANE KRETLI WINKELSTRÖTER ELLER
UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Profa. Dra. ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA
UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Profa. Dra. VALÉRIA CATANELI PEREIRA
UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Profa. Dra. JÉSSICA FREIRE FEITOR
Wyss Institute - Harvard University - Boston-MA / Estados Unidos

Prof. Dr. CAÍQUE DE FIGUEIREDO
USP - Universidade de São Paulo - Instituto de Ciências Biomédicas / São Paulo (SP)

Data da realização: Presidente Prudente, 09 de maio de 2025.

URL do documento: https://www.unoeste.br/ca/d013a108
Assinatura digital do documento: 3546e3cdd40cf6ced44b3492927129cc49f2a8f22eda4bebe600e5df0294c537

Central de Assinaturas Eletrônicas

Sobre o documento

Assunto: Documento eletrônico
Status do documento: Concluído
Data de criação do documento: 13/05/2025 09:17
Fuso horário: (UTC-03:00) Brasília
Número de assinaturas: 5
Solicitante: KEID RIBEIRO KRUGER (#6125078)

Signatários do documento

ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (COORDENADOR DE CURSO)
rosa@unoeste.br
Recebido em 13/05/2025 09:17
Assinado em 13/05/2025 09:58
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.131.39.1
ID da assinatura: 4829344

LIZZIANE KRETLI WINKELSTROTER ELLER (PROFESSOR)
lizziane@unoeste.br
Recebido em 13/05/2025 09:17
Assinado em 13/05/2025 13:06
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 2804:7f0:90b2:a522:4d1a:48b9:6d6f:430a
ID da assinatura: 4829343

VALERIA CATANELI PEREIRA (PROFESSOR)
valeriapereira@unoeste.br
Recebido em 13/05/2025 09:17
Assinado em 13/05/2025 10:09
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.131.39.1
ID da assinatura: 4829345

CAIQUE DE FIGUEIREDO (SIGNATÁRIO EXTERNO)
caiquefigueiredo22@gmail.com
Recebido em 13/05/2025 09:17
Assinado em 13/05/2025 10:39
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 143.107.20.168
ID da assinatura: 4829347

JESSICA FREIRE FEITOR (SIGNATÁRIO EXTERNO)
jessicafrefe@gmail.com
Recebido em 13/05/2025 09:17
Assinado em 13/05/2025 15:49
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 134.174.140.94
ID da assinatura: 4829346

DEDICATÓRIA

Dedico este título de doutora a Deus, e quais forem as palavras de agradecimento ou dedicatória que eu utilizar, elas estarão muito abaixo do que Deus fez e ainda fará em minha vida.

Acredito que pra tudo tem um propósito, e há um tempo determinado para todo propósito debaixo do céu. Foram nos pequenos e simples detalhes que vivi de Sua grandeza em minha vida durante esses quatro anos de doutorado. nEle depoisitei, através de orações, todas as fraquezas, inseguranças e medos, e assim, tudo me foi respondido para mais uma vez confiar. Dedico à Ele, pois, me tornei forte e corajosa, minha fé foi forjada e aumentada, e, foi através de sua graça, tive a capacidade de me tornar quem me tornei hoje.

Dedico a minha família, pelo amor e motivação que me deram no decorrer desta trajetória, acreditando em minha capacidade para que eu pudesse tornar este sonho real. Aos meus pais, Cláudio e Verônica, que sempre me ensinaram e guiaram no caminho que se deve andar. À minha irmã e cunhado, Kawanny e Arthur, por me encorajarem e insistirem em alcançar meus objetivos. Ao meu noivo, Emmanuel, que sempre me apoiou com amor e paciência em cada etapa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que até aqui me sustentou, me tornando uma pessoa grata e fortalecida na fé diante das experiências vividas ao longo desses anos.

À minha mãe, pelos dias persistentes de oração, alguém que sabe abraçar e me encorajar, me fazendo crer no melhor de Deus pra minha vida.

Ao meu pai, que cooperou para minha vitória através de suas sábias palavras, sempre de prontidão para me consolar e exercendo com honra seu papel de Pai durante minha trajetória.

À minha irmã e meu cunhado, que sempre me apoiam em cada decisão, torcem pelo meu sucesso e me inspiram na caminhada profissional.

Ao meu noivo, que com tanto amor me ajudou a acreditar que tudo seria possível, sendo calmaria nos dias de agitação e suporte em todos os momentos.

À minha orientadora, Dra. Lizziane Eller, que com tanta generosidade me ensinou e auxiliou em cada detalhe da pesquisa, despertou em mim o interesse de aprofundar os conhecimentos e me mostrou a capacidade que eu tinha para alcançar cada conquista. Lizzi, você se tornou uma amiga muito especial, alguém que tenho como referência profissional e também como pessoa. Obrigada por tudo, por acreditar em mim.

Aos meus amigos de laboratório, pessoas excepcionais e que se tornaram muito especiais durante minha passagem pela pós-graduação. Meire Correia, Letícia Gervasoni, Duda Ferraz, Thiago Neves e Kimberlly Oliveira, muito obrigada.

À todos aqueles que se disponibilizaram e contribuíram nas coletas de dados de minha tese, em especial a Maria Alves (Laboratório de Microbiologia e Imunologia – Unoeste/Campus I) Gracielle Vieira Gonçalves (Biotério Central – Unoeste/Campus II), Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino e Dr. Gilia Ruiz (Unesp – Presidente Prudente), e aos alunos de iniciação científica, Rafael Tonzar, Juliany Pissutti, Gabriela Lopes e Fernando Marins.

À coordenação do curso de Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal, Dr. Anthony Castilho e Dra. Cecília Laposy. Ao professor Dr. Leonardo Mendes. À secretária Keid Kruger.

Agradeço imensamente a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES pela bolsa concedida a mim, tanto para cursar o Doutorado no Brasil, quanto para realizar o Doutorado Sanduíche nos Estados Unidos, proporcionando-me oportunidades únicas de estudo e pesquisa.

Agradeço ainda pelo apoio e financiamento dado pela Fundação de Pesquisa de São Paulo – FAPESP (n° do processo 2022/11913-6 e 2018/22214-6).

Finalizo mais uma etapa importante da minha vida, e com imensa gratidão e amor que digo: Obrigada, Jesus!

“Mas aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam alto como águias; correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam”.

(Isaías 40:31)

RESUMO

Análise da interação pós-biótico com biossensor e efeitos de nanocomposto probiótico na inflamação intestinal

Esta tese está estruturada em dois capítulos e explora diferentes abordagens terapêuticas para a proteção intestinal, com foco no uso de nanocompostos probióticos e na relação entre pós-bióticos e biossensores na inflamação intestinal. O primeiro capítulo é uma revisão de literatura que discute a interação entre pós-bióticos e biossensores, abordando como os pós-bióticos, produzidos por probióticos, podem ser utilizados na detecção de biomarcadores inflamatórios e na promoção de efeitos terapêuticos. Além disso, a revisão destaca o potencial dos biossensores como ferramentas diagnósticas no monitoramento da inflamação intestinal e a importância da integração de tecnologias avançadas para o desenvolvimento de sistemas que permitam um diagnóstico rápido e um acompanhamento contínuo da saúde intestinal em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal (DII). O segundo capítulo investiga o efeito de nanocompostos de quitosana combinados com *Pediococcus acidilactici* CE51 na proteção contra lesões intestinais causadas pela indometacina em camundongos. O nanocomposto foi produzido por geleificação iônica e caracterizado quanto ao potencial zeta (-7,86 mV), PdI (0,513±0,05) e diâmetro médio (358±18,38 nm). A estabilidade do composto foi testada nas fases oral, gástrica e intestinal da digestão. Os resultados mostraram que o nanocomposto combinado com *P. acidilactici* CE51 promoveu uma redução significativa nos danos intestinais e hepáticos em comparação ao grupo exposto apenas à indometacina, além de melhorar os parâmetros bioquímicos, como a diminuição dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e ureia.

Palavras-chave: Biossensor, Pós-biótico, Nanocomposto, Probiótico, Inflamação Intestinal.

ABSTRACT

Analysis of postbiotic interaction with biosensor and effects of probiotic nanocomposite on intestinal inflammation

This thesis is structured in two chapters and explores different therapeutic approaches for gut protection, focusing on the use of probiotic nanocomposites and the relationship between postbiotics and biosensors in gut inflammation. The first chapter is a literature review that discusses the interaction between postbiotics and biosensors, addressing how postbiotics, produced by probiotics, can be used in the detection of inflammatory biomarkers and in the promotion of therapeutic effects. In addition, the review highlights the potential of biosensors as diagnostic tools in monitoring gut inflammation and the importance of integrating advanced technologies for the development of systems that allow rapid diagnosis and continuous monitoring of gut health in patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD). The second chapter investigates the effect of chitosan nanocomposites combined with *Pediococcus acidilactici* CE51 on protection against intestinal lesions caused by indomethacin in mice. The nanocomposite was produced by ionic gelling and characterized for zeta potential (-7.86 mV), PdI (0.513±0.05) and mean diameter (358±18.38 nm). The stability of the compound was tested in the oral, gastric and intestinal phases of digestion. The results showed that the nanocomposite combined with *P. acidilactici* CE51 promoted a significant reduction in intestinal and liver damage compared to the group exposed to indomethacin alone, in addition to improving biochemical parameters, such as the decrease in serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and urea.

Keywords: Biosensor, Postbiotic, Nanocomposite, Probiotic, Intestinal Inflammation.

LISTA DE SIGLAS

AGCCs	– Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AINEs	– Anti-inflamatórios não esteroides
ALT	– Alanina Aminotransferase
ASCA	– Anticorpos anti- *Saccharomyces cerevisiae*
AST	– Aspartato Aminotransferase
AVC	– Acidente Vascular Cerebral
CEUA	– Comitê de Ética de Uso de Animais
CMC	– Carboxilmetilcelulose
COX2	– Ciclooxigenase-2
CsNPs	– Nanocompostos de Quitosana
DCV	– Doença Cardiovascular
DII	– Doença Inflamatória Intestinal
DLS	– Dispersão Dinâmica de Luz
DSS	– Sulfato de Sódio de Dextrano
ELISA	– Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EPS	– Exopolissacarídeos
FDA	– Food and Drug Administration
GI	– Gastrointestinal
HE	– Hematoxilina-eosina
I	– Indometacina
IA	– Inteligência Artificial
IAD	– Índice de Atividade da Doença
IAP	– Fosfatase Alcalina Intestinal
IgE	– Imunoglobulina E
IN	– Indometacina + Nanocomposto
INP	– Indometacina + Nanocomposto + Probiótico
IP	– Indometacina + Probiótico
IS	– Indometacina + Sulfassalazina
LPS	– Lipopolissacarídeos
LTF	– Lactoferrina
MIPs	– Polímeros Impressos Molecularmente
ML	– Machine Learning
MMP-9	– Metaloproteinase da matriz-9
MPO	– Mieloperoxidase
MRSA	– *Staphylococcus aureus* restistente à meticilina
NPs	– Nanopartículas

LISTA DE SIGLAS

OGMs	– Organismos Geneticamente Modificados
p-ANCA	– Anticorpos Anticitoplasma De Neutrófilos Perinucleares
PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase
PdI	– Índice de Polidispersividade
pH	– Potencial Hidrogeniônico
QS	– *Quorum Sensing*
RIA	– Radioimunoensaio
SPR	– Ressonância de Plásmon de Superfície
ST2	– Supressão da tumorigenicidade 2
TGI	– Trato Gastrointestinal
TLRs	– Toll-like
TNFAIP6	– Proteína 6 induzida pelo fator de necrose tumoral alfa
TNF-α	– Fator de Necrose Tumoral
TPP	– Tripolifosfato
Tregs	– Células T Reguladoras
VHS	– Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

ARTIGO A- INTERAÇÃO PÓS-BIÓTICO COM BIOSSENSOR: NOVAS ABORDAGENS PARA O MONITORAMENTO DA SAÚDE INTESTINAL..... 14

ARTIGO B- DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPOSTO DE QUITOSANA ASSOCIADO A ISOLADO COM POTENCIAL PROBIÓTICO *Pediococcus acidilactici* CE51 E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO NO DANO INTESTINAL EM MODELO ANIMAL..... 44

ANEXO A- PARECER FINAL DO COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) E DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA)..... 74

ANEXO B- INSTRUÇÕES PARA AUTORES DA C*RITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION*..... 75

ANEXO C- INSTRUÇÕES PARA AUTORES DA *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE*..... 78

ARTIGO A – REVISÃO DE LITERATURA: A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA *CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION*

Interação pós-biótico com biossensor: Novas abordagens para o monitoramento da saúde intestinal

Karolinny Cristiny de Oliveira Vieira[3], Letícia Franco Gervasoni[3], Lucimeire Fernandes Correia[3], Kimberlly de Oliveira Silva[2], Erika Kushikawa Saeki[4], Lizziane Kretli Winkelstroter [1,2,3]

[1] Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil

[2] Mestrado em Ciências da Saúde - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil

[3]Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil

[4] Regional Laboratory of Presidente Prudente, Adolfo Lutz Institute, Presidente Prudente, SP, Brazil

Contato: Karolinny Cristiny de Oliveira Vieira. E-mail: karow.vieira@hotmail.com. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

Resumo

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são condições crônicas caracterizadas por inflamação persistente no trato gastrointestinal (TGI), afetando milhões de indivíduos. Embora sua etiologia varie, o desenvolvimento está intimamente ligado à disbiose da microbiota intestinal. Essas condições podem resultar em manifestações clínicas graves e apresentar desafios significativos na precisão diagnóstica e no seu monitoramento. Manter a homeostase da microbiota intestinal é fundamental para preservar a saúde e regular as interações hospedeiro-microbiota no TGI. Consequentemente, a detecção precoce de microrganismos patogênicos na mucosa intestinal é essencial para prevenir a disbiose e patologias associadas. Assim, métodos práticos são necessários para diagnóstico da inflamação intestinal e avaliar a eficácia dos tratamentos. Desta maneira, surgiu um interesse significativo na aplicação de probióticos para a detecção *in situ* de condições intestinais adversas. A capacidade das bactérias probióticas de resistir a condições de TGI, bem como de identificar e responder a sinais ambientais específicos, são características atrativas para a sua potencial aplicação no desenvolvimento de biossensores capazes de identificar biomarcadores associados a essas doenças. Os probióticos secretam substâncias conhecidas como "pós-bióticos". Esses componentes já foram discutidos na literatura como potenciais estratégias terapêuticas devido à sua vida útil prolongada, maior biodisponibilidade para as células-alvo e benefícios à saúde do hospedeiro. Assim, os probióticos podem ser incorporados em sistemas biotecnológicos, como biossensores, para detectar biomarcadores de inflamação *in situ* e mediar efeitos terapêuticos por meio da produção pós-biótica. Nesse contexto, ferramentas de diagnóstico miniaturizadas, como biossensores, oferecem alternativas rápidas, precisas e eficientes. Esta revisão investiga o papel dos pós-bióticos na sinergia com biossensores para a detecção e tratamento da inflamação intestinal. Além disso, examina a importância e os avanços recentes dos biossensores no monitoramento da microbiota intestinal, juntamente com os desafios e perspectivas futuras associados ao uso de biossensores probióticos e seus metabólitos pós-bióticos em aplicações terapêuticas.

Palavras-chave: Biossensor, Probiótico, Pós-biótico, Inflamação Intestinal.

Introdução

O sistema gastrointestinal (GI) desempenha funções vitais para o organismo, tais como absorção e digestão de nutrientes, equilíbrio de fluídos, barreira mecânica e ação imune (Oliver et al, 2024; Sharkey e Mawe, 2022; Shao et al, 2021). Nesse contexto, a microbiota intestinal possui um papel relevante pois são responsáveis pela modulação da função imunológica e manutenção da barreira intestinal, conferindo assim proteção (Shan et al, 2023). Disbiose é o termo empregado quando se tem alterações da biodiversidade que compõe a microbiota intestinal, sendo este o motivo mais associado ao desenvolvimento, evolução e progressão da Doença Inflamatória Intestinal (DII) (Lee e Chang, 2020; Haneishi et al, 2023).

A DII é uma patologia crônica, debilitante e incurável, definida por uma inflamação imunomediada que agride principalmente o intestino, porém, pode acometer outros tecidos que compõem o trato gastrointestinal (TGI) (M'Koma, 2022; Matsuoka et al, 2018; Singh e Bernstein, 2022). Estima-se que em todo mundo mais de 7 milhões de indivíduos convivem com a DII. Embora sua etiologia permaneça controversa, estudos demostram alterações significativas na microbiota destes pacientes, bem como o redução de espécies e metabólitos com potencial anti-inflamatório, (Zheng et al, 2024; Shan et al, 2021; Liu et al, 2020). O diagnóstico da DII ainda é um desafio, atualmente sendo baseado na sintomatologia clínica do paciente, exames laboratoriais e achados de imagem. Dentre estes, podemos citar a colonoscopia, entretanto, é um exame que gera um diagnóstico tardio e ambíguo, o que implica em piora da qualidade de vida para o paciente (Matsuoka et al, 2018; Lv et al, 2024; M'Koma, 2022; Vălean et al, 2024). Com isso, estudos indicam a necessidade de novas tecnologias diagnósticas não invasivas para a DII, visando o diagnóstico precoce, preciso, sem causar constrangimento e desconforto ao paciente (Lv et al, 2024).

A tecnologia de biossensores é uma técnica não invasiva que tem se tornado alvo de estudos para a detecção da DII, pois é inovadora, além de apresentar alta sensibilidade e especificidade para identificação de biomarcadores (Zhang et al, 2024). Dentre a ampla gama de tipos de biossensores que tem surgido, os biossensores microbianos tem atraído interesse por ser uma opção simples e de custo reduzido. Esse fato está associado às características das espécies bacterianas utilizadas para seu desenvolvimento, assim como os biossensores ingeríveis, que apresentam vantagem por monitorar o sistema GI em tempo real por meio da identificação dos metabólitos produzidos pela microbiota (Capin et al, 2024; Marchianò et al, 2025).

Dentre os microrganismos utilizados, devem ser ressaltados os probióticos. Os probióticos são microrganismos vivos que possuem ação no sistema imune, atuam como anti-

inflamatório e é capaz de restaurar a barreira intestinal, dificultando desta forma a instalação de microrganismos patogênicos. Além disso, há de se notar que os probióticos possuem a capacidade de resistir às condições impostas pelo TGI. Os pós-bióticos por sua vez são subprodutos gerados pelos probióticos e tem ganhado cada vez mais relevância por serem seguros, possuírem maior biodisponibilidade e estabilidade (Liu et al, 2020; Scott et al, 2022; Thorakkattu et al, 2022).

Portanto, tendo em vista os benefícios oferecidos pelos probióticos e pós-bióticos juntamente com a sua aplicação nos biossensores microbianos, o presente artigo visa discutir essa nova biotecnologia com intuito de detectar os biomarcadores produzidos pela DII *in situ*, tendo em vista não apenas o diagnóstico e monitoramento, como também o tratamento precoce da doença.

Pós-bióticos: Conceito, Mecanismo de Ação e Composição

Os pós-bióticos tem sido reconhecidos como uma alternativa terapêutica com o potencial de impactar positivamente a saúde humana. São definidos como produtos ou compostos resultantes da fermentação bacteriana, incluindo fragmentos celulares, peptidoglicanos, lipopolissacarídeos (LPS) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Desta forma, eles têm sido amplamente explorados por sua capacidade de modular a microbiota intestinal, influenciar a resposta imunológica e promover efeitos protetores em diversos sistemas do corpo humano (Filidou et al, 2024; Bäuerl et al, 2020; Żółkiewicz et al, 2020).

Além da grande diversidade, é notado também que os pós-bióticos podem ter efeitos sinérgicos na manutenção do equilíbrio microbiano e na promoção da saúde intestinal (Filidou et al, 2024; Żółkiewicz et al, 2020). Ao contrário dos probióticos, que envolvem o uso de microrganismos vivos, os pós-bióticos oferecem um perfil de segurança aprimorado, uma vez que não há exposição direta a microrganismos vivos. Este aspecto de segurança é particularmente importante em populações vulneráveis, como crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos, onde a utilização de microrganismos vivos pode representar riscos (Bäuerl et al, 2020; Żółkiewicz et al, 2020). Além disso, recentemente foi demonstrado que biossensores podem detectar de forma mais precisa os efeitos de pós-bióticos em tempo real, permitindo intervenções terapêuticas personalizadas (Khani et al, 2024).

Os pós-bióticos são compostos derivados de diversas espécies bacterianas, como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium prausnitzii* e *Roseburia* spp. (Żółkiewicz et al, 2020; Bäuerl et al, 2020, Pyclik et al, 2020). Esses componentes bioativos têm efeitos distintos, dependendo da sua origem bacteriana e da resposta do hospedeiro. Por exemplo, os

exopolissacarídeos (EPS), polissacarídeos produzidos por várias espécies bacterianas, podem formar uma camada protetora na superfície intestinal, ajudando a modular a microbiota e a proteger o epitélio intestinal contra agentes patogênicos (Filidou et al, 2024). Os peptidoglicanos, compostos da parede celular de várias bactérias, interagem com os receptores do sistema imunológico, como os receptores Toll-like (TLRs), desempenhando um papel crucial na regulação da resposta imunológica. Esses compostos podem atuar tanto de forma anti-inflamatória quanto pró-inflamatória, dependendo do contexto e da composição da microbiota intestinal (Żółkiewicz et al, 2020; Mehta et al, 2023).

Um dos principais componentes dos pós-bióticos são os AGCCs, que incluem butirato, propionato e acetato. Esses compostos são produzidos pela fermentação de fibras dietéticas pelas bactérias intestinais e desempenham um papel vital na saúde intestinal, influenciando a motilidade intestinal, a regeneração celular e a manutenção da integridade da barreira intestinal (Jung et al, 2022; Bäuerl et al, 2020).

O butirato, por exemplo, é um regulador chave da função intestinal e possui efeitos anti-inflamatórios poderosos, além de ser uma importante fonte de energia para as células epiteliais intestinais. O butirato também tem se mostrado eficaz na proteção contra DIIs, como a Doença de Crohn, ao induzir a expressão de genes anti-inflamatórios e promover a regeneração da mucosa intestinal (Bäuerl et al, 2020). A detecção dos níveis de AGCCs por biossensores oferece uma maneira eficaz de avaliar o impacto dos pós-bióticos na saúde intestinal e seu papel na manutenção da função intestinal saudável (Vrzáčková et al, 2021; Żółkiewicz et al, 2020).

Além dos AGCCs, os pós-bióticos também incluem proteínas e enzimas bacterianas, como as muramidases P40 e P75, que têm efeitos benéficos sobre o epitélio intestinal. Essas proteínas associadas às vesículas extracelulares de *Lactobacillus casei* têm propriedades que modulam respostas inflamatórias e contribuem para a homeostase intestinal (Bäuerl et al, 2020). Entretanto, o grande destaque da ação dos pós-bióticos é a modulação do sistema imunológico, efeitos antimicrobianos e impactos na saúde intestinal. Um dos mecanismos mais amplamente reconhecidos é o efeito imunomodulador, que envolve a indução de células T reguladoras (Tregs), que desempenham um papel crucial na prevenção de reações autoimunes e inflamatórias. Compostos como o butirato, propionato e acetato não só modulam a função do sistema imune, mas também influenciam a expressão gênica das células imunes, o que ajuda a restabelecer o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 (Żółkiewicz et al, 2020; Yilmaz, 2024). Além disso, os pós-bióticos modulam a produção de citocinas anti-inflamatórias e a ativação de linfócitos Th2, resultando em uma diminuição das respostas

mediadas por Th1, o que é benéfico em condições de doenças atópicas e inflamatórias (Bäuerl et al, 2020, Anhê et al, 2022).

Outro mecanismo importante de ação dos pós-bióticos é a prevenção de infecções. Alguns deles demonstram propriedades antimicrobianas diretas, seja selando a barreira intestinal, alterando a expressão genética do hospedeiro ou competindo por locais de aderência com patógenos. Por exemplo, a combinação de pós-bióticos e probióticos foi eficaz na prevenção da diarreia associada ao rotavírus, demonstrando seu potencial para melhorar a função da barreira intestinal (Żółkiewicz et al, 2020; Zhong et al, 2024). Além disso, outros pós-bióticos, como proteínas bacterianas e fragmentos celulares, podem aumentar a produção de mucinas, reforçando a proteção da mucosa intestinal contra microrganismos patogênicos (Mehta et al, 2023).

Essas propriedades também têm mostrado eficácia em proteger contra infecções respiratórias e gastrointestinais. A interação pós-biótico com biossensor permite o monitoramento da resposta do sistema imunológico e da barreira intestinal em tempo real, possibilitando a avaliação da eficácia desses compostos na proteção contra infecções (Filidou et al, 2024; Bäuerl et al, 2020).

A indução de efeitos antitumorais por pós-bióticos está sendo amplamente estudada. Compostos como propionato, produzido por várias espécies bacterianas, têm mostrado potencial para reduzir a proliferação de células tumorais e melhorar os tratamentos contra cânceres intestinais (Qureshi et al, 2024). A indução da apoptose em células cancerígenas por compostos como o propionato, bem como a regulação de oncogenes por modificações epigenéticas, são aspectos relevantes que podem contribuir para a prevenção e tratamento de cânceres, especialmente relacionados ao trato gastrointestinal (Żółkiewicz et al, 2020). O uso de biossensores para detectar mudanças nos níveis de compostos pós-bióticos no organismo pode fornecer insights valiosos sobre os mecanismos de ação antitumoral e acelerar o desenvolvimento de terapias baseadas em pós-bióticos (Vrzáčková et al, 2021; Yilmaz, 2024; Jung et al, 2022).

Disbiose, Inflamação Intestinal e Biomarcadores de Inflamação Intestinal

A microbiota intestinal desempenha um papel crucial na homeostase do hospedeiro, influenciando processos metabólicos, imunológicos e neurológicos. A disbiose, definida como um desequilíbrio qualitativo ou quantitativo na composição microbiana, tem sido associada a diversas DIIs, incluindo a Colite Ulcerativa e a Doença de Crohn. Esse desequilíbrio pode resultar de fatores como dieta inadequada, uso excessivo de antibióticos, estresse crônico e

predisposição genética, levando a alterações na interação entre o microbioma e o sistema imunológico do hospedeiro (Tsai et al, 2019; Pires et al, 2024; Ma et al, 2024).

Estudos sugerem que a redução de bactérias benéficas, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, e o aumento de microrganismos potencialmente patogênicos, como certas cepas de *Escherichia coli* e *Clostridium*, podem contribuir para um fenômeno de inflamação persistente na mucosa intestinal. Além disso, essa alteração na ecologia intestinal pode comprometer a produção de metabólitos benéficos, como os AGCCs, essenciais para a manutenção da integridade da barreira intestinal e da resposta imunológica (Mostafavi e Zhou, 2024; Tie et al, 2023; Lê et al, 2022).

A disbiose pode afetar o eixo intestino-cérebro, influenciando processos cognitivos e emocionais, potencialmente exacerbando doenças neuroinflamatórias e distúrbios psiquiátricos (El Baassiri et al, 2024; Reyes-Martínez et al, 2023). Além disso, também pode estar relacionada ao desenvolvimento de doenças sistêmicas, uma vez que ocorre a translocação de bactérias nocivas para a circulação sanguínea e pode desencadear uma resposta inflamatória crônica em outros orgãos (Ottria et al, 2024; Xu et al, 2024; Ma at el, 2024).

A disbiose intestinal está fortemente associada à ativação exacerbada do sistema imunológico inato e adaptativo, levando à produção desregulada de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-6 e IL-1β. Esse processo inflamatório crônico contribui para a progressão de DIIs e pode comprometer a função da barreira epitelial intestinal, favorecendo o aumento da permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana (Tie et al, 2023; Piccioni et al, 2024; Ma et al, 2024).

Um dos mecanismos-chave que ligam a disbiose à inflamação intestinal é a ativação dos receptores TLRs, que reconhecem padrões moleculares associados a microrganismos patogênicos. A ativação excessiva dos TLRs leva à ativação de macrófagos inflamatórios do subtipo M1, exacerbando a resposta imune e promovendo danos teciduais na mucosa intestinal. Estudos recentes destacam que certas cepas probióticas, como *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*, podem modular essa resposta, promovendo a polarização de macrófagos M1 para o subtipo anti-inflamatório M2 (Tsai et al, 2019; Lê et al, 2022; Ma et al, 2024).

Ademais, a interação entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico envolve a produção de metabólitos microbianos, como AGCCs e EPS, que podem exercer efeitos imunomodulatórios, reduzindo a expressão de citocinas inflamatórias e reforçando a integridade da barreira intestinal. Essas descobertas apontam para a possibilidade do uso de

estratégias baseadas em pós-bióticos e simbióticos na regulação no TGI diante de um processo de disfunção (Mostafavi e Zhou, 2024; Ottria et al, 2024; Pires et al, 2024).

A identificação de biomarcadores eficazes para a detecção e monitoramento da inflamação intestinal é essencial para avançar na abordagem clínica das DIIs. Marcadores tradicionais, como a calprotectina e a lactoferrina fecal, são amplamente utilizados para avaliar a inflamação intestinal de forma não invasiva. Esses biomarcadores refletem diretamente a atividade inflamatória no trato gastrointestinal e apresentam correlação com a gravidade da doença (Tsai et al, 2019; Piccioni et al, 2024; Xu et al, 2024).

Além dos biomarcadores tradicionais, avanços recentes sugerem que metabólitos derivados da microbiota, como AGCCs, podem ser indicadores promissores da saúde intestinal. O perfil metabolômico de AGCCs tem sido associado à regulação da resposta imune e à manutenção da homeostase intestinal. A detecção de biomarcadores baseados em metabólitos pode permitir uma abordagem mais personalizada e eficaz para o monitoramento de DIIs (Tie et al, 2023; Lê et al, 2022; Ma et al, 2024).

A integração de biossensores com a detecção de biomarcadores de inflamação intestinal representa um avanço significativo no monitoramento da saúde intestinal. Biossensores podem oferecer uma alternativa acessível e em tempo real para avaliar a presença e concentração de biomarcadores inflamatórios, auxiliando no diagnóstico precoce e na personalização das terapias baseadas em moduladores intestinais, como os pós-bióticos (Mostafavi e Zhou, 2024; Ottria et al, 2024; Pires et al, 2024).

Tecnologia dos biossensores

Nos últimos anos, a tecnologia de biossensores tem se destacado em diversas áreas da medicina, segurança alimentar e monitoramento ambiental (Moratti et al, 2024). Essa tecnologia visa realizar a detecção de moléculas em tempo real, de forma prolongada, com baixo custo e uso de compostos específicos, com o objetivo de garantir um diagnóstico precoce, tratamento clínico ou a proteção de um determinado ambiente contra patógenos (Aslan et al, 2020).

Os biossensores são dispositivos que integram componentes biológicos com detectores físicos ou químicos, possibilitando desta maneira identificar e quantificar substâncias específicas, como biomarcadores de doenças, patógenos e microrganismos (Kaushal et al, 2023). Em geral, esses dispositivos são compostos por três partes principais: Biorreceptor (elemento biológico responsável por interagir com o analito como por exemplo anticorpos, enzimas, biomarcadores, ácidos nucleicos ou microrganismos); Transdutor (converte a

interação entre o biorreceptor e o analito em um sinal de medição que pode ser físico, químico ou elétrico como por exemplo transdutores eletroquímicos, ópticos, piezoelétricos ou térmicos) e Unidade de Processamento de Sinal (gera a informação final de forma compreensível após interpretar o sinal gerado pelo transdutor) (Moratti et al, 2024).

Existe um amplo número de diferentes biossensores utilizados que variam conforme cada área de aplicação, levando em consideração a particularidade e dinâmica de funcionamento de cada um (Tabela 1). Embora sejam tecnologias amplamente utilizadas, esses métodos geram altos custos operacionais devido à necessidade de substâncias de alta qualidade, ferramentas laboratoriais especializadas e profissionais qualificados (Jia et al, 2024).

Tabela 1. Comparação entre os principais tipos de biossensores.

Tipo de Biossensor	Princípio de Funcionamento	Características Principais	Aplicações	Referências
Eletroquímico	Determinação de sinais elétricos através de reações bioquímicas (potenciométrico, amperométrico, impedimétrico)	- Alta sensibilidade - Rápido tempo de resposta - Pode ser miniaturizado	Diagnóstico médico, como sensores de glicose para diabetes, controle de alimentos e ambiental	Farajpour et al. (2021)
Óptico	Reconhecimento de variações na luz (absorção, fluorescência, luminescência, SPR) através da interação com o analito	- Alta especificidade - Não invasivo - Detecção em tempo real	- Biomarcadores de doenças - Identificação de microrganismos patogênicos - Monitoramento de poluentes	Kaushal et al. (2023)
Piezoelétrico	Determina mudanças de massa através de oscilações na frequência de ressonância de um cristal piezoelétrico	- Alta sensibilidade - Detecção de alterações de massa - Não requer marcadores	- Avaliação de interações biomoleculares - Detecção de vírus	Narita et al. (2021)
Térmico	Monitora variações de temperatura formadas por reações químicas ou biológicas	- Sensibilidade a reações endotérmicas e exotérmicas	- Biotecnologia - Avaliação do metabolismo celular	Kaushal et al. (2023)

	- Utilizado para medir meios complexos

SPR: Ressonância de Plásmon de Superfície.

Os biossensores têm se destacado como uma alternativa para melhora na acessibilidade, eficiência e relação custo-benefício para detecção de analitos. Para identificação e análise de biomoléculas, frequentemente são elaborados biossensores formados por receptores biométricos (anticorpos, enzimas e ácidos nucleicos) em conjunto a elementos biomiméticos, como polímeros impressos molecularmente (MIPs) e nanomateriais inorgânicos (Jia et al, 2024).

A partir da biologia sintética, a criação de microrganismos vivos associados a biossensores microbianos desempenham funções importantes que estão diretamente ligados a resolução de doenças complexas, como câncer (Kiani et al, 2025), DII (Lan et al, 2024), Acidente Vascular Cerebral (AVC) (Alavian et al, 2025) e Doença Cardiovascular (DCV) (Anbuselvam et al, 2024), viabilizando a medicina de precisão com monitoramento avançado e personalizado. Apesar de sistemas biológicos não serem naturalmente modulares, é possível criar circuitos genéticos com células vivas para avaliação de seus efeitos e liberação de seus componentes terapêuticos, os pós-bióticos (Inda e Lu, 2020).

As células vivas detectam e reagem a diversos sinais por meio de redes de transdução, ativando reguladores que geram respostas. Microrganismos podem ser reprogramados para criar biossensores que identificam analitos e estímulos, como luz, permitindo aplicações médicas, incluindo a detecção de biomoléculas e produção terapêutica (Inda e Lu, 2020; Wang e Childers, 2022).

Aplicações de biossensores no diagnóstico de inflamação intestinal

Para que pacientes com DII tenham um tratamento eficaz e um bom prognóstico, é necessário que a doença seja detectada de forma rápida e precisa (Lv et al, 2024). A colonoscopia e a endoscopia digestiva alta são métodos tradicionais de diagnóstico eficazes, no entanto, são procedimentos invasivos, que exigem infraestrutura especializada e que podem ser desconfortáveis ao paciente, o que reduz a adesão dos mesmos ao exame, dificultando a detecção da doença (Ashton e Beattie, 2024). Além dos procedimentos citados, a Velocidade de Hemossedimentação (VHS) também é um exame considerado útil para avaliar inflamações crônicas e subagudas, porém, a especificidade do exame é limitada, sendo que fatores como gravidez e anemia também pode elevar o valor de VHS (Sakurai e Saruta, 2023).

As citocinas inflamatórias, principais mediadores da resposta inflamatória nas DII, têm se destacado como biomarcadores da doença. Sua detecção em fluidos biológicos possibilita um diagnóstico rápido por meio de análises não invasivas (Clough et al, 2024). Técnicas

laboratoriais amplamente utilizadas, como Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Radioimunoensaio (RIA) e Ressonância de Plásmon de Superfície (SPR) em menor escala, permitem a identificação de biomarcadores-chave na fisiopatologia das DII (Sciurti et al, 2024). Entretanto, essas metodologias apresentam limitações, incluindo altos custos, necessidade de equipamentos complexos e dependência de profissionais altamente treinados, restringindo sua aplicabilidade em larga escala (Sciurti et al, 2024).

Os biossensores vêm se destacando como uma abordagem inovadora para a detecção rápida, sensível e acessível de biomarcadores inflamatórios das DII em amostras de fezes, sangue e urina (Chidambaram et al, 2024). Dessa forma, essa tecnologia tem sido explorada com alternativa aos exames convencionais. Dentre os avanços recentes que podem ser citados, está o estudo de Sciurti et al. (2024) que buscou desenvolver um imunossensor eletroquímico com alta sensibilidade e simplicidade, capaz de detectar a oncostatina M – uma proteína da família IL-6 superexpressa em tecidos intestinais inflamados de pacientes com DII. Outro exemplo notável, foi o desenvolvimento de biossensores luminescentes para detecção e quantificação de calprotectina em amostras biológicas diversas, um biomarcador útil para medir processos inflamatórios no intestino e que auxilia no diagnóstico diferencial entre DIIs e de outras doenças inflamatórias (Lan et al, 2024). Com os avanços nessa tecnologia, novas possibilidades de abordagem surgem, como no estudo de Mimee et al. (2018), em que desenvolveram um sistema probiótico ingerível, que detecta sangramentos intestinais ao identificar o grupo heme liberado pela lise dos glóbulos vermelhos. Os resultados são transmitidos para um dispositivo externo, proporcionando um teste rápido, minimamente invasivo e acessível para detectar sangramentos agudos no trato gastrointestinal, diferente do teste de detecção de sangue oculto nas fezes que detecta apenas sangramentos crônicos, podendo levar a diagnóstico tardio.

Os biossensores bacterianos também vêm sendo explorados para monitorar não só biomoléculas associadas à inflamação intestinal, como também à microbiota, impulsionados por tecnologia como CRISPR-Cas9, que possibilita a criação de células capazes de detectar biomarcadores com alta especificidade e funcionalidade no trato gastrointestinal (Tanna et al, 2021). Sistemas desse tipo já foram aplicados na identificação de tetrationato e tiossulfato, marcadores relevantes da inflamação intestinal e que estão envolvidos com processo metabólico de grupos bacterianos relacionados a doença (Daeffler et al, 2017; Riglar et al, 2017). Em abordagens mais avançadas, Zou et al. (2023) desenvolveram um dispositivo bacteriano inteligente capaz não apenas de reconhecer tiossulfato com alta sensibilidade, mas

também de liberar proteínas terapêuticas em resposta ao ambiente inflamatório, abrindo novos campos de aplicação dos biossensores.

Várias abordagens de biossensores permitem adaptações para a detecção de diversos biomarcadores, ampliando desta forma o seu potencial diagnóstico. No entanto, estudos adicionais são necessários para aprimorar essa tecnologia, que se destaca em relação aos métodos convencionais por oferecer precisão, agilidade e conforto ao paciente. A Tabela 2 compara os métodos tradicionais de detecção de principais biomarcadores, como ELISA e PCR e os biossensores, destacando suas vantagens, limitações e os principais biomarcadores detectados utilizados em estudos.

Tabela 2. Comparação de métodos de detecção de biomarcadores utilizados no diagnóstico para DII.

Método	Vantagens	Desvantagens	Principais biomarcadores detectados	Referência
ELISA	-Alta precisão e sensibilidade -Amplamente utilizado na pesquisa e diagnóstico clínico -Protocolo bem estabelecido -Resultado quantitativo	-Tempo de execução relativamente longo -Custo elevado -Possibilidade de reações cruzadas	-Proteína C Reativa (PCR) -Anticorpos anti- *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) -Anticorpos anticitoplasma de neutrófilos perinucleares (p-ANCA) -Fator de necrose tumoral α (TNF-α) -Supressão da tumorigenicidade 2 (ST2) -Proteína 6 induzida pelo fator de necrose tumoral alfa (TNFAIP6) -Calprotectina fecal -Calgranulina C -Lactoferrina (LTF) -Lipocalina-2 -Mieloperoxidase (MPO) -Metaloproteinase da matriz-9 (MMP-9) -Fosfatase alcalina intestinal (IAP)	(D'Amico et al, 2021; Liu et al, 2022)
PCR (Imuno-PCR, RT-PCR, RT-qPCR)	-Alta sensibilidade e especificidade -Boa reprodutibilidade -Possibilidade de análise	-Complexidade técnica -Necessidade de equipamentos especializados	-Fator de necrose tumoral α (TNF-α) -miRNAs de citocinas inflamatórias -Genes associados a respostas inflamatórias e patógenos	(Komatsu et al, 2001; Bednarz-Misa et al, 2020; Liu et al, 2022; Ozdemir et al, 2023)

	quantitativa em tempo real	-Custo elevado -Requer amostras de alta qualidade		
Biossensores	-Alta sensibilidade -Rapidez -Baixo custo operacional -Portabilidade e possibilidade de uso no Point-of-Care (detecção em tempo real) -Adaptação para detectar diferente biomarcadores	-Pode necessitar de mais estudos para aplicação no uso clínico	-Oncostatina M -Calprotectina fecal -Grupo heme dos glóbulos vermelhos -Tetrationato e tiossulfato	(Daeffler et al, 2017; Riglar et al, 2017; Mimee et al, 2018; Tanna et al, 2021; Zou et al, 2023; Lan et al, 2024; Sciurti et al, 2024)

Probióticos, pós-bióticos e biossensores

Os biossensores para probióticos modificados podem ser derivados de sistemas naturais ou de reguladores sintéticos a partir da introdução de um gene repórter em uma cepa, que se torna geneticamente modificada (Abu-Rmailah et al, 2024). O gene repórter é uma sequência de DNA que permite acompanhar a expressão de um gene-alvo, assim permitindo codificar uma molécula detectável, como biomarcadores de inflamação e patógenos de interesse (Shaikh et al, 2020).

A engenharia de biossensores para probióticos projetados a partir de sistemas naturais é uma perspectiva inovadora na biotecnologia que engloba temas relacionados a microbiologia, engenharia genética e nanotecnologia para avaliar condições de saúde e diagnosticar doenças. Utiliza-se microrganismos que possuem mecanismos intrínsecos de detecção, como as bactérias intestinais (*Lactobacillus*, *E. coli*), capazes de perceber alterações no ambiente do intestino (Jiang et al, 2025; Aslan et al, 2020). Em seus mecanismos internos, os sistemas de *Quorum Sensing* (QS) são fundamentais para regular a expressão gênica conforme a densidade celular (Spacapan et al, 2023), bem como a formação de proteínas fluorescentes e enzimas repórteres, que são importantes para indicar a presença da molécula-alvo (Wang et al, 2023). Em contrapartida, usando a biologia sintética é possível adicionar novas partes genéticas a esses organismos, projetados para funções específicas e oferecendo maior controle e precisão (Alam et al, 2021) (Figura 1). Os primeiros ensaios clínicos foram voltados para doenças metabólicas para analisar a capacidade de engenharia de probióticos para produzir metabólitos sintéticos e proteínas terapêuticas (McNerney et al, 2021; Kang et al, 2020; Lazar e Tabor, 2021). A comparação entre ambos os sistemas pode ser observada na Tabela 3.

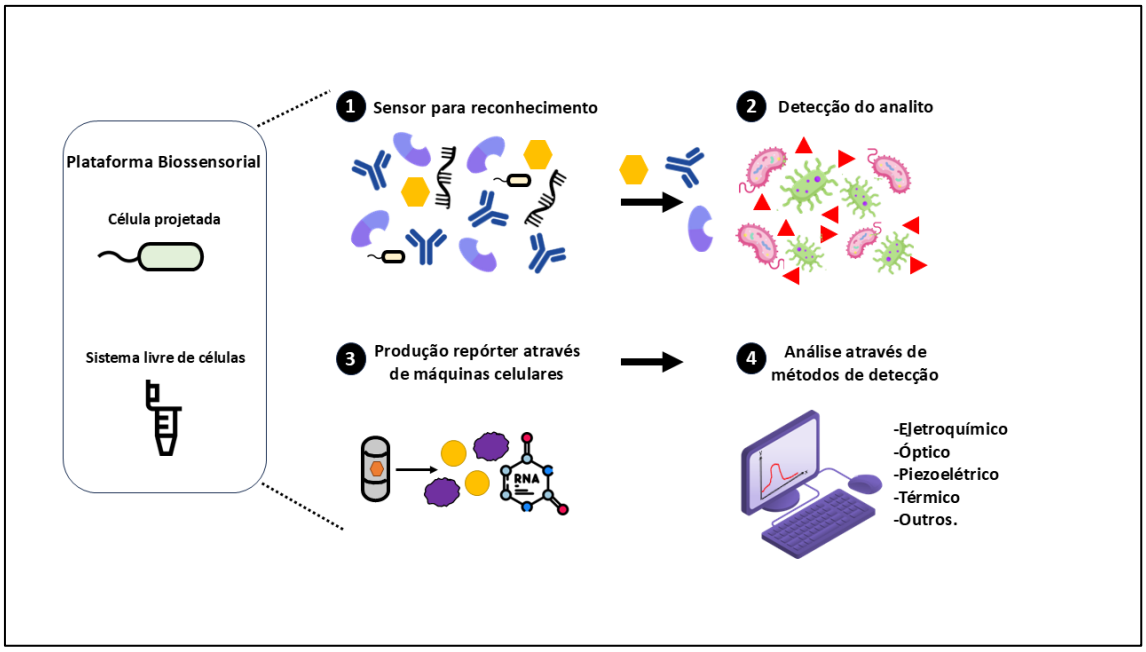

Figura 1. Funcionamento de um biossensor sintético. Células vivas são geneticamente modificadas para atuar como biossensores ao detectar substâncias alvo. Sistemas livres de células são biossensores que utilizam biomoléculas isoladas das células. 1 e 2) Um sensor de reconhecimento pode ser classificado como uma bactéria ou uma biomolécula (enzimas, anticorpos, ácido nucleico), capaz de detectar um segmento genético de um microrganismo patogênico (bactérias) ou um analito específico (biomarcadores de inflamação). 3) Esse processo de reconhecimento e detecção aciona mecanismos celulares (maquinário celular), que produzem um sinal de saída (componentes repórteres: enzimas, proteínas e RNA) por meio da expressão gênica, indicando a presença do composto químico ou patógeno. Para a criação dos biossensores, o elemento sensor e repórter tornam-se integrados um ao outro em uma célula modificada ou em sistema livre de células que viabiliza as ligações biológicas para emissão do sinal. 4) A análise da detecção e resultados são comumente avaliados em tecnologia computadorizada de forma rápida e precisa, observando gráficos através de métodos eletroquímicos, ópticos, piezoelétricos, térmicos, entre outros.

Tabela 3. Sistemas naturais e sintéticos para biossensores probióticos.

Aspecto	Sistemas Naturais	Sistemas Sintéticos	Referências
Fonte de Detecção	Utilizam mecanismos biológicos existentes, como QS e proteínas fluorescentes.	Projetados artificialmente para funções específicas, como circuitos genéticos sintéticos e receptores de engenharia.	Jiang et al, 2025; Kaushal et al, 2023
Complexidade	Menor complexidade devido ao uso de sistemas biológicos já existentes.	Maior complexidade devido ao design e construção de novos circuitos genéticos e sistemas de detecção.	Thai et al, 2023; Shi et al, 2022
Especificidade	Especificidade limitada aos mecanismos naturais de detecção presentes nos organismos utilizados.	Alta especificidade, pois podem ser projetados para detectar moléculas ou condições muito específicas.	Benítez-Chao et al, 2021
Aplicações	Monitoramento de condições gerais, como alterações no microbioma intestinal ou presença de patógenos comuns.	Diagnóstico de doenças específicas, liberação controlada de terapias e detecção de biomarcadores específicos.	Alam et al, 2021

Desafios	Limitações na modificação e controle dos sistemas naturais; menor precisão em detecções específicas.	Desafios na estabilidade dos sistemas sintéticos no ambiente biológico; considerações de biossegurança e regulamentação de OGMs.	Calzini et al, 2021

Abreviações: **QS**, Quorum sensing; **OGMs**, Organismos Geneticamente Modificados.

Os microrganismos possuem mecanismos que respondem a estímulos externos, regulando seus níveis de RNA e proteína para se adaptarem. Essa capacidade pode ser explorada na criação de biossensores microbianos. A utilização desses biossensores para identificar e monitorar a atividade metabólica intestinal pode viabilizar uma abordagem médica mais segura e não invasiva (Lan et al 2024).

A regulação da expressão por biossensores permite um controle inteligente da produção de proteínas pelos probióticos, no momento e local adequado. Este controle dos biossensores probióticos podem ser realizados por meio da detecção de sinais ambientais e metabólicos, além da identificação de biomarcadores de inflamação e patógenos. Estas sinalizações são capazes de estimular a liberação de compostos terapêuticos sem afetar a microbiota saudável, e assim resulta em inibição de microrganismo patogênicos e a redução da toxicidade (Jiang et al, 2025) (Figura 2). Os biossensores possibilitam a manipulação de microrganismos destinados ao diagnóstico e tratamento de doenças, bem como para o desenvolvimento de sistemas de biocontenção, a fim de gerenciar o risco de agentes biológicos patogênicos (Lazar e Tabor, 2021).

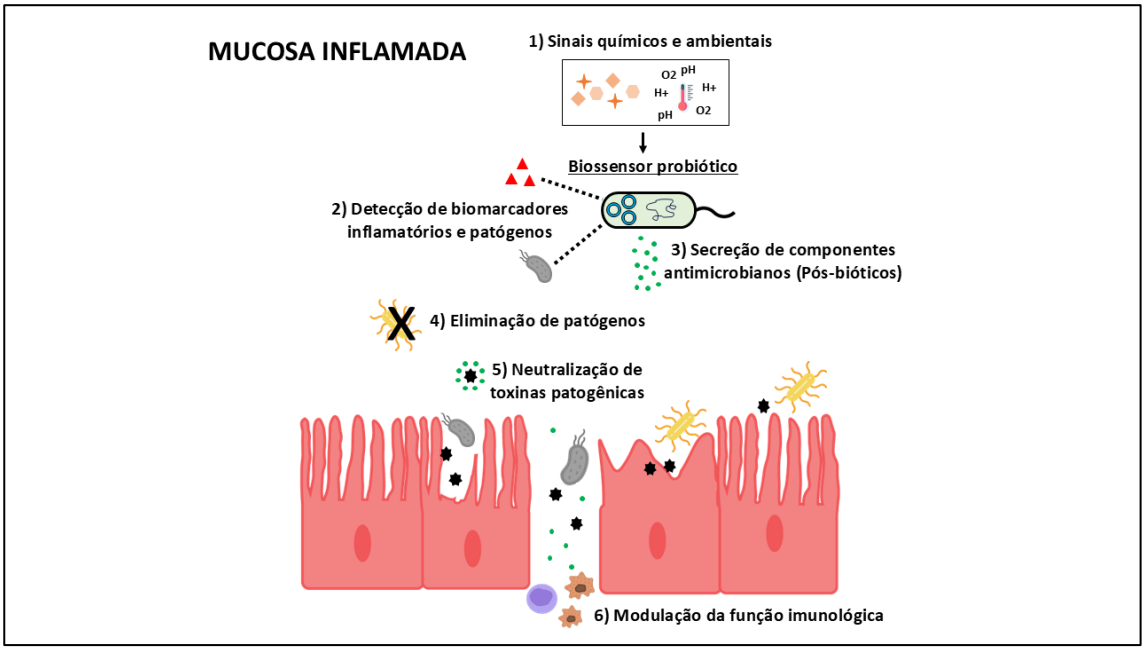

Figura 2. Atividade dos pós-bióticos na inflamação intestinal através de um biossensor de células vivas projetadas. **1) Regulação por sinais químicos e ambientais:** Biossensores probióticos podem ser projetados para detectar variações de sinais naturais ou administrados externamente (açúcares, metabólitos) e fatores ambientais (temperatura, pH, oxigênio, hidrogênio); **2) Detecção do analito:** Sensores geneticamente modificados podem ser incorporados para detectar e medir a presença de moléculas sinalizadoras e metabólitos, como biomarcadores da inflamação intestinal e microrganismos nocivos; **3) Produção de pós-bióticos:** Probióticos projetados podem secretar saídas terapêuticas, como bacteriocinas e enzimas líticas, após detecção de estímulos, sem prejudicar a microbiota saudável. **4) Erradicação de patógenos:** A competição por espaço e

nutrientes impede a proliferação e colonização intestinal por microrganismos nocivos, levanto a morte seletiva e evitando a disbiose intestinal. **5) Neutralização de toxinas:** A captação de toxinas bacterianas por compostos antimicrobianos reduz a virulência e os danos ao hospedeiro. **6) Modulação imunológica:** Os metabólitos antimicrobianos produzidos podem regular a resposta imunológica através da interação com células dendríticas e T para reduzir a secreção de citocinas inflamatórias.

A monitoração de biomarcadores intestinais é um processo fundamental para fornecer informações sobre o diagnóstico da DII. Quando estabelecidas no ambiente gastrointestinal, as bactérias probióticas modificadas podem contribuir ao reconhecer indícios característicos da inflamação no local e liberar pós-bióticos. Esse fato já tem sido comprovado por meio de estudos que projetaram cepas capazes de monitorar biomarcadores clássicos de inflamação intestinal, como calprotectina (Xia et al, 2023), tiossulfato e tetrationato (Buss et al, 2024) e sinais de sangramento (Demirhan et al, 2024).

Grande parte dos métodos utilizam moléculas fluorescentes ou testes colorimétricos nas fezes. No entanto, essa abordagem não fornece a localização precisa da inflamação no intestino e depende de equipamentos especializados, como a citometria de fluxo, o que dificulta sua aplicação clínica (Buss et al, 2024). Algumas cepas bioluminescentes podem ser visualizadas diretamente em camundongos, mas sua eficiência é reduzida devido à dispersão da luz. Além disso, essa técnica não é viável para humanos ou animais maiores, pois a penetração da luz nos tecidos é limitada (Jiang et al, 2021; Zhao et al, 2020). Uma alternativa foi o aclopamento de bactérias bioluminescentes ligadas a um dispositivo eletrônico sem fio em forma de pílula. Porém, o grande tamanho da cápsula (~4,5 cm) torna essa tecnologia complexa para a ingestão de humanos e a coleta de dados espaço-temporais limitada devido à rápida passagem pelo trato gastrointestinal (Mimee et al, 2018).

As células probióticas geneticamente modificadas podem expressar biossensores capazes de detectar a liberação de componentes pós-bióticos. Por exemplo, a ativação de um gene luminescente ou fluorescente pode estar associada à produção de bacteriocinas, possibilitando o monitoramento da liberação desses compostos de forma visual ou por meio de leitura de sinais eletrônicos (Choi et al, 2023).

Biossensores já foram empregados para analisar sobrenadantes de uma coleção de isolados bacterianos obtidos de leite de vaca cru. Naquele contexto, foi avaliado sua capacidade de inibir o crescimento microbiano e causar danos à membrana celular. Essa abordagem possibilitou observar potenciais probióticos produtores de substâncias antimicrobianas (Desiderato et al, 2021). Foram também desenvolvidas plataformas de triagem baseadas em biossensores de células inteiras para a descoberta de novas bacteriocinas. No entanto, a variação entre células individuais durante esse processo ainda é pouco

considerada, e acredita-se que possa influenciar significativamente a resposta do biossensor frente a liberação e exposição à bacteriocina, dentre outros pós-bióticos (Fante et al, 2024).

A produção de biossensores bacterianos de células inteiras, equipados com repórteres ativados por promotores específicos, podem ser utilizados para determinar o mecanismo de ação e funções biológicas de compostos antimicrobianos por ser uma técnica de triagem rápida, de alta sensibilidade e especificidade (Jiang et al, 2025; Kang et al, 2020). Benítez-Chao et al (2021) demonstraram que *E. coli* foi modelada in silico para funcionar como um biossensor de célula inteira. Os autores relataram que o dispositivo foi capaz de identificar moléculas de *quorum sensing* de *Staphylococcus aureus* restistente à meticilina (MRSA) além de ativar a produção de uma bacteriocina letal para essa bactéria, apresentando uma estratégia eficaz para o combate à infecção em estudos clínicos.

Shobharani et al. (2015) desenvolveram bactérias que foram geneticamente modificadas para detectar a presença de determinados produtos químicos ou condições de estresse. Naquele estudo, os biossensores foram empregados como ferramenta para investigar o mecanismo de ação de diferentes compostos antimicrobianos (pós-bióticos) liberados, produzidos por duas cepas probióticas de *Bacillus licheniformis* (MCC2514 e MCC2512) (Shobharani et al. 2015). Em outro estudo, bactérias repórteres específicas para nisina foram empregadas como biossensores a fim de identificar bacteriocinas semelhantes a esse composto. A cepa repórter *Lactococcus lactis* NZ9800.AUT1 foi utilizada por sua alta sensibilidade e especificidade a lantibióticos do tipo nisina, e as bacteriocinas detectadas apresentaram ação antimicrobiana contra patógenos transmitidos por alimentos e bactérias resistentes a medicamentos, tornando-se potenciais agentes para a biopreservação de alimentos e produtos de saúde (Sharma et al, 2021).

No ponto de vista terapêutico, os biossensores associados aos probióticos são desenvolvidos para operar em ambientes com variações de pH e temperatura, como o TGI, o que possibilita o acompanhamento em tempo real da produção de pós-bióticos no combate a patógenos intestinais (Rottinghaus et al, 2020; Wang e Childers, 2022). Ainda, alguns biossensores têm sido desenvolvidos para detectar a atividade antimicrobiana das bacteriocinas, contribuindo para a avaliação de novos compostos antimicrobianos de origem bacteriana, bem como para monitorar a presença de bactérias produtoras de bacteriocinas, como as *Lactobacillus, Enterococcus* e *E. coli* (Benítez-Chao et al, 2021; Xia et al, 2023).

Embora a combinação de pós-bióticos e biossensores apresenta uma abordagem inovadora para o monitoramento da saúde intestinal, essa integração apresenta desafios tecnológicos e econômicos significativos que precisam ser abordados. A eficácia dos pós-

bióticos depende de sua estabilidade e atividade biológica. Limitações na estabilidade das cepas podem comprometer os efeitos benéficos na modulação da saúde do hospedeiro, sendo crucial o desenvolvimento de métodos de preparação e armazenamento que preservem suas propriedades funcionais (Yan et al, 2024; Isaac-Bamgboye et al, 2024). Além disso, é ideal o uso de materiais e revestimentos estáveis para que os biossensores possam resistir a ambientes agressivos e reduzir a sua degradação ao longo do tempo (Bhatia et al, 2024).

A elaboração desses tipos de biossensores requer uma integração tecnológica sofisticada, sendo necessário desenvolver plataformas que permitam a interação eficiente entre os componentes biológicos e os sistemas de detecção, garantindo sensibilidade e especificidade adequadas (Wang e Childers, 2022; Bhatia et al, 2024). Vale ressaltar também que os custos de produção em larga escala podem ser elevados, especialmente quando envolvem materiais avançados e processos complexos, levando a investimentos significativos (Ngashangva e Chattopadhyay, 2023).

Por fim, deve ser considerado também que a transição de protótipos laboratoriais para produtos comercializáveis enfrenta desafios relacionados à escalabilidade da produção e à conformidade com regulamentações de segurança e eficácia (Akhlaghi et al, 2024; Flynn e Chang, 2024; Moreira et al, 2024). Mesmo após a comercialização, garantir que essas tecnologias sejam financeiramente acessíveis aos consumidores é um desafio. Os custos de desenvolvimento, produção e implementação associados à tecnologia de biossensores podem dificultar a sua disponibilidade ao mercado, por isso, sugere-se um desenvolvimento mais econômico e sustentável, sem perder a sua qualidade (Bhatia et al, 2024).

Perspectivas futuras

Para garantir que os pacientes diagnosticados com DII recebam um bom tratamento e manejo clínico adequado, é de extrema importância avaliar a doença de maneira eficaz. A monitoração por métodos rápidos e acessíveis que ocorrem no próprio local de atendimento do paciente (Point-of-Care) tem ganhado espaço em centros de saúde principalmente por permitirem a tomada de decisões clínicas em tempo real, e assim, facilitar a triagem e o gerenciamento precoce dos pacientes (Sathananthan et al, 2019).

Novas abordagens vêm sendo exploradas na literatura. Dentre elas, o uso do ultrassom gastrointestinal no local de atendimento e o desenvolvimento de ensaios rápidos, como a detecção de fosfatase alcalina intestinal, um biomarcador que se demonstrou eficiente para monitorar a colite em modelos de camundongo com DII (Sathananthan et al, 2019; Sheng et al, 2021). Outro exemplo interessante, foi a utilização de testes domiciliares para detecção de

calprotectina fecal para pacientes pediátricos com DII durante a pandemia de COVID-19, que demonstraram potencial para serem incorporados no monitoramento contínuo da DII (Jere et al, 2021).

Embora exista diferentes abordagens, a utilização de biossensores representam uma solução significativa nesse cenário, uma vez que esses oferecem realização de testes portáteis de forma rápida e acessível. Entre os mais promissores e estudados atualmente, os biossensores eletroquímicos possuem fácil portabilidade, operação simples, alto desempenho, estabilidade e baixo custo, não sendo necessário infraestrutura complexa para sua utilização (Amen et al, 2022; Ning et al, 2022). Estudos já exploram seu uso na detecção de marcadores de outras doenças, como glicose, ácido úrico, colesterol e até biomarcadores tumorais, evidenciando seu potencial para aplicações no monitoramento da DII (Ning et al, 2022).

Para que essa tecnologia possa ser usada em ensaios clínicos são necessários aprimoramentos, como a investigação de possíveis interferentes que podem ocorrer na análise e garantia de uma validação clínica. A boa notícia é que a tendência atual e futura é tornar esses dispositivos integrados a novas tecnologias, como é o caso da utilização da Inteligência Artificial (IA) para análise de dados, em exemplo o Machine Learning (ML), que permite melhorar o desempenho básico, reduzindo variabilidades nos resultados e aumentando sua reprodutibilidade, e, portanto, podendo potencializar a ação dos biossensores (Zhu et al, 2021). Dessa maneira, a combinação dessas novas tecnologias recentes permite criar dispositivos e testes que torna possível um diagnóstico rápido, monitoramento contínuo e adequado da saúde intestinal dos pacientes com DII, permitindo um melhor controle da doença, tão necessário nos dias atuais.

Apesar do grande potencial dos biossensores para uso clínico, sua implementação em larga escala ainda enfrenta importantes limitações. Um dos principais desafios está na considerável variabilidade entre os indivíduos, especialmente no perfil da microbiota, que difere significativamente e é influenciada por fatores como dieta, genética, uso de medicamentos e condições ambientais. Essa complexidade pode impactar na composição e concentração dos biomarcadores detectáveis, comprometendo a sensibilidade e a especificidade dos biossensores. Diante disso, é fundamental que a interpretação dos dados obtidos leve em consideração esse contexto multifatorial, o que exige desenvolvimento de tecnologias mais robustas, padronizadas e versáteis, capazes de integrar essas variáveis e fornecer diagnósticos precisos e personalizados.

Referências

Abu-Rmailah N, Moscovici L, Riegraf C, et al. Enhanced detection of estrogen-like compounds by genetically engineered yeast sensor strains. *Biosensors (Basel)* 2024;14(4):193. doi:10.3390/bios14040193

Akhlaghi AA , Kaur H, Adhikari BR, et al. Editors' Choice—Challenges and opportunities for developing electrochemical biosensors with commercialization potential in the Point-of-Care diagnostics market. *ECS Sens Plus* 2024; 3(1):011601. doi: 10.1149/2754-2726/ad304a

Alam K, Hao J, Zhang Y, et al. Synthetic biology-inspired strategies and tools for engineering of microbial natural product biosynthetic pathways. *Biotechnol Adv* 2021;49:107759. doi:10.1016/j.biotechadv.2021.107759

Alavian F, Khodabakhshi F, Chenary FH. Biosensors for early stroke detection. *Clin Chim Acta* 2025;567:120079. doi:10.1016/j.cca.2024.120079

Amen MT, Pham TTT, Cheah E, et al. Metal-Oxide FET Biosensor for Point-of-Care testing: Overview and perspective. *Molecules* 2022;27(22):7952. doi:10.3390/molecules27227952

Anbuselvam B, Gunasekaran BM, Srinivasan S, et al. Wearable biosensors in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2024;561:119766. doi:10.1016/j.cca.2024.119766

Anhê FF, Bhatwa A, Schertzer JD. Determining the metabolic impact of postbiotics in mice. *STAR Protoc* 2022;3(1):101098. doi: 10.1016/j.xpro.2021.101098.

Ashton JJ and Beattie RM. Inflammatory bowel disease: recent developments. *Arch Dis Child* 2024; 109(5):370–376. doi:10.1136/archdischild-2023-325668

Aslan S, Noor E, Benito Vaquerizo S, et al. Design and engineering of *E. coli* metabolic sensor strains with a wide sensitivity range for glycerate. *Metab Eng* 2020;57:96-109. doi:10.1016/j.ymben.2019.09.002

Bäuerl C, Coll-Marqués JM, Tarazona-González C, Pérez-Martínez G. *Lactobacillus casei* extracellular vesicles stimulate EGFR pathway likely due to the presence of proteins P40 and P75 bound to their surface. *Sci Rep* 2020;10(1):19237. doi: 10.1038/s41598-020-75930-9

Bednarz-Misa I, Neubauer K, Zacharska E, et al. Whole blood ACTB, B2M and GAPDH expression reflects activity of inflammatory bowel disease, advancement of colorectal cancer, and correlates with circulating inflammatory and angiogenic factors: Relevance for real-time quantitative PCR. *Adv Clin Exp Med* 2020;29(5):547-556. doi:10.17219/acem/118845

Benítez-Chao DF, Balderas-Cisneros FJ, León-Buitimea A, et al. Design and in silico analysis of a whole-cell biosensor able to kill methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biotechnol Appl Biochem* 2021. doi:10.1002/bab.2210

Bhatia D, Paul S, Acharjee T, et al. Biosensors and their widespread impact on human health. *Sensors International* 2024;5:100257. doi: 10.1016/j.sintl.2023.100257

Buss M, Zhu L, Kwon JH, et al. Probiotic acoustic biosensors for noninvasive imaging of gut inflammation. *bioRxiv* 2024; 614598. doi: 10.1101/2024.09.23.614598

Calzini MA, Malico AA, Mitchler MM, et al. Protein engineering for natural product biosynthesis and synthetic biology applications. *Protein Eng Des Sel* 2021;34:gzab015. doi:10.1093/protein/gzab015

Capin J, Chabert E, Zuñiga A, et al. Microbial biosensors for diagnostics, surveillance and epidemiology: Today's achievements and tomorrow's prospects. *Microbial Biotechnology* 2024; 17(11): e70047; doi: 10.1111/1751-7915.70047

Chidambaram P, Sakeeba SS, Eswaramoorthy N, et al. Versatile conductometric biosensors for rapid and selective detection of inflammatory and cardiac biomarkers in saliva. *Biosens Bioelectron* 2024;261:116516. doi:10.1016/j.bios.2024.116516

Choi IY, Oh J-H, Wang Z, et al. Bioluminescent monitoring of recombinant lactic acid bacteria and their products. *mBio* 2023;14(5):e0119723. doi:10.1128/mbio.01197-23

Clough J, Colwill M, Poullis A, Pollok R, Patel K, Honap S. Biomarkers in inflammatory bowel disease: a practical guide. *Therap Adv Gastroenterol* 2024;17:17562848241251600. doi:10.1177/17562848241251600

Daeffler KN, Galley JD, Sheth RU, et al. Engineering bacterial thiosulfate and tetrathionate sensors for detecting gut inflammation. *Mol Syst Biol* 2017;13(4):923. doi:10.15252/msb.20167416

D'Amico F, Rubin DT, Kotze PG, et al. International consensus on methodological issues in standardization of fecal calprotectin measurement in inflammatory bowel diseases. *United European Gastroenterol* J 2021;9(4):451-460. doi:10.1002/ueg2.12069

Demirhan A, Chianella I, Patil SB, et al. A low-cost miniature immunosensor for haemoglobin as a device for the future detection of gastrointestinal bleeding. *Analyst* 2024;149(4):1081-1089. doi:10.1039/d3an02147e

Desiderato CK, Sachsenmaier S, Ovchinnikov KV, et al. Identification of potential probiotics producing bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* by a combination of screening tools. *Int J Mol Sci* 2021;22(16):8615. doi:10.3390/ijms22168615

El Baassiri MG, Raouf Z, Badin S, et al. Dysregulated brain-gut axis in the setting of traumatic brain injury: review of mechanisms and anti-inflammatory pharmacotherapies. *J Neuroinflammation*. 2024;21(1):124. doi:10.1186/s12974-024-03118-3

Fante N, Desiderato CK, Riedel CU, Grünberger A. Time-resolved cell-to-cell heterogeneity of *Listeria innocua* after nisin exposure. *Front Bioeng Biotechnol* 2024;12:1408652. doi:10.3389/fbioe.2024.1408652

Farajpour N, Deivanayagam R, Phakatkar A, et al. A Novel antimicrobial electrochemical glucose biosensor based on silver-prussian blue modified TiO 2 nanotube arrays. *Med Dev & Sensors* 2020. doi:10.1002/mds3.10061

Filidou E, Kandilogiannakis L, Shrewsbury A, Kolios G, Kotzampassi K. Probiotics: Shaping the gut immunological responses. *World J Gastroenterol*. 2024 Apr 21;30(15):2096-2108. doi: 10.3748/wjg.v30.i15.2096. PMID: 38681982; PMCID: PMC11045475.

Flynn CD, Chang, D. Artificial intelligence in Point-of-Care biosensing: Challenges and opportunities. *Diagnostics* 2024, 14, 1100. https://doi.org/10.3390/diagnostics14111100

Haneishi Y, Furuya Y, Hasegawa M, et al. Inflammatory bowel diseases and gut microbiota. *Int J Mol Sci* 2023; 24(4):3817; doi: 10.3390/ijms24043817

Inda ME, Lu TK. Microbes as biosensors. *Annu Rev Microbiol* 2020;74:337-359. doi:10.1146/annurev-micro-022620-081059

Isaac-Bamgboye FJ, Mgbechidinma CL, Onyeaka H, et al. Exploring the potential of postbiotics for food safety and human health improvement. *J Nutr Metab* 2024;2024:1868161. doi: 10.1155/2024/1868161.

Jere M, Garrick V, Curtis L, et al. Point-of-care faecal calprotectin testing in patients with paediatric inflammatory bowel disease during the COVID-19 pandemic. *BMJ Open Gastroenterol* 2021;8(1):e000631. doi:10.1136/bmjgast-2021-000631

Jia Y, Chen S, Wang Q, et al. Recent progress in biosensor regeneration techniques. *Nanoscale* 2024;16(6):2834-2846. doi:10.1039/d3nr05456j

Jiang S, Chen H, Chen S, et al. Genetically encoded biosensors for constrained biological functions in probiotic *Escherichia coli Nissle*. *ACS Synth Biol* 2025;14(1):296-303. doi:10.1021/acssynbio.4c00747

Jiang T, Yang X, Li G, et al. Bacteria-based live vehicle for *in vivo* bioluminescence imaging. *Anal Chem* 2021;93(47):15687-15695. doi:10.1021/acs.analchem.1c03568

Jung YJ, Kim HS, Jaygal G, Cho HR, Lee KB, Song IB, Kim JH, Kwak MS, Han KH, Bae MJ, Sung MH. Postbiotics enhance nk cell activation in stress-induced mice through gut microbiome regulation. *J Microbiol Biotechnol* 2022;32(5):612-620. doi: 10.4014/jmb.2111.11027

Kang M, Choe D, Kim K, et al. Synthetic biology approaches in the development of engineered therapeutic microbes. *Int J Mol Sci* 2020;21(22):8744. doi:10.3390/ijms21228744

Kaushal JB, Raut P, Kumar S. Organic electronics in biosensing: A promising frontier for medical and environmental applications. *Biosensors (Basel)* 2023;13(11):976. doi:10.3390/bios13110976

Khani N, Abedi Soleimani R, Chadorshabi S, et al. Postbiotics as candidates in biofilm inhibition in food industries. *Lett Appl Microbiol* 2024;77(4):ovad069. doi: 10.1093/lambio/ovad069

Kiani P, Vatankhahan H, Zare-Hoseinabadi A, et al. Electrochemical biosensors for early detection of breast cancer. *Clin Chim Acta* 2025;564:119923. doi:10.1016/j.cca.2024.119923

Komatsu M, Kobayashi D, Saito K, et al. Tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR. *Clin Chem* 2001;47(7):1297-1301.

Lan T, Slezak T, Pu J, et al. Development of luminescent biosensors for calprotectin. *ACS Chem Biol* 2024;19(6):1250-1259. doi:10.1021/acschembio.4c00265

Lazar JT, Tabor JJ. Bacterial two-component systems as sensors for synthetic biology applications. *Curr Opin Syst Biol* 2021;28:100398. doi:10.1016/j.coisb.2021.100398

Lê A, Mantel M, Marchix J, et al. Inflammatory bowel disease therapeutic strategies by modulation of the microbiota: how and when to introduce pre-, pro-, syn-, or postbiotics? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2022;323(6):G523-G553. doi: 10.1152/ajpgi.00002.2022

Lee M, Chang EB. Inflammatory bowel diseases and the microbiome: Searching the crime scene for clues. *Gastroenterology* 2020; 160(2):524-37; doi: 10.1053/j.gastro.2020.09.056

Liu D, Saikam V, Skrada KA, Merlin D, Iyer SS. Inflammatory bowel disease biomarkers. *Med Res Rev* 2022;42(5):1856-1887. doi:10.1002/med.21893

Liu S, Zhao W, Lan P, et al. The microbiome in inflammatory bowel diseases: from pathogenesis to therapy. *Prot & Cell* 2020; 12(5):331-45; doi: 10.1007/s13238-020-00745-3

Lv H, Liu HY, Zhang HN, et al. Delayed diagnosis in inflammatory bowel disease: Time to consider solutions. *World J Gastroenterol* 2024; 30(35): 3954-58; doi: 10.3748/wjg.v30.i35.3954

M'Koma AE. Inflammatory Bowel Disease: Clinical diagnosis and surgical treatment-overview. *MDPI– Medicine* 2022; 58(5):567; doi: 10.3390/medicina58050567

Ma C, Zheng X, Zhang Q, et al. A postbiotic exopolysaccharide synergizes with *Lactobacillus acidophilus* to reduce intestinal inflammation in a mouse model of colitis. *Int J Biol Macromol* 2024;291:138931. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.138931

Marchianò V, Tricase A, Cimino A, et al. Inside out: Exploring edible biocatalytic biosensors for health monitoring. *Bioelectrochemistry* 2025; 161: 108830; doi: 10.1016/j.bioelechem.2024.108830

Matsuoka K, Kobayashi T, Ueno F, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for inflammatory bowel disease. *J Gatroenterol* 2018; 53(3):305-53; doi: 10.1007/s00535-018-1439-1

McNerney MP, Doiron KE, Ng TL, et al. Theranostic cells: emerging clinical applications of synthetic biology. *Nat Rev Genet* 2021;22(11):730-746. doi:10.1038/s41576-021-00383-3

Mehta JP, Ayakar S, Singhal RS. The potential of paraprobiotics and postbiotics to modulate the immune system: A Review. *Microbiol Res* 2023;275:127449. doi: 10.1016/j.micres.2023.127449

Mimee M, Nadeau P, Hayward A, et al. An ingestible bacterial-electronic system to monitor gastrointestinal health. *Science* 2018;360(6391):915-918. doi:10.1126/science.aas9315

Moratti CF, Yang SNN, Scott C, et al. Development of a whole-cell biosensor for ethylene oxide and ethylene. *Microb Biotechnol* 2024;17(6):e14511. doi:10.1111/1751-7915.14511

Moreira MJ, Pintado M, Almeida JMMM. Are aptamer-based biosensors the future of the detection of the human gut microbiome?-A systematic review and meta-analysis. *Biosensors (Basel)* 2024;14(9):423. doi: 10.3390/bios14090423.

Mostafavi AH, Zhou JR. Gut microbiota dysbiosis, oxidative stress, inflammation, and epigenetic alterations in metabolic diseases. *Antioxidants (Basel)* 2024;13(8):985. doi: 10.3390/antiox13080985

Narita F, Wang Z, Kurita H, et al. A review of piezoelectric and magnetostrictive biosensor materials for detection of covid-19 and other viruses. *Adv Mater* 2021;33(1):e2005448. doi:10.1002/adma.202005448

Ngashangva L, Chattopadhyay S. Biosensors for point-of-care testing and personalized monitoring of gastrointestinal microbiota. *Front Microbiol* 2023;14:1114707. doi: 10.3389/fmicb.2023.1114707.

Ning Q, Feng S, Cheng Y, et al. Point-of-care biochemical assays using electrochemical technologies: approaches, applications, and opportunities. *Mikrochim Acta* 2022;189(8):310. doi:10.1007/s00604-022-05425-z

Oliver JO, Huang N, Bartolome-Casado R, et al. Single-cell integration reveals metaplasia in inflammatory gut diseases. *Nature Portfolio* 2024; 635(8039):699-707; doi: 10.1038/s41586-024-07571-1

Ottria R, Xynomilakis O, Casati S, Ciuffreda P. Pre- to postbiotics: The beneficial roles of pediatric dysbiosis associated with inflammatory bowel diseases. *Microorganisms* 2024;12(8):1582. doi: 10.3390/microorganisms12081582.

Ozdemir B, Atay A, Kayhan MA, et al. Tissue quantitative RT-PCR test for diagnostic significance of cytomegalovirus infection in patients with inflammatory bowel disease and treatment response: Cytomegalovirus infection in patients with inflammatory bowel disease. *Medicine (Baltimore)* 2023;102(31):e34463. doi:10.1097/MD.0000000000034463

Piccioni A, Spagnuolo F, Candelli M, et al. The gut microbiome in sepsis: From dysbiosis to personalized therapy. *J Clin Med* 2024;13(20):6082. doi: 10.3390/jcm13206082.

Pires L, González-Paramás AM, Heleno SA, Calhelha RC. Exploring therapeutic advances: A comprehensive review of intestinal microbiota modulators. *Antibiotics (Basel)* 2024;13(8):720. doi: 10.3390/antibiotics13080720

Pyclik M, Srutkova D, Schwarzer M, et al. Bifidobacteria cell wall-derived exo-polysaccharides, lipoteichoic acids, peptidoglycans, polar lipids and proteins - their chemical structure and biological attributes. *Int J Biol Macromol* 2020;147:333-349. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.227

Qureshi W, Dar MA, Rather MY. New therapy for metabolic syndrome: Gut microbiome supplementation. *World J Diabetes*. 2024;15(9):1833-1836. doi: 10.4239/wjd.v15.i9.1833

Reyes-Martínez S, Segura-Real L, Gómez-García AP, et al. Neuroinflammation, Microbiota-Gut-Brain Axis, and Depression: The Vicious Circle. *J Integr Neurosci*. 2023;22(3):65. doi:10.31083/j.jin2203065

Riglar DT, Giessen TW, Baym M, et al. Engineered bacteria can function in the mammalian gut long-term as live diagnostics of inflammation. *Nat Biotechnol* 2017;35(7):653-658. doi:10.1038/nbt.3879

Rottinghaus AG, Amrofell MB, Moon TS. Biosensing in Smart Engineered Probiotics. *Biotechnol J* 2020;15(10):e1900319. doi:10.1002/biot.201900319

Sakurai T, Saruta M. Positioning and usefulness of biomarkers in inflammatory bowel

disease. *Digestion* 2023;104(1):30-41. doi:10.1159/000527846

Sathananthan D, Rajagopalan A, Van De Ven L, et al. Point-of-care gastrointestinal ultrasound in inflammatory bowel disease: An accurate alternative for disease monitoring. *JGH Open* 2019;4(2):273-279. doi:10.1002/jgh3.12269

Sciurti E, Signore MA, Velardi L, et al. Label-free electrochemical biosensor for direct detection of Oncostatin M (OSM) inflammatory bowel diseases (IBD) biomarker in human serum. *Talanta* 2024;271:125726. doi:10.1016/j.talanta.2024.125726

Scott E; Paepe KD; Wiele TV. Postbiotics and their health modulatory biomolecules. *MDPI – Biomolecules* 2022; 12(11): 1640; doi: 10.3390/biom12111640

Shaikh FA, Kurtys E, Kubassova O, et al. Reporter gene imaging and its role in imaging-based drug development. *Drug Discov Today* 2020. doi:10.1016/j.drudis.2019.12.010

Shan Y, Lee M, Chang EB. The gut microbiome and inflammatory bowel diseases. *Annu Rev Med* 2023; 73:455-68; doi: 10.1146/annurev-med-042320-021020

Shao Y, Wang K, Xiong X, et al. The landscape of interactions between hypoxia-inducible factors and reactive oxygen species in the gastrointestinal tract. *Oxi Med Cel Long* 2021; 2021:8893663; doi: 10.1155/2021/8893663

Sharkey KA, Mawe GM. The enteric nervous system. *Physiol Rev* 2022; 103(2):1487-1564; doi: 10.1152/physrev.00018.2022

Sharma BR, Jayant D, Rajshee K et al. Distribution and diversity of nisin producing lab in fermented food. *Curr Microbiol* 2021;78, 3430–3438. doi: 10.1007/s00284-021-02593-8

Sheng X, Liu D, Gamage SK, et al. Point-of-Care monitoring of colitis using intestinal alkaline phosphatase in inflammatory bowel disease. *ACS Sens* 2021;6(3):698-702. doi:10.1021/acssensors.0c02177

Shi S, Xie Y, Wang G, Luo Y. Metabolite-based biosensors for natural product discovery and overproduction. *Curr Opin Biotechnol* 2022;75:102699. doi:10.1016/j.copbio.2022.102699

Shobharani P, Padmaja RJ, Halami PM. Diversity in the antibacterial potential of probiotic cultures Bacillus licheniformis MCC2514 and *Bacillus licheniformis* MCC2512. *Res Microbiol* 2015;166(6):546–554. doi:10.1016/j.resmic.2015.06.003

Singh N, Bernstein CN. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *United European Gastroenterol* 2022; 10(10): 1047-53; doi: 10.1002/ueg2.12319

Spacapan M, Bez C, Venturi V. Quorum sensing going wild. *iScience* 2023;26(10):108000. doi:10.1016/j.isci.2023.108000

Tanna T, Ramachanderan R, Platt RJ. Engineered bacteria to report gut function: technologies and implementation. *Curr Opin Microbiol* 2021;59:24-33. doi:10.1016/j.mib.2020.07.014

Thai TD, Lim W, Na D. Synthetic bacteria for the detection and bioremediation of heavy metals. *Front Bioeng Biotechnol* 2023;11:1178680. doi:10.3389/fbioe.2023.1178680

Thorakkattu P; Khanashyam AC; Shah K, et al. Postbiotics: Current trends in food and pharmaceutical industry. *MDPI – Foods* 2022; 11(19): 3094; doi: 10.3390/foods11193094

Tie Y, Huang Y, Chen R, et al. Current insights on the roles of gut microbiota in inflammatory bowel disease-associated extra-intestinal manifestations: Pathophysiology and therapeutic targets. *Gut Microbes* 2023;15(2):2265028. doi: 10.1080/19490976.2023.2265028

Tsai YL, Lin TL, Chang CJ, et al. Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases. *J Biomed Sci* 2019;26(1):3. doi: 10.1186/s12929-018-0493-6

Vălean D, Zaharie R, Țaulean R, et al. Recent trends in non-invasive methods of diagnosis and evaluation of inflammatory bowel disease: A short review. *Int J Mol Sci* 2024; 25(4):2077; doi: 10.3390/ijms25042077

Vrzáčková N, Ruml T, Zelenka J. Postbiotics, metabolic signaling, and cancer. *Molecules* 2021;26(6):1528. doi: 10.3390/molecules26061528

Wang J, Childers WS. The future potential of biosensors to investigate the gut-brain axis. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;9:826479. doi:10.3389/fbioe.2021.826479

Wang M, Da Y, Tian Y. Fluorescent proteins and genetically encoded biosensors. *Chem Soc Rev* 2023;52(4):1189-1214. doi:10.1039/d2cs00419d

Xia JY, Hepler C, Tran P, et al. Engineered calprotectin-sensing probiotics for IBD surveillance in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2023;120(32):e2221121120. doi:10.1073/pnas.2221121120

Xu YW, Tian J, Song Y, et al. Metabolic syndrome's new therapy: Supplement the gut microbiome. *World J Diabetes* 2024;15(4):793-796. doi: 10.4239/wjd.v15.i4.793

Yan R, Zeng X, Shen J, et al. New clues for postbiotics to improve host health: a review from the perspective of function and mechanisms. *J Sci Food Agric* 2024;104(11):6376-6387. doi: 10.1002/jsfa.13444

Yilmaz, Y. Postbiotics as antiinflammatory and immune-modulating bioactive compounds in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Mol Nutr Food Res* 2024;68(23):e2400754. doi: 10.1002/mnfr.202400754

Zhang Y, Bi S, Xu Q, et al. Trends and perspectives in biosensing and diagnosis. *MDPI – Biosensors* 2024; 14(10): 499; doi: 10.3390/bios14100499

Zhao N, Liu JM, Yang FE, et al. A novel mediation strategy of DSS-Induced colitis in mice based on an iron-enriched probiotic and *in vivo* bioluminescence tracing. *J Agric Food Chem* 2020;68(43):12028-12038. doi:10.1021/acs.jafc.0c05260

Zheng J, Sun Q, Zhang M, et al. Noninvasive, microbiome-based diagnosis of inflammatory bowel disease. *Nature Portfolio* 2024; 30(12):3555-67. doi: 10.1038/s41591-024-03280-4

Zhong Y, Wang T, Luo R, et al. Recent advances and potentiality of postbiotics in the food industry: Composition, inactivation methods, current applications in metabolic syndrome, and future trends. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2024;64(17):5768-5792. doi: 10.1080/10408398.2022.2158174

Zhu X, Liu P, Xue T et al. A novel graphene-like titanium carbide MXene/Au–Ag nanoshuttles bifunctional nanosensor for electrochemical and SERS intelligent analysis of ultra-trace carbendazim coupled with machine learning. *Ceram Int* 2021;47(1):173–184. doi: 10.1016/j.ceramint.2020.08.121.

Żółkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, et al. Postbiotics—A step beyond pre- and probiotics. Nutrients 2020;12(8):2189. doi: 10.3390/nu12082189

Zou ZP, Du Y, Fang TT, et al. Biomarker-responsive engineered probiotic diagnoses, records, and ameliorates inflammatory bowel disease in mice. *Cell Host Microbe* 2023;31(2):199-212.e5. doi:10.1016/j.chom.2022.12.004

ARTIGO B – ARTIGO EXPERIMENTAL: A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE*

Desenvolvimento de nanocomposto de quitosana associado a isolado com potencial probiótico *Pediococcus acidilactici* CE51 e avaliação do seu efeito no dano intestinal em modelo animal

Karolinny Cristiny de Oliveira Vieira[1], Kimberlly de Oliveira Silva[2], Gisele Alborghetti Nai[3], Gilia Cristine Marques Ruiz[4], Carlos José Leopoldo Constantino[4], Lizziane Kretli Winkelstroter[1,2,3]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil
[2] Mestrado em Ciências da Saúde - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil
[3] Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil
[4] Department of Physics, Chemistry, and Biology, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Presidente Prudente, Brazil

Contato: Karolinny Cristiny de Oliveira Vieira. E-mail: karow.vieira@hotmail.com. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

Resumo

A ruptura dos mecanismos de proteção do sistema gastrointestinal (GI) pode causar síndromes de disfunção, como úlceras e sangramentos. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), como a indometacina, inibem a síntese de prostaglandinas protetoras, aumentando o risco de lesões na mucosa. Probióticos e nanopartículas surgem como alternativas promissoras para prevenir esses danos e auxiliar no tratamento. Este estudo teve como objetivo avaliar nanocompostos de quitosana associados ao probiótico *Pediococcus acidilactici* CE51 no dano intestinal induzido por indometacina em experimentação *in vivo*. O nanocomposto foi sintetizado por geleificação iônica e caracterizado morfologicamente. Sua resistência foi testada em condições adversas das fases oral, gástrica e intestinal da digestão. Foram utilizados 54 camundongos machos (*Mus musculus*), divididos em cinco grupos de nove, tratados via oral por 28 dias antes da indução da inflamação intestinal com indometacina (10 mg/kg) por 48h. Após a eutanásia, órgãos, sangue e fezes foram analisados para avaliar o efeito anti-inflamatório e a modulação da microbiota intestinal. Os resultados mostraram que o nanocomposto apresentou potencial zeta de -7,86 mV, índice de polidispersidade (PdI) de 0,513±0,05 e diâmetro médio das partículas de 358±18,38 nm. Foi observado um alto índice de mortalidade dos animais tratados com indometacina. O nanocomposto associado a probiótico demonstrou maior resistência às condições gastrointestinais em comparação ao probiótico isolado (p<0,05).). No grupo tratado, houve redução de 40% na congestão hepática e mais de 60% na lesão intestinal em relação ao grupo indometacina (p<0,05). Além disso, verificou-se diminuição dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e ureia. Entretanto, a análise metagenômica revelou impactos na microbiota intestinal, com redução de *Lactobacillus* e aumento de *Enterococcus*, sugerindo possíveis efeitos adversos. Conclui-se que os nanocompostos de quitosana associados a *Pediococcus acidilactici* CE51 possuem potencial farmacêutico, mas ajustes são necessários para minimizar impactos negativos na microbiota.

Palavras-chave: Indometacina, Inflamação Intestinal, Nanocomposto, Probiótico, Metagenômica.

1. Introdução

O sistema gastrointestinal (GI) é essencial para a digestão e absorção de alimentos, além de desempenhar importantes funções endócrinas, imunes e de barreira. Ele também é responsável pelo equilíbrio de fluídos, eletrólitos e ácido-base. Sua regulação ocorre por meio de complexos mecanismos miogênicos, neurais e humorais, que sofrem influência da presença de nutriente no lúmen, hormônios gastrointestinais e mediadores inflamatórios (Mahapatro et al, 2021).

Os mecanismos de proteção do sistema GI consistem em elementos físicos (mucosa intestinal intacta), não imunes (ácido gástrico, mucina intestinal, bile e peristaltismo) e imunes (tecido linfoide associado ao intestino). A ruptura de algum destes mecanismos de proteção pode desencadear uma cascata de processos inflamatórios no TGI, tornando a preservação da função gastrointestinal fundamental para uma recuperação favorável do paciente diante das doenças inflamatórias intestinais (DIIs) (Jarmakiewicz-Czaja et al, 2021).

A manutenção da homeostase intestinal requer o bom funcionamento da barreira intestinal, composta por epitélio intestinal, células e microbiota intestinal. Distúrbios gastrointestinais funcionais resultam de anormalidades morfológicas e fisiológicas que podem ocorrer em combinação, levando a alteração da motilidade, hipersensibilidade visceral, das mucosas e funções imunológicas, além de impactar a microbiota e o processamento do sistema nervoso central. Esses distúrbios são caracterizados por sintomas como náuseas, dor abdominal, sensação de queimação, que podem ocorrer por diversos fatores, incluindo o uso de alguns medicamentos, alimentação e estilo de vida (Pereira et al, 2020; Jarmakiewicz-Czaja et al, 2021; Gliszczyńska e Nowaczyk, 2021).

Os distúrbios gastrointestinais induzidos por medicamentos se assemelham a condições como síndrome do intestino irritável e DIIs. A falha em reconhecer esses sintomas relacionados aos medicamentos podem conduzir a um diagnóstico incorreto. Essas alterações podem ser decorrentes a: 1) alteração da fisiologia (constipação induzida por medicação anticolinérgica), 2) toxicidade e dano tecidual (úlceras de anti-inflamatórios não esteroides-AINEs), 3) alteração da microbiota intestinal, (antibióticos que causam infecção por *Clostridium difficile*), ou 4) por mecanismos desconhecidos, como com metformina (Philpott et al, 2014; Gliszczyńska e Nowaczyk, 2021; Monteros et al, 2021).

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são comumente prescritos devido efeito antipiréticos e analgésicos. No entanto, os AINEs, incluindo a indometacina, causam lesões no estômago e no intestino delgado. Comprovadamente, as análises fisiopatologia da lesão

intestinal induzida por AINEs são semelhantes à da Doença de Crohn em humanos, e desta forma, a lesão intestinal induzida por indometacina em camundongos tem sido aplicada como modelo útil para avaliar a inflamação intestinal (Shin e Lim, 2020; Tai e Mcalindon, 2021).

Normalmente, o tratamento dos distúrbios gastrointestinais, como as DIIs, visam apenas a melhora da sintomatologia, com o uso de anti-inflamatórios, antibióticos e imunossupressores, que podem causar graves efeitos adversos, além de não serem totalmente eficazes. Desta forma faz-se necessária a busca por alternativas que sejam mais confiáveis e eficientes (Amoroso et al, 2020).

As cepas probióticas possuem propriedades de restaurar a microbiota intestinal e modular a resposta imune agindo diretamente nas células do sistema imunológico. Estes microrganismos são denominados bioterapêuticos vivos que podem reestabelecer a homeostase e a integridade intestinal, diminuindo as consequências causadas pelo processo inflamatório, como a síndrome do intestino permeável. Eles podem ser administrados como cepas únicas ou múltiplas e ainda como uma terapêutica complementar a certos medicamentos convencionais (Yadav et al, 2022; Partty et al, 2018).

Os probióticos estão amplamente disponíveis em alimentos fermentados, além de suplementos com custo relativamente baixo, permitindo seu acesso por diferentes camadas da população. A confiabilidade de seu uso pode ser respaldada por inúmeras evidências científicas que demonstram sua eficácia na modulação da microbiota intestinal, no fortalecimento da resposta imunológica e na promoção da saúde gastrointestinal, com um perfil de segurança favorável e mínimos efeitos adversos. Além disso, é considerada uma terapia promissora, visto que estudos recentes apontam seu potencial terapêutico em diversas condições, incluindo distúrbios gastrointestinais e transtornos relacionados ao eixo intestino-cérebro, sugerindo novas perspectivas para a pesquisa e aplicação clínica (Wieërs et al, 2019; Durazzo et al, 2020).

Entretanto, para que exerçam sua função benéfica ao indivíduo, é necessário que atinjam o ambiente intestinal de forma viável e na quantidade adequada, resistindo a condições presentes no trato gastrointestinal (baixo pH gástrico, a atuação de enzimas digestivas e atividade dos sais biliares) (Plaza-Diaz et al, 2019; Wilkins e Sequoia, 2017). O efeito destas condições nos probióticos pode ser minimizada por técnicas de encapsulamento e nanotecnologia.

A nanoencapsulação tem despertado grande interesse para a produção de nanoterapêuticos pois auxiliam na obtenção de tratamentos mais precisos, melhor

monitoramento, desempenho aprimorado, além de diminuir os riscos de efeitos adversos devido sua baixa toxicidade (Wu et al, 2019). As nanocompostos de quitosana (CsNPs) tem despertado grande interesse para aplicações biomédicas, biotecnológicas e farmacêuticas, devido aos aspectos funcionais, não tóxico e biodegradável, sendo capazes de auxiliar no tratamento de doenças (Mukherjee et al, 2021; Aibani et al, 2021).

Na literatura, são escassos os trabalhos que avaliam o papel das nanocompostos associados aos probióticos no dano intestinal causado por indometacina, visto que raramente são conduzidas pesquisas experimentais sobre sua segurança e seu efeito. Nesse sentido, são necessários estudos para o desenvolvimento de novas estratégias com a utilização de nanocompostos com baixo custo, melhor qualidade e seguros para garantir a viabilidade e estabilidade destes componentes até o seu local de ação no hospedeiro e desta forma promover o tratamento e prevenção de distúrbios gastrointestinais. Este estudo teve como objetivo avaliar o impacto de nanocompostos de quitosana associado a isolado com potencial probiótico *Pediococcus acidilactici* CE51 no dano intestinal induzido por indometacina em experimentação *in vivo.*

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Desenvolvimento e caracterização de nanocompostos de quitosana associada a probiótico

O método de gelificação iônica foi utilizado para a preparação de nanocompostos de quitosana (Raj et al, 2015). Para a formação de nanocompostos, 0,3% de quitosana foi preparado em 0,2% de ácido acético. A associação com células probióticas (*Pediococcus acidilactici* CE51) também foi preparada com incorporação de solução de tripolifosfato (TPP) em solução de quitosana contendo aproximadamente 1 mL de bactéria diluída a 10^8 UFC/ml. Em seguida a solução foi titulado contra TPP (1 mg/ml) mantido em agitador magnético (Vieira et al, 2020). A solução foi então submetida a ultrassom, para reduzir o tamanho das partículas e em seguida centrifugada a 5000 rpm por 30 minutos. O nanocomposto foi então caracterizado por espalhamento dinâmico da luz (DLS) e potencial zeta usando o equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Worcestershire, UK). As medidas foram realizadas usando um ângulo de dispersão de 90º e a tensão potencial foi ajustada automaticamente pelo software (Raj et al, 2015).

Adicionalmente, foi realizada a determinação da digestibilidade pelo método padrão INFOGEST de simulação de digestão gastrointestinal *in vitro*. Foi simulado as fases oral,

gástrica e intestinal do processo de digestão, utilizando os fluídos digestivos: suco salivar com 75U.mL-1 de α-amilase, suco gástrico com 2.000U.mL-1 de pepsina, suco duodenal com 100U.mL-1 de pancreatina e bile com 10mmol.mL-1 de sais biliares. Sendo 100 µl das amostras agitado com 4 mL de saliva e incubado a 37°C durante 5min. Depois, foram adicionados 8 mL de suco gástrico, com 2h de incubação (37°C) com agitação constante. Na terceira etapa foi adicionado 8 mL de suco duodenal e 4 mL de bile ao extrato, submetido a uma segunda incubação (2h, 37°C). A digestão foi interrompida por imersão das amostras em gelo (5 min). As frações digeridas e não digeridas das amostras foram separadas por centrifugação a 2750×g (4°C, 10 min) e em seguida foi realizada a quantificação do *Pediococcus acidilactici* CE51 por meio da contagem em placa de MRS e em seguidas encubadas a 37°C por 24 horas para avaliação da sua resistência em condições estomacais e Intestinais (Brodkorb et al, 2019).

2.2. Avaliação do efeito de nanocompostos de quitosana associado a isolado com potencial probiótico *Pediococcus acidilactici* CE51 no dano intestinal induzido por indometacina

2.2.1. Experimentação animal

Planejamento estatístico

O cálculo amostral foi desenvolvido de acordo com Charan e Kanthari (2013). De acordo com este método, um valor "E" é medido, que nada mais é do que o grau de liberdade de análise de variância (ANOVA). O valor de E deve estar acima de 10. Se E for menor que 10, a adição de mais animais aumentará a chance de obter um resultado mais significativo. Embora, este método seja baseado em ANOVA, é aplicável a todas as experiências com animais. Qualquer tamanho de amostra, que mantém E acima de 10, deve ser considerado como adequado. E pode ser medido pela seguinte fórmula:

E = Número total de animais - Número total de grupos

E= 60 – 6 = 54 animais

Desta forma, 54 animais foi um número aplicável para testes quantitativos e qualitativos com experimentação animal. Foram utilizados 6 grupos (controle + tratamento) avaliados no trabalho, com 9 animais em cada grupo, totalizando 54 animais. Cada grupo foi distribuído em 3 caixas, contendo 3 animais por caixa.

O cálculo do tamanho da amostra apresentado também foi confirmado em detalhes segundo Damy et al. (2010), que determina o número de animais por grupo, igual a 9, é ideal

para alcançar significância para $p<0,05$ para diferenças entre o grupo controle e o tratado, considerando coeficiente de variação (CV) de 20%.

Delineamento experimental

Foram utilizados 54 camundongos machos linhagem *Mus musculus* (linhagem Swiss), de 6-8 semanas de idade (peso entre 18- 22g). Os animais foram acomodados em gaiolas e mantidos em condições controladas de temperatura (24 ± 2 ° C) e luz (ciclo: claro e escuro de 12 horas). Eles receberam ração e água *ad libitum*. Os camundongos passaram por um período de adaptação de 7 dias antes do início do protocolo. Os procedimentos deste experimento foram compatíveis com o Comitê de Ética de uso de animais (CEUA) (nº do protocolo 7660) e seguindo as diretrizes do The ARRIVE guidelines 2.0.

Para protocolo, os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos de 9 camundongos para cada tratamento (Shu et al, 2019, Rinwa e Kumar, 2012). A descrição dos tratamentos e do grupo experimental está demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos grupos experimentais.

Grupos experimentais	Fase pré-tratamento	Fase de indução + tratamento
Grupo 1: CMC	Os animais receberam via oral 0,5% de carboxilmetilcelulose (veículo)	Os animais receberam por via oral 0,5% de carboxilmetilcelulose (veículo)
Grupo 2: I	Os animais receberam via oral 0,5% de carboxilmetilcelulose (veículo)	Os animais receberam por via oral indometacina (10 mg/kg)
Grupo 3: IP	Os animais receberam por via oral isolado com potencial probiótico *Pediococcus acidilactici* CE51 10^8UFC/ml	Os animais receberam por via oral solução indometacina (10mg/kg) + isolado com potencial probiótico *Pediococcus acidilactici* CE51 10^8UFC/ml
Grupo 4: INP	Os animais receberam por via oral nanocompostos de quitosana associados ao isolado com potencial probiótico *Pediococcus acidilactici* CE51 10^8UFC/ml	Os animais receberam por via oral solução indometacina (10 mg/kg) + nanocompostos de quitosana associado ao isolado com potencial probiótico *Pediococcus acidilactici* CE51 10^8UFC/ml
Grupo 5: IN	Os animais receberam por via oral nanocomposto de quitosana	Os animais receberam por via oral solução indometacina (10 mg/kg) + nanocomposto de quitosana
Grupo 6: IS	Os animais receberam via oral 0,5% de carboxilmetilcelulose (veículo)	Os animais receberam por via oral solução indometacina (10 mg/kg) +

Sulfassalazina (10mg/kg)

Os animais receberam os tratamentos propostos via oral (gavagem) na fase de pré-tratamento por 28 dias. Após esse período, a inflamação intestinal foi induzida pela administração de indometacina (10 mg/kg) via oral (gavagem) durante os 2 dias de experimentação, num intervalo de 30 min após a dose do tratamento. Em um grupo experimental, foi administrado via oral (gavagem) 0,5% de carboxilmetilcelulose (veículo) como controle, por ser utilizado como veículo dos reagentes.

O índice de atividade da doença (IAD) foi observado diariamente pela perda ou ganho de peso, positividade de sangue oculto nas fezes, sangramento grave e consistência das fezes. Esses parâmetros clínicos correspondem aos sintomas observados na DII (Nandi et al, 2008).

No 38° dia de experimento, os animais foram eutanasiados, seguindo a ordem: 1- Anestesia geral; 2- Punção cardíaca; 3- Morte por exsanguinação; 4- Necropsia. Foram utilizados os anestésicos Cloridrato de Cetamina 10% (75mg/kg) e Cloridrato Xilazina 2% (10mg/kg), sendo administrados por via intraperitoneal. Os indicativos de morte foram a ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos (Shu et al, 2019).

O sangue foi coletado por punção cardíaca e em seguida centrifugado para obtenção do soro. O rim, intestino, fígado, baço e estômago foram coletados para análise histopatológica. As fezes foram coletadas para análise de metagenômica.

Dosagem de marcadores bioquímicos

O sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca sob anestesia e então centrifugado (15minutos a 1000xg em temperatura ambiente). O soro foi coletado e armazenado a -20ºC até momento das dosagens. A concentração de Aspartato aminotransferase - AST, Alanina aminotransferase - ALT, proteína, albumina, globulina, creatinina e ureia foi determinada pelo método de espectrofotometria, segundo orientações do fabricante (Roche. Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Suíça) na plataforma de análise modular Roche Cobas 8000.

Análise histopatológica

Após eutanasiados, o baço, rim, fígado, estômago, intestinos delgado e grosso foram removidos e pesados (gramas). Para pesagem do estômago, o orgão foi previamente lavado em seu interior para remoção de resíduos. As extremidades dos rins foram medidas utilizando

paquímetro antropométrico e os intestinos foram lavados e medidos utilizando régua e fita métrica. Os órgãos foram limpos (gorduras e tecidos aderidos à parede foram removidos), lavados em água corrente, fixados por imersão em solução de formalina tamponada a 10% por 48 horas, processadas rotineiramente e embebidas em parafina. Os cortes histológicos de 5µm de espessura foram corados com Hematoxilina-eosina (HE) para análise em microscopia de luz.

A análise histomorfométrica foi realizada obtendo-se 3 segmentos sequenciais do intestino de cada animal. A altura (µm) de 10 vilosidades e 10 criptas de cada animal foi obtida medindo-se a distância vertical da extremidade superior até o limite inferior de cada uma.Os valores da altura das vilosidades e criptas para cada animal foram representados pelos valores médios dos três cortes histológicos (Nandi et al, 2008; Shu et al, 2019).

As imagens dos cortes histológicos foram capturadas em um aumento de 100x por uma câmera digital conectada a um microscópio de luz. As imagens digitais foram analisadas por meio de software apropriado (Image J® 1.50b, *National Institutes of Health*, EUA) (Gerhard et al, 2017).

O dano tecidual foi analisado e avaliadas as alterações teciduais com seus respectivos escores conforme Pegoraro et al. (2021) (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros microscópicos avaliados e seus respectivos escores.

Estômago
Congestão: ausente (0); leve (1); moderada (2); intensa (3);
Intensidade da inflamação: ausente (0); leve (1); moderada (2); intensa (3);
Tipo de célula inflamatória;
Atrofia da mucosa;
Necrose da mucosa: ausente (0); presente e pequena (1); presente e extensa (2);
Hiperplasia da mucosa: ausente (0); presente (1);
Intestino grosso e delgado
Intensidade da inflamação: ausente (0); leve (1); moderada (2); intensa (3);
Tipo de célula inflamatória
Hiperplasia linfoide: ausente (0); presente (1);
Ulceração do epitélio: ausente (0); presente e pequena (1); presente e extensa (2);
Necrose da parede intestinal: ausente (0); presente (1);
Atipias regenerativas do epitélio: ausente (0); presente (1);
Fígado
Intensidade da inflamação: ausente (0); leve (1); moderada (2); intensa (3);
Tipo de célula inflamatória: mononuclear; polimorfonuclear;
Esteatose: ausente (0); presente (1);
Padrão de esteatose: macrovesicular; microvesicular; misto (macrovesicular e microvesicular);
Baço
Hiperplasia de polpa branca: ausente (0); presente (1);
Hiperplasia de polpa vermelha: ausente (0); presente (1);

Análise metagenômica da microbiota intestinal

Foram amostradas fezes do intestino médio de 9 camundongos por tratamento (CMC, I, IP, IN, INP, IS). O conteúdo intestinal (fezes) de cada animal foi coletado, armazenado em microtubos livres de DNases e RNases e, imediatamente, congelado à -20°C para posterior análise metagenômica.

A extração de amostras de DNA bacteriano foi realizada usando o ZymoBIOMICSTM DNA Miniprep Kit (Zymo Research) seguindo as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram imediatamente congeladas em freezer a -20°C até a análise molecular. A biblioteca foi preparada com primers para a região V3-V4 do 16S rRNA (~ 470 pb, amplificado com primers 341F x 806R), e os amplicons das bactérias foram sequenciados pela plataforma Illumina (Novaseq6000 PE 250). Sequência dos primers 341F 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3' e 806R 5'- GGACTACNNGGTATCTAAT-3'.

Os dados da sequência foram processados e analisados com QIIME [Quantitative Insights Into Microbial Ecology, versão 2022.2.0 (https://qiime2.org/)]. Em média, um total de 153.269 leituras brutas foram sequenciadas. Inicialmente, durante as etapas de demultiplexação e trimming, as leituras de baixa qualidade foram removidas, como leituras até Q30, leituras com comprimento insatisfatório e quimeras foram removidas com o QIIME. Após esse processo, o conjunto de dados continha uma média de 106.918 leituras brutas. As leituras limpas foram usadas na definição do ASV(Amplicon Sequence Variant).

Para medir as taxas presentes nas amostras, foi utilizado um modelo preditor da região V3 e V4 (SILVA 138,99% OTUs full length sequences). Heatmaps e barplots de abundância relativa de ASVs foram gerados com Python (versão 3.7) através de códigos desenvolvidos pela empresa ByMyCell Inova Simples Ltda.

Análise estatística

Todos os dados analisados foram submetidos ao teste de normalidade usando o teste Kolmogorov-Smirnov. A comparação entre dois grupos foi realizada através do teste t de Student para dados não pareados ou pelo teste de Mann-Whitney. Quando três ou mais grupos foram comparados foi usado a análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Bonferroni para verificar a diferença entre os grupos. Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$. O programa de estatística usado foi o GraphPadPrism 3.0.

3. Resultados

O potencial zeta do nanocomposto de quitosana foi de -7,86 mV, indicando uma carga negativa na superfície da célula. Os nanocompostos de quitosana apresentaram valor de índice de polidispersividade (PdI) igual a 0,513±0,05, e o DLS indicou que o diâmetro das partículas (z-média) foi de aproximadamente 358nm±18,38.

A análise da resistência em condições orais, estomacais e intestinais demonstraram uma redução em apenas 0,4 log UFC/ml nas contagens do probiótico na formulação isolada quando submetidos a fase intestinal ($p<0,05$) (Figura 1B). Os nanocompostos de quitosana associados ao isolado com potencial probiótico *Pediococcus acidilactici* CE51 apresentou resistência a condições orais, estomacais e intestinais, sem decréscimo significativo do inóculo inicial em fase oral (Figura 1A).

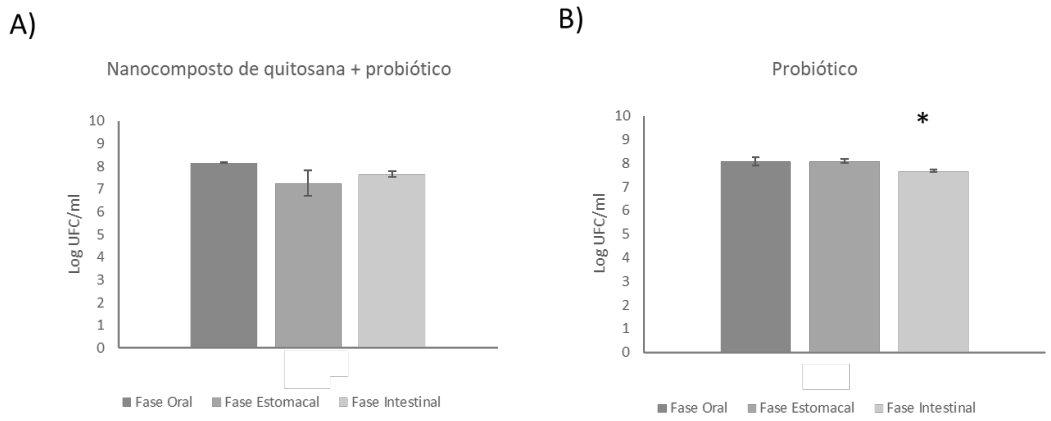

Figura 1. Contagem em placa para a avaliação da resistência a condições orais, estomacais e intestinais pelo A) nanocompostos de quitosana associado a isolado com potencial probiótico *Pediococcus acidilactici* CE51 e B) isolado com potencial probiótico *Pediococcus acidilactici* CE51.

O protocolo de indução do dano intestinal foi confirmado pela presença de sangue oculto nas fezes nos grupos de animais que receberam indometacina (Figura 2A). Todos os animais apresentaram o aumento de peso até o final do pré-tratamento ($p<0,05$) (Figura 2B). Após período de indução de dano intestinal foi observado perda de peso nos grupos tratados com indometacina.

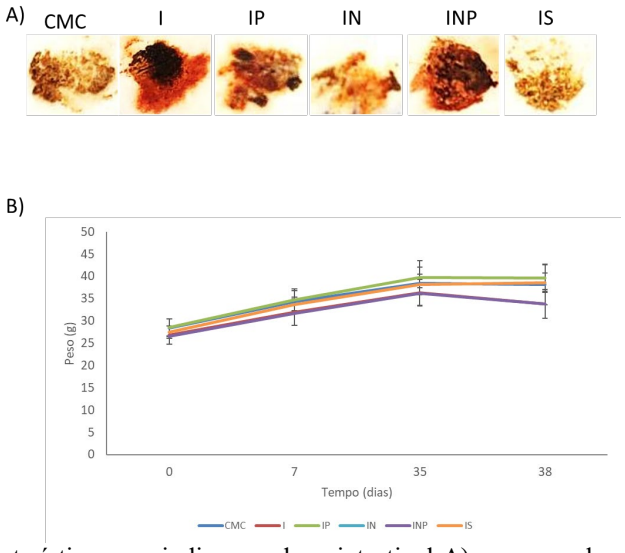

Figura 2. Avaliação de características que indicam o dano intestinal A) presença de sangue oculto nas fezes dos animais dos grupos I, IP, IN e INP. B) Avaliação da variação de peso (g) dos animais do grupo CMC, I, IP, INP, IN e IS nos 38 dias de experimento considerando: início dos experimentos (T0), final do período de adaptação (T7), final do período de pré-tratamento (T35) e final do período de indução (T38).

Os grupos CMC e IS apresentaram 100% de sobrevivência dos animais ao final do experimento (Figura 3). Os grupos I, IP, INP e IN apresentaram redução significativa na sobrevivência dos animais ($p<0,05$). Dentre os grupos tratados com indometacina, o grupo INP apresentou menor sobrevivência (33,3%) se comparado com os grupos IP e IN que apresentaram maior sobrevivência dos animais ($p<0,05$).

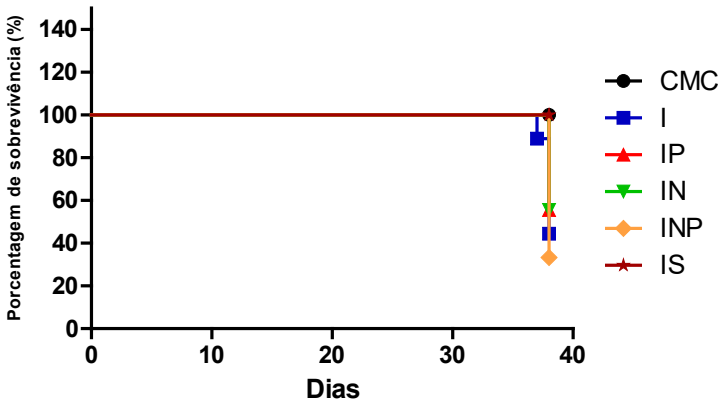

Figura 3. Curva de sobrevivência dos animais durante período de experimentação de 38 dias considerando: CMC (grupo controle), I (grupo com indução de dano intestinal por indometacina), IP (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento com probiótico), IN (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento nanocompostos de quitosana), INP (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento com nanocompostos de quitosana associado a probiótico), IS (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento com sulfassalazina).

De acordo com a figura 4, a dosagem de ALT foi maior no grupo I se comparado com todos os grupos experimentais ($p<0,05$) e AST apresentou a menor valor no grupo INP

($p<0,05$). Não foram observadas diferenças significativas na dosagem de creatinina, entretanto, a dosagem de ureia foi menor no grupo INP se comparado com os outros grupos tratados com indometacina para indução de dano intestinal ($p<0,05$).

Foi observado uma redução na síntese de proteínas totais e albumina em todos os grupos tratados com indometacina ($p<0,05$), entretanto, foi notado um menor impacto na dosagem do grupo INP. A concentração de globulina apresentou um aumento nos grupos I, IP, IN e INP se comparado com o grupo IS ($p<0,05$).

Em relação as análises anatohistopatológicas não foram observadas alterações no estômago e rim. Foi observado uma redução de cerca de 67% e 100% do dano intestinal no intestino delgado e grosso respectivamente, no grupo INP se comparado com o grupo I ($p<0,05$), entretanto, não houveram alterações significativas nas medidas de vilosidades e criptas (Tabela 3 e Figura 5). As análises do fígado demonstraram uma redução em cerca de 40% na congestão do grupo INP ($p<0,05$) se comparado com o grupo I. Por outro lado, o baço do grupo INP apresentou um aumento de 25% na hiperplasia de polpa branca em comparação com o mesmo grupo ($p<0,05$) (Tabela 2 e Figura 5).

Foram observadas alterações macroscópicas após necropsia, como estômago dilatado, esplenomegalia e encurtamento dos intestinos delgado e grosso.

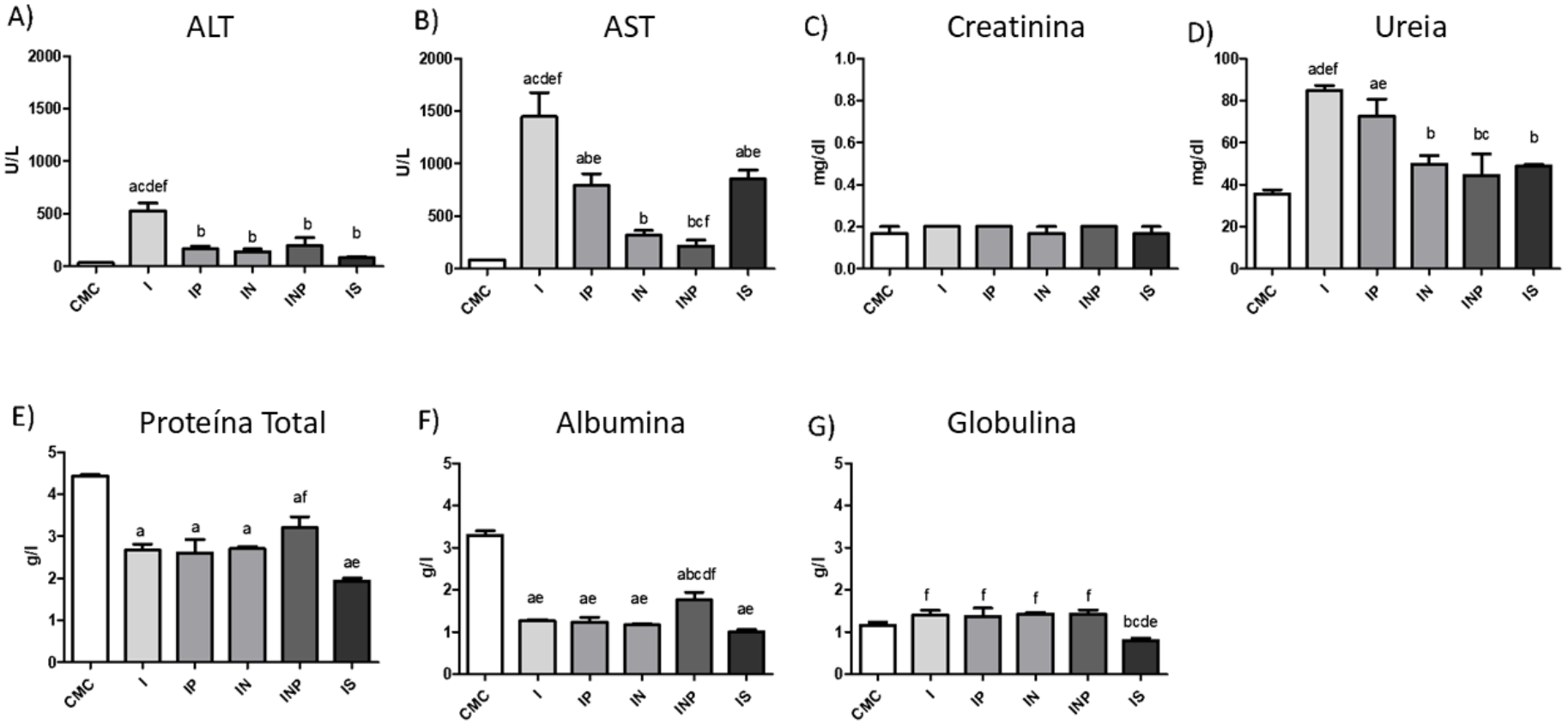

Figura 4. Dosagem sorológica de A) ALT B) AST C) Creatinina D) Ureia E) Proteína Total F) Albumina G) Globulina de animais dos grupos experimentais: CMC (grupo controle), I (grupo com indução de dano intestinal por indometacina), IP (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento com probiótico), IN (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento nanocompostos de quitosana), INP (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento com nanocompostos de quitosana associado a probiótico), IS (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento com sulfassalazina). [a]Diferença estatística em relação ao grupo CMC ($p<0,05$). [b] Diferença estatística em relação ao grupo I ($p<0,05$)[c] Diferença estatística em relação ao grupo IP ($p<0,05$) [d] Diferença estatística em relação ao grupo IN ($p<0,05$) [e] Diferença estatística em relação ao grupo INP ($p<0,05$) [f] Diferença estatística em relação ao grupo IS ($p<0,05$) .

Tabela 3. Análise histopatológica do intestino delgado, intestino grosso, baço e fígado de camundongos dos grupos experimentais: CMC (grupo controle), I (grupo com indução de dano intestinal por indometacina), IP (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento com probiótico), IN (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento nanocompostos de quitosana), INP (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento com nanocompostos de quitosana associado a probiótico), IS (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento com sulfassalazina).

	Intestino Delgado		Intestino Grosso		Baço	Fígado
Grupos	Intensidade de inflamação n/N (%)	Medidas vilosidades (µm)	Medidas Criptas (µm)	Intensidade de inflamação n/N (%)	Hiperplasia de Polpa Branca n/N (%)	Congestão n/N (%)
CMC	0/9 (00,0)	388,3±52,0	73,0± 15,1	0/9 (00,0)	0/9 (00,0)	0/9 (00,0)
I	4/4 (100)[a,e,f]	370,9±29,6	57,4 ±11,8	1/4 (25,0)[a,d,e]	2/4 (50,0) [a,d,e,f]	3/4(75,0) [a,c,e]
IP	5/5 (100)[a,e,f]	401,3±13,8	62,2 ±10,7	1/5 (20,0)[a,d,e]	2/5 (40,0) [a,d,e,f]	2/5 (40,0) [a,b,d,f]
IN	5/5 (100)[a,e,f]	390,9±29,5	87,5 ± 9,3	0/5 (00,0)[b,c,f]	4/4 (100,0)[a,b,c,e,f]	3/5 (60,0) [a,b,c,e]
INP	1/3 (33,3)[a,b,c,d]	458,7±14,82	82,8 ± 35,8	0/3 (00,0)[b,c,f]	3/4 (75,0)[a,b,c,d,f]	1/3 (33,3) [a,b,d,f]
IS	2/9 (22,2)[a,b,c,d]	378,3±40,2	74,1 ± 13,8	2/9 (22,2) [a,d,e]	1/9 (11,1) [a,b,c,d,e]	6/9 (66,6) [a,c,e]

[a]Diferença estatística em relação ao grupo CMC ($p<0,05$)
[b] Diferença estatística em relação ao grupo I ($p<0,05$)
[c] Diferença estatística em relação ao grupo IP ($p<0,05$)
[d] Diferença estatística em relação ao grupo IN ($p<0,05$)
[e] Diferença estatística em relação ao grupo INP ($p<0,05$)
[f] Diferença estatística em relação ao grupo IS ($p<0,05$)

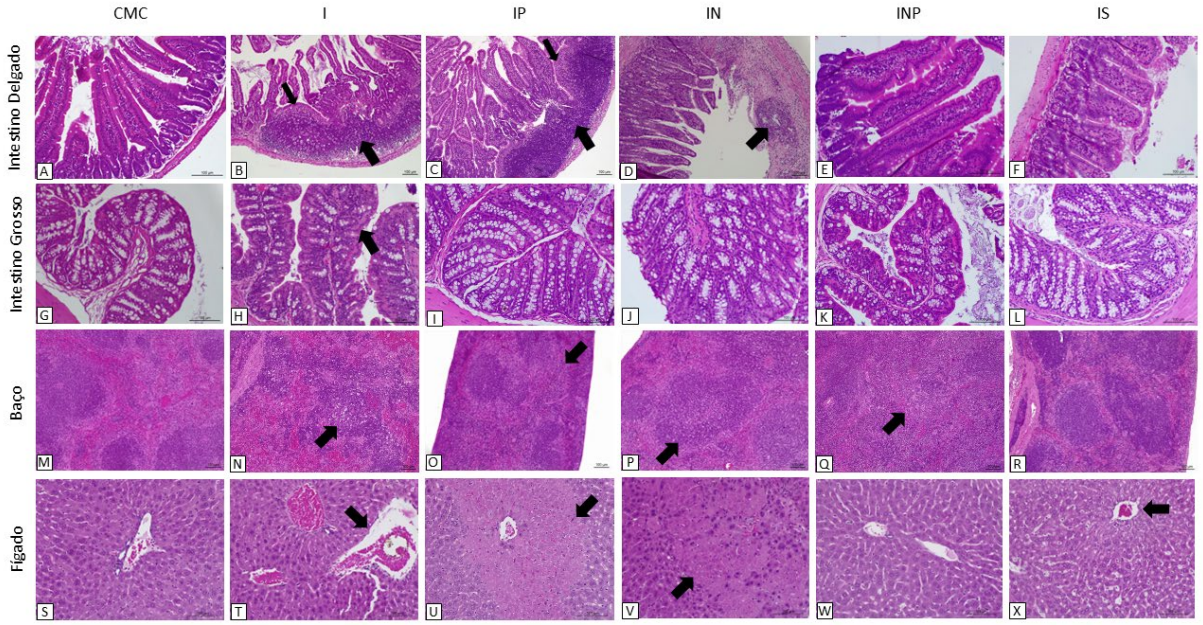

Figura 5. Atenuação da inflamação por tratamento com nanoquitosana e probiótico em análises histopatológicas na colite induzida por indometacina. **Fotomicroscopia do intestino delgado: (A)** Mucosa normal (grupo CMC animal) (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x). **(B)** Hiperplasia linfoide (seta larga) e inflamação leve (seta fina) (animal do grupo I) (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x). **(C)** Hiperplasia linfoide (seta larga) e inflamação leve (seta fina) (animal do grupo IP) (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x). **(D)** Área ulcerada da mucosa (seta) (animal do grupo IN) (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x). **(E)** Mucosa normal (animal do grupo INP) (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x). **(F)** Mucosa normal (grupo IS animal) (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x). **Fotomicroscopia do intestino grosso: (G)** Mucosa normal (grupo CMC animal). **(H)** Inflamação leve da mucosa (seta) (animal do grupo I). **(I)** Mucosa normal (animal do grupo IP). **(J)** Mucosa normal (animal do grupo IN). **(K)** Mucosa normal (animal do grupo INP). **(L)** Mucosa normal (animal do grupo IS). (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x). **Fotomicroscopia do baço: (M)** Parênquima esplênico normal (animal do grupo CMC). **(N)** Exuberante hiperplasia da polpa branca com aspecto de "céu estrelado" (seta) (grupo I animal). **(O)** Hiperplasia da polpa branca (seta) (animal do grupo IP). **(P)** Hiperplasia da polpa branca (seta) (animal do grupo IN). **(Q)** Hiperplasia da polpa branca (seta) (animal do grupo INP). **(R)** Parênquima esplênico normal (animal do grupo IS). (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x). **Fotomicroscopia do fígado: (S)** Parênquima hepático normal. **(T)** Intensa congestão hepática, com vasos muito dilatados e repletos de hemácias. **(U)** Notar área de células sem núcleo e com citoplasma mais rosa ao redor da veia centrolobular. **(V)** Notar área de células sem núcleos e coloração mais rósea, indicando a necrose celular. **(W)** Parênquima hepático normal. **(X)** Presença de vasodilatação, muitas hemácias no interior indicando congestão (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x).

A Figura 6 demonstra a abundância relativa dos filos, família e gênero da microbiota intestinal dos animais dos grupos experimentais do presente estudo. Foi observado aumento do filo Firmicutes na amostra IP se comparado com a amostra CMC ($p<0,05$). O filo Bacteroidota apresentou uma redução significativa nos grupos I, IP e IN. Foi observado aumento do filo Proteobacteria nos grupos I, INP e IN ($p<0,05$).

Em relação a família, os grupos I, INP e IS apresentaram redução na família *Lactobacillaceae* ($p<0,05$). A família *Muribaculaceae* apresentou redução em I, IP, INP e IN ($p<0,05$). A família *Enterobacteriaceae* apresentou um aumento significativo para o grupo I,

enquanto a família *Clostridiaceae* apresentou aumento nas amostras de IP e IN ($p<0,05$).

Em relação ao gênero, foi observado redução de *Lactobacillus* em I, INP e IS enquanto que o gênero *Muribaculaceae* apresentou redução nas amostras I, IP, INP e IN ($p<0,05$). Gênero *Escherichia-Shigela* aumentou nas amostras de I, INP, IN e de *Enterococcus* no grupo I e INP se comparado com grupo CMC.

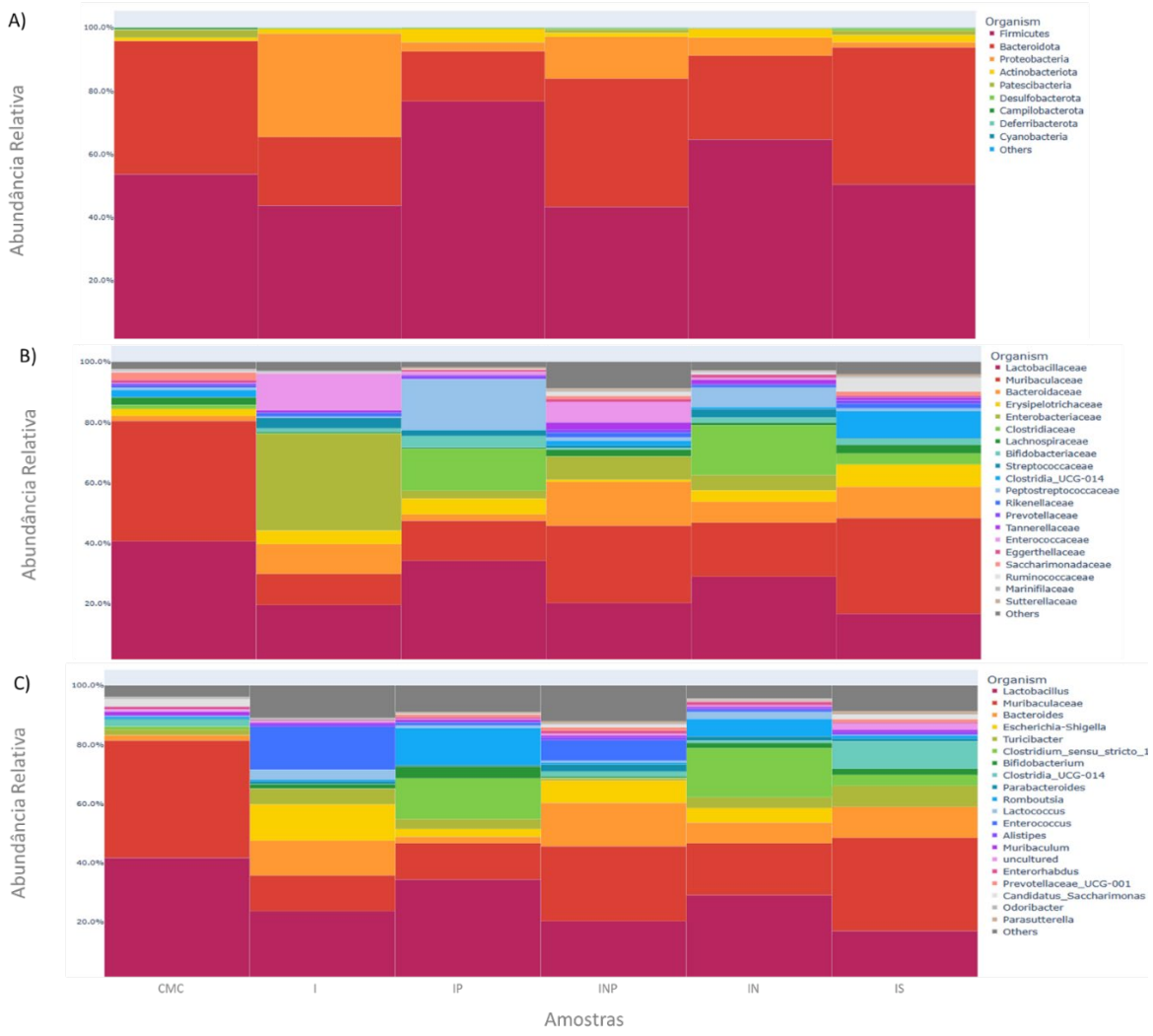

Figura 6. Avaliação da abundância relativa da microbiota intestinal obtida a partir da análise de fezes de camundongos dos grupos experimentais: CMC (grupo controle), I (grupo com indução de dano intestinal por indometacina), IP (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento com probiótico), IN (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento nanocompostos de quitosana), INP (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento com nanocompostos de quitosana associado a probiótico), IS (grupo com indução de dano intestinal por indometacina + tratamento com sulfassalazina). Considerar em A) análise referente a diversidade dos Filos dos microrganismos B) análise referente a diversidade da família dos microrganismos C) análise referente a diversidade do gênero dos microrganismos.

4.Discussão

O potencial Zeta representa a carga elétrica efetiva na superfície dos nanocompostos, que pode variar de -100 mV a +100 mV, indica a estabilidade dos nanocompostos (Selvamani, 2019; Ramar, 2022). Na literatura alguns trabalhos demonstram os potenciais Zeta de nanocompostos de quitosana como: –11,8 mV (Hoang et al, 2022), −28 mV (Manikandan e Sathiyabama, 2016), 20,8–27,8 mV (Suryadi et al, 2017), 21,7–45,6 mV (Kheiri et al, 2017). O material testado no presente trabalho resultou um potencial zeta de -7,86 mV, apresentando particularidade catiônica e boa qualidade, por não permitir agregação devido à repulsão entre as partículas.

O DLS apresentou o tamanho da partícula com diâmetro médio em torno de 358nm±18,38. Resultados aproximados foram encontrados em estudo de Kheiri et al. (2017) para nanocompostos sintetizados a partir de quitosana com diferentes pesos moleculares, sendo obtidos valores aproximadamente entre 180–595 nm. A distribuição de tamanho do nanocomposto é avaliada por meio do PDI, que indica um sistema monodisperso quando próximo a 0, e um sistema heterodisperso quando próximo a 1 (Mirtajaddini et al, 2021). O PDI obtido neste estudo foi de 0,513, que está entre os parâmetros e sugere homogeneidade do sistema, indicando que a maior parte do nanocomposto de quitosana se encontra distribuída em tamanhos iguais.

Diferentes isolados de *P. acidilactici* tem atraído o interesse de pesquisadores por suas propriedades de adesão aos enterócitos, colonização do trato digestivo e síntese de metabólitos ativos. O isolado *P. acidilactici* CE51 foi avaliado previamente quanto a resistência a condições gastrintestinais e em matriz alimentícia (Rocha et al, 2021; Vieira et al, 2020). Os resultados de Abbasiliasi et al. (2017) também corroboram com o presente trabalho, no qual observaram que o isolado *P. acidilactici* Kp10 apresentou tolerância significativa aos sais biliares e condições de pH ácido encontrado na solução gástrica.

Dentre os resultados apresentados, observamos que a formulação de nanocomposto de quitosana associado a *P. acidilactici* CE51 demonstrou melhor resistência à fase intestinal quando comparado ao probiótico de maneira isolada, conferindo melhor viabilidade *in vitro*. Ebrahimnezhad et al. (2017) utilizou da quitosana para a nanoencapsulação da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* com o objetivo de aumentar sua estabilidade e viabilidade no ambiente gástrico e intestinal. Eles obtiveram um resultado satisfatório, dado que, *in vitro*, a bactéria encapsulada teve uma taxa de sobrevivência maior quando comparada

a bactéria livre. Deste modo, a nanoformulação de probióticos pode ser considerada uma técnica promissora nos processos farmacêuticos e necessária para maior efetividade dos probióticos no paciente.

É relatado que o uso de indometacina pode gerar danos graves ao TGI levando a sangramentos, formação de úlceras e desequilíbrio da microbiota intestinal (Munjal e Allam, 2023). No presente trabalho, foi possível notar que o pré-tratamento não interferiu no ganho de peso dos animais. A administração do CMC, do probiótico e do nanocomposto possibilitou a evolução normal do peso dos animais, no entanto, quando iniciado o tratamento com indometacina, ocorreu redução no peso dos grupos que a receberam. Salameh et al. (2020) obtiveram um resultado semelhante ao verificar que a indometacina induziu a perda de peso corporal dos camundongos tratados.

Foi constatado no presente trabalho um alto índice de mortalidade dos animais tratados com indometacina, inclusive aqueles tratados com probióticos. Estudos revelam que a indometacina leva a uma hiperpermeabilidade intestinal por reduzir a camada de muco intestinal. Os AINES são conhecidos por inibir a ciclooxigenase-2 (COX2) e consequentemente reduz a produção de prostaglandinas, como a PGE2, que é responsável pelo controle da produção de muco do intestino delgado (Strnad et al, 2016; Kwak et al, 2016). Segundo El-Lekawy et al. (2019), houve aumento da permeabilidade intestinal em ratos nas primeiras horas após uma única aplicação de indometacina. A desintegração da mucosa intestinal faz com que aumentem as chances de evolução para a sepse, o que pode ter levado a diminuição da sobrevida dos animais que receberam a indometacina e probióticos. Desta maneira é possível ressaltar que os mecanismos de defesa da barreira intestinal são fundamentais para impedir a disseminação de bactérias para a corrente sanguínea e causar a sepse.

Além disso, a indometacina também induz ulcerações graves com células necróticas, infiltração neutrofílica do baço e linfonodo mesentérico (Munjal e Allam, 2023; Whitfield-Cargile et al, 2016). Kwon et al. (2019) constatou extensas lesões na mucosa gástrica de camundongos com sinais de hemorragia após 3 horas da administração de indometacina. Tendo em vista o dano grave causado pelo medicamento, no presente estudo, os animais podem ter apresentado processos hemorrágicos suficiente para resultar em óbito.

Observamos o aumento da dosagem da alanina aminotransferase (ALT), enzima hepática que é determinante na identificação de lesão hepatocelular e que pode ter sido induzida pelo uso da indometacina, visto que esta alteração foi encontrada principalmente no grupo I (Moriles e Azer, 2023). Em contrapartida, no grupo INP, a dosagem de aspartato

aminotransferase (AST) e ureia se encontrou diminuída. A AST participa de processos de transaminação e é responsável pela síntese do aminoácido L-Asp que está envolvido no ciclo da ureia, portanto a diminuição da AST interfere indiretamente nos valores de ureia e indicam que o composto nano probiótico foi eficaz em reduzir o dano hepático e manter a função renal, visto que esta diminuição com o uso de probióticos já foi descrita em trabalhos anteriores (Otto-ŚlusarczyK et al, 2016; Huang et al, 2019; Zhu et al, 2021). Tendo em vista a interação entre os sistemas hepático e intestinal, o uso de indometacina também pode refletir em danos hepáticos, podendo também ocasionar hepatite colestática (Nor et al, 2021; Colomba et al, 2014).

A diminuição das proteínas totais e da albumina foi constatada em todos os grupos que receberam a indometacina, diminuição esta que se assemelha a resultados em pesquisas prévias que também apontaram uma redução acentuada em suas concentrações séricas após a aplicação em modelo animal (Whiting et al, 1987; Cervantes-Garcia et al, 2020; Singh et al, 2016).

O fígado é responsável por diversas funções metabólicas e de biossíntese, especialmente de proteínas, sendo a albumina a mais abundante e de síntese exclusivamente hepática (Kim e Choi, 2020; Gounden et al, 2023). A albumina representa 55% do conteúdo total de proteínas plasmáticas e é essencial na manutenção da pressão oncótica, porém, sua produção pode ser inibida por mediadores pró-inflamatórios, como a interleucina-6, interleucina-1 e fator de necrose tumoral (TNF-α) (Trefts et al, 2017; Gounden et al, 2023). Tendo em vista que estas proteínas estão relacionadas com a síntese hepática, a redução das mesmas indica o potencial dano causado pela indometacina, tanto pelo seu efeito hepatotóxico quanto pela inflamação gerada por acarretar a liberação de mediadores pró-inflamatórios. Outro fator que pode ter ocasionado esta redução seria a enteropatia perdedora de proteínas, que implica na perda excessiva de proteínas pelo TGI, uma vez que está associado com lesões na mucosa com aumento da sua permeabilidade levando ao extravasamento de fluídos ricos em proteína, como em casos de colite ulcerativa (Braamskamp et al, 2010). Falzon et al. (1985) utilizou juntamente com a indometacina um composto denominado i6, i6 dimetilprostaglandina F22 na tentativa de amenizar os efeitos da indometacina sob as proteínas totais e a albumina, porém, não obteve sucesso. Entretanto, no presente estudo o uso concomitante da indometacina com o nanocompostos de quitosana associados ao isolado com potencial probiótico *Pediococcus acidilactici* CE51 gerou resultados favoráveis na atenuação da inflamação.

De modo geral, a globulina também se apresentou elevada em todos os grupos que

receberam o tratamento com a indometacina, com exceção apenas do grupo IS. A globulina sérica tem sido utilizada não apenas como um marcador de danos hepáticos, mas também como indicador de outros processos patológicos, como a colite ulcerativa (Huang et al, 2023). Portanto, sua elevação pode estar relacionada tanto com o efeito hepatotóxico da indometacina quanto aos danos ulcerativos causados pela mesma que gerou uma resposta imunológica. Naggar et al. (2020) testou o efeito da naringina, medicamento anti-inflamatório, no tratamento de colite induzida por indometacina em coelhos e verificou que a administração da indometacina deu origem a ulcerações por toda mucosa, o que fez com que os níveis de anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos perinucleares séricos tivessem aumento significativo quando comparado ao controle. Suchiva et al. (2021) relata ainda que a inibição da COX2, característica já conhecida dos AINES, fez com que os níveis de imunoglobulina E (IgE) total sérica aumentassem sua dosagem.

A sulfassalazina é um fármaco aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) indicado para o tratamento de DII por demonstrar ser eficaz na atenuação da inflamação intestinal e melhora da resposta inflamatória (Jaafar, Abu-Raghif, 2023; Dik et al, 2018). Devido esta atenuação do processo inflamatório, é sugerido que a resposta imunológica também decaia, o que explica a eficácia da sulfassalazina em conter o aumento de globulina.

A utilização de probióticos para a terapêutica de DII tem se mostrado promissora devido seus efeitos moduladores na microbiota intestinal, entre diversos outros mecanismos exercidos que geram impacto benéfico (Roy e Dhaneshwar, 2023; Jakubczyk et al, 2020). Zhou et al. (2022) utilizaram uma cepa probiótica geneticamente modificada associada ao revestimento de quitosana e alginato de sódio para suportar as condições do TGI afim de verificar sua ação na DII induzida por sulfato de sódio de dextrano (DSS). A intervenção terapêutica demonstrou proteção aos camundongos às consequências causadas pelo DSS, como danos ao cólon quando comparado ao controle, tendo alívio da inflamação (Zhou et al, 2022).

No presente estudo foi possível notar atenuação dos danos ocasionados pela indometacina ao intestino delgado e grosso com a administração do nanocomposto associado ao probiótico quando comparado ao grupo I. Em estudo de Monteros et al. (2021), foram avaliadas duas cepas probióticas, denominadas *Lactobacillus casei CRL 431 e Lactobacillus paracasei CNCM I-1518* para avaliar os efeitos frente a inflamação induzida por indometacina. Foi observado naquele estudo um encurtamento do intestino delgado e grosso nos camundongos que receberam indometacina, enquanto o grupo tratado com os probióticos apresentaram um menor impacto com a terapêutica probiótica. Parker et al. (2019) mostraram

o dano causado as células epiteliais durante a inflamação intestinal induzida pela administração de TNF pró-inflamatório, constatando atrofia das vilosidades e aumento da apoptose de células epiteliais ao longo do eixo cripta-vilosidade. Em contrapartida, no presente trabalho não foram observadas alterações nas medidas de criptas e vilosidades, possivelmente em decorrência do curto período de experimentação, não sendo o suficiente para gerar modificações significativas a estas estruturas.

O efeito tóxico da indometacina pode ser observado em diversos órgãos, sendo um deles, o fígado, onde é mostrado que o medicamento provoca reduções do citoplasma hepático e das enzimas microssomais como citocromo P450, o citocromo b5 e a aminopirina N-desmetilase (Fracasso et al, 1987). No presente trabalho foi demonstrado uma redução em cerca de 40% na congestão do fígado grupo INP. Mendonça et al. (2014) fez uso da suplementação probiótica a fim de amenizar os danos hepáticos e observaram que os camundongos que receberam a terapêutica probiótica obtiveram maior preservação do tecido hepático, com menor quantidade de focos inflamatórios em comparação ao grupo controle.

Entretanto, o grupo INP apresentou um aumento de 25% na hiperplasia de polpa branca. O baço possui função imunológica, sendo o maior órgão linfoide secundário, e também de depuração de eritrócitos senescentes para reciclagem do ferro, sendo dividido por sua função e estrutura em polpa vermelha, que compõe 75% do volume esplênico e os outros 25% é composto pela polpa branca (Lewis et al, 2019; Suttorp e Classen, 2021). Enquanto a polpa vermelha abriga os macrófagos responsáveis por exercer o papel de apoptose dos eritrócitos e reciclagem, a polpa branca é a região imunológica do baço, responsável pela produção e armazenamento de anticorpos, sendo a mesma dividida em zonas com células T e B, permitindo que sejam geradas respostas imunes específicas pela liberação de imunoglobulinas (Porto et al, 2010; Bronte e Pittet, 2014). Provavelmente a hiperplasia de polpa branca encontrada pode estar associado a um aumento da função adrenérgica desta área devido ao processo inflamatório gerado, tendo maior proliferação de imunoglobulinas. Fong et al. (2022) teve como objetivo em seu estudo verificar os efeitos de diferentes cepas e misturas probióticas na resposta imunológica podendo constatar uma elevação de células natural killer (NK) nas populações de linfócitos esplênicos em algumas cepas, bem como o aumento de outras linhagens de células, e observaram que o probiótico tem capacidade de afetar a proliferação de populações linfocíticas esplênicas.

A microbiota intestinal possui papel fundamental na modulação dos processos fisiológicos, patológicos e imunológicos do organismo, sendo alvo de pesquisas como potencial terapêutica para DII, pois seu equilíbrio influencia na atenuação de processos

inflamatórios, uma vez que a DII promove um estado disbiótico quando comparada a redução da biodiversidade em pacientes com DII e aqueles com a microbiota normal (Mangiola et al, 2018; Roy e Dhaneshwar, 2023; Mottawea et al, 2016).

Segundo Magne et al. (2020), a microbiota intestinal humana é constituída principalmente por dois filos, denominados Firmicutes e Bacteroidetes. Estes filos caracterizam uma microbiota intestinal saudável, visto que corroboram para a síntese de metabólitos epiteliais, ao passo que na DII é identificada uma depleção destes filos enquanto prevalecem os filos *Enterobacteriaceae* e Fusobacteria (Morgan et al, 2012). A microbiota conta com abundância do filo Firmicutes, que compreende um grupo de microrganismos fermentadores de carboidratos que dão origem ao ácido lático, incluindo os gêneros *Enterococcus, Lactobacillus, Streptococcus* entre outros, além de microrganismos que representam uma problemática na saúde devido suas características de resistência a antimicrobianos, como os gêneros *Staphylococcus* e *Listeria* (Lanza et al, 2015). O filo Bacteroidetes, por sua vez, possuem abundância relativa entre hospedeiros e tem a função de fermentação de polissacarídeos indigeríveis, sintetizando ácidos graxos de cadeia curta, e embora haja controvérsias, estudos especulam sua relação com doenças metabólicas (Johnson et al, 2017). Alterações na relação Firmicutes/Bacteroidetes evidencia uma disbiose, podendo ter o desenvolvimento da DII (Yañez et al, 2021; Hand et al, 2016). Frank et al. (2007) teve como objetivo em seu trabalho a caracterização da disbiose ocasionada em DII e observou em seus resultados que amostras do TGI com colite ulcerativa e Doença de Crohn demonstravam microbiotas anormais com notável redução da de microrganismos comensais que compreendiam principalmente os filos Firmicutes e Bacteroidetes.

No trabalho de Liang et al. (2015) foi demonstrado que uma única dose de indometacina via oral foi suficiente para causar uma perturbação a composição e diversidade da microbiota intestinal de camundongos, resultando em um aumento do filo Firmicutes e uma redução notável no filo Bacteroidetes. Entretanto, Feng et al. (2023), observaram que no processo de ulceração gástrica induzido pela indometacina houve um enriquecimento do filo Bacteroidota e Proteobacteria, por outro lado obteve uma redução do filo Firmicutes na microbiota.

Os resultados do presente trabalho não observaram alteração nos filos Firmicutes e Bacteroidetes no grupo INP. Entretanto o aumento do filo Proteobacteria pode indicar o processo inflamatório intestinal induzido pela indometacina. Carvalho et al. (2012) utilizou camundongos suscetíveis a inflamação para verificar a incapacidade transitória no controle Proteobactérias na DII, sendo possível constatar notável elevação do filo *Proteobacteria* em camundongos que evoluíram para a colite, que posteriormente ao serem analisadas mostraram

aumento principalmente de Enterobactérias do gênero *Escherichia* em camundongos colíticos.

A família *Lactobacillaceae* é composta por uma ampla gama de bactérias, que em sua maioria são comensais e constituem parte da microbiota intestinal oferecendo efeitos benéficos de proteção, e sua redução favorece a suscetibilidade a doenças gastrointestinais (Huynh e Zastrow, 2022; Walter e O'toole, 2023). O principal gênero que representa esta família são os *Lactobacillus*, que são inclusive explorados como potencial probiótico, como é visto na pesquisa de Monteros et al. (2021). Com a administração da indometacina, foi observada uma redução tanto da família *Lactobacillaceae* quanto do gênero *Lactobacillus* nos grupos I, INP e IS.

A microbiota intestinal saudável é composta por uma ampla gama de microrganismos, em sua maioria benéficas para o hospedeiro, como é o caso dos *Lactobacillus*, e estes necessitam de nutrientes para sobreviver. Como já foi visto, a inflamação intestinal pode levar a disbiose, fazendo com que a quantidade de microrganismos nocivos seja expandida, o que induz a uma competição entre populações bacterianas distintas por nutrientes e espaço (Stubbendieck e Straight, 2016; Pickard et al, 2017). Huang et al. (2022) observou em seu trabalho os efeitos dos antibióticos sob a microbiota intestinal e verificou que o aumento de microrganismos patogênicos, como o *Enterococcus,* leva a uma redução de gêneros com potencial probiótico, como o *Lactobacillus.* Os autores relataram que isto se dá não apenas a ação do antibiótico, mas sim em decorrência da competição gerada pela disbiose. Portanto, a redução de *Lactobacillus* no grupo INP pode ter sido ocasionada pela expansão de *Enterococcus* verificada no mesmo grupo.

Também foram observadas reduções tanto na família quanto no gênero *Muribaculaceae* no grupo INP. Este gênero se trata de um grupo de bactérias comensais descobertas recentemente que compõe predominantemente a microbiota intestinal saudável de camundongos (Lagkouvardos et al, 2019). Desta forma é sugerido que a diminuição observada no presente trabalho possa estar relacionada com a administração da cepa de *Pediococcus acidilactici,* uma bactéria que não faz parte da microbiota natural dos camundongos, e o grande número de microrganismos participando do processo de modulação a fim de combater a inflamação gerada, resultando na substituição da microbiota natural dos camundongos.

Por sua vez, o gênero *Enterococcus* se mostrou elevado nos grupos I e INP. Os *Enterococcus* são microrganismos patogênicos que fazem parte da família *Enterobacteriaceae,* que possuem a característica de se proliferarem exponencialmente durante a DII (Pickard et al, 2017; Huang et al, 2022). A condição inflamatória encontrada no

grupo INP pode ter propiciado o aumento de *Enterococcus,* que é patogênico, e também a redução dos microrganismos que são benéficos, como *Lactobacillus* e *Muribaculaceae.*

A quitosana, composto utilizado no nano encapsulamento da cepa probiótica, possui propriedades de ser biocompatível e biodegradável, porém, tem sido explorados meios de melhorar sua dissolução em água, visto que a mesma possui baixa solubilidade, o que é um desafio na sua utilização em indústria alimentícia e biomédica (Mateos-Aparicio et al, 2016). Liu et al. (2020) utilizou carboximetilquitosana (CMC), um biopolímero obtido por meio da alteração carboximetila da quitosana, a fim de melhorar esta característica e avaliar sua influência na microbiota intestinal de camundongos. Porém concluiu-se que este composto perturba o perfil de inflamação, induz alterações no metabolismo de gordura e glicose, e reduz a abundância relativa de espécies da microbiota intestinal. Portanto, é possível que a falta de solubilidade apresentada pela quitosana possa ter interferido no potencial benéfico da cepa probiótica na atenuação da inflamação gerada pela indometacina.

5.Conclusão

Foi demonstrado que o nanocompostos de quitosana associado a *Pediococcus acidilactici* CE51 favoreceu a viabilidade e estabilidade do probiótico diante das condições gastrointestinais simuladas *in vitro*. O nanocomposto probiótico foi eficaz na redução do dano hepático e renal conforme observado pela redução das dosagens de AST e ureia no grupo INP. Foi observado também efeito relevante do grupo INP em restaurar os danos intestinais ocasionados pelo processo inflamatório, principalmente no intestino grosso, onde houve redução de 100%. Entretanto, o produto gerou impacto na modulação da microbiota intestinal dos camundongos, onde houve aumento do filo *Proteobacteria*, do gênero *Enterococcus,* e redução de *Lactobacillus* e *Muribaculaceae*. Concluímos que nanocompostos de quitosana associados a *Pediococcus acidilactici* CE51 podem apresentar uma ferramenta útil nas formulações probióticas na indústria alimentícia e farmacêutica, entretanto, nossos resultados baseiam-se na experimentação em camundongos, sendo necessário maiores investigações de seus efeitos modulatórios, além de sua formulação e do período necessário de aplicação da terapêutica antes da aplicação em pacientes para reparação do dano intestinal.

Reconhecimentos

Agradecemos a toda assistência técnica do Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista e do Hospital Veterinário da Unoeste (Campus 2). Este trabalho foi financiado pela Fundação de Pesquisa de São Paulo-FAPESP (n° do processo 2022/11913-6 e 2018/22214-6).

Referências

Abbasiliasi S, Tan JS, Bashokouh S, et al. *In vitro* assessment of *Pediococcus acidilactici* Kp10 for its potential use in the food industry. *BMC Microbiol* 2017;17:121. doi:10.1186/s12866-017-1000-z

Aibani N, et al. Chitosan nanoparticles at the biological interface: Implications for drug delivery. *Pharmaceutics.* 2021;14:1-23. doi:10.3390/pharmaceutics13101686

Amoroso C, Perillo F, Strati F, et al. The role of gut microbiota biomodulators on mucosal immunity and intestinal inflammation. *Cells* 2020;9(5):1234. doi:10.3390/cells9051234

Braamskamp MJ, Dolman KM, Tabbers MM. Clinical practice. Protein-losing enteropathy in children. *Eur J Pediatr* 2010;169(10):1179-1185. doi:10.1007/s00431-010-1235-2

Brodkorb A, Egger L, Alminger M, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc* 2019;14:991–1014. doi:10.1038/s41596-018-0119-1

Bronte V, Pittet MJ. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* 2013;39(5):806-818. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.010

Carvalho FA, Koren O, Goodrich JK, et al. Transient inability to manage Proteobacteria promotes chronic gut inflammation in TLR5-deficient mice. *Cell Host Microbe* 2012;12(2):139-152. doi:10.1016/j.chom.2012.07.004

Cervantes-García D, Bahena-Delgado AI, Jiménez M, et al. Glycomacropeptide ameliorates indomethacin-induced enteropathy in rats by modifying intestinal inflammation and oxidative stress. *Molecules* 2020;25(10):2351. doi:10.3390/molecules25102351

Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother* 2013;4(4):303-306. doi:10.4103/0976-500X.119726

Colomba C, Siracusa L, Madonia S, et al. Irreversible acute renal failure and cholestatic hepatitis following therapy with indomethacin in an HIV-naïve patient with pericarditis: a case report. *Le Infezioni in Medicina* 2014;22(3):247-249.

Dik B, Sonmez G, Faki HE, et al. Sulfasalazine treatment can cause a positive effect on LPS-induced endotoxic rats. *Exp Anim* 2018;67(4):403-412. doi:10.1538/expanim.18-0029

Durazzo A, Nazhand A, Lucarini M, et al. An updated overview on nanonutraceuticals: focus on nanoprebiotics and nanoprobiotics. *Int J Mol Sci* 2020;21(7):2285. doi:10.3390/ijms21072285

Ebrahimnezhad P, Khavarpour M, Khalili S. Survival of *Lactobacillus acidophilus* as probiotic bacteria using chitosan nanoparticles. *Int J Eng* 2017;30(4):456-263.

El-Lekawy AM, Abdallah DM, El-Abhar HS. Alanyl-glutamine heals indomethacin-induced gastric ulceration in rats via antisecretory and anti-apoptotic mechanisms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2019;69(6):710-718. doi:10.1097/MPG.0000000000002474

Falzon M, Whiting PH, Ewen SWB, et al. Comparative effects of indomethacin on hepatic enzymes and histology and on serum indices of liver and kidney function in the rat. *Br J Exp Pathol* 1985;66:527-534.

Feng L, Bao T, Bai L, et al. Mongolian medicine formulae Ruda-6 alleviates indomethacin-induced gastric ulcer by regulating gut microbiome and serum metabolomics in rats. *J Ethnopharmacol* 2023;314:116545. doi:10.1016/j.jep.2023.116545

Fong FLY, El-Nezami H, Mykkänen O, et al. The effects of single strains and mixtures of probiotic bacteria on immune profile in liver, spleen, and peripheral blood. *Front Nutr* 2022;9:773298. doi:10.3389/fnut.2022.773298

Fracasso ME, Cuzzolin L, Soldato PD, et al. Multisystem toxicity of indomethacin: effects on kidney, liver, and intestine in the rat. *Agents Actions* 1987;22(4). doi:10.1007/BF02009061

Frank DN, Amand ALS, Feldman RA, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial

community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(34):13780-13785. doi:10.1073/pnas.0706625104

Gerhard D, Sousa FJSS, Andraus RAS, et al. Probiotic therapy reduces inflammation and improves intestinal morphology in rats with induced oral mucositis. *Braz Oral Res* 2017;31:e71. doi:10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0071

Gliszczyńska A, Nowaczyk M. Lipid formulations and bioconjugation strategies for indomethacin therapeutic advances. *Molecules* 2021;26(6):1576. doi:10.3390/molecules26061576

Gounden V, Vashisht R, Jialal I. Hypoalbuminemia. *StatPearls Publishing*. August 2023. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526080/.

Hand TW, Vujkovic-Cvijin I, Ridaura VK, et al. Linking the microbiota, chronic disease and the immune system. *Trends Endocrinol Metab* 2016;27(12):831-843. doi:10.1016/j.tem.2016.08.003

Hoang NH, Le Thanh T, Sangpueak R, et al. Chitosan nanoparticles-based ionic gelation method: A promising candidate for plant disease management. *Polymers (Basel)* 2022;14(4):662. doi:10.3390/polym14040662

Huang H, Lin Z, Zeng Y, et al. Probiotic and glutamine treatments attenuate alcoholic liver disease in a rat model. *Exp Ther Med*. 2019;18(6):4733-4739. doi:10.3892/etm.2019.8123.

Huang C, Feng S, Huo F, et al. Effects of four antibiotics on the diversity of the intestinal microbiota. *Microbiol Spectr* 2022;10(2):e01904-21. doi:10.1128/spectrum.01904-21

Huang J, Li R, Zhu H, et al. Association between serum globulin and cognitive impairment in older American adults. *Front Public Health* 2023;11:1193993. doi:10.3389/fpubh.2023.1193993

Huynh U, Zastrow ML. Metalobiologia de Lactobacillaceae no microbioma intestinal. *J Inorg Biochem* 2023;248:112023. doi:10.1016/j.jinorgbio.2022.112023

Jaafar FR, Abu-Raghif A. Comparative treatment of Sulfasalazine+Ezetimibe combination and Sulfasalazine in a rat model with induced colitis. *J Med Life* 2023;16(8):1165-1169. doi:10.25122/jml-2023-0194

Jakubczyk D, Leszczyńska K, Górska S. The effectiveness of probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease (IBD)—a critical review. *Nutrients* 2020;12(7):1973. doi:10.3390/nu12071973

Jarmakiewicz-Czaja S, et al. The impact of selected food additives on the gastrointestinal tract in the example of nonspecific inflammatory bowel diseases. *Arch Med Sci* 2021. doi:10.5114/aoms/125001

Johnson EL, Heaver SL, Walters WA, et al. Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *J Mol Med (Berl)* 2017;95(1):1-8. doi:10.1007/s00109-016-1492-2

Kheiri A, Moosawi Jorf SA, Malihipour A, et al. Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles and their effect on Fusarium head blight and oxidative activity in wheat. *Int J Biol Macromol* 2017;102:526–538. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.04.034

Kim TS, Choi DH. Liver dysfunction in sepsis. *Korean J Gastroenterol* 2020;75(4):182-187. doi:10.4166/kjg.2020.75.4.182

Kwak DS, Lee OY, Lee KN, et al. The effect of DA-6034 on intestinal permeability in an indomethacin-induced small intestinal injury model. *Gut Liver* 2016;10(3):406–411. doi:10.5009/gnl15251

Kwon DA, Kim YS, Baek SH, et al. Protective effects of a standardized extract (HemoHIM) using indomethacin- and ethanol/HCl-induced gastric mucosal injury models. *Pharm Biol* 2019;57(1):543–549. doi:10.1080/13880209.2019.1651875

Lagkouvardos I, Lesker TR, Hitch TCA, et al. Sequence and cultivation study of Muribaculaceae

reveals novel species, host preference, and functional potential of this yet undescribed family. *Microbiome* 2019;7:28. doi:10.1186/s40168-019-0637

Lanza VF, Tedim AP, Martínez JL, et al. The plasmidome of Firmicutes: impact on the emergence and the spread of resistance to antimicrobials. *Microbiol Spectr* 2015;3(2):PLAS-0039-2014. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0039-2014

Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure-function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol* 2019;4(33):eaau6085. doi:10.1126/sciimmunol.aau6085

Liang X, Bittinger K, Li X, et al. Bidirectional interactions between indomethacin and the murine intestinal microbiota. *eLife* 2015;4:e08973. doi:10.7554/eLife.08973

Liu Y, Zong S, Li JL. Carboxymethyl chitosan perturbs inflammation profile and colonic microbiota balance in mice. *J Food Drug Anal* 2020;28(1):175-182. doi:10.1016/j.jfda.2019.07.002

Magne F, Gotteland M, Gauthier L, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients?. *Nutrients*. 2020;12(5):1474. doi:10.3390/nu12051474.

Manikandan A, Sathiyabama M. Preparation of chitosan nanoparticles and its effect on detached rice leaves infected with *Pyricularia grisea*. *Int J Biol Macromol.* 2016;84:58–61. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.11.083

Mendonça AH, Cerqueira MMOP, Nicoli JR, et al. A *Lactobacillus rhamnosus* strain induces protection in different sites after *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium challenge in gnotobiotic and conventional mice. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2014;66(4):347–354. doi:10.1590/1678-41625517

Mateos-Aparicio I, Mengíbar M, Heras Á. Effect of chito-oligosaccharides over human faecal microbiota during fermentation in batch cultures. *Carbohydr Polym.* 2016;137:617–624. doi:10.1016/j.carbpol.2015.11.011

Mirtajaddini SA, Fathi Najafi M, Vaziri Yazdi SA, et al. Preparation of chitosan nanoparticles as a capable carrier for antigen delivery and antibody production. *Iran J Biotechnol.* 2021;19(4):e2871. doi:10.30498/ijb.2021.247747.2871

Monteros MJM, et al. Probiotic lactobacilli as a promising strategy to ameliorate disorders associated with intestinal inflammation induced by a non-steroidal anti-inflammatory drug. *Sci Rep.* 2021;11(1):571. doi:10.1038/s41598-020-80557-w

Moriles KE, Azer SA. Alanine amino transferase. *StatPearls Publishing*; 2023. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544248/

Mukherjee A, Goswami S, Maity S, et al. A review of green synthesis of metal nanoparticles using algae. *Front Microbiol* 2021;12:e693899. doi:10.3389/fmicb.2021.693899

Munjal A, Allam AE. Indomethacin. *StatPearls Publishing*; 2023.

El Naggar EEE, Mohamed EA, Borg TM, et al. Colon targeting of naringin for enhanced cytoprotection against indomethacin-induced colitis in rabbits. *Drug Des Devel Ther* 2020;14:677–96. doi:10.2147/DDDT.S218357.

Nandi J, Saud B, Zinkievich JM, et al. 5-Aminosalicylic acid improves indomethacin-induced enteropathy by inhibiting iNOS transcription in rats. *Dig Dis Sci* 2008;53(1):123–32. doi:10.1007/s10620-007-9832-2.

Nor MHM, Ayob N, Mokhtar NM, et al. The effect of probiotics (MCP® BCMC® strains) on hepatic steatosis, small intestinal mucosal immune function, and intestinal barrier in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients* 2021;13(9):3192. doi:10.3390/nu13093192.

Otto-Ślusarczyk D, Graboń W, Mielczarek-Puta M. Aspartate aminotransferase—key enzyme in the human systemic metabolism. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2016;70:219–30. doi:10.5604/17322693.1197373.

Parker A, Vaux L, Patterson AM, et al. Elevated apoptosis impairs epithelial cell turnover and shortens villi in TNF-driven intestinal inflammation. *Cell Death Dis* 2019;10(2):108. doi:10.1038/s41419-018-1275-5.

Partty A, Rautava S, Kalliomäki M. Probiotics on pediatric functional gastrointestinal disorders. *Nutrients* 2018;10(12):1836. doi:10.3390/nu10121836.

Pegoraro CMR, Nai GA, Garcia LA, et al. Protective effects of *Bidens pilosa* on hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats. *Drug Chem Toxicol* 2021;44(1):64–74. doi:10.1080/01480545.2018.1526182.

Pereira LB, Boing AC, Melo LFG, et al. Use of drugs for gastrointestinal disorders: evidence from National Survey on Access, Use and Promotion of Rational Use of Medicines. *Einstein (Sao Paulo)* 2020;18:eAO5314. doi:10.31744/einstein_journal/2020AO5314.

Philpott HL, Nandurkar S, Lubel JS. Drug-induced gastrointestinal disorders. *Frontline Gastroenterol* 2014;5:49–57. doi:10.1136/flgastro-2013-100316

Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev* 2017;279(1):70–89. doi:10.1111/imr.12567.

Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of action of probiotics. *Adv Nutr* 2019;10(1):49–66. doi:10.1093/advances/nmy063.

Porto APNA, Lammers AJJ, Bennink RJ, et al. Assessment of splenic function. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29(12):1465–73. doi:10.1007/s10096-010-1049-1.

Raj LFAA, Arulmozhi M, Rajalakshmi AN, et al. Preparation and characterization of BSA and chitosan nanoparticles for sustainable delivery system for quercetin. *J Appl Pharm Sci* 2015;5(7):1–5. doi: 10.7324/JAPS.2015.50701

Ramar K, N V. Biocompatibility of chitosan nanoparticle in root canal sealant with Vero cell line. *Int J Clin Pediatr Dent* 2022;15(Suppl 1):S57–S62. doi:10.5005/jp-journals-10005-2133.

Rinwa P, Kumar A. Piperine potentiates the protective effects of curcumin against chronic unpredictable stress-induced cognitive impairment and oxidative damage in mice. *Brain Res* 2012;1488:38–50. doi:10.1016/j.brainres.2012.10.002.

Rocha IP, Costa VR, Moraes YA, Pereira VC, Winkelströter LK. Bacteriocin-like substance produced by *Pediococcus acidilactici* CE51 as a biopreservative in orange juice. *Biocontrol Sci Technol* 2021;1:1.

Roy S, Dhaneshwar S. Role of prebiotics, probiotics, and synbiotics in management of inflammatory bowel disease: current perspectives. *World J Gastroenterol* 2023;29(14):2078–2100. doi:10.3748/wjg.v29.i14.2078.

Salameh E, Jarbeau M, Morel FB, et al. Modeling undernutrition with enteropathy in mice. *Sci Rep* 2020;10:15581. doi:10.1038/s41598-020-72705-0.

Selvamani V. Stability studies on nanomaterials used in drugs. In: Mohapatra S, Ranjan S, Dasgupta N, Mishra R, Thomas S, eds. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery.* Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 2019:425–444.

Shin DW, Lim BO. Nutritional interventions using functional foods and nutraceuticals to improve inflammatory bowel disease. *J Med Food* 2020;23:1136–1145.

Shu R, Wang C, Meng Q, et al. Resveratrol enhances the protective effects of JBP485 against indomethacin-induced rat intestinal damage *in vivo* and *in vitro* through up-regulating oligopeptide transporter 1 (Pept1). *Biomed Pharmacother* 2019;111:251–261.

Singh DP, Borse SP, Nivsarkar M. A novel model for NSAID-induced gastroenteropathy in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2016;78:66–75. doi:10.1016/j.vascn.2015.11.008

Strnad P, Tacke F, Koch A, et al. Liver—guardian, modifier and target of sepsis. *Nat Rev*

Gastroenterol Hepatol 2016;14:55–66. doi:10.1038/nrgastro.2016.168

Stubbendieck RM, Straight PD. Multifaceted interfaces of bacterial competition. *J Bacteriol* 2015;198(16):2145–2155. doi:10.1128/JB.00275-16

Suchiva P, Takai T, Kamijo S, et al. Inhibition of both cyclooxygenase-1 and -2 promotes epicutaneous Th2 and Th17 sensitization and allergic airway inflammation on subsequent airway exposure to protease allergen in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2021;182(9):788–799. doi:10.1159/000514975

Suryadi Y, Priyatno TP, Samudra I, et al. Control of anthracnose disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) using nano chitosan hydrolyzed by chitinase derived from *Burkholderia cepacia* isolate E76. *J AgroBiogen* 2017;13(2):111–122. doi:10.21082/jbio.v13n2.2017.p111-122

Suttorp M, Classen CF. Splenomegaly in children and adolescents. *Front Pediatr* 2021;9:704635. doi:10.3389/fped.2021.704635

Tai FWD, McAlindon ME. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract. *Clin Med* 2021;21:131–134.

Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol* 2017;27(21):R1147–R1151. doi:10.1016/j.cub.2017.09.019

Vieira KCO, et al. Development and viability of probiotic orange juice supplemented by *Pediococcus acidilactici* CE51. *LWT Food Sci Technol* 2020;130(1):109637.

Walter J, O'Toole PW. Microbe Profile: The *Lactobacillaceae*. *Microbiology* 2023;169(12):001414. doi:10.1099/mic.0.001414

Whitfield-Cargile CM, Cohen ND, Chapkin RS, et al. The microbiota-derived metabolite indole decreases mucosal inflammation and injury in a murine model of NSAID enteropathy. *Gut Microbes* 2016;7(3):246–261. doi:10.1080/19490976.2016.1156827

Whiting PH, Barnard N, Neilsch A, et al. Interactions between cyclosporin A, indomethacin, and i6,16-dimethyl prostaglandin E2: Effects on renal, hepatic, and gastrointestinal toxicity in the rat. *Br J Exp Pathol* 1987;68:777–786.

Wilkins T, Sequoia J. Probiotics for gastrointestinal conditions: A summary of the evidence. *Am Fam Physician J* 2017;96(3):170–178.

Wieërs G, Belkhir L, Enaud R, et al. How probiotics affect the microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;9:54. doi:10.3389/fcimb.2019.00454

Wu LP, Wang D, Li Z. Grand challenges in nanomedicine. *Mater Sci Eng C* 2019;106:110302. doi:10.1016/j.msec.2019.110302

Yadav MK, Kumari I, Singh B, et al. Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol* 2022;106(2):505–521. doi:10.1007/s00253-021-11646-8

Yañez CM, Hernández AM, Sandoval AM, et al. Prevalence of *Blastocystis* and its association with *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in clinically healthy and metabolically ill subjects. *BMC Microbiol* 2021;21:339. doi:10.1186/s12866-021-02402-z

Zhou J, Li M, Chen Q, et al. Programmable probiotics modulate inflammation and gut microbiota for inflammatory bowel disease treatment after effective oral delivery. *Nat Commun* 2022;13:3432. doi:10.1038/s41467-022-31171-0

Zhu H, Cao C, Wu Z, et al. The probiotic *L. casei Zhang* slows the progression of acute and chronic kidney disease. *Cell Metab* 2021;33(10):1926–1942. doi:10.1016/j.cmet.2021.06.014

ANEXO A- PARECER FINAL DO COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) E DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA)

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado **"APLICAÇÃO DE NANOPROBIÓTICOS E NANOPREBIÓTICOS NO DANO INTESTINAL CAUSADO POR INDOMETACINA: UM MODELO EXPERIMENTAL EM ANIMAIS"**, cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº **7660** e tendo como participante(s) **KAROLINNY CRISTINY DE OLIVEIRA VIEIRA (discente), LUCIMEIRE FERNANDES CORREIA (discente), MARIA VITORIA MINZONI DE SOUZA IACIA (discente), KIMBERLLY DE OLIVEIRA SILVA (discente), MARIA EDUARDA FERRAZ MENDES (discente), FERNANDA DE JESUS RAMOS MELO OLIVEIRA (discente), GISELE ALBORGHETTI NAI (docente), LEONARDO DE OLIVEIRA MENDES (docente), LIZZIANE KRETLI WINKELSTROTER ELLER (orientador responsável)**, foi avaliado e **APROVADO** pelo **COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA)** da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 13/09/2022.

Vigência do projeto: 10/2022 a 08/2025.

ANIMAL VIVO

Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
camundongos	54	20 gramas	45 dias	M	UFMS

Presidente Prudente, 23 de Setembro de 2022.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Docente Responsável pela CPDI

Prof. Dr. Felipe Rydygier de Ruediger
Coordenador da CEUA - UNOESTE

ANEXO B- INSTRUÇÕES PARA AUTORES DA REVISTA *CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION* (ARTIGO A)

About the Journal

Critical Reviews in Food Science and Nutrition is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. Please see the journal's Aims & Scope for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

Critical Reviews in Food Science and Nutrition accepts the following types of article: original articles.

Open Access

You have the option to publish open access in this journal via our Open Select publishing program. Publishing open access means that your article will be free to access online immediately on publication, increasing the visibility, readership and impact of your research. Articles published Open Select with Taylor & Francis typically receive 35% more citations* and over 5 times as many downloads** compared to those that are not published Open Select.

Your research funder or your institution may require you to publish your article open access. Visit our Author Services website to find out more about open access policies and how you can comply with these.

You will be asked to pay an article publishing charge (APC) to make your article open access and this cost can often be covered by your institution or funder. Use our APC finder to view the APC for this journal.

Please visit our Author Services website if you would like more information about our Open Select Program.

*Citations received up to 7th August 2024 for articles published in 2019-2023. Data obtained on 7th August 2024, from Digital Science's Dimensions platform, available at https://app.dimensions.ai **Usage in 2021-2023 for articles published in 2019-2023.

Peer Review and Ethics

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be single anonymous peer reviewed by two independent, anonymous expert referees, each delivering at least one report. If you have shared an earlier version of your Author's Original Manuscript on a preprint server, please be aware that anonymity cannot be guaranteed. Further information on our preprints policy and citation requirements can be found on our Preprints Author Services page. Find out more about what to expect during peer review and read our guidance on publishing ethics.

Preparing Your Paper

All authors submitting to medicine, biomedicine, health sciences, allied and public health journals should conform to the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, prepared by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word Limits

Please include a word count for your paper. There are no word limits for papers in this journal.

Format-free Submission

Authors may submit their paper in any scholarly format or layout. Manuscripts may be supplied as single or multiple files. These can be Word, rich text format (rtf), open document format (odt), PDF, or LaTeX files. Figures and tables can be placed within the text or submitted as separate documents. Figures should be of sufficient resolution to enable refereeing.

- There are no strict formatting requirements, but all manuscripts must contain the essential elements needed to evaluate a manuscript: abstract, author affiliation, figures, tables, funder information, and references. Further details may be requested upon acceptance.

- References can be in any style or format, so long as a consistent scholarly citation format is applied. For manuscripts submitted in LaTeX format a .bib reference file must be included. Author name(s), journal or book title, article or chapter title, year of publication, volume and issue (where appropriate) and page numbers are essential. All bibliographic entries must contain a corresponding in-text citation. The addition of DOI (Digital Object Identifier) numbers is recommended but not essential.

- The journal reference style will be applied to the paper post-acceptance by Taylor & Francis.

- Spelling can be US or UK English so long as usage is consistent.

Note that, regardless of the file format of the original submission, an editable version of the article must be supplied at the revision stage.

Taylor & Francis Editing Services

To help you improve your manuscript and prepare it for submission, Taylor & Francis provides a range of editing services. Choose from options such as English Language Editing, which will ensure that your article is free of spelling and grammar errors, Translation, and Artwork Preparation. Taylor & Francis Editing Services can also help you create research promotion materials, including infographics, video abstracts, lay summaries and graphical abstracts, to support your article's impact. For more information, including pricing, visit this website.

Checklist: What to Include

1. **Author details.** Please ensure everyone meeting the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) requirements for authorship is included as an author of your paper. Please ensure all listed authors meet the Taylor & Francis authorship criteria. All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. Read more on authorship.

2. Should contain an unstructured abstract of 200 words. Read tips on writing your abstract.

3. You can opt to include a **video abstract** with your article. Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming. Taylor & Francis Editing Services provides a video abstract creation service for a fee.

4. Between 3 and 6 **keywords**. Read making your article more discoverable, including information on choosing a title and search engine optimization.

5. **Funding details.** Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:
For single agency grants
This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].
For multiple agency grants
This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].

6. **Disclosure statement.** This is to acknowledge any financial or non-financial interest that has arisen from the direct applications of your research. If there are no relevant competing interests to declare please state this within the article, for example: *The authors report there are no competing interests to declare*. Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it.

7. **Data availability statement.** If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). Templates are also available to support authors.

8. **Data deposition.** If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a recognized data repository prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.

9. **Supplemental online material.** Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. Articles with extenders, such as infographics or video summaries, are up to 108% more likely to be downloaded (based on data in May 2024 from Plain Language Summary of Publication and Clinical Trial Protocol articles published in Future Oncology in 2023). We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about supplemental material and how to submit it with your article. Taylor & Francis Editing Services can help you create research promotion materials, including

infographics, video abstracts, lay summaries and graphical abstracts, to support your article's impact. For more information, including pricing, visit this website.

10. **Figures.** Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: PS, JPEG, TIFF, or Microsoft Word (DOC or DOCX) files are acceptable for figures that have been drawn in Word. For information relating to other file types, please consult our Submission of electronic artwork document.

11. **Tables.** Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.

12. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about mathematical symbols and equations.

13. **Units.** Please use SI units (non-italicized).

Complying with Ethics of Experimentation

Please ensure that all research reported in submitted papers has been conducted in an ethical and responsible manner, and is in full compliance with all relevant codes of experimentation and legislation. All original research papers involving humans, animals, plants, biological material, protected or non-public datasets, collections or sites, must include a written statement in the Methods section, confirming ethical approval has been obtained from the appropriate local ethics committee or Institutional Review Board and that where relevant, informed consent has been obtained. For animal studies, approval must have been obtained from the local or institutional animal use and care committee. All research studies on humans (individuals, samples, or data) must have been performed in accordance with the principles stated in the Declaration of Helsinki. In settings where ethics approval for non-interventional studies (e.g. surveys) is not required, authors must include a statement to explain this. In settings where there are no ethics committees in place to provide ethical approval, authors are advised to contact the Editor to discuss further. Detailed guidance on ethics considerations and mandatory declarations can be found in our Editorial Policies section on Research Ethics.

ANEXO C- INSTRUÇÕES PARA AUTORES DA REVISTA *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE* (ARTIGO B)

Manuscript Types and Guidelines

Original Research Articles	• 3,000-word limit • Unstructured abstract of no more than 300 words • Maximum total of six (6) figures and/or tables
Review Articles	*Reviews are summaries of developments in the field. All reviews are subject to peer review. The Editor-in-Chief will make the invitation and ensure the quality of the review with the assistance of the editorial board.* • 5,000-word limit • Unstructured abstract of no more than 300 words • Maximum total of eight (8) figures and/or tables
Short Communications	*Short Communications are generally based on limited experiments that test a timely, original hypothesis of importance. These articles must contain a hypothesis, objectives, sufficient detail in methodology for repetition of the work, results with brief discussion, and references.* • 1,000-word limit • Unstructured abstract of no more than 150 words • May include one figure OR table • Maximum of ten (10) references
Editorials and Commentaries	*Editorials and commentaries may be on any issue relevant to the field but must be brief and appropriately documented by data.* • 1,000-word limit • An abstract is not required • No tables or figures
Letters to the Editor	• 500-word limit • May include one figure OR table • Reference citations are identical in style to those of full original articles, but should not exceed five (5).

Word limits do NOT pertain to the abstract, disclosure statements, author contribution statements, funding information, acknowledgments, tables, figure legends, or references.

References

Foodborne Pathogens and Disease uses Mary Ann Liebert's **Harvard** style reference format. Templates are available in **Zotero** and through the CSL Style Repository. An **Endnote template** is also available.

Liebert Harvard Style (Name/Date)

- Reference list: Include a complete list of all cited references in alphabetical (last) name/date order
- NOTE: References with the same author list and publication year should be distinguished by using lower case letter after the year of publication (Ex: Jones, 2020a; Jones, 2020b), both in text and in the reference list.
- Citation within text: At the point of citation and in parentheses, include only author surname(s) followed by a comma, then year of publication (Ex: One author: Jones, 2020; Two authors: Jones and Smith, 2021; Three or more authors: Jones et al, 2022).
- Journal titles should follow the abbreviation style of PubMed/Medline.
- Include among the references any articles that have been accepted but have not yet published; identify the name of publication and add "In Press." If the reference has been published online, provide the DOI number in place of the page range.

Style Examples for Reference List:

Type of Reference	Punctuation and Order of Elements in Reference List
Journal article with 1-3 authors	Wang Q, Nambiar K, Wilson JM. Isolating natural adeno-associated viruses from primate tissues with a high-fidelity polymerase. Hum Gene Ther 2021;32(23-24):1439-1449; doi: 10.1089/hum.2021.055 [insert article-specific DOI if available].
Journal article with more than 3 authors	Pfister EL, DiNardo N, Mondo E, et al. Artificial miRNAs reduce human mutant Huntington throughout the striatum in a transgenic sheep model of Huntington's disease. Hum Gene Ther 2018;29(6):663–673; doi: 10.1089/hum.2017.199 [insert article-specific DOI if available].
Edited Book	Herzog RW, Zolotukhin S, (eds). A Guide to Human Gene Therapy. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore; 2010.
Chapter in an Edited Book	Nicklin SA, Baker AH. Adenoviral Vectors. In: A Guide to Human Gene Therapy. (Herzog RW, Zolotukhin S. eds.) World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore, 2010; pp. 21-36.
Authored Book	Isaacson W. The Code Breaker: Jennifer Doudna, Gene Editing, and the Future of the Human Race. Simon & Schuster: New York, NY; 2021.

Website	Last name, first/middle initial(s) of author(s) [if available]. U.S. Food and Drug Administration. What is Gene Therapy? Silver Spring, MD; 2018. Available from: **https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy** [Last accessed: month/date/year].
Personal communications	References that are unpublished (ie: personal communications, emails, letters) are not to be included in the reference list. Instead, insert "Personal communication; [name], date" parenthetically at the point of citation within text.
Using previously published images or tables as a reference	Reused/adapted images, tables, or any published material must be officially cited as a reference in the reference list, and the author(s) of the submitted work must obtain written permission from the copyright holder. Verbal approvals are not acceptable. Any fees associated with the reuse or adaptation of any material is the sole responsibility of the author(s).

Other

Manuscript Text

Scientific names for species must appear with genus spelled in full on the first occurrence and abbreviated thereafter. Family names should appear on first occurrence of uncommon species. All microorganisms must be named by genus and species in accordance with the latest edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Lippincott Williams & Wilkins, 9th ed., 1994.

Bacteriology

The name of the genus must appear in full the first time that the microorganism is cited in the abstract, in the body of the article, and in each table and figure legend. Thereafter, the genus can be abbreviated by its first initial unless it will be confused with other microorganisms cited in the manuscript, in which case each genus should be abbreviated to use enough letters to avoid confusion. The names of all microorganisms should be in italics. Specific strain designations and numbers should be used when appropriate. Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on Taxonomy of Viruses.

PaperPal Preflight

The Paperpal Preflight service is available for this journal. PaperPal Preflight allows authors to check their **Original Research** manuscripts for common errors prior to submitting a manuscript for consideration. Please note that this does not guarantee that your paper will pass all submission or other checks, nor that it will be considered for review.

The checks are configured for Original Research manuscripts only and may not be applicable to other manuscript types. There may be additional requirements for submission. Please review the full instructions for authors for guidelines.

The basic service is free. PaperPal preflight offers an *optional* fee-based service that will provide a report showing tracked changes and potential modifications. Please note that if this service is used, a clean copy of the manuscript must be uploaded to the submission system.

There is no obligation to use either the free or paid service. No editorial, review, nor any other decisions will be dependent on its use.

All manuscripts must be submitted through the journal's ScholarOne Manuscripts site.

Manuscript formating

Please check your journal's requirements for file formatting. Many journals require formatting compliance only on revision; however, unless stated, the file formatting should comply with the following requirements on submission.

Manuscript Files

The main text file, figure legends, and tables should be prepared in Microsoft Word. Some journals may accept LaTex. Please consult your individual journal instructions for guidance.

File Naming

- All file names should be in English and contain only alphanumeric characters.
- **Do not include spaces, symbols, special characters, dashes, dots, or underscores.**
- Title each file with the type of content contained in the file (e.g., manuscript.doc, tables.doc, FigureLegends.doc, Fig1.tif, SupplementalData.pdf, etc.).

Figures

- Submission of high resolution .TIFF or .EPS figure files is preferred. Please upload as individual files.
- Cite figures consecutively in text within parentheses.
- Images should not reveal the name of a patient or a manufacturer.
- Note: Figures that will not be reproduced in color must be readable and interpretable in black and white.

Figure Legends

- A legend should be provided for each supplied figure.
- All legends should be numbered consecutively.
- Figure legends may be included at the end of the main text file or uploaded as a separate, double-spaced Word file.
- In each legend, provide explanations for any abbreviations or symbols that appear in the figure.
- If the figure is taken from a copyrighted publication, permission must be secured by the author(s) and supplied at the time of submission with appropriate credit listed in the legend. Permissions and associated fees are the responsibility of the author.

Tables

- Tables may be included after the references at the end of the main text file, or uploaded as a single, separate Word file. All tables should be editable.

- Provide a title for each supplied table.
- Cite tables sequentially in text within parentheses.
- Explain abbreviations used in the body of the table in footnotes using superscript letters, not symbols.
- If a table is taken from a copyrighted publication, permission must be secured by the author(s) and supplied at the time of submission with appropriate credit listed in the legend. Permissions and associated fees are the responsibility of the author.

Supplemental Files

- Supplemental files should be uploaded as individual files. Most text, photo, graphic, and video formats are accepted. Ensure that patient identities are not revealed.
- Supplemental Information will not be copyedited or typeset; it will be posted online as supplied.
- For journals that publish accepted versions of papers prior to copyediting and typesetting, supplemental files will not be posted with the paper until after production has been completed.

Manuscript Structure

Specific journal requirements will vary, however the general order of elements in each manuscript should be

- Title page* with full manuscript title, all contributing authors' names and affiliations, a short running title, a denotation of the corresponding author, and a list of 4-6 keywords/search terms,
- Abstract,
- Main text without embedded figures or tables and with appropriate section headings, if applicable. Most research papers should be organized as follows: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and Conclusions.
- Acknowledgments,
- Authorship confirmation/contribution statement (CRediT format is preferred)
- Author(s') disclosure (Conflict of Interest) statement(s), even when not applicable,
- Funding statement, even when not applicable,
- References,
- Tables included in the text or as a separate document,
- Figure legends at the end of the main text or in a separate Word file,
- Figures uploaded as individual high-resolution files,
- Supplemental files uploaded as individual files.

*Double-blinded journals require a separate title page with the title, all contributing authors' names and affiliations, a denotation of the corresponding author, author acknowledgements, disclosures, and related identifying information.
Your individual journal may require

- An Institutional Review Board (IRB) approval (or waiver) statement and statement of patient consent as a separate paragraph after the methods section,
- Other relevant ethics attestations (see icmje.org for further guidance),
- Data sharing statement,
- Specific abstract and content sections, depending on manuscript type,
- Word count limits, tables/figure limits, and reference format requirements.

Please note that paragaphs should be no longer than 15 lines once typeset.