



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE
(PPGBAS)

JÚLIA HAYALE OLIVEIRA SIMAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREBIÓTICO DOS CARBOIDRATOS DE
Arthrospira platensis

Recife
2023

JÚLIA HAYALE OLIVEIRA SIMAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREBIÓTICO DOS CARBOIDRATOS DE
Arthrospira platensis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Figueiredo Porto

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE

Coorientadora:

Prof.^a Dr.^a Raquel Pedrosa Bezerra

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE

Recife

2023

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Simas, Júlia Hayale Oliveira

Avaliação do potencial prebiótico dos carboidratos de *Arthrospira platensis*. / Júlia Hayale Oliveira Simas. – 2023.

60 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.

Coorientadora: Raquel Pedrosa Bezerra.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências, apêndices.

1. Alimento funcional. 2. Cianobactéria. 3. Probiótico. 4. Trato gastrointestinal. I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (Orient.). II. Bezerra, Raquel Pedrosa (Coorient.). III. Título.

570

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-180

JÚLIA HAYALE OLIVEIRA SIMAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PREBIÓTICO DOS CARBOIDRATOS DE
Arthrospira platensis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 25/ 08/ 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Orientadora)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^o. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Daniela de Araújo Viana Marques (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Dedico

A cada um que confiou no meu trabalho dando suporte e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar que me permitiu chegar aqui, por me mostrar o caminho e me fazer esperar o tempo certo de cada coisa acontecer. Pela proteção, condições, força e determinação. Por me mostrar a luz quando me vi na escuridão.

À minha mãe e Maurício, que me deram suporte nas minhas necessidades, principalmente financeiras. A meu irmão Daniel, prestativo nas minhas dificuldades. Ao meu pai, que sempre me incentivou e acreditou em mim. À Ana, gratidão pelos momentos que me acolheu e compreendeu. A Filipe, quem foi um grande parceiro e esteve ao meu lado durante todo o processo apoiando e acreditando na minha capacidade quando, por muitas vezes, eu desacreditei.

À prof.^a Dr.^a Raquel que me acolheu nesse projeto e esteve comigo quando precisei tirar dúvidas, repensar o caminho e encontrar a melhor solução. À prof.^a Dr.^a Ana Porto, que abriu as portas e me deu subsídios para ingressar e permanecer no mestrado. À prof.^a Dr.^a Maria Taciana, que me recebeu e orientou no laboratório durante a iniciação científica e sempre se disponibilizou a colaborar com o que pudesse até hoje. Cada um foi essencial nessa trajetória e eu sou muito grata por ter tido o acompanhamento desses profissionais que são referência de pesquisadores e de seres humanos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), órgão de fomento que deu apoio financeiro a essa pesquisa.

Aos colegas do laboratório que contribuíram cada um com sua experiência, o que foi de grande valia para mim. Principalmente Elaine, que me ensinou de tudo pacientemente desde que entrei no laboratório, Dayane, grande amiga desde a graduação que sempre compartilhou oportunidades e me deu a mão, sempre que precisei ela estava lá! Calaça, aquela mãe, sempre acolhedora e rainha dos probióticos! Ketyline, Gabrielly, José Noé, que me ajudaram a entrar no “mundo” das microalgas. Leandros Fragoso e Paes que me auxiliaram muito nos experimentos e demais pessoas do laboratório que de alguma forma contribuíram.

À querida UFRPE que foi minha segunda casa durante esses anos e seus servidores, sempre acolhedores e que guardo com muito carinho. Aos amigos em especial Pedro Lucas, Victor Felipe, Pedro Santos, Brunno e Yasmin, primos, avós, tios, todos que torceram por mim nessa jornada.

Ao meu pequenino eterno companheiro Tony (*in memoriam*).

“Vencer a si próprio é a maior das vitórias.”
(PLATÃO; PEREIRA, 2017)

RESUMO

Produtos funcionais contendo probióticos, e prebióticos são cada vez mais procurados pelo consumidor. A busca pela obtenção de fontes com potencial prebiótico ganhou força e nesse aspecto as cianobactérias se destacam. A *Arthrospira platensis* é fonte de bioativos que vêm sendo eficientes no tratamento de algumas doenças e podem servir como nutriente para o crescimento de outros microrganismos. O extrato intracelular precipitado (EIP) dessa cianobactéria foi extraído da biomassa por sonicação e precipitado com etanol. Os metabólitos extracelulares (ME) foram obtidos por precipitação e diálise. O EIP foi adicionado às culturas de *L. rhamnosus* GG, *E. faecium* 133v, *E. coli* e *S. aureus* como fonte de carbono nos meios comerciais MRS e LB nas concentrações 1%, 1,5% e 2%. Glicose, frutoligossacarídeos (FOS) e os meios isentos de fonte de carbono foram usados como controles. As unidades formadoras de colônias (UFC/ mL) foram contadas após 24 h e 48 h de incubação. Não foi possível realizar atividade prebiótica com os ME devido à sua baixa porção de carboidratos de somente 7,8% da massa seca, enquanto EIP representou 44% de carboidratos da massa seca. EIP estimulou o crescimento de *Lactobacillus* e *Enterococcus* acima de $1,0 \times 10^{10}$ UFC/ mL, ultrapassando, inclusive o prebiótico padrão FOS. *E. coli* e *S. aureus* foram também estimuladas pelo FOS e EIP, mas em menor proporção, $1,0 \times 10^9$ UFC/ mL. Análises estatísticas demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos, onde a faixa de 1- 1,5% foi a que mais estimulou microrganismos benéficos que patógenos. A partir dos resultados pode-se concluir que os carboidratos extraídos de *A. platensis* possuem potencial prebiótico frente às cepas *L. rhamnosus* GG e *E. faecium* 133v, mas mais estudos são necessários para analisar o comportamento dos patógenos na presença do EIP e de outros microrganismos da microbiota intestinal.

Palavras-chave: Alimento funcional; Cianobactéria; Probiótico; Trato gastrointestinal.

ABSTRACT

Functional products containing probiotics, and prebiotics are increasingly sought after by the consumer. The search for sources with prebiotic potential has gained strength and in this aspect cyanobacteria stand out. *Arthrospira platensis* is a source of bioactives that have been efficient in the treatment of some diseases and can serve as a nutrient for the growth of other microorganisms. The precipitated intracellular extract (EIP) of this cyanobacterium was extracted from the biomass by sonication and precipitated with ethanol. Extracellular metabolites (ME) were obtained by precipitation and dialysis. EIP was added to *L. rhamnosus* GG, *E. faecium* 133v, *E. coli* and *S. aureus* cultures as a carbon source in MRS and LB commercial media at concentrations 1%, 1.5% and 2%. Glucose, fructooligosaccharides (FOS) and carbon-free media were used as controls. The colony-forming units (CFU/mL) were counted after 24 h and 48 h of incubation. It was not possible to perform prebiotic activity with the ME due to their low carbohydrate portion of only 7,8% of the dry mass, while EIP represented 44% of the carbohydrates of the dry mass. EIP stimulated the growth of *Lactobacillus* and *Enterococcus* above 1.0×10^{10} CFU/mL, even surpassing the standard prebiotic FOS. *E. coli* and *S. aureus* were also stimulated by FOS and EIP, but in a smaller proportion, 1.0×10^9 CFU/mL. Statistical analyses showed significant differences between treatments, where the range of 1-1.5% was the one that stimulated beneficial microorganisms more than pathogens. From the results, it can be concluded that carbohydrates extracted from *A. platensis* have prebiotic potential against the *L. rhamnosus* GG and *E. faecium* 133v strains, but more studies are needed to analyze the behavior of pathogens in the presence of EIP and other microorganisms of the intestinal microbiota.

Keywords: Functional food; Cyanobacteria; Probiotic; Gastrointestinal tract.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Biomassa liofilizada de *A. platensis*. Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Figura 2. Determinação de açúcares totais de acordo com o método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956b). Reação em tubos (a); amostras em microplaca para leitura das absorvâncias (b); gráfico da curva padrão (c). Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Figura 3. Detecção de açúcar-reductor utilizando o método ácido 3,5 – dinitrosalicílico (MILLER, 1959). Tubos em banho-maria (a); tubos resfriados e diluídos (b); amostras em microplaca para leitura das absorvâncias (c); gráfico da curva padrão (d). Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Figura 4. Biomassa sonicada e precipitada (EIP) de *A. platensis* antes (a) e após (b) solubilização em água por sonicação. Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Figura 5. Solução a 10% de polissacarídeos extraídos de *A. platensis*. Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Figura 6. Crescimento de *Enterococcus faecium* 133v (A) e *Lactobacillus rhamnosus* GG (B) e em meio MRS sem glicose (0 %); MRS com glicose (Gli); MRS sem glicose e acrescido de FOS e MRS sem glicose e acrescido do extrato intracelular precipitado de *Arthrospira platensis* (EIP) nas concentrações de 1 %, 1.5 % e 2 %, nos tempos de 0, 24 e 48 horas.

Figura 7. Crescimento de *Escherichia coli* (A) e *Staphylococcus aureus* (B) em meio LB sem glicose (0 %); LB com glicose (Gli); MRS sem glicose e acrescido de FOS e LB sem glicose e acrescido do extrato intracelular precipitado de *Arthrospira platensis* (EIP) nas concentrações de 1 %, 1.5 % e 2 %, nos tempos de 0, 24 e 48 horas.

Fluxograma 1. Obtenção dos metabólitos provenientes do cultivo de *A. platensis*. EIB= extrato intracelular bruto; EIP= extrato intracelular precipitado; LM= líquido metabólico; ME= metabólitos extracelulares; MEC= metabólitos extracelulares concentrados.

Fluxograma 2. Atividade prebiótica.

Figura 8. Produção de exopolissacarídeos por *E. faecium* 133v em caldo de Man Rogosa and Sharpe ágar.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações das fontes de carbono adicionadas aos meios caldo de Man Rogosa and Sharpe, para *L. rhamnosus* GG e *E. faecium* 133v e Luria Bertani, para *E. coli* e *S. aureus*. Considera-se FOS= frutooligossacarídeo; EIP= extrato intracelular precipitado de *A. platensis*.

Tabela 2. Rendimento de carboidratos presentes no extrato intracelular precipitado (EIP) e nos metabólitos extracelulares (ME) provenientes do cultivo de *A. platensis*.

Tabela 3. Concentrações de carboidratos totais na biomassa celular e líquido metabólico de *A. platensis* dosadas pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956b). Onde FOS = frutoligossacarídeo; EIB = extrato intracelular bruto; EIP = extrato intracelular precipitado; LM = líquido metabólico; ME = metabólitos extracelulares; MEC = metabólitos extracelulares concentrados.

Tabela 4. Concentração de açúcares-redutores na biomassa celular e líquido metabólico de *A. platensis* obtida pelo método ADNS (MILLER, 1959) provenientes de *A. platensis*. BS= sobrenadante resultante do rompimento celular livre de células; EIP= extrato intracelular precipitado; LM= líquido metabólico; ME= metabólitos extracelulares.

Tabela 5. Análise de variância de um fator (ANOVA) para crescimento de *Enterococcus faecium* 133v (a), *Lactobacillus rhamnosus* GG (b), *Escherichia coli* (c) e *Staphylococcus aureus* (d) de 0h, 24h e 48 h em diferentes concentrações e fontes de carbono. DP = desvio padrão; FOS= frutoligossacarídeo; EIP= extrato intracelular precipitado de *Arthrospira platensis*. Dados foram apresentados como intervalos de confiança (95%) (n= 3). Letras diferentes no mesmo ensaio de tempo representam diferenças significantes entre os grupos no nível de significância de 0.05 ($p < 0.05$).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

° C	Graus Celcius
µL	Microlitros
<i>A. platensis</i>	<i>Arthrospira platensis</i>
abs	Absorbância
ADNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bactéria ácido-lática
Da	Daltons
DO	Densidade óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EIB	Extrato intracelular bruto de <i>Arthrospira platensis</i>
EIP	Extrato intracelular precipitado de <i>Arthrospira platensis</i>
FDA	Food and Drug Administration
FOS	Frutoligossacarídeos
g	Gramas
GRAS	Generally Recognized As Safe
h	Horas
L	Litros
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
LB	Luria Bertani
LBA	Luria Bertani ágar
LM	Líquido metabólico de <i>Arthrospira platensis</i>
ME	Metabólitos extracelulares de <i>Arthrospira platensis</i>
MEC	Metabólitos extracelulares concentrados de <i>Arthrospira platensis</i>
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
MRS	de Man Rogosa and Sharpe
MRSA	de Man Rogosa and Sharpe ágar
nm	Nanômetros

p	Peso
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
<i>S. platensis</i>	<i>Spirulina platensis</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UTEX	Universidade do Texas
v	Volume
W	Watts
μmol	Micromol

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	17
Objetivos geral	17
Objetivos específicos	18
REVISÃO DE LITERATURA	18
Prebióticos e probióticos	18
Fontes alternativas de prebióticos	22
Potencial biotecnológico das cianobactérias e microalgas	23
Gênero <i>Arthrospira</i>	24
Bioativos obtidos de <i>Arthrospira</i>	25
Métodos de obtenção de polissacarídeos	25
MATERIAIS E MÉTODOS	26
Condições de cultivo e manutenção de <i>Arthrospira platensis</i>	26
Obtenção dos polissacarídeos	27
Determinação de solubilidade dos polissacarídeos	28
Dosagem de carboidratos totais	28
Determinação de açúcares-redutores	29
Manutenção e cultura das linhagens bacterianas	30
Atividade prebiótica	30
Análise estatística	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
Rendimento	33
Solubilidade dos polissacarídeos	39
Atividade prebiótica	41
Análise estatística	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
APÊNDICES	58

1. INTRODUÇÃO

A procura emergente por produtos alimentícios com propriedades funcionais significativas e de fontes seguras, tem se tornando cada vez mais comum no mercado mundial. Este, que cresce a cada dia, exige o emprego de novas fontes alimentícias que demandem de menor custo possível, sejam produtíveis em larga escala e ecologicamente corretas ou “*eco-friendly*” (GOUDA et al., 2022; HYRSLOVA et al., 2021).

O aumento na busca pelos produtos alimentícios funcionais, como os que contém prebióticos e probióticos, pode ser explicado principalmente pelo fato de que a manutenção da microbiota intestinal pode atuar tanto na terapêutica quanto na prevenção de doenças, como as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (diabetes, hipertensão, cânceres e doenças cardiovasculares), responsáveis por aproximadamente 71% das mortes no mundo a cada ano e que tem como agentes agravantes do risco de morte a adoção de maus hábitos de vida, como má alimentação, tabagismo e sedentarismo, por exemplo (SIDDIQI, 2010). Além disso, ter uma microbiota intestinal rica em microrganismos probióticos também pode prevenir o indivíduo de contrair doenças infecciosas, tendo em vista que dentre os diversos benefícios está o aumento de imunidade (CHEN et al., 2022; JENKINS; MASON, 2022; VELIKOVA et al., 2020).

Prebióticos, carboidratos não-digeríveis, estimulam seletivamente a proliferação e/ou atividade de populações de bactérias probióticas, promovendo efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Diante disso, o uso da biomassa de microalgas e cianobactérias como a *Arthrospira platensis*, classificada pela *American Food and Drug Administration* (FDA) como GRAS (Generally Recognized As Safe) (NO, 2015) aparece como uma alternativa interessante. Estes microrganismos podem ser incorporados em produtos alimentícios e cosméticos, levando em conta o potencial anticâncer, atividade imunoestimulante, antioxidante, entre outras (HYRSLOVA et al., 2021), sendo, inclusive, consideradas como superalimentos (TORRES-TIJI; FIELDS; MAYFIELD, 2020).

Para obtenção da biomassa rica em nutrientes esses microrganismos fotossintetizantes (MF) são cultivados em meio e condições específicas, onde ao final se separa biomassa e líquido metabólico (LM). Este, apesar de ser tratado como resíduo, podendo gerar impactos sobre o meio ambiente quando descartado de forma inadequada (LIU; POHNERT; WEI, 2016), possui compostos bioativos liberados pelos MF que podem ser reaproveitados para o crescimento celular (SILVA et al., 2020).

Na produção industrial de biomassa de MF mais de 84 % da água utilizada para o cultivo é descartada. A reciclagem desse conteúdo pode também reduzir em até 55% o uso de nutrientes (YANG et al., 2011), o que faz dela uma alternativa interessante para reduzir o impacto do descarte indevido no meio ambiente, economizar água, nutrientes, reduzir custos na produção e, por consequência, tornar mais acessível o produto para o consumidor de nutracêuticos, biocombustíveis, cosméticos ou medicamentos provenientes de MF (CHEN et al., 2022).

O uso do líquido metabólico (LM) de microrganismos fotossintetizantes já se mostrou eficiente na redução de custos na produção de bactérias probióticas (SILVA et al., 2020), porém a investigação do potencial prebiótico dos carboidratos do LM ainda não foi investigada. Ainda, não foram encontrados estudos que além de testar o potencial prebiótico frente a cepas probióticas, também testassem o efeito em cepas patogênicas, fator relevante para um melhor discernimento da real eficiência do LM. Nesse viés, este estudo tem por objetivo avaliar a porção de carboidratos na biomassa e no líquido metabólico de *Arthrospira platensis*, bem como sua viabilidade e capacidade de promover crescimento de cepas probióticas ou patogênicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a porção de carboidratos da biomassa celular de *A. platensis* e do líquido metabólico para testar o potencial prebiótico frente a cepas de *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

2.2 Específicos

- Quantificar carboidratos na biomassa e líquido metabólico de *A. platensis*;
- Testar a solubilidade do extrato precipitado proveniente da biomassa;
- Cultivar *L. rhamnosus* GG, *E. faecium* 133v, *E. coli* e *S. aureus* em meio comercial adicionado dos polissacarídeos obtidos;
- Definir qual concentração de extrato de *A. platensis* foi mais eficiente na promoção do crescimento das cepas testadas;
- Avaliar se o extrato de *A. platensis* ou o líquido metabólico podem ser viáveis como prebióticos estimulando cepas benéficas à saúde.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Prebióticos e probióticos

A microbiota intestinal de um indivíduo é um ecossistema dinâmico, composto por diversos microrganismos responsáveis pela modulação e manutenção da funcionalidade do órgão e fisiologia do indivíduo. A composição da microbiota intestinal é constituída em sua grande parte logo após o nascimento, a depender do tipo de parto, e se expande e desenvolve continuamente ao longo da vida do indivíduo. Essa composição pode ser influenciada também pela amamentação, fatores genéticos e pelo estilo de vida do indivíduo, como a dieta, uso de medicações, níveis de estresse e até fatores ambientais. A microbiota pode influenciar não só localmente no trato

gastrointestinal, mas também, afetando o sistema nervoso central (SNC) (COMAN; VODNAR, 2020; RATSIKA et al., 2021; RINNINELLA et al., 2019).

A dieta é considerada um fator determinante com relação à composição, função e diversidade da microbiota e está associada à maioria das doenças degenerativas (COMAN; VODNAR, 2020). Isso acontece porque os componentes dos alimentos interagem com a microbiota, afetando a saúde do indivíduo através de diversos mecanismos (ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019).

Fibras alimentares ao serem fermentadas no trato gastrointestinal por bactérias benéficas geram ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), sendo os mais estudados o butirato, propionato, acetato e lactato. Os AGCC podem atuar na prevenção de obesidade e resistência à insulina, melhora no metabolismo com o aumento de gasto energético, gliconeogênese intestinal e modulação do apetite, promovendo redução do consumo alimentar. O butirato, especialmente, têm papel fundamental na homeostase imune intestinal, protegendo contra inflamação e surgimento de cânceres (ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019). Ainda, uma dieta rica em fibras pode contribuir na defesa do organismo contra patógenos (WALKER et al., 2011) e suprimir alergias respiratórias (TROMPETTE et al., 2014).

Dentre os microrganismos presentes no intestino as bactérias são predominantes, onde os filos Firmicutes e Bacteroidetes representam até 90% dessa microbiota. Além destes, estão presentes os filos Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia, considerando uma microbiota de um intestino saudável (COMAN; VODNAR, 2020; KOLIADA et al., 2017; RINNINELLA et al., 2019). A presença de proteobactérias no intestino serve como um forte indicador no diagnóstico de doenças e disbiose (SHIN; WHON; BAE, 2015).

A disbiose é comumente definida como um desequilíbrio configurado pela redução da diversidade microbiana com a perda de bactérias benéficas como Bacteroidetes e o aumento de patobiontes (bactérias simbiotes que a depender das condições tornam-se patogênicas) como as *Escherichia coli* gram-negativas, por exemplo (HUMPHREYS, 2020). Esse desequilíbrio provoca uma série de malefícios ao indivíduo, pois uma microbiota

desequilibrada não consegue proteger o organismo contra patógenos. Dessa maneira, a disbiose é associada a inflamações, doenças, alimentação pobre em fibras e rica em adoçantes artificiais, uso de antibióticos, entre outros fatores (RAJENDRAN; SCHULZKE; SEIDLER, 2018; SWAMINATHAN; SHAH, 2021).

As bactérias benéficas promovem modificações positivas no hospedeiro como produção de lactase, ou fora dele, podendo ser utilizadas na indústria na fermentação de alimentos ou produzindo compostos de interesse para o mercado (SILVA et al., 2020). Algumas delas desempenham papel probiótico, atuando na promoção de saúde do indivíduo em geral (BHOWMIK; DUBEY; MEHRA, 2009; DUARTE et al., 2017).

As bactérias conhecidas como maléficas são aquelas que, ao contrário das benéficas, trazem prejuízo ao hospedeiro. As bactérias patogênicas fazem parte delas e são responsáveis por diversas doenças que afetam a população mundial (tuberculose, meningite, cólera, entre outras) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2019). Além das patogênicas, existem outras bactérias consideradas maléficas, mas que a depender da imunidade do indivíduo e quantidade ingerida, não chegam a impactar negativamente, como atuam na deterioração de matéria orgânica (LIU et al., 2022a).

Lactobacillus é o gênero de bactérias que predomina dentre as bactérias ácido lácticas. São microrganismos benéficos vastamente utilizados na indústria de fermentos lácteos e como probióticos, já que são reconhecidos como GRAS. Compreendem microrganismos gram-positivos que fermentam glicose em lactose, são facultativamente anaeróbios. Estão presentes na microbiota natural e saudável humana e são produtoras de bacteriocinas e exopolissacarídeos. Dentre seus potenciais estão adesão, regulação do sistema imune, inibição de formação de hifas, virucida contra HIV-1 e outros vírus, entre outros (DUARTE et al., 2017; LIU et al., 2022b; RAFTER et al., 2007). A cepa *L. rhamnosus* GG em associação com prebiótico inulina rica em oligofrutose promoveu melhora na barreira intestinal e reduziu câncer colorretal em humanos (RAFTER et al., 2007).

O gênero *Enterococcus* compreende microrganismos facultativos anaeróbios, gram-positivos e de morfologia oval, podendo ser encontrados

sozinhos ou em agrupamentos. Habitam naturalmente o trato gastrointestinal animal e humano e suas espécies podem ter potencial probiótico ou patogêno. Das mais de 20 espécies as mais comuns são *E. faecalis* e *E. faecium* (GIRAFFA, 2014).

Essas bactérias têm a habilidade de sobreviver em condições ambientais hostis fora do ambiente intestinal e podem, portanto, serem encontradas em vegetais, água e solos (KAVITAKE et al., 2023). Conseguem sobreviver ainda em condições adversas no ambiente intestinal, como alta salinidade, extremo pH e temperatura. Isso indica que elas também podem resistir aos processos comuns da indústria de alimentos (GIRAFFA, 2003).

Enterococcus, se destacam na indústria alimentícia, devido a sua habilidade de acelerar a maturação de queijos, configurar características organolépticas e auxiliar na conservação de produtos lácteos, através da sua ação antimicrobiana (GIRAFFA, 2014; KAVITAKE et al., 2023). Podem produzir exopolissacarídeos de interesse na indústria de panificação e de derivados do leite, devido à alta viscosidade desses compostos. Além disso, promovem efeito antioxidante. Inclusive, a cepa *E. faecium* 133v utilizada neste trabalho é uma produtora de EPS (Figura 8) (SILVA, 2021).

A diferenciação entre as cepas probióticas e patogênas desse gênero é alcançada por meio da diferenciação genética (SANTOS et al., 2020). O potencial probiótico de *E. faecium* foi verificado por BAGCI et al. (2019) e GHATTARGI et al. (2018), entretanto para ser classificada como probiótico, cada cepa precisa ser analisada individualmente. No ramo veterinário, probióticos contendo *E. faecium* são comumente utilizados no tratamento de quadros de diarreia, prevenção de doenças e aumento de imunidade (WU et al., 2019). Há evidências de que as bactérias ácido lácticas, quando consumidas, podem proteger indiretamente o indivíduo de ser afetado por câncer, através do aumento de imunidade adaptativa. No estudo de CALAÇA et al., (2021), *E. faecium* 137v protegeu animais de câncer colorretal retardando a progressão tumoral.

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em doses adequadas, promovem efeitos benéficos ao hospedeiro (FAO/WHO, 2001). São utilizados na terapia de infecções virais, pois podem produzir pós-bióticos, ou seja, metabólitos derivados de

microrganismos que quando administrados ao hospedeiro podem conferir efeitos fisiológicos benéficos (VINDEROLA; SANDERS; SALMINEN, 2022). 00

Exopolissacarídeos, ácido lático, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas são exemplos de pós-bióticos que tem potencial antioxidante, anticolestêmico, prebiótico, imunomodulador, anticâncer, antidiabético e, ainda, podem agir contra alguns vírus (AL KASSAA et al., 2014; SILVA, 2021), como o coronavírus SARS-CoV-2, responsável pela pandemia da COVID-19 (DE BRITO et al. , 2021).

Um prebiótico pode ser visto como um composto alimentar indigerível que gera mudanças específicas na composição e/ ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro como um todo (RAPOSO; DE MORAIS, 2015). Prebióticos são fibras solúveis que podem reduzir a obesidade por meio da normalização da disbiose intestinal, principal causadora das doenças metabólicas. BROWN et al. (2012) testou os efeitos da administração de prebióticos em ratos com disbiose e houve redução nos Bacteroidetes e aumento de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., demonstrando redução no quadro de disbiose.

Sabendo que os prebióticos são capazes de estimular a proliferação de microrganismos probióticos, o mercado vem investindo em produtos contendo ambos para promoverem melhores efeitos ao consumidor: os simbióticos (VINDEROLA; SANDERS; SALMINEN, 2022). Essa associação de prebióticos aos probióticos permite que ocorram alterações específicas na composição e atividade da microbiota intestinal, promovendo, assim, redução na disbiose e aumento de imunidade (DUARTE et al., 2017).

3.2 Fontes alternativas de prebióticos

Organismos fotossintetizantes em geral são conhecidos por possuírem fibras solúveis, e logo apresentam propriedades prebióticas. Os vegetais, fonte mais disseminada destas fibras, podem ser explorados nas suas mais diversas partes como folhas, frutos, raízes e até as sementes (DUARTE et al., 2017;

PARIKH et al., 2019; ZMORA; SUEZ; ELINAV, 2019). Outra fonte que vem ganhando atenção é o mel produzido pelas abelhas, que também é uma fonte de prebióticos (MOHAN et al., 2017; RICIGLIANO et al., 2021).

Microrganismos fotossintetizantes como as microalgas e as cianobactérias podem conter alguns polissacarídeos solúveis que não são degradáveis por enzimas no trato digestivo superior e, portanto, podem exercer papel prebiótico. Disseminadas como fibras solúveis, frutoligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS), xilooligossacarídeos (XOS) e beta-glucanas, são algumas das mais disseminadas fibras prebióticas do mundo (CARBALLO et al., 2019; LIU et al., 2015).

3.3 Potencial biotecnológico das cianobactérias e microalgas

Cianobactérias e microalgas são fonte de biomoléculas de grande interesse comercial e são visadas pelas indústrias de biocombustíveis, farmacêutica e de alimentos, principalmente. São ricas em macronutrientes, vitaminas e minerais e por serem vastamente encontradas nos habitats, se tornaram um alvo a ser explorado e bem aproveitado pelo mercado (MAHENDRAN et al., 2021).

As indústrias buscam aproveitar os compostos bioativos como proteínas, lipídeos e carboidratos que podem ser obtidos a partir desses microrganismos fotossintetizantes (SILVA et al., 2018). Por ser mais valiosa, apenas a biomassa deles é intensivamente explorada e adicionada aos produtos atuais. No entanto, FOGG (1966) relatou presença de produtos extracelulares encontrados no meio de cultivo de cianobactérias. Matéria orgânica, principalmente polissacarídeos e polipeptídeos em quantidades suficientes para servirem de suporte à vida animal aquática, o que indica que esses produtos extracelulares podem servir de fonte de energia para bactérias.

Tendo em vista que bactérias ácido lácticas como as do gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*, por exemplo, requerem meios de cultivo de alto custo, pois são meios de alta complexidade de nutrientes e que as indústrias visam sempre alternativas em seus processos para reduzir o

custo do produto para o consumidor, o meio de cultivo que sobra dos cultivos em larga escala de cianobactérias e microalgas vem se destacando nesse aspecto (PARADA et al., 1998). SILVA et al., (2020) incorporou o meio utilizado por *C. vulgaris* aos meios comerciais e obteve resultados positivos no crescimento de *L. acidophilus* com até 50% de meio adicionado.

O reuso do meio contendo metabólitos extracelulares de microrganismos fotossintetizantes é visto como *eco-friendly*. Cultivos desses microrganismos demandam de muita água, que ao final do processo é descartada num percentual de até 84%, como resíduo, podendo gerar impactos ambientais e, logo demandar custos para o tratamento dos locais onde forem despejados (LIU; POHNERT; WEI, 2016; YANG et al., 2011). Desse modo, ao fazer o reuso desse meio o descarte será reduzido, assim como os custos na produção dos produtos de interesse, como os probióticos.

Vale salientar que a reciclagem do meio também para o próprio cultivo das microalgas promove meios futuros cada vez mais ricos em bioativos extracelulares, já que eles se acumulam a cada cultivo, segundo (CUI et al., 2019; DEPRAETERE et al., 2015).

Os polissacarídeos presentes na biomassa e excretados no meio ao longo do crescimento de cianobactérias cumprem papéis importantes na saúde e nutrição humana e animal. Estudos mostram que ao serem ingeridos ou adicionados a cultivos de bactérias esses compostos estimulam seletivamente o crescimento e a atividade de bactérias benéficas específicas, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, agindo como prebióticos (BENELHADJ et al., 2016; LEAL et al., 2017; RAPOSO; DE MORAIS, 2015) mas, a avaliação do efeito deles isoladamente também em patógenos não é um fator presente nos trabalhos e isso foi considerado nesse estudo.

3.4 Gênero *Arthrospira*

O gênero *Arthrospira*, mais conhecido como Spirulina, compreende procariotos fotossintetizantes gram-negativos, filamentosos e comestíveis

chamados de cianobactérias, ou algas verde-azuladas, muitas vezes referidas como microalgas por ter um perfil semelhante. Possuem metabolismo aeróbio e são encontradas naturalmente nos mais diversos habitats onde houver luz necessária para seu crescimento, mas habitam principalmente lagos de águas alcalinas (COELHO et al., 2020; DE MEDEIROS et al., 2021). São comercialmente viáveis para produção industrial em grande escala, tanto que dominam o mercado de microalgas seguido pelo gênero *Chlorella* sp. (DE MEDEIROS et al., 2021), que assim como *Arthrospira*, é reconhecido como GRAS.

3.5 Bioativos obtidos de *Arthrospira*

Especificamente a espécie *Arthrospira platensis* foi designada como alimento saudável pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (SEYIDOGLU et al., 2017). Sua biomassa, de composição típica de 55-70% de proteínas, 15-25% de carboidratos e 4-7% de lipídeos (LJUBIC et al., 2018) é a parte explorada de interesse do mercado, onde ela tem se tornado cada vez mais visada e utilizada na promoção de saúde como alimento nutracêutico (BELAY, 2007; HU et al., 2019).

Sua parede celular é composta na maior parte de peptideoglicanos e lipopolissacarídeos (SEYIDOGLU et al., 2017) e sua biomassa é ampla quanto a compostos bioativos, incluindo polissacarídeos e oligossacarídeos, peptídeos e aminoácidos, polifenóis, pigmentos, fitoesteróis, vitaminas e ácidos graxos polinsaturados, isso explica o motivo dela ser a mais consumida no mundo no ramo das microalgas e cianobactérias (DE MEDEIROS et al., 2021; RAPOSO; DE MORAIS, 2015).

3.6 Métodos de obtenção de polissacarídeos

Para que os polissacarídeos de cianobactérias sejam obtidos, existem técnicas diversas que podem ser aplicadas, como, agitação mecânica (LIU et al., 2022; LUPATINI et al., 2017) , centrifugação (LJUBIC et al., 2018), micro-ondas (AI et al., 2023; SILVA et al., 2018), aplicação de enzimas (COELHO et al., 2020; RAJASEKAR et al., 2019), água quente e ultrassom. Dentre elas, água quente é o método mais tradicional utilizado pelos pesquisadores, e tal método é caracterizado por baixos rendimentos. Sendo assim a combinação de métodos como enzimático com ultrassom podem reduzir drasticamente o tempo de extração e elevar o rendimento, sendo uma opção interessante para a indústria (AI et al., 2023).

Recentemente, a ultrassom é uma técnica que vem crescendo no mercado de produtos naturais, devido ao seu poder de cavitação para extrair compostos intracelulares, aumentar rendimento de polissacarídeos, proteínas, entre outros bioativos visados no mercado. A ultrassom tem vantagens sobre os métodos tradicionais que fazem uso de solventes, é considerada uma técnica verde e econômica quimicamente. Não requer temperaturas elevadas, servindo para amostras sensíveis a temperatura, como enzimas, leva um tempo menor de procedimento, o qual é muito simples e não requer reagentes e longos passo-a-passos. Nessa perspectiva, trabalhos que envolvem a otimização das condições de sonicação vem surgindo cada vez mais (CHAO; RI-FU; TAI-QIU, 2013; LI et al., 2023) e contribuem para o mercado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Condições de cultivo e manutenção de *Arthrospira platensis*

A cepa de *Arthrospira platensis* UTEX 2010 foi obtida a partir da coleção de culturas da Universidade do Texas (Austin, Texas, Estados Unidos da América) e mantida em meio Schlösser (SCHLÖSSER, 1982) a 30 ± 2 °C.

A *Arthrospira platensis* foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo meio Schlösser na concentração celular inicial de 50 mg L⁻¹ (PELIZER et al., 2003), e permaneceu sob agitação contínua a 95 ± 5 rpm em mesa agitadora (TE-1401, Tecnal, Piracicaba, São Paulo (SP) – Brasil), sob temperatura de 27±1 °C e intensidade luminosa de 52 ± 5 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Após 13 dias, todo o cultivo foi centrifugado a 4500 rpm por 15 min (Hermlle LaborTechnik, Centrífuga Universal de alta velocidade refrigerada – Z323K, Baden-Württemberg, Wehingen – Alemanha), separando-se assim, biomassa e líquido metabólico (LM). A biomassa foi lavada 4x com água destilada, liofilizada (Figura 1) e mantida a – 80 ° C, assim como o líquido metabólico.

4.2. Obtenção dos polissacarídeos

Os polissacarídeos presentes na biomassa foram extraídos por sonicação, de acordo com a metodologia de (QU et al., 2013) modificada. Se utilizou o Ultrasonicador HD 2070 Bandelin Sonoplus (Berlim, Alemanha) de sonda MS 72 a 70 W, na amplitude de 95-97%, a 50 ° C, durante 50 min em um único ciclo, sem repouso. A concentração de células a serem sonicadas com água destilada foi de 25 mg/ mL.

Após sonicação o conteúdo foi centrifugado a 6000 rpm por 15 min em centrífuga refrigerada para se coletar o extrato de interesse: o sobrenadante, livre de células, contendo os bioativos intracelulares, aqui denominado de extrato intracelular bruto (EIB). Na etapa seguinte, 4 volumes de etanol absoluto refrigerado foram adicionados ao EIB e a solução foi armazenada a 4 °C overnight para ocorrer a precipitação. O precipitado foi lavado com 3 volumes de etanol absoluto refrigerado, centrifugado e o extrato obtido foi seco em estufa a 50° C até peso constante, resultando no extrato intracelular precipitado (EIP). O rendimento da extração de polissacarídeos (massa de polissacarídeos/ peso seco da biomassa x 100%) foi determinado (CAI et al., 2022; KURD; SAMAVATI, 2015).

O líquido metabólico obtido do cultivo e já livre de células foi precipitado e seco, seguindo o mesmo protocolo aplicado na biomassa, para a obtenção dos metabólitos extracelulares (ME). Estes ME foram dialisados (TRABELSI et al., 2009) com água destilada em membrana de celulose de 14.000 Da a 4° C por 24 h e em seguida foram liofilizados, resultando em metabólitos extracelulares concentrados (MEC). O rendimento de polissacarídeos presentes no LM foi determinado pela equação: massa de polissacarídeos/ peso seco do LM x 100%. No Fluxograma 1 encontram-se todas as etapas para a obtenção dos polissacarídeos provenientes do cultivo de *A. platensis*.

4.3 Determinação de solubilidade dos polissacarídeos

A solubilidade dos polissacarídeos contidos no extrato intracelular precipitado de *A. platensis* (EIP) foi determinada utilizando vários solventes orgânicos, além de água, tais como: etanol, metanol, acetona, éter, clorofórmio, diclorometano, n-butanol e dimetilsulfóxido (DMSO). Todos foram adicionados à EIP em tubos na proporção de 1:100 (p/ v) de EIP e solvente, respectivamente e foram agitados manualmente (RAJASEKAR et al., 2019). A amostra com adição de água foi ainda sonicada levemente, apenas para auxiliar na solubilização (YIN et al., 2021), nas seguintes condições: Ultrasonicador HD 2070 Bandelin Sonoplus (Berlim, Alemanha) de sonda MS 72 a 70 W, na amplitude de 95-97%, concentração de 0,01g/ mL, durante 1 min., ciclo contínuo e temperatura 25 ± 2 °C. Quanto aos metabólitos extracelulares, foi testado somente a solubilidade em água, na mesma proporção. A solubilidade foi monitorada por observação visual (RAJASEKAR et al., 2019).

4.4 Dosagem de carboidratos totais

A porção de carboidratos presentes nas amostras aqui analisadas foi dosada de acordo com o método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956a),

modificado. As amostras foram inseridas em tubos de ensaio contendo uma solução de fenol a 5% e ácido sulfúrico concentrado na proporção de 1:1:5 (v/v/v), respectivamente. Após atingirem temperatura ambiente (25° C) alíquotas de 200 µL foram transferidas para poços de uma microplaca de 96 poços e conteúdo foi lido em leitor de microplaca a 490 nm (iMark™ Absorbance Microplate Reader, BIO-RAD). A substituição do espectrofotômetro, comumente utilizado no método, pelo leitor de microplaca é uma otimização que apresenta maior sensibilidade e promove economia de tempo, volume de amostra e reagentes, segundo MASUKO et al. (2005).

A concentração de carboidratos foi estabelecida em triplicata, por meio da equação obtida a partir de uma curva padrão de calibração de glicose construída a partir de uma solução de glicose de 1 mg/ mL previamente preparada. As absorbâncias foram lidas excluindo-se o valor do branco, onde a amostra foi substituída por água destilada.

4.5 Determinação de açúcares-redutores

A porção de açúcares redutores foi determinada através do método ADNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) (MILLER, 1959), em triplicata. Inicialmente, a solução de ADNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico, 1 g/ L; tartarato de sódio e potássio, 300 g/ L e NaCl, 16 g/ L) foi adicionada à amostra em tubos de ensaio. Após permanecer em banho-maria a 100° C por 5 min, os tubos foram resfriados em banho de gelo e o conteúdo foi diluído com água destilada na proporção de 1:1:5 (amostra: ADNS: água) (v/ v/ v). Alíquotas de 200 µL foram transferidas para os poços de uma microplaca de 96 poços em triplicata e as absorbâncias foram lidas a 590 nm, excluindo-se o valor do branco, onde a amostra foi substituída por água destilada. A concentração de açúcares redutores foi estabelecida por meio da equação proveniente da curva padrão de calibração de glicose preparada nas mesmas condições da curva padrão para dosagem de carboidratos totais.

4.6 Manutenção e cultivo das linhagens bacterianas

A bactéria ácido-lática (BAL) *Enterococcus faecium* 133v, caracterizada como cocos gram positivos e catalase negativa (SILVA, 2021), foi isolada de queijo Coalho artesanal, produzido no Sertão e Agreste de Pernambuco (Arcoverde, Capoeiras e Venturosa) e foi proveniente da Coleção de Bactérias ácido-láticas do Laboratório de Avanços em Biotecnologia e Proteínas e Tecnologia de Bioativos (LABIOPROTECBIO) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil. A linhagem *Lactobacillus rhamnosus* GG (DSM 33156), foi isolada de um probiótico comercial. Os isolados foram mantidos a -80°C em tubos estéreis contendo caldo de Man Rogosa and Sharpe (MRS) e 20 % (v/v) de glicerol.

As linhagens patógenas *Escherichia coli* (ATCC) 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foram providas pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil e foram mantidas a -80°C em tubos estéreis contendo meio Luria Bertani (Miller) (LB) e 20 % (v/v) de glicerol.

As bactérias foram reativadas e pré-inoculadas em 5 mL de meio MRS para *L. rhamnosus* GG e *E. faecium* 133v e LB para *E. coli* e *S. aureus* por 24h a 37°C .

4.7 Atividade prebiótica

Após reativadas e pré-inoculadas, as linhagens bacterianas foram primeiramente padronizadas a fim de obter uma densidade óptica (DO) inicial de 0.1 (600 nm) de células (DUARTE et al., 2017). Após padronizadas, o volume de cada pré-inóculo foi calculado e adicionado aos meios de cultivo (MRS e LB) preparados em diferentes condições, tais como: isentos (0%) ou com adição de soluções de: glicose, frutooligossacarídeo (FOS) e EIP (Tabela 2), de maneira que as concentrações dessas fontes de carbono nos meios fossem de 1%, 1,5% e 2%. Tais concentrações foram escolhidas tendo como

base o percentual de fonte de carbono presente no meio de cultura comercial MRS que é de 2%, os demais serviram para fins comparativos. Os ME nem MEC foram testados quanto à atividade prebiótica.

Os cultivos foram realizados em microplacas de 96 poços de fundo chato, estéreis, em triplicata, onde cada poço teve o volume final de 150 µL composto por meio de cultivo + pré-inóculo. As microplacas permaneceram em estufa bacteriológica por 48 h a 37° C e alíquotas foram retiradas no tempo inicial (0 h), após 24 h e 48 h para análise de concentração de células.

As fontes de carbono utilizadas foram adicionadas aos meios de cultivo através de soluções, não diretamente. As soluções a 10% foram previamente preparadas e o volume de cada uma delas a ser adicionado aos meios de cultivo foi calculado a partir da seguinte equação:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Onde, C1 representa a concentração da solução (neste caso, 10%), V1 é o volume necessário da solução a 10% para atingir a concentração desejada, C2 é a concentração final de carboidratos no meio (1%, 1,5% ou 2%) e V2 representa o volume final de meio + solução de carboidrato.

No que se refere à esterilidade dos meios preparados, as soluções de glicose e FOS foram filtradas em membrana de 0.22 µm antes de serem incluídas em MRS e LB. Foi feito o espalhamento de todos os meios de cultivo preparados (com ou sem adição das fontes de carbono) para os cultivos em placas de petri contendo meios MRS ágar ou LB ágar estéreis e solidificados, mantidas a 37 ° C por 48 h.

Meios isentos de fonte de carbono serviram como controle negativo para *L. rhamnosus* GG e *E. faecium* 133v. Meios adicionados de glicose ou FOS serviram como controle positivo. Para *E. coli* e *S. aureus* não houve controle negativo, tendo em vista que o meio LB já é isento de fonte de carbono.

Tabela 1. Concentrações das fontes de carbono adicionadas aos meios caldo de Man Rogosa and Sharpe, para *L. rhamnosus* GG e *E. faecium* 133v e Luria Bertani, para *E. coli* e *S. aureus*. Considera-se FOS= frutooligossacarídeo; EIP= extrato intracelular precipitado de *A. platensis*.

Fonte de carbono	Concentração (%)
Isento	0
Glicose	1
FOS	1,5
EIP	2

A concentração de células foi avaliada em três períodos: logo após a inoculação (tempo 0), após 24 h e 48 h de fermentação. Foram feitas diluições seriadas dos inóculos para cada período, utilizando solução salina estéril a 10% (PBS). A diluição de 10^4 foi feita para avaliar a concentração de células no tempo 0, a de 10^5 para as 24 h e a de 10^6 para as 48 h. Posteriormente, 3 μ l das diluições seriadas dos inóculos foram transferidos para placas de petri contendo MRS ágar (MRSA) ou LB ágar (LBA), previamente estéril e solidificado, e espalhados com o auxílio de uma alça de Drigalski, para obtenção de colônias isoladas. As placas foram incubadas invertidas por 48 h em estufa bacteriológica, a 37 ° C, em condições aeróbicas (MARTELLI et al., 2021).

Os cultivos, diluições e as semeaduras nos meios solidificados foram realizadas em triplicatas.

As colônias foram contadas manualmente e expressadas como Log 10 UFC/ mL. Para calcular a concentração de UFC/ mL de cada ensaio a seguinte equação foi aplicada:

$$\text{UFC/ mL} = (\text{n}^\circ \text{ de colônias} \times \text{fator de diluição total} / \text{volume de cultura plaqueada em mL})$$

Onde,

$$\text{fator de diluição total} = (\text{volume do diluente} + \text{volume de cultura}) / \text{volume de cultura transferido.}$$

O frutooligossacarídeo utilizado nos ensaios foi adquirido da farmácia de manipulação Força e vida (Recife, PE) e tem certificado de análise emitido pela SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA. Segundo o certificado, o FOS é originário do Chile, é descrito como um pó fino, branco e levemente amarelo e

higroscópico, pH de 5,0-7,0 (solução 50%), cinzas insolúveis em ácido $\leq 1,5$ (0,04%) e é composto por 93,2-97,5 (96,3%) de oligofrutose e 2,5-6,8 (3,7%) de glicose + frutose + sacarose. O fluxograma 2 representa todas as etapas da atividade prebiótica.

4.8 Análise estatística

Para o processamento dos dados estatísticos foi utilizado o Minitab Statistical Software. As diferenças entre os tratamentos com fontes de carbono em concentrações diferentes versus tempo de fermentação de cada cepa foram representadas por meio de análise de variância (ANOVA) de um fator. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento

O rendimento de carboidratos da biomassa seca (Figura 1) e do líquido metabólico foi investigado (Tabela 2) nas diferentes etapas durante o processo de obtenção: EIB, EIP, LM, ME e MEC. O uso de sonicação seguida pela precipitação, tanto quanto somente a precipitação e diálise apresentaram resultados positivos no rendimento de polissacarídeos. A alta força de dano celular, da sonicação promove maior transferência de massa (WEN et al., 2011), por essa razão, já vem sendo adotada em alguns estudos que obtiveram resultados satisfatórios (CAI et al., 2022; FERREIRA-SANTOS et al., 2020; KURD; SAMAVATI, 2015; QU et al., 2013; WANG et al., 2018).



Figura 1. Biomassa liofilizada de *A. platensis*. Fonte: elaborado pelo autor (2022).

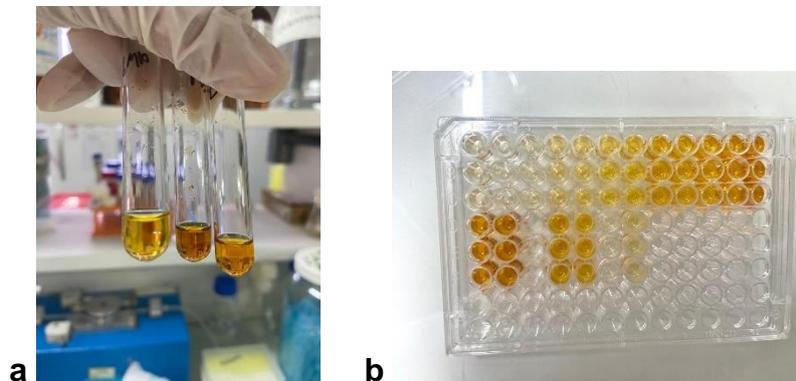
Tabela 2. Rendimento de carboidratos presentes no extrato intracelular precipitado (EIP) e nos metabólitos extracelulares (ME) provenientes do cultivo de *A. platensis*.

	Quantidade	Precipitado (mg)	Carboidratos totais no EIP e ME		Açúcares redutores no EIP e ME	
			mg/ ml	Precipitado (%)	mg/ ml	Precipitado (%)
Biomassa seca	1 g	343	151	44	18	5,2
Líquido metabólico	1 ml	14	1,1	7,8	0,03	0,21

A precipitação com etanol, que aparece geralmente como complemento ao método adotado de lise celular, se mostra eficiente no rendimento de polissacarídeos (KURD; SAMAVATI, 2015; PANDEIRADA et al., 2019; QU et al., 2013; RAJASEKAR et al., 2019; WANG et al., 2018). Os estudos consideram o precipitado como extrato bruto de polissacarídeos e, a partir dele, calculam o rendimento. Dessa maneira, o rendimento da biomassa seca de *A. platensis* foi de 34,3%, um valor elevado em comparação a alguns resultados encontrados na literatura. RAJASEKAR et al. (2019) isolou polissacarídeos sulfatados de *Spirulina platensis* e obteve 13%, WANG et al. (2018) extraiu polissacarídeos de *S. platensis* por diversos métodos, incluindo ultrassom,

como neste trabalho, e conseguiu 9% de rendimento de polissacarídeos. KURD & SAMAVATI (2015) determinaram as condições ótimas para a extração de polissacarídeos de *S. platensis* e a sua atividade anticâncer utilizando ultrassom e obtiveram 14% de rendimento. ZHONG & WANG (2010) extraíram polissacarídeos da polpa da fruta longan por sonicação e obtiveram 4,4% de rendimento.

A maioria dos estudos encontrados na literatura, apesar de mensurar o rendimento do extrato bruto de polissacarídeos, não realiza dosagem de carboidratos, fator considerado neste estudo. As concentrações de carboidratos estabelecidas através de curvas de glicose, realizadas em tubos e microplacas (Figuras 2 e 3), estão presentes nas Tabelas 3 e 4. O rendimento de carboidratos totais (Tabela 3) presentes nesse extrato intracelular precipitado (EIP) foi de 44% e, se comparado à biomassa seca, representa um rendimento de 15%. Um estudo que isolou polissacarídeos sulfatados de *S. platensis* utilizando NaOH, ácido tricloroacético (TCA) e etanol obteve rendimento inferior, mas próximo, de 38% (RAJASEKAR et al., 2019).



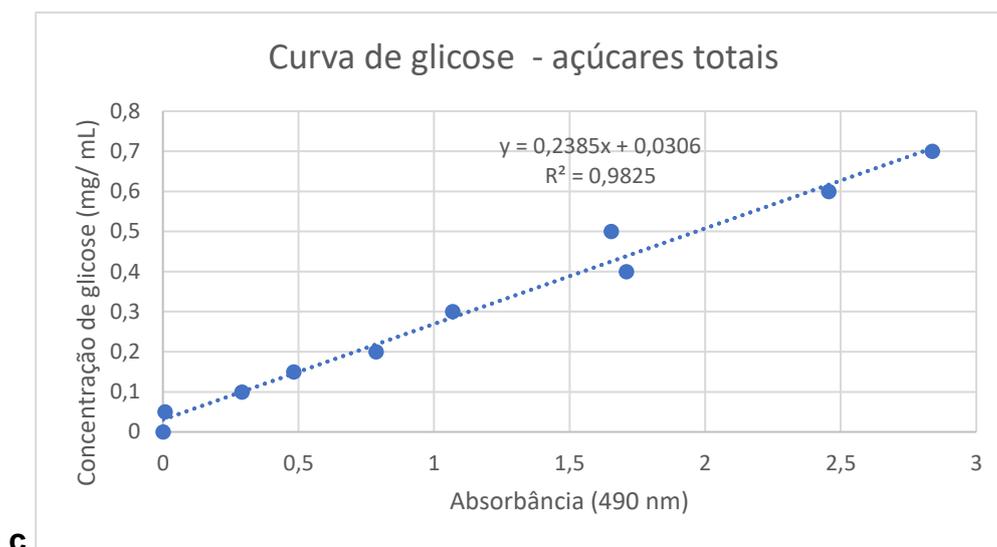


Figura 2. Determinação de açúcares totais de acordo com o método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956b). Reação em tubos (a); amostras em microplaca para leitura das absorbâncias (b); gráfico da curva padrão (c). Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Tabela 3. Concentrações de carboidratos totais na biomassa celular e líquido metabólico de *A. platensis* dosadas pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956b). Onde EIB = extrato intracelular bruto; EIP = extrato intracelular precipitado; LM = líquido metabólico; ME = metabólitos extracelulares; MEC = metabólitos extracelulares concentrados.

Fonte de carbono	Concentração (mg/mL)
EIB	0,32
EIP	0,44
LM	0,05
ME	0,08
MEC	0,1

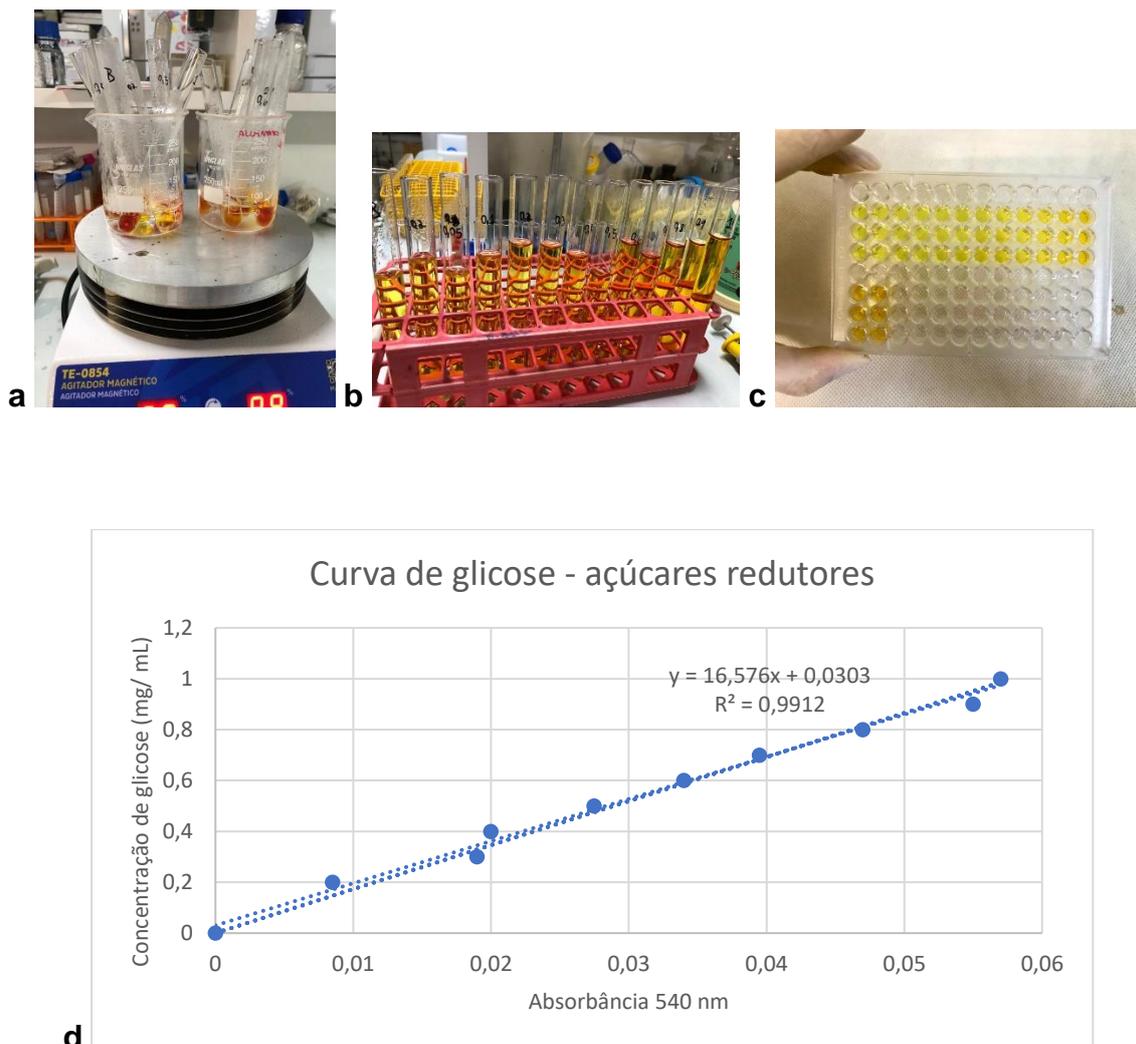


Figura 3. Detecção de açúcar-reduzidor utilizando o método ácido 3,5 – dinitrosalicílico (MILLER, 1959). Tubos em banho-maria (a); tubos resfriados e diluídos (b); amostras em microplaca para leitura das absorbâncias (c); gráfico da curva padrão (d). Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Tabela 4. Concentração de açúcares-redutores na biomassa celular e líquido metabólico de *A. platensis* obtida pelo método ADNS (MILLER, 1959) provenientes de *A. platensis*. BS= sobrenadante resultante do rompimento celular livre de células; EIP= extrato intracelular precipitado; LM= líquido metabólico; ME= metabólitos extracelulares.

Fonte de carbono	Concentração (mg/ mL)
EIB	0,021

EIP	0,053
LM	0,002
ME	0,003

A porção de açúcares redutores (Tabela 2) na biomassa foi baixa, de somente 1,8% em relação à biomassa seca e 5,2% em relação aos carboidratos totais. 2,42 g/ L foram obtidos por COELHO et al. (2020) quando incubou um mix de enzimas com *A. platensis*, dado inferior ao obtido aqui de 18 g/ L. O rendimento nos ME foi de 0,21%. Quando comparados aos carboidratos totais, os açúcares redutores compõem o percentual de 27% deles.

O rendimento dos metabólitos extracelulares foi de 14 mg por mL de LM, dos quais foi constatado que somente 0,11 mg/ mL, ou seja, 0,78% representam a porção de carboidratos totais. A porção de açúcares redutores nos ME foi de 0,03 mg/ mL, representando 0,21% do LM (Tabela 2). Tendo em vista que o rendimento de carboidratos de EIP superou em 27% o do EIB e o do MEC superou o do LM em 50%, a precipitação com etanol se mostrou uma metodologia eficaz na obtenção de carboidratos.

Sabendo que o meio de cultivo de *A. platensis* contém alta concentração de sais dissolvidos (aproximadamente 18 g L⁻¹ de bicarbonato e carbonato de sódio) e o rendimento dos ME foi considerado baixo, esta amostra foi dialisada. Desse processo foram gerados os metabólitos extracelulares concentrados (MEC). Estes apresentaram um aumento de 20 % no rendimento de carboidratos totais em comparação aos metabólitos extracelulares. DE JESUS et al. (2019) também isolou polissacarídeos por precipitação com etanol e utilizou a diálise com água destilada em membrana de ultrafiltração para remover sais. Desse modo, a diálise se aparece como um bom método e deve ser considerada para um melhor isolamento de carboidratos presentes no líquido metabólico.

Em geral, a fonte de carbono EIP apresentou a maior concentração de carboidratos, sendo superior em 77% sobre MEC, 82% sobre ME e 88,6% sobre LM. EIB apresentou concentração 84% maior que LM. Tais resultados

evidenciam que os métodos aplicados para obter a porção de carboidratos foram eficientes e puderam elevar os rendimentos das amostras brutas (EIB e LM). Diante disso, fica nítido que a biomassa é mais interessante e rica em carboidratos, apesar disso, o líquido metabólico ainda pode ser vantajoso nesse aspecto.

Já foi observado que as concentrações de polissacarídeos se elevam ao longo do tempo de cultivo e foi possível obter um aumento de concentração de 210 mg L^{-1} após 21 dias de cultivo de *Arthrospira platensis* (TRABELSI et al., 2009). Essa alternativa pode ser vantajosa, mas, além dela, para obtenção de um rendimento mais satisfatório pode-se utilizar um líquido metabólico proveniente de culturas aonde o meio já fora repetidamente reciclado. Isso gera um acúmulo de polissacarídeos, dito que na reciclagem somente a biomassa celular é removida e os polissacarídeos permanecem no LM. Estudos que analisaram a concentração total de carboidratos em cultivos de *Arthrospira platensis*, relataram aumento de 30 a 914 mg L^{-1} em 1 mês em culturas de meio 4x reciclados e de 50 a 180 mg L^{-1} em 6 semanas, naquelas que estavam sendo cultivadas há 1 mês, respectivamente (CUI et al., 2019; DEPRAETERE et al., 2015).

5.2 Solubilidade dos polissacarídeos

A solubilidade de polissacarídeos é um fator relevante e foi testada visando suas aplicações. Polissacarídeos macromoleculares são pouco solúveis em solventes orgânicos, e alguns são relativamente solúveis em água. A temperatura é uma variável que também pode influenciar na solubilidade dos polissacarídeos, como evidenciaram LI et al., 2023 ao analisar a solubilidade dos polissacarídeos extraídos com ultrassom de *Ginkgo biloba* e comprovaram que temperaturas mais altas geram altos valores de rendimentos de solubilidade. De acordo com GUO et al. (2017) o mecanismo químico capaz de modificar a solubilidade dos polissacarídeos seria a modificação dos grupos que alteram a estrutura espacial dos polissacarídeos, fazendo com que suas

moléculas agregadas se estiquem mais, expondo, assim, grupos de hidroxilas mais hidrofílicos.

Os polissacarídeos dos metabólitos extracelulares foram totalmente solúveis em água. Quanto ao extrato intracelular precipitado (EIP), ele apresentou consistência semelhante a pequenos grumos firmes (Figura 4a), os quais foram dissolvidos, resultando em uma amostra com aspecto de grãos de areia. A amostra se mostrou insolúvel inicialmente em vários solventes orgânicos como a água, etanol, metanol, acetona, éter, clorofórmio, diclorometano, n-butanol e DMSO, algo incomum. Logo, foi necessário empregar algum método mecânico que pudesse influenciar na solubilização da amostra em pelo menos um dos solventes para que fosse possível prosseguir com os próximos testes.

A força mecânica exercida pela vibração emitida, cavitação, durante a sonicação gera um grande impacto entre as partículas, enfraquecendo forças moleculares e levando a uma maior interação com o solvente. A ultrassom, além dos efeitos mecânicos, promove elevação da temperatura e esse conjunto contribui para o rompimento celular, aumento da atividade de polissacarídeos e também pode homogeneizá-los no solvente (LI et al., 2023; YIN et al., 2021).

Há evidências de que o extrato de polissacarídeos de *A. platensis* é solúvel em água (RAJASEKAR et al., 2019; SILVA et al., 2018) e de que a temperatura é um fator que pode afetar a solubilidade dos polissacarídeos, onde quanto mais elevada a temperatura, maior a solubilidade (CHAO; RI-FU; TAI-QIU, 2013; GUO et al., 2017). Desse modo, a escolha da água como solvente para realizar a homogeneização através da sonicação da amostra foi ideal e o processo resultou em uma boa solubilização do EIP (Figura 4b). Apesar de as condições utilizadas para solubilizar o EIP neste trabalho terem sido eficientes, o resultado em trabalhos futuros poderá variar a depender do tipo de polissacarídeo, solvente, condições de sonicação e temperatura.

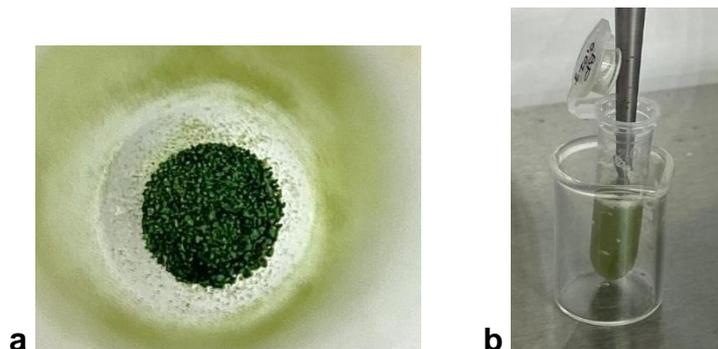


Figura 4. Biomassa sonicada e precipitada (EIP) de *A. platensis* antes (a) e após (b) solubilização em água por sonicação Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Visto que o EIP inicialmente não se solubilizou nos solventes testados o teste de dosagem de açúcares totais foi realizado utilizando água como solvente e, como esperado, apresentou resultado inferior, com concentração de açúcares de 0,17 mg/ mL, ou seja, 0,27 mg/ mL a menos que no EIP solubilizado após a sonicação. Por isso, pode se considerar que o emprego da sonicação nesse processo foi de extrema relevância. Sem uma amostra devidamente homogeneizada não seria possível avaliar adequadamente os níveis de carboidratos nem tampouco o potencial prebiótico.

5.3 Atividade prebiótica

No presente estudo, foi analisado o crescimento *in vitro* das linhagens *E. faecium* 133v, *L. rhamnosus* GG, *E. coli* e *S. aureus* em meios adicionados do extrato obtido de *A. platensis*. Os inóculos das linhagens bacterianas previamente realizados em meio MRS ou LB em diferentes concentrações (1%, 1,5% e 2%) do EIP, inseridas a partir de uma solução a 10% do mesmo (Figura 5) e diluídos em PBS foram espalhados em placas de petri contendo MRSA ou LBA e posteriormente foram quantificadas pelo número total de UFC.



Figura 5. Solução a 10% de polissacarídeos extraídos de *A. platensis*. Fonte: elaborado pelo autor (2023).

O rendimento de polissacarídeos obtido do líquido metabólico, mesmo após as etapas de isolamento, que geraram os ME e MEC, foi baixo. Logo, a massa seca tanto de ME, como de MEC a ser inserida na solução a 10% que seria adicionada aos meios de cultivos das bactérias, foi elevada de maneira que impossibilitou a solubilização no solvente. O fato inviabilizou os ensaios posteriores de inoculação e contagem de UFC das linhagens utilizando esses metabólitos extracelulares.

O que foi proveniente da biomassa (EIB e EIP) apresentou ótimos resultados com alto rendimento de polissacarídeos e baixo rendimento de açúcares redutores, o que a torna interessante no papel de prebiótico, uma vez que os níveis elevados de açúcares redutores podem promover disbiose intestinal, através do crescimento de patógenos, enquanto dietas ricas em carboidratos complexos promovem o aumento de bacteroidetes e bactérias benéficas como *B. longum* e reduzem enterobactérias (BROWN et al., 2012).

O crescimento de *E. faecium* 133v (Figura 6a) e *L. rhamnosus* GG (Figura 6b) e em *E. coli* (Figura 7a) e *S. aureus* (Figura 7b) foi representado em gráficos em milhões de Log₁₀ UFC/ mL.

Todas as cepas cresceram nos meios isentos de carboidratos. Quanto aos demais meios contendo carboidratos, *E. faecium* 133v foi estimulada por todos em 24 h e nas 48 h também, com exceção do meio com 1,5 % glicose que se manteve similar ao controle isento. Não houve inibição em

nenhum dos testes. *L. rhamnosus* GG até 24h foi estimulada por todos os meios, exceto pelos adicionados de EIP. Após 48 h, a cepa foi estimulada por todos os carboidratos, principalmente por EIP. Não houve inibição de crescimento. *E. coli* foi estimulada por todas as concentrações do EIP, 1,5 e 2 % de glicose e 2 % FOS após 24h de incubação. Ao atingir 48h, o microrganismo foi estimulado pelas mesmas concentrações dos carboidratos anteriores, com exceção de 1 % glicose e 1% FOS. Em geral, FOS em menores concentrações e 1 % glicose provocaram inibição ou efeito similar ao controle na cepa. Foi observado que quanto maior a concentração de carboidratos, maior o crescimento. *S. aureus* da mesma maneira, nas 24h foi estimulada por todas as concentrações de EIP, como também por 2 % de glicose e 1 e 2 % FOS. Mas, vale salientar que essas fontes não provocaram estímulo demasiado, não superando o controle em mais de 22 % de UFC/ ml. As concentrações de 1-1,5 % glicose e 1,5 % FOS demonstraram inibição da cepa. Após 48h, somente 2 % FOS e 2 % EIP estimularam o microrganismo. Porém, a quantidade de UFC/ ml na concentração 2 % EIP ($5,2 \times 10^9$ UFC/ ml) foi muito próxima à dos testes isentos de fonte de carbono, no caso $5,0 \times 10^9$ UFC/ ml. Isso significa que 2 % EIP não necessariamente estimulou a cepa. Quanto aos demais ensaios, todos inibiram *S. aureus*.

LE BOURGOT et al. (2022) estudaram os efeitos de FOS de cadeia curta em bactérias selecionadas da pele e seus resultados demonstraram impacto negativo no crescimento de *S. aureus* em 24 h em concentrações entre 0,5 e 15 % de FOS. Aqui neste estudo, até as 24h somente a concentração de 1,5 % FOS teve esse efeito, já as demais 1 % e 2 % FOS cresceram 16 % e 11 % UFC/ ml a mais que o controle, respectivamente. A inibição do crescimento, neste caso ocorreu de forma mais lenta, somente após as 48 h de incubação.

Nas primeiras 24h, 2 e 1,5 % EIP favoreceram mais o crescimento de *E. faecium* 133v, atingindo até $3,5 \times 10^9$ UFC/ ml em 2 % EIP. Já *L. rhamnosus* GG preferiu nesse momento 1 e 2 % de glicose, chegando a $1,7 \times 10^9$ UFC/ ml na concentração de 1%. Após 48h, *E. faecium* 133v apresentou maiores crescimentos em meios com 1 e 1,5 % EIP, respectivamente, onde a maior concentração de células foi de $5,3 \times 10^{10}$ UFC/ ml em 1% EIP. *L. rhamnosus*

GG apresentou maior crescimento em 1,5 e 2 % EIP, com a maior concentração celular de $1,7 \times 10^{10}$ UFC/ ml em 1,5 % EIP. Esses resultados demonstram que o EIP de *A. platensis* influenciou positivamente nos crescimentos de *E. faecium* 133v e *L. rhamnosus* GG, superando, inclusive, o prebiótico padrão FOS ao final dos cultivos. Onde, *E. faecium* 133v em meios adicionados de FOS teve seu crescimento máximo de $1,2 \times 10^{10}$ UFC/ ml na concentração de 2 % e *L. rhamnosus* GG cresceu mais na concentração de 1,5 % FOS atingindo $6,6 \times 10^9$ UFC/ ml.

A cepa *E. coli* nas primeiras 24h de cultivo apresentou crescimentos mais altos nos meios contendo 2 % EIP, atingindo $9,3 \times 10^9$ UFC/ ml e 1,5 % de glicose. O maior crescimento de *S. aureus* foi em 2 % EIP, com $1,6 \times 10^9$ UFC/ ml, seguido por 2 % de glicose e 1 % FOS, onde estes dois últimos mencionados promoveram crescimentos muito similares de aproximadamente $1,5 \times 10^9$ UFC/ ml. Após as 48 h de cultivo os mais altos crescimentos celulares de *E. coli* foram em meios com 2 e 1,5 % EIP, atingindo os $1,1 \times 10^{10}$ UFC/ ml na concentração de 2%. Quanto a *S. aureus*, cresceu mais em meios com 2 % FOS, atingindo os $7,3 \times 10^9$ UFC/ ml seguido por 2 % EIP. Esses dados mostram que as concentrações mais elevadas testadas de EIP e FOS podem promover crescimento de *E. coli* e *S. aureus*.

Os resultados demonstram que a adição de fonte de carbono pode estimular o crescimento das bactérias testadas e que pode haver variações entre as cepas a depender da fonte de carbono, concentração e o tempo que o microrganismo leva para metabolizá-la.

Nesse estudo, o estímulo significativo de EIP às bactérias benéficas foi comprovado, então EIP pode ser considerado um extrato com potencial prebiótico. Mas, o crescimento de patógenos no meio com EIP e, inclusive, com o próprio FOS chama atenção e exige estudos futuros de preferência *in vivo* para analisar o comportamento diante de uma microbiota. O fato de um prebiótico tipicamente estimular a proliferação de bactérias probióticas e, dessa forma, diminuir a população de bactérias patógenas impõe uma ideia de que bactérias patógenas não metabolizam, por exemplo, o FOS. Corroborando com os resultados aqui obtidos, o estudo de SCHOULER et al. (2009) evidenciou uma ilha genômica de uma *E. coli* patogênica que a permite metabolizar FOS,

possibilitando que ela colonize o intestino. O contrário do efeito tipicamente esperado para a ingestão de FOS também ocorreu em estudos com ratos, onde foi registrada a multiplicação, colonização no intestino e a capacidade de perfurar a mucosa intestinal e chegar a *sites* extra intestinais (translocação) de *Salmonella* (TEN BRUGGENCATE et al., 2003). MAO et al., (2015) investigaram a fermentação *in vitro* de FOS por bactérias comensais e descobriram algumas delas capazes de metabolizar FOS, entre elas a *E. coli*, e concluiu que essa capacidade é específica de cada cepa. Entretanto, apesar de cepas patógenas conseguirem colonizar o intestino, a virulência depende fortemente da microbiota (FABER et al., 2012; PORCHERON et al., 2012).

Todas essas evidências e os resultados obtidos neste estudo indicam que o EIP é composto por carboidratos como o FOS, metabolizáveis também pelas cepas patógenas testadas, observando que *E. coli* se proliferou bem em todas as fontes de carbono, principalmente em concentrações mais elevadas, e beneficiou mais em 2 % EIP, enquanto a *S. aureus* foi estimulada somente por 2 % FOS e por 2 % EIP, ainda que discretamente.

Apesar de EIP ou FOS terem colaborado também com a proliferação dos patógenos *E. coli* e *S. aureus*, *L. rhamnosus* GG e *E. faecium* 133v se proliferaram em maior número. Essas bactérias “do bem”, além de conseguirem crescer em maior número ao consumirem o EIP, ainda possuem atividade antimicrobiana (BAHY et al., 2023; ZHU et al., 2021), antiaderente e antibiofilme contra certos patógenos. SOLTANI et al. (2022) estudaram a atividade antibiofilme e antimicrobiana de lactobacilos contra *E. coli* de mulheres com infecção do trato urinário e obtiveram resultados positivos. BAHY et al., (2023) detectaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* e antivírus contra SARS-CoV-2 de uma substância semelhante a uma bacteriocina proveniente de *Enterococcus faecium*. PATEL et al. (2021) também registraram atividade antiaderente de um biossurfactante glicolípido de *L. rhamnosus* contra biofilmes de *S. aureus*.

A

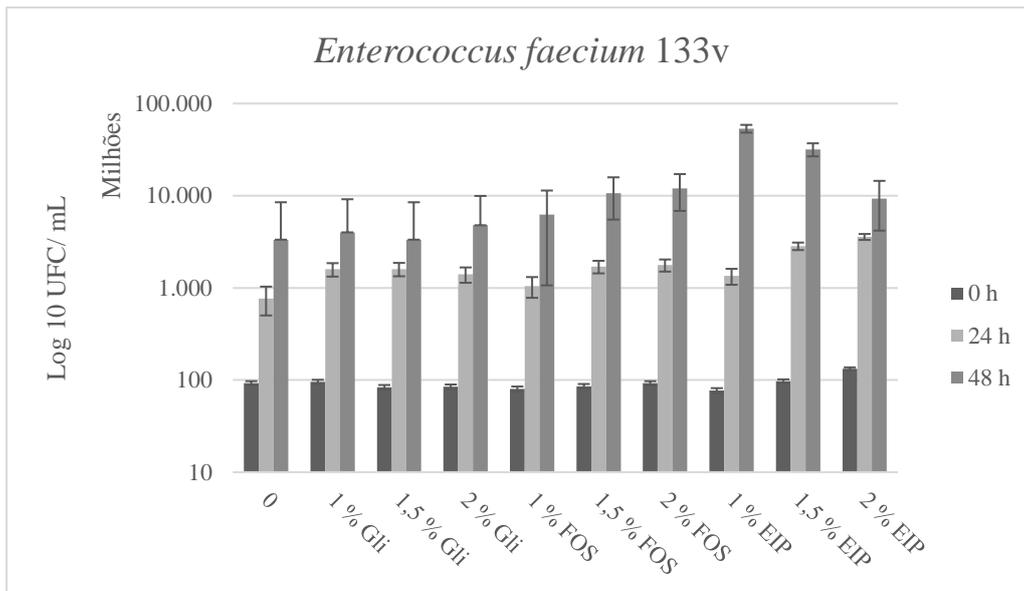
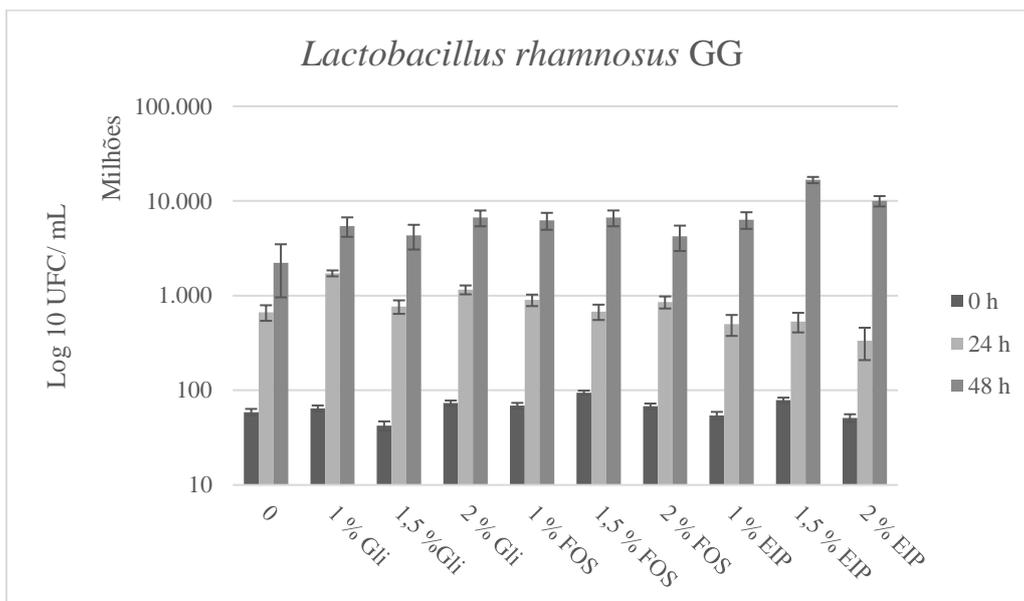
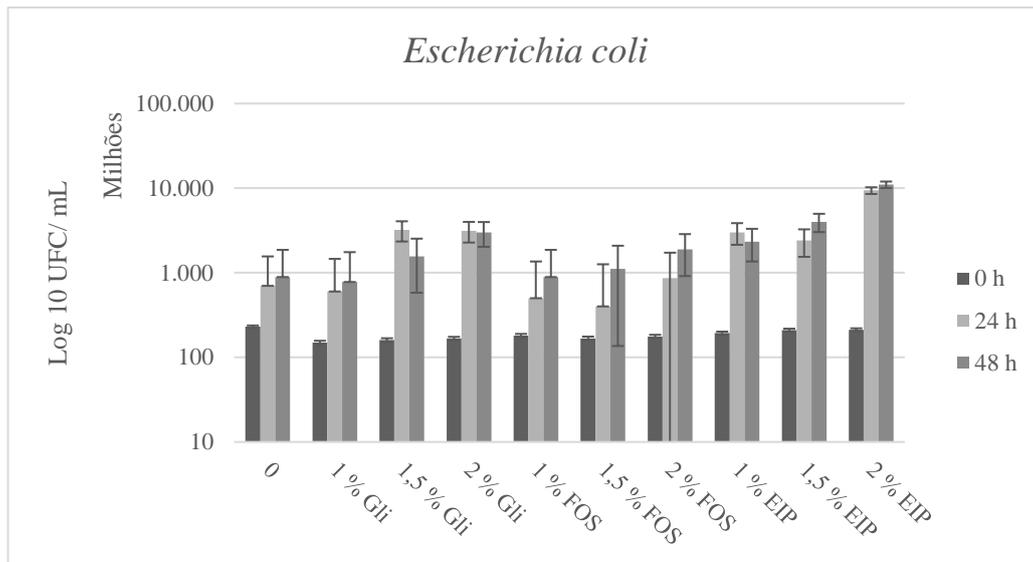
**B**

Figura 6. Crescimento de *Enterococcus faecium* 133v (A) e *Lactobacillus rhamnosus* GG (B) e em meio MRS sem glicose (0 %); MRS com glicose (Gli); MRS sem glicose e acrescido de FOS e MRS sem glicose e acrescido do extrato intracelular precipitado de *Arthrospira platensis* (EIP) nas concentrações de 1 %, 1.5 % e 2 %, nos tempos de 0, 24 e 48 horas.

A



B

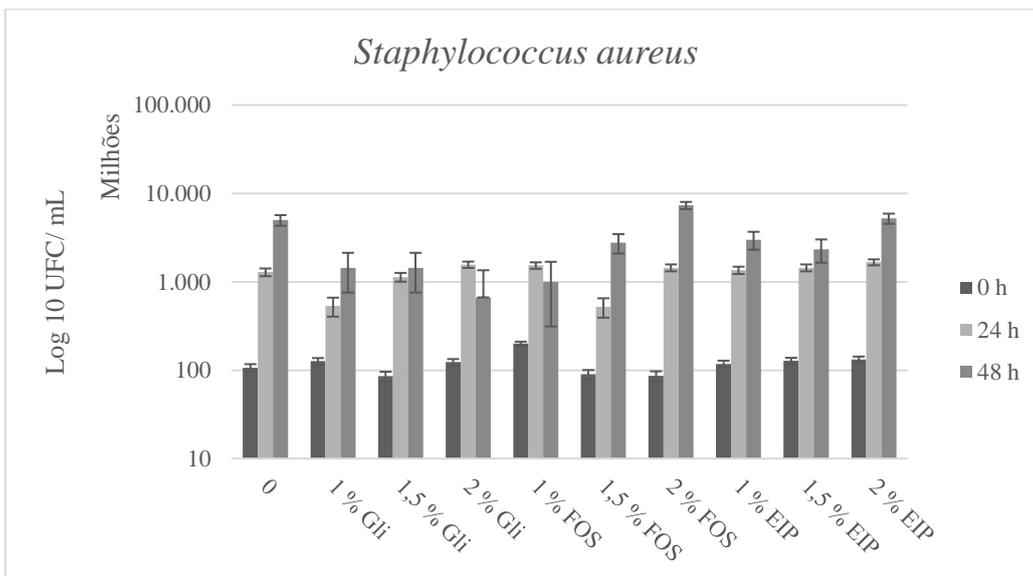


Figura 7. Crescimento de *Escherichia coli* (A) e *Staphylococcus aureus* (B) em meio LB sem glicose (0 %); LB com glicose (Gli); MRS sem glicose e acrescido de FOS e LB sem glicose e acrescido do extrato intracelular precipitado de *Arthrospira platensis* (EIP) nas concentrações de 1 %, 1.5 % e 2 %, nos tempos de 0, 24 e 48 horas.

5.4 Análise estatística

Análises de variância de um fator (Tabela 5) foram preparadas nas condições de tempo de cultivo versus fontes de carbono a 1%, 1,5 % e 2 %, ou isento (controle, 0%) separadamente para cada microrganismo. Assim, foi possível diagnosticar se, estatisticamente, houve diferenças significativas entre as médias dos tratamentos e quais deles promoveram maior multiplicação celular. ANOVA de *E. faecium* 133v (Tabela 5a), *L. rhamnosus* GG (Tabela 5b) e em *E. coli* (Tabela 5c) e *S. aureus* (Tabela 5d).

Em geral, de 24 a 48 h as diferentes condições apresentaram valores que não se sobrepõem, demonstrando que tiveram efeitos significativos. A condição que mais favoreceu *E. faecium* 133v nas 24 h foi de 2% EIP e nas 48 h de 1% EIP. Para *L. rhamnosus* GG nas 24h foi de 1% glicose e nas 48h de 1,5% EIP. Para *E. coli* nas 24 ou 48 h foi de 2% EIP. Para *S. aureus* nas 24 h foi 2% EIP e nas 48 h foi 2% FOS.

A ANOVA de *E. faecium* 133v em 24 h mostrou que todas as concentrações das fontes de carbono testadas tiveram influência significativa no crescimento da cepa, superando o controle (0% de carboidratos). As concentrações 1 % FOS, 1,5 e 2 % EIP diferiram estatisticamente, enquanto 1, 1,5 e 2 % de glicose e 1 % EIP não diferiram entre si e 1 e 1,5 % de glicose e 1,5 e 2 % FOS também não. Após 48 h de fermentação, os ensaios controle e com glicose não diferiram significativamente entre si. Nesse momento, pode-se dizer que a presença de glicose foi irrelevante, com exceção somente da concentração de 2 % de glicose, que se sobressaiu um pouco e representou nível de significância semelhante ao 1% FOS. 1,5 e 2 % FOS e 2 % EIP não diferiram estatisticamente entre si. O mesmo não aconteceu com 1 e 1,5 % EIP, os quais diferiram dos demais ensaios.

Nas primeiras 24 h as concentrações 1 e 2 % glicose diferiram significativamente dos demais ensaios e foram destaque para *L. rhamnosus* GG. Nenhuma das concentrações do EIP diferiu entre si e não influenciaram positivamente no crescimento da cepa nesse momento. Enquanto 1,5 % glicose e 1,5 e 2 % FOS não diferiram significativamente entre si e nem do teste controle. As concentrações de FOS não divergiram entre si, nem de 1,5 % glicose. Após as 48h de incubação todas as fontes de carbono influenciaram positivamente no crescimento da cepa, ficando acima do ensaio controle. Além

do controle, apenas 1,5 e 2 % EIP divergiram significativamente entre si e dos demais. 1 e 1,5 % glicose e 2 % FOS tiveram influência similar, ou seja, não foram estatisticamente diferentes uns dos outros. O mesmo ocorreu com o conjunto formado por: 2 % glicose, 1 e 1,5 % FOS e 1 % EIP.

Nos ensaios com *E. coli* em 24 h, 1% glicose e 1 e 1,5 % FOS além de não demonstrarem diferença significativa entre si estatisticamente, não demonstraram influência significativa no crescimento. Ensaios com 1 % glicose e 1 e 2 % FOS tiveram resultados que se sobrepuseram, inclusive, ao controle, logo essas concentrações desses carboidratos tiveram influência significativa no crescimento da cepa. Ensaios de 1,5 % glicose apresentaram resultado superior ao controle, mas, em parte, similar a 1 % EIP. Os ensaios nas concentrações 1,5 e 2 % tanto de glicose como de EIP foram significativamente diferentes tanto entre si, como entre os demais ensaios. Nas 48h, controle, 1% glicose, 1 e 1,5% FOS não diferiram significativamente entre si. Desse modo, todos os outros ensaios tiveram influência positiva no crescimento da cepa. 1,5 % glicose e 2% FOS não diferiram entre si. Todos os testes EIP foram significativamente diferentes entre si e entre os demais ensaios, bem como ocorreu com o teste 2% glicose.

Com relação a *S. aureus*, após as 24 h, as concentrações 1 e 1,5 % glicose e 1,5 % FOS não estimularam o crescimento do microrganismo. 1% EIP teve resultados superiores ao controle, mas muito similares, não significativamente divergentes na maior parte. Ensaios 2 % glicose, 1 e 2 % FOS e 1 e 1,5 % EIP estimularam o crescimento e tiveram efeitos similares entre si, não se diferenciando estatisticamente. 2 % glicose, 1 % FOS e 2 % EIP foram os que mais estimularam crescimento e não se diferenciaram entre si. Após 48 h, com exceção do controle, 2 % FOS e 2 % EIP, nenhuma das demais concentrações das fontes de carbono estudadas demonstraram estímulo ao crescimento da cepa. O resultado de 2 % EIP foi superior ao do controle, porém se sobrepôs a ele em mais de 95 %. Diante disso, pode-se afirmar que o 2 % EIP não estimulou a cepa de maneira considerável, diferentemente do 2 % FOS que estimulou mais que todos os outros testes.

Tabela 5. Análise de variância de um fator (ANOVA) para crescimento de *Enterococcus faecium* 133v (a), *Lactobacillus rhamnosus* GG (b), *Escherichia coli* (c) e *Staphylococcus aureus* (d) de 0h, 24h e 48 h em diferentes concentrações e fontes de carbono. DP = desvio padrão; FOS= frutoligossacarídeo; EIP= extrato intracelular precipitado de *Arthrospira platensis*. Dados foram apresentados como intervalos de confiança (95%) (n= 3). Letras diferentes no mesmo ensaio de tempo representam diferenças significantes entre os grupos no nível de significância de 0.05 ($p < 0.05$).

a

<i>Enterococcus faecium</i> 133v						
Grupos	0 h	24 h		48 h		DP
		DP	DP	DP	DP	
Controle (0 %)	24,44; 30,90 ^a	1,12	19,20; 26,80 ^a	2,65	7,61; 12,39 ^a	1,73
1 % Glicose	25,44; 31,90 ^a	2,89	43,87; 51,46 ^{cd}	1,12	9,61; 14,39 ^a	1,73
1,5 % Glicose	21,77; 28,23 ^a	3,46	44,20; 51,80 ^{cd}	3,46	7,61; 12,39 ^a	1,73
2 % Glicose	22,10; 28,56 ^a	2,89	38,20; 45,80 ^c	4,36	11,94; 16,72 ^{ab}	2,89
1 % FOS	20,77; 27,23 ^a	3,46	27,54; 35,13 ^b	1,12	16,28; 21,06 ^b	2,31
1,5 % FOS	22,44; 28,90 ^a	2,31	47,20; 54,80 ^d	1,73	29,61; 34,39 ^c	0,00
2 % FOS	24,44; 30,90 ^a	2,89	49,20; 56,80 ^d	3,61	33,61; 38,39 ^{cd}	0,00
1 % EIP	19,77; 26,23 ^a	3,46	36,54; 44,13 ^c	4,62	158,28; 163,06 ^f	0,58
1,5 % EIP	25,77; 32,23 ^a	1,73	81,20; 88,80 ^e	0,00	93,28; 98,06 ^e	4,04
2 % EIP	36,44; 42,90 ^b	1,12	103,54; 111,13 ^f	4,62	25,61; 30,39 ^c	0,00

b

<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG						
Grupos	0 h	24 h		48 h		DP
		DP	DP	DP	DP	
Controle (0 %)	14,95; 20,39 ^{ab}	2,89	16,83; 23,17 ^b	0,00	4,54; 8,80 ^a	0,58
1 % Glicose	16,61; 22,05 ^b	3,21	48,50; 54,84 ^e	3,51	14,20; 18,47 ^b	1,53

1,5 % Glicose	9,95; 15,39 ^a	3,79	19,83; 26,17 ^{bc}	0,00	10,87; 15,13 ^b	0,00
2 % Glicose	19,28; 24,72 ^b	0,00	31,50; 37,84 ^d	1,53	17,87; 22,13 ^c	3,46
1 % FOS	17,95; 23,39 ^b	2,08	23,83; 30,17 ^c	3,46	16,53; 20,80 ^c	2,89
1,5 % FOS	25,61; 31,05 ^c	1,16	17,16; 23,50 ^{bc}	4,73	17,87; 22,13 ^c	0,00
2 % FOS	17,61; 23,05 ^b	1,16	22,50; 28,84 ^{bc}	4,16	10,53; 14,80 ^b	2,89
1 % EIP	13,61; 19,05 ^{ab}	1,53	11,83; 18,17 ^a	0,00	16,87; 21,13 ^c	0,00
1,5 % EIP	20,95; 26,39 ^{bc}	2,89	12,83; 19,17 ^a	1,73	47,87; 52,13 ^e	0,00
2 % EIP	12,61; 18,05 ^{ab}	0,58	6,83; 13,17 ^a	0,00	27,87; 32,13 ^d	0,00

c

<i>Escherichia coli</i>						
Grupos	0 h		24 h		48 h	
		DP		DP		DP
Controle (0 %)	65,97; 72,03 ^c	3,46	17,90; 24,10 ^b	1,73	1,91; 3,43 ^a	0,58
1 % Glicose	41,64; 47,70 ^a	2,89	14,90; 21,10 ^{ab}	1,73	1,57; 3,10 ^a	1,16
1,5 % Glicose	44,97; 51,03 ^{ab}	0,00	92,90; 99,10 ^{df}	0,00	3,91; 5,43 ^b	0,58
2 % Glicose	46,97; 53,03 ^{ab}	3,46	90,90; 97,10 ^{de}	0,00	8,24; 9,76 ^d	0,00
1 % FOS	51,30; 57,36 ^b	2,31	11,90; 18,10 ^{ab}	3,46	1,91; 3,43 ^a	0,58
1,5 % FOS	47,30; 53,36 ^{ab}	2,31	8,90; 15,10 ^a	0,00	2,57; 4,10 ^a	0,58
2 % FOS	49,97; 56,03 ^b	0,00	22,90; 29,10 ^b	3,61	4,91; 6,43 ^b	1,16
1 % EIP	54,97; 61,03 ^{bc}	3,46	86,90; 93,10 ^d	0,00	6,24; 7,76 ^c	0,00
1,5 % EIP	59,97; 66,03 ^c	0,00	68,90; 75,10 ^c	5,20	11,24; 12,76 ^e	0,00
2 % EIP	60,64; 66,70 ^c	2,89	278,56; 284,77 ^g	2,89	32,24; 33,76 ^f	0,00

d

<i>Staphylococcus aureus</i>						
Grupos	0 h		24 h		48 h	
		DP		DP		DP

Controle (0 %)	29,94; 34,06 ^b	3,46	36,63; 40,71 ^d	1,16	13,66; 16,34 ^f	0,00
1 % Glicose	35,94; 40,06 ^c	1,73	13,96; 18,04 ^{ab}	1,73	3,00; 5,67 ^a	0,58
1,5 % Glicose	23,60; 27,73 ^a	2,31	31,96; 36,04 ^c	0,00	3,00; 5,67 ^a	1,16
2 % Glicose	34,94; 39,06 ^c	0,00	44,96; 49,04 ^{ef}	0,00	0,66; 3,34 ^a	0,00
1 % FOS	57,94; 62,06 ^f	0,00	43,96; 48,04 ^{ef}	0,00	1,66; 4,34 ^{ab}	0,00
1,5 % FOS	24,94; 29,06 ^{ac}	1,73	13,63; 17,71 ^a	3,79	7,00; 9,67 ^{cd}	2,31
2 % FOS	23,94; 28,06 ^{ab}	0,00	41,29; 45,37 ^e	0,58	20,66; 23,34 ^h	0,00
1 % EIP	33,27; 37,40 ^b	0,58	38,63 42,71 ^{de}	0,00	7,66; 10,34 ^{ce}	2,00
1,5 % EIP	36,27; 40,40 ^{cd}	0,58	41,29; 45,37 ^e	2,89	5,66; 8,34 ^c	0,00
2 % EIP	37,60; 41,73 ^{ce}	2,31	47,96; 52,04 ^f	0,00	14,33; 17,00 ^{fg}	1,16

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biomassa de *A. platensis* é fonte rica em polissacarídeos de potencial prebiótico, que foram satisfatoriamente extraídos, com rendimentos superiores aos da literatura, utilizando o método de ultrassom seguido por precipitação com etanol. No líquido metabólico foram encontradas baixas quantidades de carboidratos e, inviabilizando os testes de potencial prebiótico, mas sua riqueza em outros metabólitos extracelulares, já explorada no cultivo de bactérias, pode ser aproveitada na reciclagem do meio de cultivo da própria *A. platensis* por diversas vezes. Dessa maneira, será possível acumular quantidades suficientes de carboidratos extracelulares para prosseguir com os ensaios prebióticos.

A faixa de concentração de EIP que mais beneficiou as linhagens benéficas à saúde e menos favoreceu patógenos foi entre 1% e 1,5%. Portanto, pode-se considerar o extrato intracelular precipitado de *A. platensis* como um potente prebiótico, pois estimulou em grandes proporções as cepas de *L. rhamnosus* GG e *E. faecium* 133v. Estudos futuros seriam interessantes

para analisar os efeitos do EIP *in vivo* em meio a uma microbiota, já que *in vitro* cepas patogênicas também foram estimuladas e isso deve ser evitado.

7. REFERÊNCIAS

- AI, X. et al. Polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction methods, structural features and bioactivities diversity. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2023. Available at: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123211>>. Accessed on: 23 ago. 2023
- AL KASSAA, I. et al. Antiviral Potential of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 1 dez. 2014. Available at: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24880436/>>. Accessed on: 25 ago. 2023
- BAGCI, U. et al. Probiotic characteristics of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from human milk and colostrum. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 6, p. 735–750, 1 nov. 2019.
- BELAY, M. E. G. & A. **Spirulina in Human Nutrition and Health**. [s.l.] CRC Press, 2007.
- BENELHADJ, S. et al. Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1056–1063, 2016.
- BHOWMIK, D.; DUBEY, J.; MEHRA, S. Probiotic Efficiency of *Spirulina platensis*-Stimulating Growth of Lactic Acid Bacteria. **World Journal of Dairy & Food Sciences**. [s.l.: s.n.].
- BRITO, L. P. DE et al. Can postbiotics show antiviral effects against Sars-CoV-2? **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e14610817259, 2021.
- BROWN, K. et al. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. **Nutrients**, 2012. Available at: <<https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez16.periodicos.capes.gov.br/23016134/>>. Accessed on: 21 ago. 2023
- CAI, B. et al. Structural characterization of oligosaccharide from *Spirulina platensis* and its effect on the faecal microbiota in vitro. **Food Science and Human Wellness**, v. 11, n. 1, p. 109–118, 1 jan. 2022.
- CALAÇA, P. R. DE A. et al. *Enterococcus faecium* 137v as a protective factor in an animal model for colorectal cancer. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e9110615354, 21 may 2021.
- CARBALLO, C. et al. Yeast β -glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 92, p. 31–39, 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Antibiotic resistance threats in the United States 2019. **Cdc**, p. 148, 2019.

CHAO, Z.; RI-FU, Y.; TAI-QIU, Q. Ultrasound-enhanced subcritical water extraction of polysaccharides from *Lycium barbarum* L. **Separation and Purification Technology**, v. 120, p. 141–147, 2013.

CHEN, Z. et al. A mutant of seawater *Arthrospira platensis* with high polysaccharides production induced by space environment and its application potential. **Algal Research**, v. 61, p. 102562, 1 jan. 2022.

COELHO, D. et al. A two-enzyme constituted mixture to improve the degradation of *Arthrospira platensis* microalga cell wall for monogastric diets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, n. 1, p. 310–321, 1 jan. 2020.

COMAN, V.; VODNAR, D. C. Gut microbiota and old age: Modulating factors and interventions for healthy longevity. **Experimental Gerontology**, 2020. Available at: <<https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111095>>. Accessed on: 23 feb. 2024

CUI, H. et al. Combination of utilization of CO₂ from flue gas of biomass power plant and medium recycling to enhance cost-effective *Spirulina* production. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 4, p. 2175–2185, 2019.

DE MEDEIROS, V. P. B. et al. Freshwater microalgae biomasses exert a prebiotic effect on human colonic microbiota. **Algal Research**, v. 60, 2021.

DEPRAETERE, O. et al. Influence of culture medium recycling on the performance of *Arthrospira platensis* cultures. **Algal Research**, v. 10, p. 48–54, 2015.

DUARTE, F. N. D. et al. Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on Lactobacillus species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 11, p. 3712–3719, 1 ago. 2017.

FAO/WHO. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. **Food and Nutrition Paper**, v. 85, p. 71, 2001.

FERREIRA-SANTOS, P. et al. Influence of thermal and electrical effects of ohmic heating on C-phycoerythrin properties and biocompounds recovery from *Spirulina platensis*. **LWT**, v. 128, 2020.

FOGG, G. E. The extracellular products of algae. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, v. 4, p. 197–212, 1966.

GHATTARGI, V. C. et al. Comparative genome analysis reveals key genetic factors associated with probiotic property in *Enterococcus faecium* strains. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 1–16, 4 sep. 2018.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**. 2003. Available at: <www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro>. Accessed on: 24 ago. 2023

GIRAFFA, G. *Enterococcus*. In: **Encyclopedia of Food Microbiology: Second**

Edition. [s.l.] Academic Press, 2014. p. 674–679.

GOUDA, M. et al. Microalgae Bioactive Carbohydrates as a Novel Sustainable and Eco-Friendly Source of Prebiotics: Emerging Health Functionality and Recent Technologies for Extraction and Detection. **Frontiers in Nutrition**, 2022. Available at: <www.frontiersin.org>

GUO, M. Q. et al. Polysaccharides: Structure and Solubility. In: **Solubility of Polysaccharides**. [s.l.] InTech, 2017.

HU, J. et al. Dose Effects of Orally Administered Spirulina Suspension on Colonic Microbiota in Healthy Mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 5 jul. 2019.

HUMPHREYS, C. Intestinal Permeability. **Textbook of Natural Medicine (fifth edition)**, n. 19, p. 166–177, 2020.

HYRSLOVA, I. et al. Functional properties of *Chlorella vulgaris*, colostrum, and bifidobacteria, and their potential for application in functional foods. **Applied Sciences**, Switzerland, v. 11, n. 11, 2021.

JENKINS, G.; MASON, P. The Role of Prebiotics and Probiotics in Human Health: A Systematic Review with a Focus on Gut and Immune Health. **Food & Nutrition Journal**, v. 7, n. 1, p. 245, 2022.

KAVITAKE, D. et al. Exopolysaccharides produced by *Enterococcus* genus — An overview. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2023. Available at: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.042>>. Accessed on: 25 mar. 2024

KOLIADA, A. et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, 22 may 2017.

KURD, F.; SAMAVATI, V. Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction and in vitro anti-cancer activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 498–506, 1 mar. 2015.

LEAL, B. E. S. et al. Potential prebiotic oligosaccharides from aqueous thermopressurized phosphoric acid hydrolysates of microalgae used in treatment of gaseous steakhouse waste. **Algal Research**, v. 24, p. 138–147, 1 jun. 2017.

LI, J. et al. Ultrasound-assisted extraction and properties of polysaccharide from Ginkgo biloba leaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 93, p. 106295, 1 feb. 2023.

LIU, J. et al. Prebiotic effects of diet supplemented with the cultivated red seaweed *Chondrus crispus* or with fructo-oligo-saccharide on host immunity, colonic microbiota and gut microbial metabolites. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, 14 ago. 2015.

LIU, L. et al. Isolation and characterization of bacteria that produce quorum sensing molecules during the fermentation and deterioration of pickles. **International Journal of Food Microbiology**, v. 379, p. 109869, 2022a.

- LIU, L. et al. Effects of *Lactobacillus pentosus* combined with *Arthrospira platensis* on the growth performance, immune response, and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 120, p. 345–352, 2022b.
- LIU, L.; POHNERT, G.; WEI, D. Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. **Marine Drugs**, 2016. Available at: <www.mdpi.com/journal/marinedrugs>. Accessed on: 24 ago. 2023
- LJUBIC, A. et al. Biomass composition of *Arthrospira platensis* during cultivation on industrial process water and harvesting. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 2, p. 943–954, 2018.
- MAHENDRAN, M. S. et al. Antiviral properties of microalgae and cyanobacteria. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 9, n. Specialissue 1, p. S43–S48, 2021.
- MOHAN, A. et al. Effect of honey in improving the gut microbial balance. **Food Quality and Safety**, v. 2017, n. 2, p. 107–115, 2017.
- NO, G. R. N. GRAS Notices. **U.S.FOOD & DRUG**, n. 553, p. 4–5, 2015.
- PARADA, J. L. et al. Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 225–228, 22 dec. 1998.
- PARIKH, M. et al. Dietary Flaxseed as a Strategy for Improving Human Health. **Nutrients**, v. 11, n. 5, 1 may 2019.
- QU, C. et al. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from *Ziziphus jujuba* Mill. By response surface methodology. **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 1, 23 sep. 2013.
- RAFTER, J. et al. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 2, p. 488–496, 1 feb. 2007.
- RAJASEKAR, P. et al. Isolation and structural characterization of sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis* and its bioactive potential: In vitro antioxidant, antibacterial activity and Zebrafish growth and reproductive performance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 809–821, 1 dec. 2019.
- RAJENDRAN, V. M.; SCHULZKE, J. D.; SEIDLER, U. E. Ion Channels of the Gastrointestinal Epithelial Cells. In: **Physiology of the Gastrointestinal Tract, Sixth Edition**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 2p. 1363–1404.
- RAPOSO, M. F. D. J.; DE MORAIS, A. M. M. B. **Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke** **Life Sciences**, 2015. Available at: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.09.018>>. Accessed on: 23 ago. 2023
- RATSIKA, A. et al. Priming for life: Early life nutrition and the microbiota-gut-brain axis. **Nutrients**, 28 jan. 2021. Available at: <<https://www.mdpi.com/2072-6643/13/2/423/htm>>. Accessed on: 22 feb. 2024
- RICIGLIANO, V. A. et al. Honey Bee Proteome Responses to Plant and

Cyanobacteria (blue-green algae) Diets. **ACS Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 17–26, 19 feb. 2021.

RINNINELLA, E. et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 14, 2019.

SANTOS, D. D. S. et al. What Differentiates Probiotic from Pathogenic Bacteria? The Genetic Mobility of *Enterococcus faecium* Offers New Molecular Insights. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 24, n. 12, p. 706–713, 1 dec. 2020.

SHIN, N. R.; WHON, T. W.; BAE, J. W. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in Biotechnology**, 2015. Available at: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>>. Accessed on: 19 mar. 2024

SIDDIQI, K. Non-communicable diseases. In: **Public Health: An action guide to improving health**. [s.l.: s.n.].

SILVA, A. DE S. E. et al. Microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Arthrospira (Spirulina) platensis* using the concept of green chemistry. **Algal Research**, v. 35, p. 178–184, 2018.

SILVA, E. C. DA et al. Alternative media consisting of by-product of the cultivation of photosynthetic microorganisms for the growth of *Lactobacillus acidophilus* and production of β -Galactosidase. **Journal of Agribusiness and Environment**, v. 13, n. 3, p. 1113–1127, 2020.

SILVA, E. C. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: optimization of production in whey, partial characterization and evaluation of antioxidant potential in vitro. **Medicine**, p. 86, 2021.

SOLTANI, N. et al. Antibacterial and antibiofilm activity of *Lactobacillus* strains secretome and extraction against *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection. **Biotechnology Reports**, v. 36, p. e00760, 1 dez. 2022.

SWAMINATHAN, S.; SHAH, S. V. Catalytic (labile) iron in kidney disease. In: **Nutritional Management of Renal Disease, Fourth Edition**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 107–119.

TORRES-TIJI, Y.; FIELDS, F. J.; MAYFIELD, S. P. Microalgae as a future food source. **Biotechnology advances**, v. 41, 1 jul. 2020.

TRABELSI, L. et al. Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 1, p. 27–31, 2009.

TROMPETTE, A. et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. **Nature Medicine**, v. 20, n. 2, p. 159–166, fev. 2014.

VELIKOVA, T. et al. Lactobacilli supplemented with larch arabinogalactan and colostrum stimulates an immune response towards peripheral NK activation and gut tolerance. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1–11, 2020.

VINDEROLA, G.; SANDERS, M. E.; SALMINEN, S. The Concept of Postbiotics.

Foods, 1 Apr 2022. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3927423/>. Accessed on: 25 ago. 2023

WALKER, A. W. et al. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. **BMC Microbiology**, v. 11, 2011.

WANG, B. et al. Extraction of Polysaccharide from *Spirulina* and Evaluation of Its Activities. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2018.

WU, Y. et al. Pretreatment with probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 ameliorates necrotic enteritis-induced intestinal barrier injury in broiler chickens. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

YANG, J. et al. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 159–165, 2011.

YIN, D. et al. Structural properties and antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Laminaria japonica* using various methods. **Process Biochemistry**, v. 111, p. 201–209, 2021.

ZMORA, N.; SUEZ, J.; ELINAV, E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, 27 Sep. 2019. Available at: <https://www-nature.ez16.periodicos.capes.gov.br/articles/s41575-018-0061-2>. Accessed on: 20 mar. 2024.

8. APÊNDICES

Fluxograma 1. Obtenção dos metabólitos provenientes do cultivo de *A. platensis*. EIB= extrato intracelular bruto; EIP= extrato intracelular precipitado; LM= líquido metabólico; ME= metabólitos extracelulares; MEC= metabólitos extracelulares concentrados.

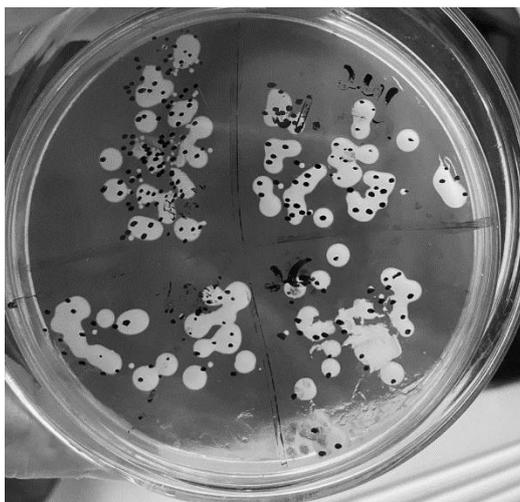


Figura 8. Produção de exopolissacarídeos por *E. faecium* 133v em caldo de Man Rogosa and Sharpe ágar.