



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

**EFEITOS DA β -GLUCANA DE LEVEDURA ISOLADA E EM COMBINAÇÃO
COM *Lactobacillus acidophilus*-LA5 NA MICROBIOTA COLÔNICA DE
PACIENTES DIABÉTICOS TIPO II**

JOÃO PESSOA

2024

JÉSSIKA RODRIGUES CLEMENTINO

**EFEITOS DA β -GLUCANA DE LEVEDURA ISOLADA E EM COMBINAÇÃO
COM *Lactobacillus acidophilus*-LA5 NA MICROBIOTA COLÔNICA DE
PACIENTES DIABÉTICOS TIPO II**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências da Nutrição.

Área de concentração: Ciências da Nutrição

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marciane Magnani

Catálogo na publicação Seção de Catalogação e Classificação

C626e Clementino, Jessika Rodrigues.

Efeitos da β -glucana de levedura isolada e em combinação com *Lactobacillus acidophilus*-la5 na microbiota colônica de pacientes diabéticos tipo II / Jessika Rodrigues Clementino. - João Pessoa, 2024.

63 f. : il.

Orientação: Marciane Magnani. Dissertação
(Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Diabetes Mellitus - Probióticos. 2. β -glucana. 3. Disbiose intestinal. 4. Ácidos graxos - Cadeia curta.
I. Magnani, Marciane. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.379-008.64(043)

JÉSSIKA RODRIGUES CLEMENTINO

**EFEITOS DA β -GLUCANA DE LEVEDURA ISOLADA E EM COMBINAÇÃO
COM *Lactobacillus acidophilus*-LA5 NA MICROBIOTA COLÔNICA DE
PACIENTES DIABÉTICOS TIPO II**

Dissertação APROVADA em 25/11/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente:
 **MARCIANE MAGNANI**
Data: 21/03/2025 18:26:42-0300
Verifique em <https://validar.itb.gov.br>

Profa. Dr^a. Marciane Magnani
Orientadora (DN/CCS/UFPB)
Presidente da Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente:
 **KATARYNE ARABE RIMA DE OLIVEIRA**
Data: 21/03/2025 20:17:07-0300
Verifique em <https://validar.itb.gov.br>

Prof. Dr^a. Kataryne Árabe Rimá de Oliveira
Examinador Interno (DN/CCS/UFPB)

Documento assinado digitalmente:
 **TATIANA COLOMBO PIMENTEL**
Data: 22/03/2025 09:35:43-0300
Verifique em <https://validar.itb.gov.br>

Prof. Dr^a. Tatiana Colombo Pimentel
Examinadora Externa (IFPR/ Paranavaí)

Dedico este trabalho à minha avó, Eliete Rodrigues (*in memoriam*), que em vida não pôde presenciar esta conquista, mas que eternamente me acompanha do outro lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar, fortalecer e iluminar durante toda esta jornada.

Aos meus pais, Andrea Rodrigues Clementino e Galberto Martins Clementino, pelo amor, dedicação e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Agradeço por não medirem esforços para me ver realizando os meus sonhos e por serem meu porto seguro em todas as fases deste caminho.

Às minhas irmãs, Gisele Rodrigues, Joyce Rodrigues e Amanda Rodrigues, por estarem sempre comigo, me incentivando e me oferecendo forças quando mais precisei.

Aos meus amigos, que estiveram ao meu lado desde o início, contribuindo direta ou indiretamente para a realização deste trabalho: Clara Cabral, Pierre Hítalo, Sandy Martins, Hassler Cavalcante e Julliane Rayara.

Aos amigos que fiz na UNESP, em especial Danielli Baeta, Mateus Kawata e Fellipe Lopes, por sempre estarem ao meu lado, compartilhando conhecimento e alegrias.

Aos meus pacientes neurodivergentes, dedico um agradecimento especial por me ensinarem, diariamente, sobre superação, resiliência e evolução.

À professora Kátia Sivieri, pela disponibilidade em ceder seu laboratório para a realização das minhas pesquisas.

À minha orientadora, professora Dr.^a Marciane Magnani, pela orientação, paciência e dedicação durante todo o processo de elaboração deste trabalho.

Ao corpo docente e técnico do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição pela assistência prestada durante os anos de formação, sempre dispostos a contribuírem com meu aprendizado e desenvolvimento acadêmico. Agradeço em especial ao secretário Sr. Carlos pelo apoio e atenção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

As professoras que compõem a banca avaliadora, pela atenção, críticas construtivas e por contribuírem com o enriquecimento deste estudo.

Por último, mas não menos especial, à minha amiga de laboratório e de vida, Louise Iara, que compartilhou comigo a bancada, os desafios e as alegrias do dia a dia no laboratório. Obrigada por me ensinar desde as tarefas mais simples até as mais complexas, e por ser uma companheira essencial em toda esta jornada.

RESUMO

β -glucanas (BGL) de leveduras são polissacarídeos reconhecidos pela sua funcionalidade fisiológica como prebióticos. O diabetes *Mellitus* tipo 2 (DMT2) representa uma preocupação de saúde pública com elevada prevalência em todo o mundo. Para a prevenção e controle do DMT2, a utilização de componentes dietéticos com propriedades funcionais, como prebióticos e probióticos mostrou-se como uma estratégia promissora. O presente estudo avaliou os efeitos da BGL de levedura descartada de cervejaria, isolada e em combinação com o probiótico *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (LA5), na composição e metabolismo da microbiota intestinal de pacientes diabéticos tipo 2. A BGL, obtida a partir de creme de levedura descartado em cervejaria, foi caracterizada por meio de ressonância magnética nuclear. Foram avaliados os tratamentos com BGL (7,5 g), LA5 (10^6 UFC/g) e LA5-BGL [LA5 (10^6 UFC/g) + BGL (7,5 g)] administrados uma vez ao dia durante 7 dias. Modelo dinâmico de fermentação colônica utilizando o Simulador do Ecossistema Microbiano Intestinal Humano (SHIME®), foi aplicado e a microbiota intestinal foi avaliada nos diferentes tratamentos quanto a composição e diversidade por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Paralelamente foram mensurados os íons de amônia e os níveis de ácidos graxos de cadeia curta nas amostras. A BGL associada ou não com a cepa probiótica LA5 contribuiu para o equilíbrio da microbiota intestinal de indivíduos diabéticos. Houve um aumento significativo na riqueza microbiana nos grupos tratados em comparação ao controle (microbiota intestinal de diabéticos tipo 2 sem administração de tratamento), sendo evidenciados índice Chao1 de 61,75 para BGL; 40,00 em LA5; 55,50 em LA5-BGL e 10,5 no controle ($p=0,028$). BGL, LA5 e sua associação aumentaram a abundância relativa de *Bacteroides*, *Alistipes*, *Lactobacillus*, *Subdoligranulum* e *Acidaminococcus*, assim como os níveis de ácidos graxos de cadeia curta (propionato, butirato e acetato). A BGL e LA5 aumentaram a secreção da citocina pro-inflamatória IL-6 ($p<0,05$), com as maiores concentrações observadas no grupo LA-5, seguidas pelo BGL e LA5-BGL. Todos os tratamentos aumentaram a citocina anti-inflamatória IL-10 ($p<0,05$), com as maiores concentrações de IL-10 nos tratamentos BGL e LA5-BGL. Os resultados indicam potenciais efeitos benéficos da BGL associada ou não ao LA5 na microbiota intestinal e indicadores metabólicos de adultos com DMT2, podendo vir a ser utilizado como adjuvante no tratamento dessa patologia, via modulação da microbiota intestinal. Os resultados deste estudo abrem perspectivas promissoras para futuras pesquisas, incluindo ensaios clínicos em larga escala para confirmar os benefícios observados na modulação da microbiota intestinal e nos indicadores metabólicos de pacientes com DMT2. Além disso, destaca o potencial para desenvolver produtos funcionais sustentáveis, aproveitando subprodutos industriais.

Palavras-chave: β -glucana; Disbiose Intestinal; Ácidos Graxos de Cadeia Curta; Diabetes Mellitus Tipo 2; Probióticos.

ABSTRACT

Yeast β -glucans (BGL) are polysaccharides recognized for their physiological functionality as prebiotics. Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is a public health concern with a high prevalence worldwide. The use of dietary components with functional properties, such as prebiotics and probiotics, has proven to be a promising strategy for T2DM prevention and management. This study evaluated the effects of BGL derived from discarded brewery yeast, alone and in combination with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (LA5), on the composition and metabolism of the gut microbiota of type 2 diabetic patients. BGL, obtained from discarded brewery yeast cream, was characterized by nuclear magnetic resonance. Treatments with BGL (7.5 g), LA5 (10^6 CFU/g), and LA5-BGL [LA5 (10^6 CFU/g) + BGL (7.5 g)] were administered once daily for seven days. A dynamic colonic fermentation model using the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) was applied, and the gut microbiota was assessed across treatments in terms of composition and diversity using 16S rRNA gene sequencing. Ammonia ions and short-chain fatty acid levels were also measured. BGL, alone or combined with the probiotic strain LA5, contributed to balancing the gut microbiota of diabetic individuals. A significant increase in microbial richness was observed in the treated groups compared to the control (T2DM gut microbiota without treatment), with Chao1 indices of 61.75 for BGL, 40.00 for LA5, 55.50 for LA5-BGL, and 10.5 for the control ($p=0.028$). BGL, LA5, and their combination increased the relative abundance of *Bacteroides*, *Alistipes*, *Lactobacillus*, *Subdoligranulum*, and *Acidaminococcus*, as well as the levels of short-chain fatty acids (propionate, butyrate, and acetate). BGL and LA5 enhanced the secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-6 ($p<0.05$), with the highest concentrations observed in the LA5 group, followed by BGL and LA5-BGL. All treatments increased the anti-inflammatory cytokine IL-10 ($p<0.05$), with the highest IL-10 levels found in the BGL and LA5-BGL treatments. These findings indicate potential beneficial effects of BGL, alone or in combination with LA5, on the gut microbiota and metabolic markers of adults with T2DM, suggesting its potential use as an adjuvant in the treatment of this condition via gut microbiota modulation. The results of this study open promising avenues for future research, including large-scale clinical trials to confirm the observed benefits on gut microbiota modulation and metabolic markers in T2DM patients. Furthermore, they highlight the potential for developing sustainable functional products by utilizing industrial by-products.

Keywords: β -glucan; Gut Dysbiosis; Short-Chain Fatty Acids; Type 2 Diabetes Mellitus; Probiotics.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1: Glucana de levedura composta por cadeia de 1,3-glicosídica linear de monômeros de -D-glicose ligada por uma ligação β -1,6- glicosídica	13
Figura 2: Mecanismo de ação dos prebióticos	19
Figura 3: Fluxograma do estudo	22
Figura 4: Simulador do Ecossistema Microbiano Intestinal Humano (SHIME®)	25

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
BAL	Bactérias Ácido-Láticas
DCNT	Doenças Crônicas Não-Transmissíveis
DMT2	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 2
DP	Desvio Padrão
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOS	Frutooligossacarídeo
GLP-1	Peptídeo – 1- Semelhante ao Glucagon
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
Hb1Ac	Hemoglobina glicada
ISAPP	Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos
IVAS	Infecção das Vias Aéreas Superiores
LPS	Lipopolissacarídeo
SHIME®	Simulador de Ecossistema Microbiano Intestinal Humano
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TGI	Trato gastrointestinal
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UNESP	Universidade Estadual Paulista

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 ESTRUTURA E BIOATIVIDADE DA B-GLUCANA DE LEVEDURA.....	12
2.2 DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 2.....	14
2.3 A INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA INTESTINAL NO DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 2	15
2.4 PREBIÓTICOS E PROBIÓTICOS	17
3 METODOLOGIA.....	21
3.1 DESENHO DE ESTUDO	21
3.2 OBTENÇÃO DA B-GLUCANA.....	22
3.3 PREPARO DA SUSPENSÃO DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	23
3.4 OBTENÇÃO DO INÓCULO FECAL	23
3.5 DIGESTÃO SIMULADA NO MODELO COLÔNICO DINÂMICO.....	24
3.5.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	26
3.6 ANÁLISE DA MICROBIOTA COLÔNICA USANDO SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA.....	26
3.7 ATIVIDADE METABÓLICA MICROBIANA: DETERMINAÇÃO DE ÍONS AMÔNIO (NH ₄ ⁺) E ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA (AGCC)	27
3.8 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS (IL-6, IL-10 E TNF- α) USANDO CO-CULTURA DE CÉLULAS CACO-2 E THP-1	27
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	28
4 RESULTADOS	29
REFERÊNCIAS.....	30
APÊNDICES	41
APÊNDICE A – ARTIGO.....	42
APÊNDICE B – TCLE	58

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença metabólica progressiva, caracterizada pela resistência à insulina e/ou disfunção das células betas pancreáticas (Galicia-Garcia *et al.*, 2020). Os principais tipos de DM são o tipo 1 e o tipo 2. O tipo 1 é uma doença autoimune que leva à destruição das células betas do pâncreas, geralmente iniciando-se na infância ou adolescência, e está associado a fatores genéticos (Müller *et al.*, 2024). Já o DM Tipo 2 (DMT2) é mais comum na fase adulta e na velhice, e o seu desenvolvimento está relacionado a fatores como a hereditariedade, etnia e os hábitos de vida inadequados, incluindo uma alimentação desequilibrada (Zheng; Ley; Hu, 2018; Caires; Chiachio, 2020; Felipe *et al.*, 2021).

O tratamento do DMT2 envolve a terapia medicamentosa e modificações no estilo de vida, visando melhorar a qualidade e expectativa de vida dos pacientes, além de evitar o surgimento de complicações associadas como doenças cardiovasculares, neuropatia, retinopatia e nefropatia (Tafoya, 2023).

A prevalência mundial de pessoas diabéticas com idade entre 20-79 anos triplicou nas últimas duas décadas. Observa-se que esse aumento passou de 151 milhões de pessoas no ano de 2000 para 463 milhões em 2019 (*International Diabetes Federation*, 2019). Em 2021, estimava-se que 529 milhões de pessoas viviam com DM, um número que dobrará para cerca de 1,31 bilhão até 2050. A taxa global de prevalência de DM, padronizada por idade, foi de 6,1%. Essa prevalência é impulsionada quase inteiramente pelo DMT2, que representou mais de 96% dos casos de DM em todo o mundo (Ong *et al.*, 2023).

O Brasil ocupava em 2019 o quinto lugar entre os países com o maior número de pessoas com DM, com cerca de 16,8 milhões de pessoas diagnosticadas pelos dois tipos da doença (*Institute For Health Metrics and Evaluation Population Health Building*, 2021).

A utilização de componentes dietéticos com propriedades funcionais incluindo prebióticos e probióticos têm mostrado ser uma estratégia promissora para o tratamento do DMT2 (Wang *et al.*, 2023). Estudos observaram efeitos positivos da suplementação com esses componentes bioativos no tratamento da obesidade, na redução da gordura visceral e dos lipídeos sanguíneos, na resposta pós-prandial da insulina e glicose, para modulação da resposta inflamatória, além da atuação como substratos fermentáveis para modificação da microbiota intestinal (Carvalho; Gallão; De Brito, 2021; Costa, 2021). Dentre os prebióticos, destaca-se a β -glucana (BGL), um polissacarídeo não digerível com potencial funcional relevante.

BGL de levedura são polissacarídeos insolúveis derivados da parede celular de leveduras que apresentam características estruturais distintas e composição diversificada, contendo glucanos de ligações mistas ($\beta 1 \rightarrow 3$), ($\beta 1 \rightarrow 6$), ($\alpha 1 \rightarrow 4$) e ($\beta 1 \rightarrow 4$) (Bastos *et al.*, 2022). Esses polissacarídeos possuem forte atividade biológica, incluindo a redução da resposta pós-prandial de glicose no sangue, diminuição do nível de colesterol sérico, combatendo infecções, resistindo à oxidação e promovendo estimulação imunológica e atividade antitumoral (Lin; Han; Wu, 2024).

BGL obtidas de *Saccharomyces cerevisiae* descartada em cervejaria como subproduto da fermentação têm sido reconhecidas pela sua funcionalidade (Sampaolesi *et al.*, 2022). Estudo recente relatou atividade prebiótica de BGL de levedura semelhante à da inulina, que é universalmente reconhecida como um prebiótico (Wang *et al.*, 2020). Prebióticos são ingredientes alimentares que promovem o crescimento de probióticos no cólon e estimulam o sistema imunológico, auxiliando na prevenção e no tratamento de diversas patologias (Yadav *et al.*, 2022).

Microorganismos probióticos são definidos como microrganismos que, quando administrados em doses adequadas, promovem benefícios para a saúde do hospedeiro. Em virtude disso, são capazes de modificar o perfil da microbiota intestinal e consequentemente influenciar os parâmetros metabólicos, como a melhora da sensibilidade à insulina (Salgaço *et al.*, 2020; Hill *et al.*, 2014). Guedes *et al.* (2019), observaram efeito protetor da BGL de levedura frente a cepas probióticas, semelhante aquele exercido por fruto-oligossacarídeos (FOS).

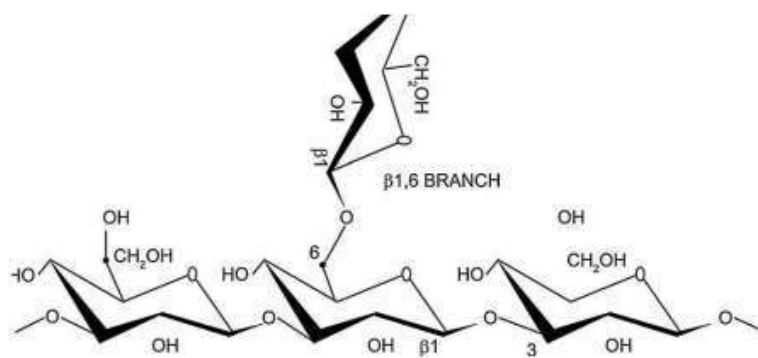
Salgaço *et al.* (2023) observaram a que a cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus*-LA5 (LA5) promoveu um aumento na diversidade microbiana, melhora do perfil metabólico, diminuindo a produção de íons de amônia e elevando os níveis de ácido butírico, um metabólito crucial para o controle glicêmico na microbiota intestinal de pacientes com DMT2. Entretanto os efeitos da BGL de levedura descartada em cervejaria, associada ou não com LA5, na microbiota intestinal de pacientes de DMT2 usando o Simulador de Ecossistema Microbiano Intestinal Humano (SHIME[®]) não foram avaliados. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivos avaliar os efeitos da BGL de leveduras descartadas em cervejaria, do LA5 e LA5-BGL na composição da microbiota intestinal de adultos com DMT2 usando o SHIME[®].

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ESTRUTURA E BIOATIVIDADE DA β -GLUCANA DE LEVEDURA

As BGL de levedura são polímeros de glicose de uma cadeia principal de β (1,3) -glucana linear com cadeias laterais ligadas em β (1,6) (Zhu; Du. Xu, 2016). A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* é uma fonte importante de BGL. A BGL de *Saccharomyces cerevisiae* é formada por um esqueleto central linear composto por unidades de glicose ligadas na posição β (1-3). Este esqueleto linear é complementado por cadeias laterais unidas em β (1-6), que ocorrem em diversas posições e apresentam tamanhos variados (Vuscan *et al.*, 2024) (Figura 1).

Figura 1: Glucana de levedura composta por cadeia 1,3-glicosídica linear de monômeros de -D-glicose ligada por uma ligação β 1,6- glicosídica.



Fonte: Bashir; Choi, 2017.

Leveduras do gênero *Saccharomyces* são amplamente utilizadas em cervejarias para fermentação e geram grandes volumes de células excedentes após o processo. Esse subproduto, pode ser reutilizado em novas fermentações até limites de viabilidade celular e contaminação. Frequentemente usado como ração animal, também pode ser destinado à extração de BGL, reconhecidas por suas propriedades bioativas, embora ainda seja inadequadamente descartada em alguns casos (Rubio *et al.*, 2020; Marson *et al.*, 2020; Jaeger *et al.*, 2020). Devido à sua composição química, esses subprodutos têm potencial para reintegração sustentável na bioeconomia circular (Farcas *et al.*, 2022).

Para cada 100 L de cerveja produzidos, geram-se entre 1,5 kg e 3 kg de levedura descartada, resultando em uma produção anual de até 400 milhões de quilos de biomassa. Essa

biomassa, devido à sua composição rica em nutrientes e compostos funcionais, apresenta um grande potencial para a reutilização e extração desses compostos, com destaque para a BGL. Por sua versatilidade, não deve ser desperdiçada, pois é um recurso importante para diversas aplicações tanto industriais, quanto para a promoção de benefícios à saúde (Gautério *et al.*, 2022).

Os benefícios da BGL para a saúde estão relacionados ao seu potencial em estimular o sistema imunológico (Spacek *et al.*, 2022), atividade antitumoral (Geller; Shrestha; Yan, 2019), antiinflamatória (Černá *et al.*, 2020), cardioprotetora e redutiva do estresse oxidativo (Wang *et al.*, 2022), hipocolesterolêmica (Sima; Vannucci; Vetvicka, 2018) e antidiabética (Cao *et al.*, 2017). A BGL de levedura também pode atuar na atenuação da doença inflamatória intestinal e contribuir para uma regulação positiva da microbiota intestinal (Yang *et al.*, 2024), apresentando propriedades prebióticas, além de regular as respostas imunes no intestino (Charlet *et al.*, 2018; Gudi *et al.*, 2019; Zhen *et al.*, 2021).

Além disso, a BGL de levedura apresenta propriedade antiobesogênica remodelando a microbiota intestinal, melhorando principalmente a abundância de bactérias relacionadas a produção de AGCCs, como *Anaerostipes*, *Coprobaecillus* e *Roseburia*, e reduzindo a abundância de bactérias associadas à obesidade, como *Parabacteroides* e *Lactococcus* (Muthuramalingam *et al.*, 2020).

Essas propriedades estão associadas aos mecanismos moleculares da BGL de levedura e sua ligação a receptores celulares específicos, como a Dectina-1, ao longo do revestimento intestinal e células imunes específicas, como células apresentadoras de antígeno. A resposta imune inata dependente de Dectina-1 induzida pela BGL na mucosa intestinal envolve fatores reguladores imunes e pró-inflamatórios (Vries *et al.*, 2020). Ainda a BGL de levedura da cerveja é capaz de induzir a fagocitose e a produção de citocinas e quimiocinas, como IL-10, IL-6 e IL-23, mediadas pela quinase Syk (Jesus, 2022).

Estudos indicam que a BGL de levedura pode ativar células do sistema imunológico, como os macrófagos, e melhorar a resposta imunológica em doenças, como o DMT2. Ela tem o potencial de aumentar a produção de IL-10 em monócitos, o que pode, por sua vez, regular a atividade das células NK (natural killer). Essas células desempenham um papel crucial na modulação das respostas inflamatórias e metabólicas, o que é relevante para o manejo do DMT2 (Hermans *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2023).

2.2 DIABETES MELLITUS TIPO 2

O DM é uma patologia de origem metabólica e natureza crônica, caracterizada predominantemente pela hiperglicemia. Essa condição decorre de disfunções na produção de insulina, na sua ação, ou em ambas as funções (Siller *et al.*, 2020; Howsawi; Alem, 2024).

Com base em suas características e mecanismos fisiopatológicos, o DM é classificado em duas categorias principais. O DMT1 decorre da destruição autoimune das células betas pancreáticas, resultando em deficiência absoluta de insulina, incluindo variantes como o diabetes autoimune latente do adulto. O DMT2 é caracterizado pela perda progressiva da capacidade de secreção adequada de insulina pelas células betas pancreáticas, geralmente associada à resistência à insulina. Além desses, existem outros tipos de diabetes relacionados a causas específicas, como alterações genéticas, doenças do pâncreas e uso de determinados medicamentos (El-sayed *et al.*, 2023).

O DMT2 é a forma mais comum da doença, e seu aumento contínuo está intimamente ligado a fatores econômicos, sociais e demográficos que influenciam os padrões de saúde em escala global (Yan *et al.*, 2023). Segundo a ADA (2024), o diagnóstico do DMT2 pode ser feito através de testes de hemoglobina glicada ($\geq 6,5\%$), glicemia de jejum (≥ 126 mg/dL) ou teste de tolerância à glicose oral (≥ 200 mg/dL após 2 horas). Caso o paciente apresente sintomas clássicos de hiperglicemia, um único teste positivo pode ser suficiente para o diagnóstico. O exame deve ser repetido para confirmação em situações padrão.

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado nas fases iniciais da doença são de fundamental importância para evitar progressão e o surgimento de complicações crônicas (SBD, 2024). Dentre as principais complicações, ressaltam-se alterações cardiovasculares, neurológicas, retinopatias e nefropatias (Muzy *et al.*, 2021; Campos *et al.*, 2024). Essas complicações do DMT2 impactam significativamente a qualidade de vida dos indivíduos afetados, resultando em consequências físicas, psicológicas, sociais e econômicas (Wang *et al.*, 2024).

O DMT2 ocorre mais frequentemente em adultos de meia-idade e idosos, e sua causa é multifatorial (Ortiz-Martínez *et al.*, 2022). Além disso, o risco é aumentado por diversos fatores, como dieta, estilo de vida, obesidade abdominal, idade, histórico familiar, hipertensão arterial e dislipidemia. Desta forma, destaca-se a importância de tratamentos individualizados para o DMT2, que combinam mudanças no estilo de vida, como dieta e atividade física, com terapias

farmacológicas, ajustados às necessidades clínicas de cada paciente (Galindo *et al.*, 2023). Além disso, estudos recentes investigaram a coadministração de probióticos e prebióticos como adjuvantes à farmacoterapia, fornecendo também uma estratégia de tratamento eficaz no manejo dos sintomas de hiperglicemia no DMT2 (Viteta *et al.*, 2023).

Recentemente, a modulação da microbiota intestinal tem emergido como uma estratégia promissora para a prevenção, controle e tratamento adjuvante do DMT2, com evidências sugerindo seu impacto positivo na regulação do metabolismo e na melhora da resposta insulínica (Zhou *et al.*, 2022; Paul *et al.*, 2022).

2.3 A INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA INTESTINAL NO DIABETES *MELLITUS* TIPO 2

Os mecanismos pró-inflamatórios desempenham um papel central no desenvolvimento do DMT2, envolvendo o acúmulo de tecido adiposo disfuncional, que produz citocinas inflamatórias em excesso, e uma disfunção do sistema imunológico. Esses fatores contribuem para a resistência à insulina e perpetuam um estado inflamatório sistêmico, agravando o controle glicêmico (Wondmkun, 2020; Salazar *et al.*, 2020).

Alterações na microbiota intestinal também podem tornar indivíduos mais susceptíveis a problemas de saúde relacionados ao DMT2 (Li *et al.*, 2020). A microbiota intestinal humana é um ecossistema complexo, composto por uma rede ecológica multifacetada de bactérias, eucariotos, *archaea*, vírus e bacteriófagos. Esta comunidade de microrganismos é responsável pela proteção do hospedeiro contra patógenos, estimulando e modulando o sistema imunológico, produzindo metabólitos essenciais e nutrindo as células gastrointestinais (Matenchuk; Mandhane; Kozyrskyj, 2020). Cerca de 10 – 100 trilhões de células microbianas simbióticas vivem no intestino humano. A comunidade bacteriana intestinal, em específico, pode ser dividida principalmente em 2172 espécies isoladas em seres humanos, classificadas em 12 diferentes filos, dos quais 93,5% pertencem aos gêneros *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* (Giambò, *et al.*, 2021).

A composição e diversidade bacteriana da microbiota intestinal pode ser alterada por diversos fatores, como transições infantis (idade gestacional de nascimento, tipo de parto, práticas de amamentação, desmame infantil), hábitos alimentares, idade, etnicidades, hábitos culturais e de estilo de vida (prática de exercícios físicos, consumo de álcool), fatores geográficos e ambientais, estresse, obesidade, o consumo de probióticos e prebióticos,

antibioticoterapia, comorbidades intestinais e doenças metabólicas (Tomova *et al.*, 2019; Wong *et al.*, 2018; Rinniella *et al.*, 2019; Milanovic *et al.*, 2019).

Ainda, o hábito alimentar é um dos fatores que também pode influenciar na microbiota intestinal. Dietas com baixo teor de fibras, proteínas e gorduras têm sido associadas ao aumento da inflamação e da permeabilidade intestinal, alterando a translocação de populações bacterianas e metabólitos que modulam a inflamação. Além disso, os metabólitos derivados da microbiota intestinal, incluindo bacteriocinas, AGCC e vitaminas, parecem desempenhar um papel vital na ativação da resposta imune intestinal, protegendo contra patógenos externos (Sakkas *et al.*, 2020; Costa, 2021).

A disbiose pode acarretar em aumento da permeabilidade intestinal, e, consequentemente, a passagem de lipopolissacarídeo (LPS) para a circulação sistêmica, causando uma endotoxemia metabólica e gerando um estado inflamatório crônico (Pantoja *et al.*, 2019). A passagem de LPS e endotoxinas para a corrente sanguínea é chamada de “síndrome do intestino permeável” (do inglês, *leaky gut syndrome*), que desempenha um papel crucial na patogênese de várias doenças, como a DMT2 (Zhang *et al.*, 2020).

Existem evidências de que o DMT2 está associado à inflamação crônica de baixo grau (Gomes; Accardo, 2019). A disbiose intestinal e o influxo de fatores microbianos têm sido associados à inflamação e ao metabolismo da glicose prejudicado (Zhang *et al.*, 2020). Além disso, a função da barreira epitelial sofre interferência dos níveis glicêmicos, uma vez que o estado de hiperglicemia favorece o influxo anormal de produtos microbianos imunoestimuladores e a difusão sistêmica de patógenos intestinais (Thaiss *et al.*, 2018).

Conforme mencionado, mudanças na microbiota intestinal influenciam nos metabólitos intestinais, afetando a produção de butirato e acetato. Esses metabólitos estão relacionados com a resistência à insulina e, consequentemente, o controle glicêmico. Sendo o butirato e o propionato os principais responsáveis pela melhora na glicemia (Vallianou; Stratigou; Tsagarakis, 2019). O butirato, em sua maioria sintetizado por bactérias do Filo *Firmicutes*, é considerado uma fonte de energia primária para as células do cólon do hospedeiro, tendo ainda efeitos sob a homeostase energética. Bactérias do Filo *Bacteroidetes* produzem essencialmente acetato e propionato, sendo o propionato responsável pela regulação da gliconeogênese e da saciedade, após transferência para o fígado. O acetato é o AGCC em maior quantidade no fígado e exerce efeitos sobre a lipogênese e no metabolismo do colesterol, bem como na regulação central do apetite (Alves, 2021; Pinto, 2019).

As proteínas da dieta também modulam a composição da microbiota intestinal e a produção de metabólitos. Enquanto a fermentação de carboidratos não digeríveis gera AGCC, as proteínas são as principais fontes de nitrogênio utilizadas na multiplicação de microrganismos da microbiota intestinal, sendo sua fermentação responsável pela produção de AGCC e amônia, entre outros metabólitos proteolíticos como poliaminas, fenóis, indóis, ácidos graxos ramificados e sulfeto de hidrogênio (Álvares *et al.*, 2021). Assim, a interação entre proteínas da dieta, prebióticos e probióticos desempenha um papel crucial na modulação da microbiota intestinal e na produção de metabólitos, contribuindo para a manutenção da saúde intestinal.

2.4 PREBIÓTICOS E PROBIÓTICOS

Prebióticos são definidos como substratos utilizados seletivamente por microrganismos do hospedeiro conferindo benefícios à saúde. Prebióticos devem apresentar algumas características específicas, tais como: resistência à acidez gástrica, hidrólise por enzimas digestivas e gastrointestinais; fermentação pela microbiota intestinal e promoção do crescimento de microrganismos probióticos (Gibson *et al.*, 2017; Guarino *et al.*, 2020).

Além disso, para que um componente seja considerado prebiótico, ele deve ser seguro para consumo e demonstrar benefícios à saúde que sejam mediados pela microbiota intestinal. Ainda, é essencial que a ingestão desse componente esteja associada a alterações na microbiota intestinal do hospedeiro, influenciadas pela atividade dos microrganismos presentes no intestino. Assim, são essas alterações, juntamente com os benefícios à saúde que delas resultam, que definem um alimento como "prebiótico" (Gibson *et al.*, 2017; Swanson *et al.*, 2020).

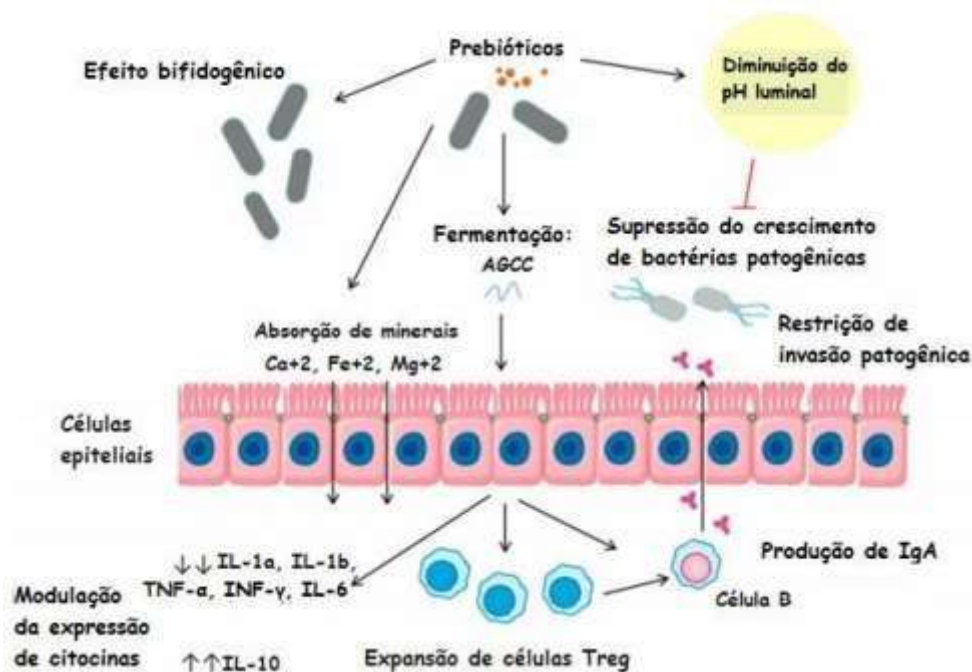
A maioria dos prebióticos requer uma dose oral superior a 3 g por dia para exercer um efeito benéfico. No entanto, um consumo mínimo diário de 3 g de prebióticos é considerado suficiente para proporcionar benefícios, relacionados à saúde intestinal e ao equilíbrio da microbiota intestinal (Gibson *et al.*, 2017; Neves, 2024). Por outro lado, doses de até 20 g por dia podem ser necessárias para alcançar resultados terapêuticos específicos (Holscher; Hutkins; Sanders, 2021).

Algumas fibras dietéticas possuem alegação prebiótica, uma vez que a ingestão desses componentes tem um efeito notável no equilíbrio da microbiota intestinal e na saúde. Todavia, nem todas as fibras podem ser classificadas como prebióticas. Até o momento, apenas os oligossacarídeos resistentes, frutanos (FOS, oligofrutose e inulina) e galactanos, estão bem

documentados na literatura como prebióticos (Rezende; Lima; Naves, 2021). Outros compostos, que não necessariamente carboidratos, também podem apresentar alegações prebióticas, como é o caso das proteínas não digeríveis ou peptídeos bioativos, ácidos graxos insaturados e compostos bioativos (Ashaolu *et al.*, 2019).

O consumo de prebióticos está associado a diversos efeitos positivos para a saúde, atuando na prevenção de alergias (Brosseau *et al*, 2019), remissão de doenças inflamatórias intestinais (Zhang *et al*, 2021), diminuição do risco de câncer (Zene *et al*, 2017), redução do risco de doenças cardiovasculares e diabetes (Lockyer; Stanner, 2019). Esses efeitos estão associados aos mecanismos diretos ou indiretos que influenciam na saúde do hospedeiro. Os prebióticos possuem a capacidade de aumentar a secreção de IgA e de mucinas, importantes para a manutenção da barreira intestinal, além de estimular maior taxa de proliferação de colonócitos, aumentar o recrutamento de leucócitos aos locais de inflamação, promover um balanço na produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a capacidade osmótica do lúmen intestinal (Figura 2) (Brosseau *et al*, 2019; Tavares, 2021).

Figura 2: Mecanismos de ação dos prebióticos.



Fonte: Tavares, 2021.

Legenda: Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) através de sua fermentação pelos microrganismos, maior absorção de minerais como cálcio, ferro e magnésio, diminuição do pH luminal e regulação do sistema imunológico (com aumento da produção de IgA e modulação da produção de citocinas).

Os prebióticos quando fermentados pelas bactérias intestinais resultam na produção de AGCC, como propionato, butirato e acetato. A produção desses ácidos tem efeitos benéficos, incluindo melhora da integridade da membrana intestinal e absorção de minerais, redução dos níveis glicêmicos e do peso corporal, melhora da imunidade e modulação de biomarcadores metabólicos, cardiovasculares e inflamatórios (Oniszczyk *et al.*, 2021; Portincasa *et al.*, 2022).

Além dos efeitos benéficos dos prebióticos na produção de AGCC e na saúde intestinal, os probióticos desempenham um papel complementar. Definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (Hill *et al.*, 2024), os probióticos possuem, em sua maioria, a capacidade de aderir ao trato gastrointestinal, se multiplicar, colonizar e modular o sistema imunológico, além de suprimir competitivamente os patógenos, embora nem todas as cepas apresentem essa habilidade imunomoduladora (Guimarães *et al.*, 2020; Schepper *et al.*, 2017). Em geral, os benefícios dos probióticos para os consumidores vão além da mediação da microbiota intestinal com base em mecanismos associados.

O consumo de compostos funcionais, como os probióticos, previne o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), contribuindo para a manutenção e promoção da saúde (Junior; Dias; Simas, 2020). Estudos relatam os efeitos benéficos da ingestão dos probióticos, tais como a redução na hiperglicemia (Kassain *et al.*, 2018), diminuição da glicose em jejum (Razmpoosh *et al.*, 2018) e redução da resistência à insulina (Kobyliak *et al.*, 2018).

Lactobacillus é um gênero microbiano importante, rico em espécies que proporcionam benefícios à saúde (Zheng *et al.*, 2020). Esse gênero é muito empregado na produção alimentar e faz parte do grupo das bactérias ácido-láticas (BAL), cujo principal produto metabólico é o ácido láctico obtido através da fermentação de uma variedade de carboidratos (Lunardi *et al.*, 2021). As BAL são úteis na prevenção ou redução da progressão do diabetes, isso porque diminuem significativamente o estresse oxidativo, regulam a atividade da α -glicosidase e aumentam a biossíntese de glutatona pancreática, reduzindo assim o estresse oxidativo no pâncreas (Jeong *et al.*, 2021).

As espécies de probióticos mais estudadas com relação ao DM2 pertencem aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e grupos associados. *L. acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus casei* demonstraram exercer efeitos antidiabéticos. No entanto, seus mecanismos ainda não foram bem definidos, mas podem incluir mudanças favoráveis na composição e / ou atividade da microbiota intestinal, inibição da

atividade da α -glucosidase, produção de ácido láctico antimicrobiano, melhora de função de barreira intestinal, modulação imunológica, produção de AGCC e regulação do metabolismo dos ácidos biliares (Adeshirlarijaney; Gewirtz, 2020).

Lactobacillus acidophilus LA-5 se destaca por ser uma cepa probiótica amplamente utilizada na indústria de laticínios para obter produtos de fermentação de alta qualidade (Meng *et al.*, 2021). Essa cepa está associada a diversos benefícios à saúde, demonstra efeitos positivos significativos no manejo de alterações glicêmicas em indivíduos com DMT2, seja na forma isolada ou em associação com multicepas (Borges; Salha, 2020). Além disso, atua na melhora do perfil lipídico e marcadores de defesa antioxidante, na redução do risco de infecção *por Clostridium difficile*, e possui propriedades anticarcinogênicas, entre outras (Lopes *et al.*, 2021).

No estudo realizado por Salgaço *et al.* (2023) foi observado que a administração de LA-5 aumentou a abundância dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, acompanhado por uma diminuição de gêneros como *Escherichia* e *Clostridium* na microbiota intestinal de pacientes de DMT2. As alterações foram associadas à melhora na sensibilidade à insulina e à redução dos níveis de glicose no sangue, destacando o potencial terapêutico do LA5 na gestão do DMT2. Porém, pouco é sabido sobre os efeitos da administração LA5 associado a prebióticos na microbiota intestinal de pacientes com DMT2.

Pelo exposto, é importante o desenvolvimento de estudos que avaliem os efeitos de prebióticos, como a BGL de levedura, na modulação da microbiota intestinal e na saúde metabólica. Além disso, a exploração dos potenciais benefícios da BGL poderá contribuir para a formulação de intervenções dietéticas mais eficazes e direcionadas, promovendo a saúde intestinal e metabólica. Nesse contexto, o uso de probióticos como LA5 surge como uma estratégia relevante, considerando sua capacidade comprovada de aderir ao trato gastrointestinal, modular a microbiota intestinal e o sistema imunológico, e contribuir para a redução de fatores de risco metabólicos. A continuidade desse tipo de investigação é essencial para estabelecer diretrizes práticas que possam ser aplicadas na nutrição clínica e na prevenção de DCNT, com destaque para o DMT2.

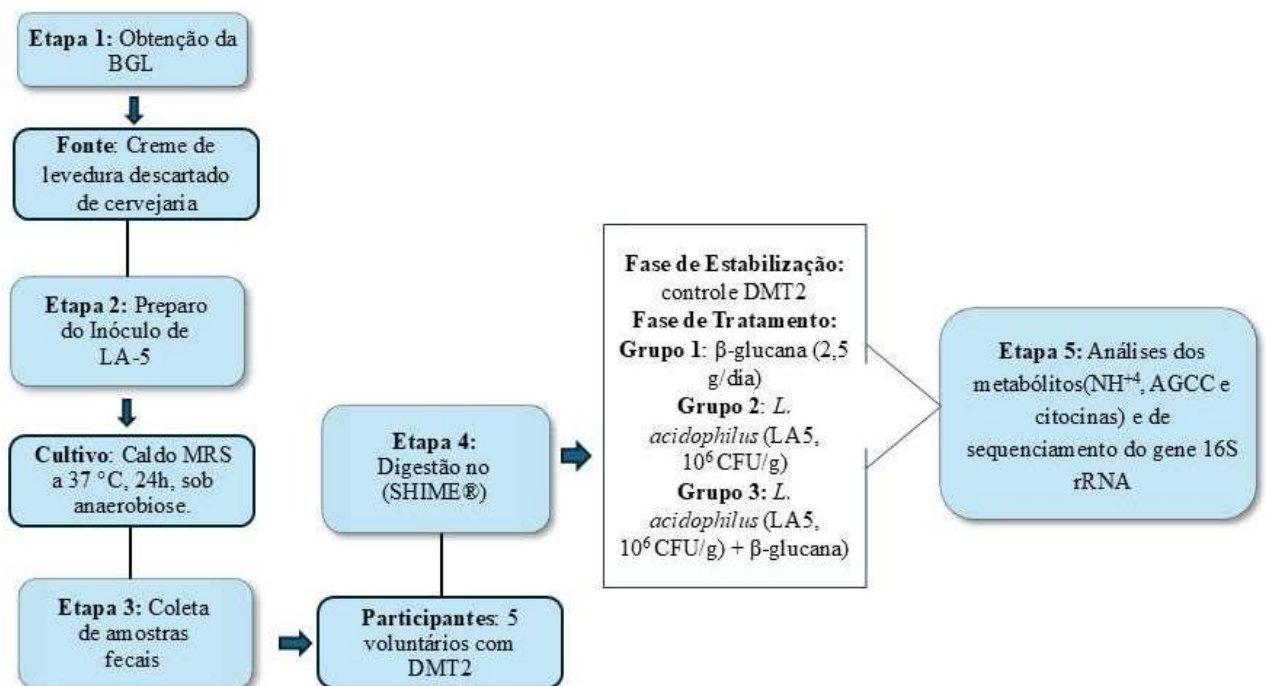
3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO DE ESTUDO

O estudo foi desenvolvido em duas fases distintas. A primeira etapa foi executada no Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos (LPMA), Centro de Tecnologia, UFPB e correspondeu à extração da BGL de levedura. A sequência do processo envolveu a caracterização da matriz, sendo essa realizada na Central Analítica Multiusuário da UFPB.

A segunda etapa foi realizada em colaboração com o Laboratório de Microbiologia em Alimentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Departamento de Ciência dos Alimentos e Nutrição) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Araraquara, São Paulo. Essa fase correspondeu à avaliação dos efeitos da administração da BGL, LA5 e LA5-BGL, na composição da microbiota intestinal de indivíduos diabéticos e na síntese de metabólitos, utilizando o SHIME®. Para facilitar a compreensão do desenho do estudo, as diferentes etapas foram apresentadas em um fluxograma (Figura 3).

Figura 3. Desenho experimental do estudo



Fonte: Autoria própria, 2024.

Legenda: BGL: β-glucana; LA5: *L. acidophilus* - LA5; MRS: Man, Rogosa e Sharpe.

3.2 OBTENÇÃO DA β -GLUCANA

A BGL foi obtida a partir de creme de levedura descartado em cervejaria conforme procedimentos descritos por Magnani *et al.* (2009). Para esse processo inicialmente as células de levedura foram submetidas à autólise em uma suspensão aquosa de 20% (v/v) com adição de 3% NaCl (p/v), em pH 5,0 e temperatura de 55 °C em banho-maria com agitação branda (120 rpm) durante 24 horas. O material foi aquecido até 85 °C, mantido durante 15 minutos, resfriado até 25 °C e centrifugado a 4500 g por 10 minutos a 22 °C. O precipitado foi coletado e ajustado para 30% de sólidos totais em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,5. A suspensão obtida foi aquecida até 121 °C em autoclave, mantida durante 4 horas, resfriada a 25 °C e centrifugada a 5000 g durante 10 minutos a 4 °C. O precipitado coletado foi ressuspensionado em água destilada estéril (15%) e sonificado (20 KHz, 150 W) durante 6 minutos em banho de gelo para posterior centrifugação a 4500 g durante 15 minutos a 10 °C.

Após esse processo, o precipitado foi coletado e submetido à extração de lipídeos em *Soxhlet* durante 2 horas sob refluxo, utilizando éter de petróleo como solvente. Em seguida, o material foi lavado por centrifugação três vezes com acetona 1:1 (p/v), a 4500 g durante 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, foi realizado tratamento enzimático com a enzima Protamax® N200 durante 5 horas a 55 °C e pH 7,5 (0,4 U por grama de parede celular de uma suspensão aquosa a 20%). Após a proteólise foram realizadas cinco lavagens por centrifugação (4500 g por 5 minutos a 4 °C) com água destilada para retirada total da protease e obtenção da BGL. A matriz obtida foi dializada com água destilada sob agitação branda, com trocas frequentes da água durante 24 horas antes da liofilização em condições de pressão reduzida e temperatura de -50 °C. O produto liofilizado foi utilizado para realização dos experimentos propostos (Magnani *et al.*, 2009).

A identidade química da matriz foi confirmada por ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros de RMN de ^{13}C e ^1H foram adquiridos dissolvendo 50 mg de BGL de levedura em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) usando um espectrômetro de RMN Varian System de 500 MHz (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) operando a 125 MHz para ^{13}C e 500 MHz para ^1H (Guedes *et al.*, 2019).

3.3 PREPARO DA SUSPENSÃO DE *Lactobacillus acidophilus* LA-5

A cultura liofilizada de *L. acidophilus* - LA5, foi obtida comercialmente da empresa Chr. Hansen S.A. (Valinhos, São Paulo, Brasil). A cepa bacteriana foi cultivada em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Hi-Media, Mumbai, Índia) a 37 °C, sob condições anaeróbicas utilizando o Sistema Anaeróbico (AnaeroGen®, Oxoid, Hampshire, Reino Unido), por um período de 24 horas (Medeiros *et al.*, 2022). Após o cultivo, o caldo foi cuidadosamente retirado por centrifugação a 4500 g durante 15 minutos a 4 °C, e as células sedimentadas foram coletadas. As células foram então lavadas duas vezes com solução salina estéril (NaCl 0,85 g/100 mL) e ressuspensas, seguidas de homogeneização por 30 segundos utilizando um vórtex IKA (Staufen, Alemanha), para obtenção do inóculo inicial. Suspensões de células com densidade óptica (OD) de 0,8 a 660 nm (OD660) resultaram em contagens viáveis de aproximadamente 6 log UFC/mL. Posteriormente, 1% (v/v) da suspensão de células foi inoculado em meio MRS (10 mL) para utilização nas formulações posteriores ou nos demais experimentos.

3.4 OBTENÇÃO DO INÓCULO FECAL

As amostras de fezes foram coletadas de cinco voluntários diagnosticados com DMT2 (3 homens e 2 mulheres), com idades entre 45 e 50 anos, recrutados voluntariamente na cidade de Araraquara (São Paulo, Brasil). O recrutamento foi realizado após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual Paulista (UNESP, Araraquara; CAAE: 100 30156020.8.0000.5426), e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B).

Os voluntários foram selecionados com base em critérios de inclusão e exclusão preestabelecidos, os critérios de inclusão foram: (1) sexo feminino ou masculino, (2) idade entre 45 e 50 anos, (3) não fez uso de suplementos alimentares, medicamentos para doenças gastrointestinais, antibióticos nos últimos 6 meses e probióticos ou prebióticos por um período mínimo de três meses antes do início do experimento. Os critérios de exclusão foram: (1) idade menor que 45 anos ou maior que 50 anos, (2) uso de suplementos alimentares, medicamentos para doenças gastrointestinais, antibióticos nos últimos 6 meses e probióticos ou prebióticos por um período mínimo de três meses antes do início do experimento (Salgaço *et al.*, 2023).

Todos os doadores receberam um kit de coleta de fezes que incluía tubos de coleta estéreis, espátulas descartáveis, instruções para coleta e entrega da amostra, luvas descartáveis e álcool 70%, e foram também instruídos previamente sobre as condições higiênicas para realizar a coleta. As fezes foram coletadas em tubos estéreis e colocadas em um frasco com um sistema gerador de anaerobiose (AnaeroGen®, Oxoid, Hampshire, Reino Unido) e imediatamente transportadas para o laboratório para análise posterior.

3.5 DIGESTÃO SIMULADA NO MODELO COLÔNICO DINÂMICO

O protocolo experimental descrito por Salgaço *et al.* (2023) foi utilizado para a análise da digestão simulada em modelo dinâmico no SHIME®. O SHIME® (Figura 4) é controlado por computador e composto por 5 compartimentos fechados que representam o estômago, intestino delgado, o cólon ascendente, o transverso e o descendente (Molly *et al.*, 1994; Possemiers *et al.*, 2004). Para o presente experimento, o simulador foi adaptado para obter triplicatas biológicas do cólon ascendente, de acordo com Salgaço *et al.* (2023).

Figura 4. Simulador do Ecosistema Microbiano Humano (SHIME®)



Fonte: Autoria própria, 2022.

Legenda: Os reatores correspondem ao estômago (R1), duodeno (R2), cólon ascendente (R3), cólon transverso (R4) e cólon descendente (R5).

Para o processo de digestão foram controladas as características de capacidade volumétrica, pH, temperatura (37 °C) e tempo de retenção (24 horas), sendo os últimos três parâmetros conectados a um agitador magnético com rotação ajustada para garantir a homogeneização adequada do sistema (120 rpm). A anaerobiose do sistema foi alcançada com a adição de nitrogênio e o pH corrigido em cada recipiente com o auxílio de ácido clorídrico (HCl, 1 M) ou hidróxido de sódio (NaOH, 1 M), atingindo a faixa de pH de 5,6–5,9 (Molly *et al.*, 1994; Possemiers *et al.*, 2004).

Os compartimentos foram colonizados com fezes dos cinco voluntários com diagnóstico de DMT2. O pool fecal (40 g) foi obtido pela homogeneização de amostras fecais frescas provenientes de cada doador (8 g) e diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 6,5) a uma concentração final de 200 mL. Em seguida, esta solução foi homogeneizada em *stomacher* e centrifugada a 3000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e 10 mL foram adicionados aos 3 últimos compartimentos, juntamente com 500 mL de meio basal para alimentação e crescimento do inóculo bacteriano (Oliveira *et al.*, 2023).

O meio de alimentação basal utilizado no SHIME® foi preparado em água destilada, constituído de 4,0 g/L de amido (Maizena, São Paulo, BR), 4,0 g/L de mucina (Sigma, St. Louis, EUA), extrato de levedura 3,0 g/L (Difco, Becton Dickinson Co., Sparks, MD, EUA), 1,0 g/L arabinogalactana (Sigma, St. Louis, EUA), xilana 1,0 g/L (Sigma, St. Louis, EUA), peptona 1,0 g/L (Himedia, Mumbai, Índia), 0,5 g/L-cisteína (Sigma, St. Louis, EUA) e 0,4 g/L de glicose (Synth, Diadema, BR). A concentração dos compostos utilizados neste estudo foi baseada em pesquisas anteriores com SHIME® (BIANCHI *et al.*, 2018; ROSELINO *et al.*, 2020; SALGAÇO *et al.*, 2021). As condições do estômago foram simuladas no reator 1 pela adição de ácido clorídrico para regular o pH, junto com o meio à base de carboidratos. A passagem pelo duodeno foi simulada em 60 mL de suco pancreático artificial (12,5 g/L de bicarbonato de sódio, 6 g/L de Ovgall e 1,9 g/L de pancreatina, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) essencial para a adaptação ambiental e o crescimento do inóculo (Molly *et al.*, 1994).

Já os compartimentos que representam o cólon ascendente, transverso e descendente foram alimentados com o meio basal descrito, ajustado para manter as condições anaeróbicas e contendo os substratos necessários para a fermentação microbiana. Esse ambiente foi ajustado para atingir um pH de 5,6–5,9, simulando o gradiente ácido do cólon, e mantido a 37 °C sob agitação contínua (120 rpm) (Molly *et al.*, 1994; Possemiers *et al.*, 2004).

3.5.1 Protocolo Experimental

O experimento no SHIME® foi executado de forma contínua por um período de 5 semanas. Inicialmente foi realizada a fase de estabilização da microbiota, onde o meio alimentar basal (240 mL) e o suco pancreático (60 mL) foram inseridos no sistema durante 14 dias (Bianchi *et al.*, 2014). Após a estabilização, o tratamento foi administrado uma vez ao dia por 7 dias. Foram 3 estágios de tratamento: o primeiro (BGL) composto de 7,5 g de β -glucana, 240 mL de meio alimentar basal; o segundo tratamento (LA5) foi realizado com a adição de *L. acidophilus* LA5 (10^6 CFU/g) e 240 mL de meio alimentar basal; terceiro tratamento (BGL-LA5) foi a adição de *L. acidophilus* LA5 (10^6 CFU/g) + β -glucana e 240 mL de meio alimentar basal. As concentrações de BGL utilizadas foram de acordo com Van de Wiele *et al.* (2004), que utilizaram 2,5g de BGL para cada reator da triplicata do cólon, sendo essa concentração equivalente a uma dose de 5 g de BGL para humanos.

3.6 ANÁLISE DA MICROBIOTA COLÔNICA USANDO SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA

A extração do DNA bacteriano das amostras de fermentação no sistema SHIME® foi realizada utilizando o Kit DNeasy® PowerSoil® Pro (Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha), conforme as orientações do fabricante. Em seguida, foi realizada a preparação da biblioteca com *primers* específicos para a região V3-V4 do 16S rRNA, utilizando os *primers* 341F (CCTACGGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT). O sequenciamento dos amplicons bacterianos foi conduzido na plataforma Illumina MiSeq (PE 250) (San Diego, CA, EUA) (Oliveira *et al.*, 2023).

As análises de bioinformática foram realizadas usando o programa QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) versão 2019.7. Foram executadas as "*sequence demultiplexing*" eliminando assim as sequências de primer e código de barras associados. Para detectar e corrigir ruído de sequenciamento e remover sequências quiméricas, o método DADA2 foi usado. Após esses procedimentos, o conjunto de dados apresentou uma média de 21.464 leituras brutas. As sequências foram agrupadas em variantes de sequência de amplicon (ASV) com 99% de similaridade e, subsequentemente, classificadas com base em suas informações taxonômicas. A classificação foi realizada utilizando o *plugin* *q2-feature-*

classifier, que emprega o método de alinhamento de busca com o banco de dados SILVA v132 (Mesa *et al.*, 2022).

3.7 ATIVIDADE METABÓLICA MICROBIANA: DETERMINAÇÃO DE ÍONS AMÔNIO (NH_4^+) E ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA (AGCC)

Após a digestão simulada, as amostras do compartimento do cólon ($n = 3$) foram coletadas e armazenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Primeiramente, os íons amônio (NH_4^+) foram quantificados de acordo com Bianchi *et al.* (2014) usando um medidor de íon específico (Modelo 710A, Orion) acoplado a um eletrodo de íon de amônia seletivo (Modelo 95-12, Orion). O eletrodo foi calibrado com diferentes padrões, sendo estes de 10, 100 e 1000 ppm (Thermo – Orion, MA, US) e em seguida, foram realizadas as leituras de 10 mL de amostras adicionadas de 0,2 mL da solução para ajuste de força iônica – ISA. A leitura foi realizada em triplicata, com temperatura de $25\text{ }^\circ\text{C}$ e sob agitação a 120 rpm. Os resultados obtidos foram divididos pela massa molar do NH_4^+ (18,04 g/mol), sendo este expresso em mmol/L.

Os AGCC foram analisados de acordo com o protocolo adotado por Oliveira *et al.* (2023). As amostras do controle e dos tratamentos (BGL, LA5 e LA5-BGL) foram centrifugadas a 14000 g por 5 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$, e o sobrenadante foi diluído em água ultrapura na proporção de 1:20 (v/v). Em seguida, o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de membrana Millex-HA de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore Co., Bedford, MA, EUA). As amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás Agilent (modelo HP-6890, Santa Clara, CA, EUA) equipado com um detector seletivo de massa Agilent HP-5975 o qual utilizava uma coluna capilar DB-WAX ($60\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$). As condições utilizadas foram temperatura do injetor = $220\text{ }^\circ\text{C}$, coluna = $35\text{ }^\circ\text{C}$, $2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, $38\text{ }^\circ\text{C}$; $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, $75\text{ }^\circ\text{C}$; $35\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, $120\text{ }^\circ\text{C}$ (1 min), $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, $170\text{ }^\circ\text{C}$ (2 min); $40\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, $170\text{ }^\circ\text{C}$ (2 min) e detector = $250\text{ }^\circ\text{C}$. A vazão foi ajustada para 1 mL/min; gás hélio foi usado como gás de arraste. Soluções estoque de ácidos acético, propiônico e butírico foram usadas para construir as curvas analíticas (curvas $R^2 \geq 0,999$). Os resultados foram expressos em mmol/g de fezes.

3.8 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS (IL-6, IL-10 E TNF- α) USANDO CO-CULTURA DE CÉLULAS CACO-2 E THP-1

Para investigar os efeitos imunomoduladores dos metabólitos microbianos derivados de SHIME®, foi realizada a co-cultura de células Caco-2 (Código BCRJ, 0059 – ATCC HTB-37)

e células de monócitos humanos THP-1 (Código BCRJ, 0234 – Código ATCC, TIB-202), conforme descrito por Satsu *et al.* (2006) e Possemeiers *et al.* (2013). Brevemente, células Caco-2 foram semeadas (8×10^4 células/poço) em Transwell de 24 poços com inserções de poros de $0,4 \mu\text{m}$, (Greener Bio-one, Wemmel, Bélgica). Monocamadas de células Caco-2 foram cultivadas por 14 dias, e o meio foi substituído a cada 4 dias, até obter a monocamada de células. As células foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies, Gent, Bélgica) (Life Technologies) e 10% (v/v) de soro fetal bovino ativado por calor (SFB; Life Technologies).

As células THP-1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 e 10% (v/v) de SFB, e semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 5×10^5 células/poço. Essas células foram tratadas com 50 ng/mL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA; Sigma-Aldrich) por 48 horas para induzir a diferenciação em células semelhantes a macrófagos. Em seguida, as células Caco-2 foram colocadas em insertos de transwells sobre células THP-1 diferenciadas por PMA, conforme descrito anteriormente por Possemiers *et al.* (2013). O compartimento apical, que continha as células Caco-2, foi preenchido com suspensões colônicas do SHIME® esterilizadas através de filtragem com filtro Millex-HA de $0,22 \mu\text{m}$ (diluídas 1:5 (v/v) em meio de cultura Caco-2, coletadas dos grupos tratados com BGL, LA5 e LA5-BGL, com 7 dias de tratamento em cada grupo. Como controle, as células também foram expostas apenas ao meio de cultura Caco-2. Após a remoção do sobrenadante, as células THP-1 diferenciadas em PMA foram estimuladas com meio de cultura Caco-2 contendo 100 ng/mL de LPS (*Escherichia coli*, Sigma) ou apenas com meio sem LPS como controle. Após 24 horas de estimulação com LPS, o sobrenadante foi coletado para medição de citocinas como IL-6 e IL-10 humanas por ELISA (HU BD OPTeia ELISA, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata, e as células foram incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada de ar/ CO_2 (95:5, v/v). As concentrações mínimas detectáveis foram de 4,7 pg/mL para IL-6 e 7,8 pg/mL para IL-10 (HU BD OPTeia ELISA, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Todos os procedimentos foram seguidos conforme as instruções do fabricante.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises foram conduzidas em triplicata em três experimentos independentes, e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Os dados referentes a AGCC, amônia

e citocinas foram analisados por análise de variância (ANOVA) para identificar diferenças significativas com um nível de significância de 5%, seguidas pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*. A análise estatística foi conduzida usando o *software* computacional *GraphPad Prism*, versão 8.0 (La Jolla, EUA).

Para avaliar a riqueza e comparar a diversidade da comunidade bacteriana nas amostras, foram calculadas as métricas de diversidade alfa, como o índice de Chao1 e os índices de Shannon e Simpson. As diferenças entre os grupos bacterianos foram analisadas utilizando o teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste *post-hoc* de *Tukey*. Para a análise de diversidade beta, foi realizada uma análise de coordenadas principais (PCoA), calculando as distâncias *UniFrac* ponderadas e não ponderadas, utilizando métodos baseados em permutação (PERMANOVA) com o pacote Adonis R (Mesa *et al.*, 2022).

A análise de correlação entre grupos microbianos e produtos metabólicos foi realizada através do teste de correlação de *Spearman* usando a função *cor.mtest* do pacote estatístico *corrplot* (Wei *et al.*, 2022).

4 RESULTADOS

A partir dos resultados foi elaborado o artigo apresentado no apêndice A, intitulado “ β -glucan alone or combined with *Lactobacillus acidophilus* positively influences the bacterial diversity and metabolites in the colonic microbiota of type II diabetic patients” que aborda os efeitos da administração da β -glucana em combinação com *L. acidophilus* na composição e metabolismo da microbiota intestinal de indivíduos diabéticos, utilizando o SHIME®. Os resultados demonstraram que todos os tratamentos apresentaram eficácia em aumentar a abundância de *Bacteroides*, *Alistipes*, *Lactobacillus*, *Subdoligranulum* e *Acidaminococcus*, assim como em elevar a produção de AGCC e a citocina anti-inflamatória IL-10 em comparação ao grupo controle. Entre os tratamentos, a administração de BGL destacou-se por sua superior eficácia em aumentar a diversidade microbiana, elevar os níveis de AGCC e aumentar a produção de IL-10. Além disso, o tratamento LA5 foi o mais eficiente em reduzir os níveis de íons amônia. Os resultados deste estudo indicam a necessidade de ensaios clínicos em larga escala para confirmar os efeitos na microbiota intestinal e nos parâmetros metabólicos de pacientes com DMT2, além de apontar o potencial para o desenvolvimento de produtos funcionais sustentáveis a partir de subprodutos industriais.

REFERÊNCIAS

- ADESHIRLARIJANEY, A.; GEWIRTZ, A. T. Considering gut microbiota in treatment of type 2 diabetes *mellitus*. **Gut microbes**, v. 11, n. 3, p. 253-264, 2020.
- ÁLVAREZ, J. *et al.* Microbiota Intestinal y Salud. **Gastroenterología y Hepatología**, 2021.
- ALVES, J. S. D. **Dieta cetogênica com alto teor de gordura saturada na lactação: efeitos sobre crescimento somático, parâmetros bioquímicos e microbiota intestinal na prole de ratos jovens. 2021.** Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION PROFESSIONAL PRACTICE COMMITTEE. 2. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2024. **Diabetes Care**, v. 47, suplemento 1, p. S20–S42. 2024.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Standards of Medical Care in Diabetes—2021:** Summary of Revisions. *Diabetes Care*, v. 44, n. Supplement 1, JAN 2021. Disponível em: Acesso em: 15 out. 2024.
- ASHAOLU, T. J. *et al.* Human colonic microbiota modulation and branched chain fatty acids production affected by soy protein hydrolysate. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 1, p. 141-148, 2019.
- ATANASOV, J. *et al.* The effects of β -glucans on intestinal health. **Ernahrungs Umschau**, v. 67, n. 3, p. 52-9, 2020.
- BARTHOW, C. *et al.* Food 4 Health-He Oranga Kai: Assessing the efficacy, acceptability and economic implications of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and β -glucan to improve glycated haemoglobin, metabolic health, and general well-being in adults with pre-diabetes: study protocol for a 2× 2 factorial design, parallel group, placebo-controlled randomized controlled trial, with embedded qualitative study and economic analysis. **Trials**, v. 20, n. 1, p. 464, 2019.
- BASHIR, K. M. I.; CHOI, J. S. Clinical and physiological perspectives of β -glucans: The past, present, and future. **International Journal of Molecular Sciences**, United States, v. 18, n. 9, p. 1-48. 2017.
- BASTOS, R. *et al.* Brewer's yeast polysaccharides—A review of their exquisite structural features and biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 277, n. 1, p. 118826, 2022.
- BIANCHI, F. *et al.* Beneficial effects of fermented vegetal beverages on human gastrointestinal microbial ecosystem in a simulator. **Food Research International**, v. 64, p. 43-52, 2014.
- BORGES, M. M. B. SALHA, M. O. F. *et al.* **Prebióticos, probióticos e simbióticos reduzem hemoglobina glicada, glicemia de jejum e HOMA-IR no Diabetes Mellitus tipo 2: revisão**

sistemática. Trabalho de conclusão de Curso (TCC). Pontifícia Universidade Católica de Goiás. 2020.

BROSSEAU, C. *et al.* Prebiotics: Mechanisms and preventive effects in allergy. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1841, 2019.

CAIRES, S. S. G.; CHIACHIO, N. C. F. Prevalência de Hipertensão Arterial Sistêmica e Diabetes *Mellitus* entre os Trabalhadores da Indústria de Vitória da Conquista, Bahia. **ID on line Revista de Psicologia**, v. 14, n. 51, p. 132-143, 2020.

CAMPOS, M. R. *et al.* Medidas de ocorrência de diabetes *mellitus* e suas complicações crônicas: caracterização da oferta e demanda de serviços de saúde para Amazonas, Rio Grande do Sul e Brasil, 2012. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 32, n. 1, p. e32010085, 2024.

CAO Y. *et al.* Orally Administered Baker's Yeast β -Glucan Promotes Glucose and Lipid Homeostasis in the Livers of Obesity and Diabetes Model Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 44, p. 9665-9674, 2017.

CAO, Y. *et al.* Hypoglycemic activity of the Baker's yeast β -glucan in obese/type 2 diabetic mice and the underlying mechanism. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 12, p. 2678-2690, 2016.

CARVALHO, D. V.; GALLÃO, M. I.; DE BRITO, E. S. Obesidade e fibra dietética: destaque para a fibra de caju. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 43474-43488, 2020.

CARVALHO, K. A.; FALEIRO, C. P. Implantação de sistema de beneficiamento de levedura residual para produção de ração animal. **Sistemas & Gestão**, v. 16, n. 1, p. 77-83, 2021.

ČERNÁ, L. *et al.* Anti-inflammatory potential of composites of yeast glucan particles and geranylated flavonoid diplacone. **Ceska a Slovenska farmacie: casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti**, v. 69, n. 3, p. 130-136, 2020.

CHARLET, R. *et al.* A decrease in anaerobic bacteria promotes *Candida glabrata* overgrowth while β -glucan treatment restores the gut microbiota and attenuates colitis. **Gut Pathogens**, v. 10, p. 1-9, 2018.

COSTA, M. de S. Fibras alimentares *versus* obesidade: o nutriente não digerido na prevenção do excesso de peso. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 10, p. 1449-1459, 2021.

EL-SAYED, N. A. *et al.* 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023. **Diabetes Care**, v. 46, Suppl. 1, p. S19–S40, 2023.

FÁRCAŞ, A. C. *et al.* An update regarding the bioactive compound of cereal by-products: Health benefits and potential applications. **Nutrients**, v. 14, n. 17, p. 3470, 2022.

FELIPE, A. G. B. *et al.* Associações entre obesidade, resistência à insulina e diabetes *mellitus* tipo 2: revisão sistemática. **Revista Científica da Faculdade Quirinópolis**, v. 2, n. 11, p. 431-446, 2021.

GALICIA-GARCIA, U. *et al.* Pathophysiology of type 2 diabetes *mellitus*. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 17, p. 6275, 2020.

GALINDO, R. J. *et al.* Advances in the management of type 2 diabetes in adults. **BMJ Medicine**, v. 2, n. 1, p. e000372, 2023.

GAUTÉRIO, G. V. *et al.* β -glucan from brewer's spent yeast as a techno-functional food ingredient. **Frontiers in Food Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 1074505, 2022.

GELLER, A.; SHRESTHA, R.; YAN, J. Yeast-derived β -glucan in cancer: novel uses of a traditional therapeutic. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3618, 2019.

GIAMBÒ, F. *et al.* Toxicology and Microbiota: How Do Pesticides Influence Gut Microbiota? A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 11, p. 5510, 2021.

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

GOMES, B. F.; ACCARDO, C. de M. Mediadores imunoinflamatórios na patogênese do diabetes *mellitus*. **Einstein (São Paulo)**, v. 17, n. 1, p. 4596, 2019.

GUARINO, M. P. L. *et al.* Mechanisms of action of prebiotics and their effects on gastrointestinal disorders in adults. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1037, 2020.

GUDI, R. *et al.* Complex dietary polysaccharide modulates gut immune function and microbiota, and promotes protection from autoimmune diabetes. **Immunology**, v. 157, n. 1, p. 70-85, 2019.

GUEDES, J. da S. *et al.* Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. **LTW - Food Science and Technology**, v. 116, n. a, p. 108496, 2019.

GUIMARÃES, J. T. *et al.* Impact of probiotics and prebiotics on food texture. **Current Opinion in Food Science**, v. 33, n. a, p. 38-44, 2020.

HERMANS, L. *et al.* β -glucan-induced IL-10 secretion by monocytes triggers porcine NK cell cytotoxicity. **Frontiers in immunology**, v. 12, n. 1, p. 634402, 2021.

HILL, C. *et al.* Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the probiotic term. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.

HOLSCHER, H. D.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E. Evidence-Based Use of Probiotics, Prebiotics and Fermented Foods for Digestive Health. Uso baseado em evidências de probióticos, prebióticos e alimentos fermentados para a saúde digestiva. **Today's Dietitian. Revista Nutricionista de Hoje**, p. 24. 2021.

HOWSAWI, A. A.; ALEM, M. M. Clinical implications and pharmacological considerations of glycemic variability in patients with type 2 diabetes *mellitus*. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 24062, 2024.

INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION POPULATION HEALTH BUILDING. Brazil. Disponível em: <http://www.healthdata.org/brazil>. Acesso em: 11 jul. 2021.

JAEGGER, A. *et al.* Brewer's spent yeast (BSY), an underutilized brewing by-product. **Fermentation**, v. 6, n. 4, p. 123, 2020.

JEONG, Y. *et al.* The antioxidant, anti-diabetic, and anti-adipogenesis potential and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human and fermented foods. **Fermentation**, v. 7, n. 3, p. 123, 2021.

JESUS, T. M. de. **Participação dos receptores de lectinas do tipo C e do tipo Toll expressos nos neutrófilos no reconhecimento do *Trichophyton rubrum***. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

JUNIOR, L. C. L.; DIAS, S. S.; SIMAS, L. Alimentos funcionais na prevenção e tratamento de doenças crônicas não transmissíveis. **Boletim de Conjuntura (BOCA)**, v. 4, n. 10, p. 54-61, 2020.

KARABÍN, M. *et al.* Melhorar o desempenho das leveduras de cerveja. **Avanços da biotecnologia**, v. 36, n. 3, pág. 691-706, 2018.

KASSAIAN, N. *et al.* Probiotic and synbiotic supplementation could improve metabolic syndrome in prediabetic adults: A randomized controlled trial. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 5, p. 2991-2996, 2019.

KOBYLIAK, N. *et al.* Effect of alive probiotic on insulin resistance in type 2 diabetes patients: randomized clinical trial. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 12, n. 5, p. 617-624, 2018.

LI, J., *et al.* Periodontitis in elderly patients with type 2 diabetes *mellitus*: impact on gut microbiota and systemic inflammation. **Aging (Albany NY)**, v. 12, n. 24, p. 25956, 2020.

LIN, H.; HAN, R.; WU, W. Glucans and applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, p. 121904, 2024.

LOCKYER, S.; STANNER, S. Prebiotics—an added benefit of some fibre types. **Nutrition Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 74-91, 2019.

LOPES, L. A. A. *et al.* Spreadable goat Ricotta cheese added with *Lactobacillus acidophilus* La-05: Can microencapsulation improve the probiotic survival and the quality parameters?. **Food Chemistry**, v. 346, p. 128769, 2021.

LUNARDI, A. *et al.* Bactérias ácido-láticas não iniciadoras (NSLAB): Um desafio à indústria do queijo. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 26383-26409, 2021.

LUO, J. *et al.* Purified β -glucans of different molecular weights enhance growth performance of LPS-challenged piglets via improved gut barrier function and microbiota. **Animals**, v. 9, n. 9, p. 602, 2019.

MACEDO, L. L. VIMERCATI, W. C. ARAÚJO, C. da S. Fruto-oligossacarídeos: Aspectos nutricionais, tecnológicos e sensoriais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, n. a, p. e2019080, 2020.

MAGNANI, M. *et al.* Optimized methodology for extraction of $(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)$ - β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 658-665, 2009.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. B-glucana de *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 631-649, 2008.

MARSON, G. V. *et al.* Spent brewer's yeast as a source of high added value molecules: A systematic review on its characteristics, processing and potential applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 95, 2020.

MATENCHUK, B. A.; MANDHANE, P. J.; KOZYRSKYJ, A. L. Sleep, circadian rhythm, and gut microbiota. **Sleep Medicine Reviews**, v. 53, n. a, p. 101340, 2020.

MEDEIROS, V. P. B. *et al.* Spirulina platensis biomass enhances the proliferation rate of *Lactobacillus acidophilus* 5 (La-5) and combined with La-5 impact the gut microbiota of medium-age healthy individuals through an in vitro gut microbiome model. **Food Research International**, v. 154, n. a, p. 110880, 2022.

MELO, F. H. C. *et al.* Prebiotic activity of monofloral honeys produced by stingless bees in the semi-arid region of Brazilian Northeastern toward *Lactobacillus acidophilus* LA-05 and *Bifidobacterium lactis* BB-12. **Food Research International**, v. 128, n. a, p. 108809, 2020.

MENG, L. *et al.* The nutrient requirements of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and their application to fermented milk. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 1, p. 138-150, 2021.

MESA, V. *et al.* Gut microbiota alterations in critically ill older patients: a multicenter study. **BMC geriatrics**, v. 22, n. 1, p. 373, 2022.

MILANOVIĆ, V. *et al.* Erythromycin-resistant lactic acid bacteria in the healthy gut of vegans, ovo-lacto vegetarians and omnivores. **PloS one**, v. 14, n. 8, p. e0220549, 2019.

MOLLY, K. *et al.* Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganism-associated activities. **Microbial ecology in health and disease**, v. 7, n. 4, p. 191-200, 1994.

MÜLLER, V. M. *et al.* Diabetes tipo 1 e suas principais complicações. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 24, n. 1, p. e14646-e14646, 2024.

MUTHURAMALINGAM, K. *et al.* Dietary intervention using (1, 3)/(1, 6)- β -glucan, a fungus-derived soluble prebiotic ameliorates high-fat diet-induced metabolic distress and alters beneficially the gut microbiota in mice model. **European Journal of Nutrition**, v. 59, n. 6, p. 2617-2629, 2020.

MUZY, J. *et al.* Prevalência de diabetes *mellitus* e suas complicações e caracterização das lacunas na atenção à saúde a partir da triangulação de pesquisas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 5, p. e00076120, 2021.

NASCIMENTO, L. P. **Elaboração de Projetos de Pesquisa - Monografia, Dissertação, Tese e Estudo de Caso, Com Base Em Metodologia Científica**. 2012.

NEVES, N. A. **Evolução dos prebióticos: novas aplicações, evidências científicas e impacto na saúde**. 2023. Revisão temática (1º ciclo em Ciências da Nutrição) — Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, 2024.

OLIVEIRA, L. I. G. *et al.* Revealing the beneficial effects of a dairy infant formula on the gut microbiota of early childhood children with autistic spectrum disorder using static and SHIME® fermentation models. **Food & Function**, v. 14, n. 19, p. 8964-8974, 2023.

ONG, K. L. *et al.* Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. **The Lancet**, v. 402, n. 10397, p. 203-234, 2023.

ONISZCZUK, A. *et al.* Role of gut microbiota, probiotics and prebiotics in the cardiovascular diseases. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1172, 2021.

ONUR, E. *et al.* Investigation of the supportive therapy potential of propolis extract and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 milk combination against breast cancer in mice. **Cytokine**, v. 149, n. a, p. 155743, 2022.

ORTIZ-MARTÍNEZ, M. *et al.* Recent developments in biomarkers for diagnosis and screening of type 2 diabetes *mellitus*. **Current diabetes reports**, v. 22, n. 3, p. 95-115, 2022.

PANTOJA, C. L., *et al.* Diagnóstico e tratamento da disbiose: Revisão Sistemática. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 32, p. e1368-e1368, 2019.

PAUL, P. *et al.* The effect of microbiome-modulating probiotics, prebiotics and synbiotics on glucose homeostasis in type 2 diabetes: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of clinical trials. **Pharmacological research**, v. 185, n. 1, p. 106520, 2022.

PICCIONI, A. *et al.* How do diet patterns, single foods, prebiotics and probiotics impact gut

microbiota?. **Microbiology Research**, v. 14, n. 1, p. 390-408, 2023.

PINTO, M. I. T. **A influência do Microbiota Intestinal na fisiopatologia da Obesidade e Diabetes Mellitus tipo 2**. Tese (Doutorado) — Universidade de Coimbra, Coimbra, 2019.

PORTINCASA, P. *et al.* Gut microbiota and short chain fatty acids: implications in glucose homeostasis. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 3, p. 1105, 2022.

POSSEMIERS, S. *et al.* A dried yeast fermentate selectively modulates both the luminal and mucosal gut microbiota and protects against inflammation, as studied in an integrated in vitro approach. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 39, p. 9380-9392, 2013.

POSSEMIERS, S. *et al.* Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. **International journal of food microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 97-103, 2010.

POSSEMIERS, S. *et al.* PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, n. 3, p. 495-507, 2004.

POSSEMIERS, S. *et al.* The prenylflavonoid isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) is activated into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 7, p. 1862-1867, 2006.

RAZMPOOSH, E. *et al.* The effect of probiotic supplementation on glycemic control and lipid profile in patients with type 2 diabetes: A randomized placebo controlled trial. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 1, p. 175-182, 2019.

REZENDE, E. S. V.; LIMA, G. C.; NAVES, M. M. V. Dietary fibers as beneficial microbiota modulators: A proposal classification by prebiotic categories. **Nutrition**, v. 89, n. a, p. 111217, 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.

ROSELINO, M. N. *et al.* Effect of fermented sausages with probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 on gut microbiota using dynamic colonic model. **LWT- Food Science and Technology**, v. 132, n. a, p. 1–8, 2020.

RUBIO, F. T. V. *et al.* Utilization of grape pomaces and brewery waste *Saccharomyces cerevisiae* for the production of bio-based microencapsulated pigments. **Food Research International**, v. 136, n. a, p. 109470, 2020.

RUIZ-HERRERA, J.; ORTIZ-CASTELLANOS, L. Cell wall glucans of fungi. A review. **The Cell Surface**, v. 5, n. a, p. 100022, 2019.

RUSSO, S. *et al.* Meta-inflammation and metabolic reprogramming of macrophages in diabetes and obesity: the importance of metabolites. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. a, p. 746151, 2021.

SAKKAS, H. *et al.* Nutritional status and the influence of the vegan diet on the gut microbiota and human health. **Medicina**, v. 56, n. 2, p. 88, 2020.

SALAZAR, J., *et al.* Microbiota and diabetes *mellitus*: role of lipid mediators. **Nutrients**, v. 12, n. 10, p. 3039, 2020.

SALGAÇO, M. K., *et al.* Relationship between gut microbiota, probiotics, and type 2 diabetes *mellitus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 23, p. 9229-9238, 2019.

SALGAÇO, M. K. *et al.* Impact of *Lactobacillus acidophilus*—La5 on Composition and Metabolism of the Intestinal Microbiota of Type 2 Diabetics (T2D) and Healthy Individuals Using a Microbiome Model. **Fermentation**, v. 9, n. 8, p. 740, 2023.

SAMPAOLESI, S. *et al.* The synthesis of soluble and volatile bioactive compounds by selected brewer's yeasts: Antagonistic effect against enteropathogenic bacteria and food spoiler—toxigenic *Aspergillus sp.* **Food Chemistry: X**, v. 13, p. 100193, 2022.

SANTAMARINA, A. B. *et al.* The symbiotic effect of a new nutraceutical with yeast β -glucan, prebiotics, minerals, and *silybum marianum* (Silymarin) for recovering metabolic homeostasis via pgc-1 α , il-6, and il-10 gene expression in a type-2 diabetes obesity model. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, p. 447, 2022.

SATSU, H. *et al.* Induction by activated macrophage-like THP-1 cells of apoptotic and necrotic cell death in intestinal epithelial Caco-2 monolayers via tumor necrosis factor- α . **Experimental Cell Research**, v. 312, n. 19, p. 3909-3919, 2006.

SCHEPPER, J. D. *et al.* Probiotics in gut-bone signaling. **Understanding the gut-bone signaling axis**, v. 1033, n. a, p. 225-247, 2017.

SHOKRYAZDAN, P. *et al.* Probiotics: from isolation to application. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 36, n. 8, p. 666-676, 2017.

SILLER, A. F. *et al.* Challenges in the diagnosis of diabetes type in pediatrics. **Pediatric Diabetes**, v. 21, n. 7, p. 1064-1073, 2020.

SILVA, P. C. da *et al.* Identificação de cepas do gênero *Lactobacillus* com potencial probiótico isoladas do trato gastrointestinal de suínos. **Episteme Transversalis**, v. 11, n. 1, 2020.

SIMA, P.; VANNUCCI, L.; VETVICKA, V. β -glucans and cholesterol. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n. 4, p. 1799-1808, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2019-2020. **Diretrizes 2019-2020**. São Paulo, Editora Clannad, 2020.

SOCIETE BRASILEIRA DE DIABETES. Tratamento do DM2 no SUS: Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes. 2024. Disponível em: <https://diretriz.diabetes.org.br/tratamento-do-dm2-no-sus/>. Acesso em: 12 nov. 2024.

SPACEK, J. *et al.* Immunomodulation with β -glucan from *Pleurotus ostreatus* in patients with endocrine-dependent breast cancer. **Immunotherapy**, v. 14, n. 1, p. 31-40, 2022.

SWANSON, K. S. *et al.* Declaração de consenso da Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ISAPP) sobre a definição e o escopo dos simbióticos. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 11, p. 687-701, 2020.

TAFOYA, J. E. Designing a Culturally Relevant Lifestyle Modification Guide for Primary Care Providers to Improve Diabetes Management in the Hispanic Population. **Capstone & Scholarly Projects**, v. a, n. 122, p. 116. 2023.

TAKEUCHI, T. *et al.* Gut microbial carbohydrate metabolism contributes to insulin resistance. **Nature**, v. 621, n. 7978, p. 389-395, 2023.

TAVARES, L. M. *et al.* **Efeitos do simbiótico *Lactobacillus delbrueckii* CIDCA133 e Fruto-oligossacarídeos (FOS) na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em modelo animal.** Dissertação (Mestrado em Genética) — Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, 2021. 2021.

THAISS, C. A. *et al.* A hiperglicemia leva à disfunção da barreira intestinal e ao risco de infecção entérica. **Science**, v. 359, n. 6382, p. 1376-1383, 2018.

TOMOVA, A. *et al.* The effects of vegetarian and vegan diets on gut microbiota. **Frontiers in nutrition**, v. 6, n. a, p. 47, 2019.

TONG, H. V. *et al.* Adiponectin and pro-inflammatory cytokines are modulated in Vietnamese patients with type 2 diabetes *mellitus*. **Journal of diabetes investigation**, v. 8, n. 3, p. 295-305, 2017.

VALLIANOU, N. G.; STRATIGOU, T.; TSAGARAKIS, S. Metformin and gut microbiota: their interactions and their impact on diabetes. **Hormones**, v. 18, n. 2, p. 141-144, 2019.

VAN DE WIELE, T. *et al.* Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 1, p. 143-153, 2004.

VITETTA, L. *et al.* Prebiotics progress shifts in the intestinal microbiome that benefits patients with type 2 diabetes *mellitus*. **Biomolecules**, v. 13, n. 9, p. 1307, 2023.

VRIES, H. *et al.* Impact of Yeast-Derived β -Glucans on the Porcine Gut Microbiota and Immune System in Early Life. **Microorganisms**, v. 8, p. 1573, 2020.

VUSCAN, P. *et al.* Potent induction of trained immunity by *Saccharomyces cerevisiae* β -glucans. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1323333, 2024.

WAGENER, J.; STRIEGLER, K.; WAGENER, N. α - and β -1, 3-Glucan Synthesis and Remodeling. **The Fungal Cell Wall**, v. 425, n. a, p. 53-82, 2020.

WANG, H. *et al.* Yeast β -glucan, a potential prebiotic, showed a similar probiotic activity to inulin. **Food & Function**, v. 11, n. 12, p. 10386-10396, 2020.

WANG, N. *et al.* Yeast β -D-glucan exerts antitumour activity in liver cancer through impairing autophagy and lysosomal function, promoting reactive oxygen species production and apoptosis. **Redox Biology**, v. 32, n. a, p. 101495, 2020.

WANG, X. *et al.* Natural Polysaccharide β -Glucan Protects against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Suppressing Oxidative Stress. **Nutrients**, v. 14, n. 4, p. 906, 2022.

WANG, Y. *et al.* Health state utility values of type 2 diabetes *mellitus* and related complications: a systematic review and meta-regression. **Health and Quality of Life Outcomes**, v. 22, n. 1, p. 1-22, 2024.

WANG, Y. *et al.* Probiotics and Prebiotics as Dietary Supplements for the Adjunctive Treatment of Type 2 Diabetes. **Polish Journal of Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 3-9, 2023.

WEI, T., SIMKO, V. R package “corrplot”: Visualization of a correlation matrix. 2021. <https://github.com/taiyun/corrplot>

WONDMKUN, Y. T. Obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes: associations and therapeutic implications. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 13, p. 3611, 2020.

WONG, M.W. *et al.* Impact of vegan diets on gut microbiota: An update on the clinical implications. **Tzu-Chi Medical Journal**, v. 30, n. 4, p. 200, 2018.

YADAV, M. K. *et al.* Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 2, p. 505-521, 2022.

YAN, Y. *et al.* Prevalence, awareness and control of type 2 diabetes *mellitus* and risk factors in Chinese elderly population. **BMC Public Health**, v. 22, n. 1, p. 1382, 2022

YANG, F. *et al.* Attenuation of inflammatory bowel disease by oral administration of mucoadhesive polydopamine-coated yeast β -glucan via ROS scavenging and gut microbiota regulation. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 22, n. 1, p. 166, 2024.

ZENE, K. L. *et al.* Ação de prebióticos e próbióticos em indivíduos com câncer colorretal: revisão integrativa. **Revista Uningá Review**, v. 29, n. 3, 2017.

ZHANG, X. *et al.* Preventive Role of Salsalate in Diabetes Is Associated With Reducing Intestinal Inflammation Through Improvement of Gut Dysbiosis in ZDF Rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. a, p. 300, 2020.

ZHANG, X. F. *et al.* Clinical effects and gut microbiota changes of using probiotics, prebiotics or synbiotics in inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Nutrition**, v. 60, n. 21, p. 2855-2875, 2021.

ZHEN, W. *et al.* Yeast β -glucan altered intestinal microbiome and metabolome in older

hens. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. a, p. 766878, 2021.

ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020.

ZHENG, Y.; LEY, S.H.; HU, F.B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes *mellitus* and its complications. **Nature Reviews. Endocrinology**, v.14, n.2, p.88-98, 2018.

ZHOU, Z. *et al.* Gut microbiota: an important player in type 2 diabetes *mellitus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 834485, 2022.

ZHU, Fengmei; DU, Bin; XU, Baojun. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. **Food Hydrocolloids**, v. 52, n. a, p. 275-288, 2016.

ZHU, Z. *et al.* Yeast β -glucan modulates macrophages and improves antitumor NK-cell responses in cancer. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 214, n. 1, p. 50-60, 2023.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO

PERIÓDICO: Probiotics and Antimicrobial Proteins

ÁREA: Ciência de Alimentos

QUALIS: A3

ISSN: 1867-1306

FATOR DE IMPACTO: 4.4

RESEARCH



β -Glucan Alone or Combined with *Lactobacillus acidophilus* Positively Influences the Bacterial Diversity and Metabolites in the Colonic Microbiota of Type II Diabetic Patients

Jéssika Rodrigues Clementino¹ · Louise Iara Gomes de Oliveira¹ · Mateus Kawata Salgado² · Felipe Lopes de Oliveira² · Victoria Mesa^{3,4} · Josean Fechine Tavares⁵ · Ludmilla Silva-Pereira⁶ · Breno Vilas Boas Raimundo⁶ · Karen Cristina Oliveira⁶ · Alexandra Ivo Medeiros⁶ · Francieli Araújo Silva¹ · Katia Sivieri² · Marciane Magnani¹

Accepted: 14 February 2025

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2025

Abstract

β -Glucan is a fermentable polysaccharide with prebiotic properties that has been shown to improve metabolic indicators. This study evaluated the effects of spent brewer's yeast β -glucan (BGL) and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (10^6 CFU/g) (LA5) alone and in combination (LA5-BGL) on the composition of the fecal microbiome of adults with type 2 diabetes mellitus (T2DM) using the Human Gut Microbial Ecosystem Simulator (SHIME®). Short-chain fatty acids (SCFAs), ammonium ions, and cytokines (IL-6 and IL-10) were measured. BGL, LA5, and LA5-BGL increased ($p < 0.05$) the richness and diversity of microbial communities in the gut microbiome of individuals with T2DM. All treatments increased ($p < 0.05$) the abundance of *Bacteroides*, *Alistipes*, *Lactobacillus*, *Subdoligranulum*, and *Acidaminococcus*, along with increased ($p < 0.05$) production of SCFAs and anti-inflammatory cytokine (IL-10) compared to the control group. BGL treatments showed a greater increase in microbial diversity, SCFAs levels (butyric, propionic, and acetic acid), and the anti-inflammatory cytokine (IL-10). LA5 showed the highest decrease in ammonium ion levels. Results indicate that BGL may have a prebiotic and immunomodulatory effect on the fecal microbial community and metabolic indicators in adults with type 2 diabetes mellitus (T2DM). Findings underscore the role of BGL as a prebiotic food.

Keywords β -glucan · Gut microbiota · Short-chain fatty acids · Functional foods · SHIME®

Introduction

Diabetes mellitus refers to metabolic diseases, including type 2 diabetes mellitus (T2DM), type 1 diabetes mellitus (T1DM), pre-diabetes, and gestational diabetes. Diabetes affects approximately 10.5% of the global population aged between 20 and 79 [1, 2]. T2DM is responsible for approximately 90% of cases of the disease and is considered the most common type. It is characterized by progressive metabolic disorders that reach insulin resistance and/or dysfunction of pancreatic β cells [2].

The connection between gastrointestinal microbiome and the prevention, development, and treatment of T2DM has been extensively investigated [3–5]. A balanced gut microbiome plays a vital role in intestinal permeability, metabolic regulation, glucose and lipid metabolism, insulin sensitivity, and the modulation of inflammation and the immune system [6]. Conversely, dysbiosis, characterized by an imbalance

Jéssika Rodrigues Clementino and Louise Iara Gomes de Oliveira had equal participation in the paper.

✉ Marciane Magnani
magnani2@gmail.com

¹ Laboratory of Microbial Processes in Foods, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

² Department of Food and Nutrition, São Paulo State University, Araraquara, Brazil

³ School of Nutrition and Dietetics, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁴ Faculty of Pharmacy, Université Paris Cité, Paris, France

⁵ Department of Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

⁶ Department of Biological Sciences, São Paulo State University, Araraquara, São Paulo, Brazil

Published online: 26 February 2025

Springer

in the intestinal microbiome, influences the development of metabolic diseases due to alterations in biochemical, inflammatory, and immunological response pathways [3, 7].

It has been observed that the decrease of butyrate-producer microorganisms, such as *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, and *Roseburia intestinalis*, characterizes the gut microbiota of individuals with T2DM. Reduction in levels of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10) has also been recognized as a marker in T2DM patients [3]. In contrast, an increase in the abundance of *Lachnospira*, *Clostridium sensu stricto* 1, *Escherichia-Shigella*, and *Enterococcus*, and pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-17, and TNF- α) was found in T2DM patients, and this imbalance has been linked to insulin resistance and inflammation [8–10].

Diet significantly impacts gut microbiota composition, mainly due to the consumption of dietary fiber, prebiotics, and probiotics [4, 11]. Prebiotics are dietary components resistant to digestion that selectively promote the proliferation and function of beneficial bacterial species in the gastrointestinal tract [12]. Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host [13]. Preclinical and clinical trials involving a short-term dietary intervention using prebiotics and probiotics show an increase in bacterial populations associated with health benefits to the host [14–18]. Therefore, modulation of the gut microbiome through these functional components can be considered a potential strategy for managing T2DM.

β -Glucan is a fermentable polysaccharide composed of a series of D-glucose units linked by a β -glycosidic bond, with differences in molecular structure according to the source (basic linear β -1,3 structure form for bacteria, both β -1,3 and β -1,4 backbone bond for cereal, and mostly β -1,3-d-glucose side chains at β -1,6 branching points for fungi), and that can be incorporated into the diet as a source of dietary fiber with prebiotic potential [19]. Clinical studies have shown that consumption of oat β -glucan as a supplement [20] or in enriched bread [21] reduced glycated hemoglobin in T2DM patients. It is known that the β -glucan chains may be different in the different sources and that the bioactivity and functionality of β -glucan are influenced by the structure [19–22]. β -Glucans obtained from spent brewer's yeast exerted prebiotic effects in vitro, increasing the survival of *Lactobacillus* strains during storage and in vitro digestion and protecting against membrane damage [23]. Furthermore, β -glucans obtained from spent brewer's yeast have demonstrated the ability to improve metabolic indicators, restoring homeostasis in several models of metabolic disorders such as T2DM [17]. As a result, spent brewer's yeast β -glucans can become an environmentally friendly active component in the diet of patients with T2DM.

Furthermore, studies using probiotic strains, mainly from the genus *Lactobacillus*, have demonstrated positive

effects on modulating the gut microbiome, stimulating the growth of beneficial bacteria, producing short-chain fatty acids (SCFAs), and reducing ammonia levels. In addition, they improve glucose tolerance, lower serum lipids, increase immune system activity, and mitigate oxidative stress associated with T2DM [12, 15–17, 24].

No prior studies evaluated the impact of β -glucan isolated from yeast alone or in association with probiotics on modulating the microbiota of adult individuals with T2DM using in vitro dynamic simulation models. In addition, although the prebiotic effects of β -glucan are well documented, studies demonstrating its effects on inflammatory cytokine production remain scarce. Therefore, this study determined the modulating impact of spent brewer's yeast β -glucan (BGL) and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (10^6 CFU/g) (LA5) alone and in combination (LA5-BGL) on the fecal microbiome composition of adults with T2DM using the Human Intestinal Microbial Ecosystem Simulator (SHIME®) and measuring fermentation metabolites and cytokines.

Materials and Methods

Obtaining the Spent Brewer's Yeast β -Glucan Prebiotic

β -Glucan was obtained from yeast cream discarded and donated by an international brewery company after five fermentation processes, according to the methodology proposed by Magnani et al. [25], that provides the β -glucan with 99% purity.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy verified the polymer's identity. The ^{13}C and ^1H NMR spectra were obtained using 50 mg of β -glucan dissolved in deuterated dimethyl sulfoxide ($\text{DMSO}-d_6$) [21]. The equipment used was a Varian NMR spectrometer (500 MHz), and the conditions used were 125 MHz and 500 MHz for ^{13}C and ^1H , respectively. Chemical signals were reported in ppm.

L. acidophilus LA-5 Probiotic Strain

The *L. acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen S.A., São Paulo, Brazil) was grown in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Hi-Media, Mumbai, India) for 24 h at 37 °C under anaerobic conditions (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). After cultivation, the cells were centrifuged ($4500 \times g$, 15 min, 4 °C), washed, and resuspended in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL). Cell suspensions were standardized at 0.8 optical density at 660 nm, corresponding to ~ 6 log CFU/mL.

Obtaining the Fecal Inoculum

Fecal samples from 5 donors diagnosed with T2DM (3 men and 2 women aged between 47.5 ± 1.29 years; BMI 27.7 ± 0.48) were recruited in Araraquara city (SP, Brazil). All the procedures were previously approved by the Human Ethics Committee of the Paulista State University, Araraquara; CAAE: 100 30156020.8.0000.5426. Volunteers matched the inclusion criteria. The inclusion criteria were: (1) female or male sex, (2) age between 45 and 50 years, (3) minimum of 3 months without intake of dietary supplements and gastrointestinal medications, and (4) minimum of 6 months without use of antibiotics, probiotics or prebiotics. All volunteers were not taking any hypoglycemic medications [16].

All donors received a fecal collection kit comprising sterile tubes and spatulas, disposable gloves, and 70% alcohol and were also instructed in advance about the hygienic conditions for carrying out the collection. The collected samples were placed in a bottle containing an anaerobic generating system (AnaeroGen®; Oxoid, Hampshire, United Kingdom) and immediately delivered to the laboratory for analysis.

Dynamic Colonic Fermentation using SHIME®

The dynamic colonic fermentation in SHIME® was evaluated in 5 compartments corresponding to the stomach, small intestine, ascending, transverse, and descending colon at 37 °C. Volume, pH, temperature, and time (24 h) were controlled by computer. In this experiment, we adapted the system to obtain biological triplicates of the ascending colon, as described previously by Salgado et al. [16]. The addition of nitrogen was used to control the anaerobiosis system, while the pH values of the compartments were adjusted to a range of 5.6 to 5.9 using HCl 1 M or NaOH 1 M [24].

The fecal pool (40 g) was obtained by homogenizing equal fresh fecal samples of each donor (8 g) following a dilution in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 6.5) (200 mL). The mixture was homogenized using Stomacher, submitted to centrifugation ($3000 \times g$, 15 min), and the supernatant was collected. Then, 10 mL of the fecal inoculum was added to the last 3 compartments, along with 500 mL of basal medium [26].

The basal food medium was prepared using distilled water, composed of starch (4.0 g/L) (Maizena, São Paulo, Brazil), mucin (4.0 g/L) (Sigma, St. Louis, USA), yeast extract (3.0 g/L) (Difco, Becton Dickinson Co., Sparks, MD, USA), arabinogalactan (1.0 g/L) (Sigma, St. Louis, USA), xylan (1.0 g/L) (Sigma, St. Louis, USA), peptone (1.0 g/L) (Himedia, Mumbai, India), cysteine (0.5 g/L) (Sigma, St. Louis, USA) and glucose (0.4 g/L) (Synth, Diadema, Brazil). Hydrochloric acid was used along with the medium to regulate the pH, simulating the stomach conditions in reactor

1. While the conditions of the duodenum (reactor 2) were simulated using artificial pancreatic juice (60 mL), which consisted of sodium bicarbonate (12.5 g/L), Oxgall (6 g/L), and pancreatin (1.9 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) [27].

SHIME® Experimental Protocol

The experiment on SHIME® was carried out continuously for 6 weeks. Firstly, the microbiota stabilization phase was carried out, where the basal food medium (240 mL) was inserted into the system for 14 days [28]. After stabilization, the basal food medium (240 mL) and pancreatic juice (60 mL) were inserted daily into the system for one week (control period). After the control period, treatment was administered once daily for 7 days. Three treatment stages were carried out, the first consisting of treatment with β -glucan (BGL) (7.5 g), and the basal food medium (240 mL). The second treatment (LA5) was carried out with the addition of *L. acidophilus* LA-5 (10^6 CFU/g) and the basal food medium (240 mL). The third treatment (LA5-BGL) consisted of the addition of *L. acidophilus* LA-5 (10^6 CFU/g) + β -glucan (7.5 g) and basal food medium (240 mL). The concentrations of β -glucan used followed Van de Wiele et al. [29], where 2.5 g of β -glucan was used for each reactor of the colon triplicate, equivalent to a dose of 5 g of β -glucan for humans.

Microbiological Analysis Using 16S rRNA Gene Sequencing

Samples collected during the SHIME® experiment were subjected to DNA extraction using the DNeasy® Pro Kit (Qiagen, Hilden, NRW, Germany) according to the manufacturer's instructions. The library was prepared using the 341F and 806R primers (V3-V4 region of 16S rRNA). Sequencing was done in the Illumina MiSeq platform (PE 250) (San Diego, CA, USA) [26].

The QIIME2 2019.7 was used for bioinformatics analyses. Samples were demultiplexed, and DADA2 was used to remove chimeric sequences. The data set resulted in an average of 21,464 raw reads. The sequences were grouped into amplicon sequence variants (ASV) with 99% similarity. The sequences were classified using the q2-feature-classifier plugin based on the search alignment method with the SILVA v132 database [30].

Metabolic Activity: Analysis of SCFAs, Ammonium (NH_4^+)

To quantify the SCFAs, samples were centrifuged ($14,000 \times g$, 5 min), the supernatant collected was diluted (ultrapure water; 1:20 v/v) and filtered using a 0.45 μm

Millex-HA membrane (Millipore Co., Bedford, MA, USA). Analyses were done in an Agilent gas chromatograph (model HP-6890, Santa Clara, CA, USA) coupled with an Agilent HP-5975 mass detector. The column used was a DB-WAX (60 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m) and the injection conditions were injector temperature at 220 °C, column at 35 °C, 2 °C/min, 38 °C; 10 °C/min, 75 °C; 35 °C/min, 120 °C (1 min), 10 °C/min, 170 °C (2 min); 40 °C/min, 170 °C (2 min) and detector at 250 °C. The flow rate was 1 mL/min, and helium gas was used as the carrier gas. Stock solutions of acetic, propionic and butyric acids were used to construct the analytical curves (R^2 curves ≥ 0.999). The results were expressed in mmol/g of feces Oliveira et al. [26].

The ammonium ions (NH_4^+) quantification followed the methodology described by Bianchi et al. [27] using a specific ion meter (Model 710A, Orion) coupled to an ammonium ion selective electrode (Model 95-12, Orion).

Determination of Cytokines (IL-6, IL-10, and TNF- α) Using Caco-2 and THP1 Cells Co-culture

To evaluate the immunomodulatory effects of metabolites derived from SHIME®, we co-culture Caco-2 cells (BCR1 Code, 0059 – ATCC HTB-37) and THP1 human monocytes cells (BCR1 Code, 0234 – ATCC Code, TIB-202), as described by Satsu et al. [31] and Possemiers et al. [30]. Briefly, the Caco-2 compartment was filled with sterilized SHIME® colonic suspensions (0.22 m) (diluted 1:5 (v/v) in Caco-2 culture media) collected from BGL, LA5, LA5-BGL and control groups on days 14 of treatment. Cells were also exposed to Caco-2 culture media alone in both chambers as a control. The supernatant was discarded and the PMA-differentiated THP1 cells were stimulated with Caco-2 culture media containing 100 ng/mL LPS (*Escherichia coli* Sigma®). Cells were also stimulated with media without LPS as a control. After 24 h of LPS stimulation, the supernatant was collected and cytokines IL-6 and IL-10 were quantified by Enzyme-linked immunosorbent assay (HU BD OPTIEA ELISA, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). The minimum detectable concentrations are 4.7 pg/ml for IL-6 and 7.8 pg/ml for IL-10.

Statistical Analysis

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation of triplicate obtained in three experiments. SCFAs, ammonia, and cytokines data were subjected to ANOVA considering $p < 0.05$, followed by Tukey's test. Analyses were performed in the GraphPad Prism 8.0 software.

Alpha diversity metrics, including the Chao1 index and Shannon and Simpson indices, were calculated to analyze the richness and compare the diversity of the bacterial community within the samples. Differences between bacterial groups

were assessed using the Kruskal–Wallis test and Tukey's post hoc test. For beta diversity analysis, principal coordinate analysis (PCoA) was performed by calculating weighted and unweighted UniFrac distances by PERMANOVA (Adonis R package) [30]. LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size) from the LEfSe tool (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/lefse/>), an algorithm for high-dimensional class comparisons between biological conditions, was used to determine the taxonomic features significantly different between groups. LDA scores were performed to estimate the effect size (score ≥ 3).

Correlation analysis between microbial groups and metabolite products was performed using Spearman's correlation test using the `cor.mtest` function of the `corrplot` statistics package [32].

Results

Characterization of (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -Glucan of Spent Brewer's Yeast Using ^{13}C NMR spectra

Due to the variety of species, the chemical structure and biofunction of 1,3- β -glucans can be highly divergent. To explore the effect of spent brewer's yeast β -glucan (99% of purity) on T2DM, we analyzed the ^{13}C NMR spectra of β -glucan with the corresponding compounds in the literature. We confirmed that the main chain is 1,3- β -glucan based on the signals observed at 103.1 ppm (C-1), 72.7 ppm (C-2), 73.3 ppm (C-3), 68.3 ppm (C-4), 76.4 ppm (C-5), and 69.9 ppm (C-6) (Supplementary Fig. 1). The NMR spectrum revealed the presence of anomeric carbons in the β configuration, with a peak identified at 103.1 ppm in C1 [23]. The C-3 signal appeared at 73.3 ppm, attributed to the β -(1,3)-linked structure [33]. In addition, the signals observed corresponding to the side chain carbons from 76.4 to 75.4 ppm refer to the C5 of the lateral glycosidic units in a β -(1 $\rightarrow$ 6) linkage [25]. Furthermore, the partial C-6 signal was shifted from 60.8 to 69.9 ppm, indicating the presence of β -(1,6)-linked side chains [33]. These changes are consistent with those previously recorded for 1,3- β -glucans [33], the indications were confirmed by 2D NMR and HSQC-TOCSY spectra. In the ^1H -1 NMR spectrum, the anomeric proton H-1 was located around 4.45 to 4.50 ppm, indicating that it was linked to β (the H-1 signal of the β configuration appeared between 4.00 and 5.00 ppm) [34].

Richness and Diversity of the Gut Microbiome of T2DM Individuals after Treatments with β -Glucan, *L. acidophilus* LA-5 and LA-5 Combined with β -Glucan

Alpha-diversity indices were used to access microbial richness (Chao1), microbial diversity (Shannon) and evenness (Simpson), as shown in Fig. 1. Significant differences

($p < 0.05$) were found between the control group and the other groups but not between the groups of treatment with β -glucan (BGL), LA-5 (LA5), and LA-5 combined with β -glucan (LA5-BGL) ($p > 0.05$). Compared to the control, greater richness ($p < 0.05$) was observed after treatments with BGL, LA5, and LA5-BGL, respectively. Treatments with BGL, LA5, and LA5-BGL, respectively, also increased ($p < 0.05$) the diversity and evenness of microbial communities compared to control, with the highest values ($p < 0.05$) observed for the BGL and LA5-BGL treatments.

Beta diversity analysis based on weighted and unweighted UniFrac and Bray–Curtis distance showed significant differences ($p < 0.05$) between the treatments and the control (Fig. 2A, B, and C). Although, no significant differences were observed between the BGL, LA5, and LA5-BGL treatments ($p > 0.05$).

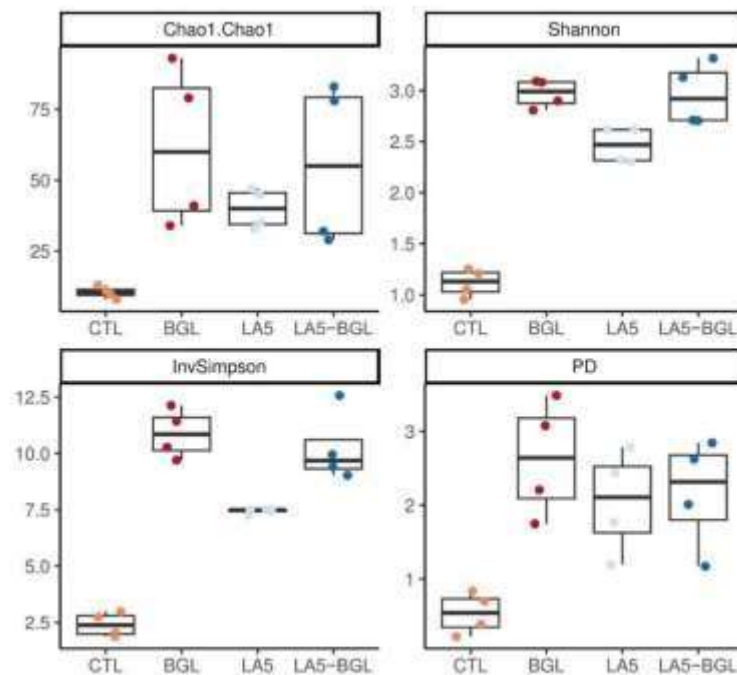
Changes in Fecal Microbial-Community of T2DM Individuals after Treatments with β -Glucan, *L. acidophilus* – LA-5 and LA-5 Combined with β -Glucan

The relative abundance at the phylum level identified in the ascending portion of SHIME® during colonic fermentation with β -glucan (BGL), LA-5 (LA5), and LA-5

combined with β -glucan (LA5-BGL) is shown in Fig. 3. Before the treatments (control period), the predominantly identified phylum was *Firmicutes*, followed by *Proteobacteria*. The BGL and LA5 treatments increased ($p < 0.05$) the abundance of the *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* phyla and decreased ($p < 0.05$) the abundance of the *Firmicutes* phylum. However, the BGL treatment reduced ($p < 0.05$) the abundance of the *Proteobacteria* phylum, while in the LA5 treatment, the abundance increased ($p < 0.05$). On the other hand, the combined LA5-BGL treatment considerably increased ($p < 0.05$) the abundance of *Bacteroidetes* and decreased ($p < 0.05$) the abundance of the *Firmicutes* phylum compared to the control group.

The relative abundance of the main genera identified in the ascending portion of SHIME® during colonic fermentation of fecal microbiome of individuals with T2DM before and after 7 days of treatments with BGL, LA5, and LA5-BGL is shown in Fig. 4. Before the treatments (control), the genera identified in the highest ($p < 0.05$) relative abundance were *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lachnospira*, *Escherichia-Shigella*, *Lactococcus*, *Clostridium_sensu_stricto*, and *Roseburia*, respectively. After 7 days, the BGL and LA5-BGL treatments suppressed the genera identified in the control, while the LA5 treatment considerably reduced ($p < 0.05$) the abundance of

Fig. 1 Alpha diversity is expressed by the Chao1 (species richness) and Shannon and Simpson (diversity) indices. CTL: Control Period; BGL: treatment with β -glucan; LA5: treatment with *L. acidophilus*—LA-5; LA5-BGL: treatment with LA-5 combined with β -glucan



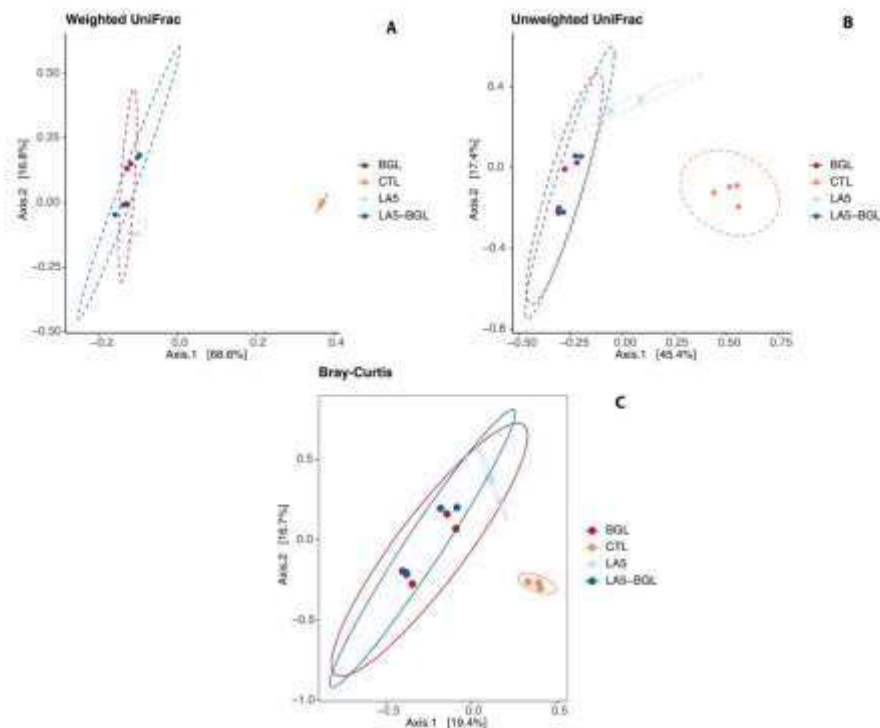


Fig. 2 Principal Coordinate Analysis (PCoA) with weighted and unweighted UniFrac metrics and Bray-Curtis distance of the microbiota of type 2 diabetic individuals in Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) colons. **A** Weighted UniFrac

($p=0.001$), **B** Unweighted UniFrac ($p=0.001$), and **C** Bray-Curtis distance ($p=0.001$). CTL: Control Period; BGL: treatment with β -glucan; LA5: treatment with *L. acidophilus* – LA-5; LA5-BGL: treatment with LA-5 combined with β -glucan

the *Escherichia-Shigella* genus and suppressed the other genera (Fig. 4).

The main genera identified in the BGL treatment in descending order of abundance were *Bacteroides*, *Alistipes*, *Acidaminococcus*, *Prevotella*, *Sutterella*, DTU089, *Parabacteroides*, *Bifidobacterium*, *Subdoligranulum*, and *Faecalibacterium*. In the LA5 treatment, the highest abundances were of *Lactobacillus*, *Subdoligranulum*, and *Bacteroides*, followed by *Faecalibacterium*, *Olsenella*, *Tyzzelerella*, *Eubacterium*, *Escherichia-Shigella*, *Lachnospirillum*, and *Veillonella*. Finally, in the combined LA5-BGL treatment, the highest ($p < 0.05$) abundances were of *Bacteroides*, followed by *Alistipes*, *Subdoligranulum*, *Holdemanella*, UCG-002, and *Acidaminococcus*. None of these genera were identified in the control, except for the genera *Lactobacillus* and *Escherichia-Shigella*, which were only present in the LA5 treatment, with the latter being considerably reduced ($p < 0.05$) in abundance compared to the control.

Complementary LefSe analyses identified discriminant taxa among the groups (Supplementary Figs. 2–4). Genera such as *Clostridium sensu stricto* 1 (including *Clostridium butyricum*), *Peptoniphilus*, *Bacteroides*, *Alistipes*, *Colidextribacter*, *Anaerostipes*, and *Acidaminococcus* were predominant in the BGL treatment. *Subdoligranulum*, *Bifidobacterium* (including *Bifidobacterium longum*), *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus*, and taxa from *Lactobacillaceae* were enriched in the LA5 group, highlighting their probiotic potential. The enrichment of *Anaerofilum*, *Bacteroides*, and *Ruminococcus* characterized the LA5-BGL treatment. These findings align with phylum- and genus-level changes, underscoring the treatments' roles in modulating microbial communities.

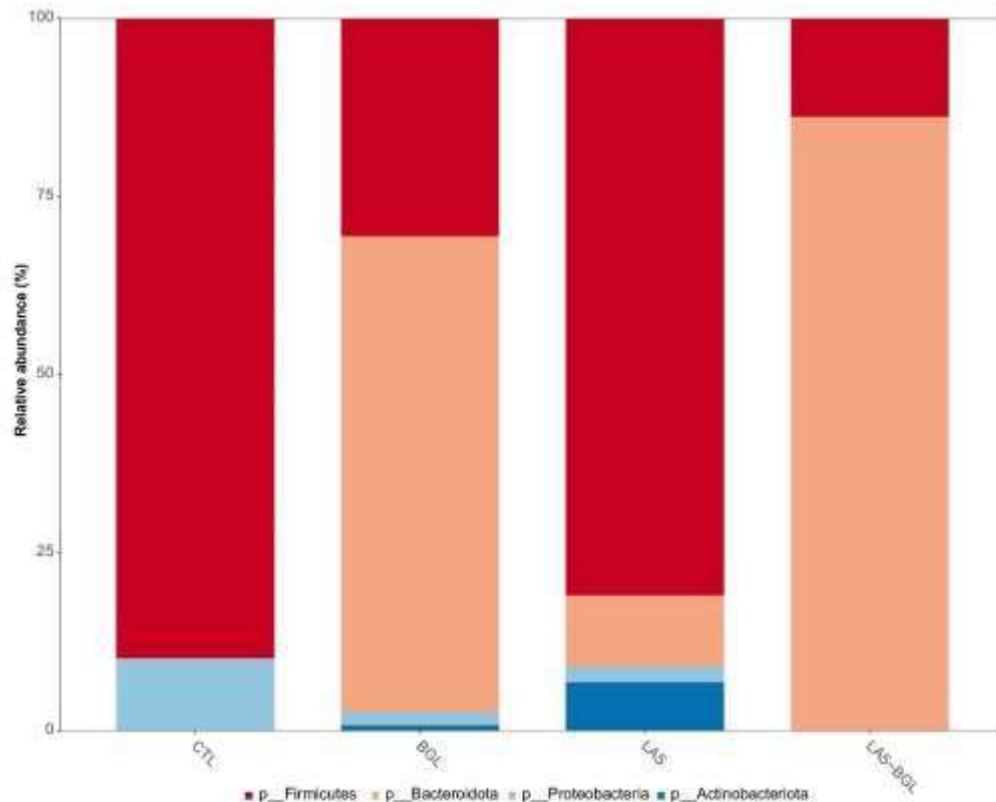


Fig. 3 Relative abundance of the main phyla identified during colonic fermentation in the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) Simulator. CTL: Control Period; BGL: treatment with

β -glucan; LA5: treatment with *L. acidophilus*—LA-5; LA5-BGL: treatment with LA-5 combined with β -glucan

Metabolic Activity during Colonic Fermentation: Production of SCFAs and Ammonium Ions (NH_4^+)

The metabolic activity of the microbiota of individuals with T2DM during colonic fermentation in SHIME® was assessed through the production of SCFAs and ammonium ions (NH_4^+), as shown in Fig. 5A and B.

The concentrations of acetic acid increased compared to the control ($p < 0.05$) but did not differ among BGL, LA5, and LA5-BGL groups. Conversely, the concentrations of propionic acid decreased ($p < 0.05$) in the LA5 treatment and increased ($p < 0.05$) in the BGL and LA5-BGL treatments. Butyric acid increased significantly ($p < 0.05$) in the BGL and LA5-BGL treatments, while the LA5 treatment did not differ from the control (Fig. 5A).

The concentration of NH_4^+ decreased ($p < 0.05$) in the LA5 treatment, while in the BGL and LA5-BGL treatments, it did not differ significantly from the control ($p > 0.05$) (Fig. 5B).

Effects on Cytokines

The potential anti-inflammatory effect of the treatments was evaluated through the secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10, as well as the pro-inflammatory cytokine IL-6 using a coculture model (Fig. 6). The BGL and LA-5 treatments increased ($p < 0.05$) the secretion of IL-6. All treatments increased ($p < 0.05$) the secretion of IL-10 cytokines compared to the control and LPS. The highest concentrations of IL-6 were observed in the LA-5 treatment

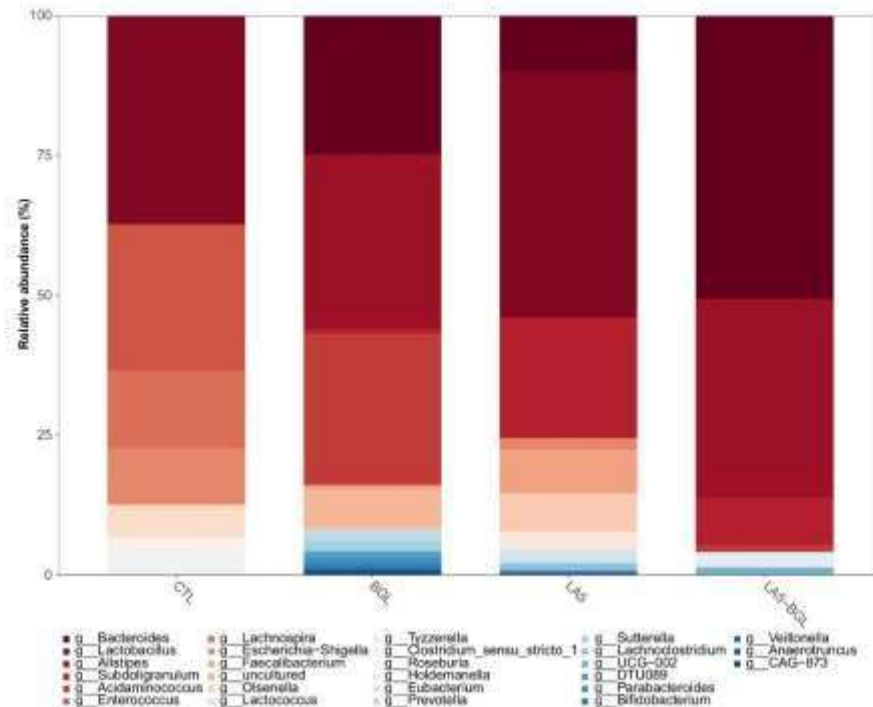


Fig. 4 Relative abundance of the main genus identified during colonic fermentation in the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) Simulator; CTL: Control Period; BGL: treatment with

β -glucan; LA5: treatment with *L. acidophilus*—LA-5; LA5-BGL: treatment with LA-5 combined with β -glucan

($p < 0.05$), followed by the BGL ($p < 0.05$) and LA5-BGL ($p < 0.05$) treatments, respectively. Conversely, the highest concentrations of IL-10 were present in the BGL and LA5-BGL treatments ($p < 0.05$), followed by the LA5 treatment.

Correlation Between Bacterial Groups and SCFA's Concentration

The correlation between the microbiota at the family and genus taxonomic levels and the concentrations of SCFAs is shown in Fig. 7, and allows to associate abundant levels of SCFAs to specific microbial groups.

Regarding acetic acid, it was observed that the genera *Eubacterium eligens* group, *Caproiciproducens*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Enterococcus*, *Escherichia-Shigella*, *Lachnospira*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, and *Roseburia* had their abundance reduced ($p < 0.05$) in samples with higher concentrations of this acid. In contrast, *Lachnospiraceae* FCS020 group showed a positive correlation ($p < 0.05$).

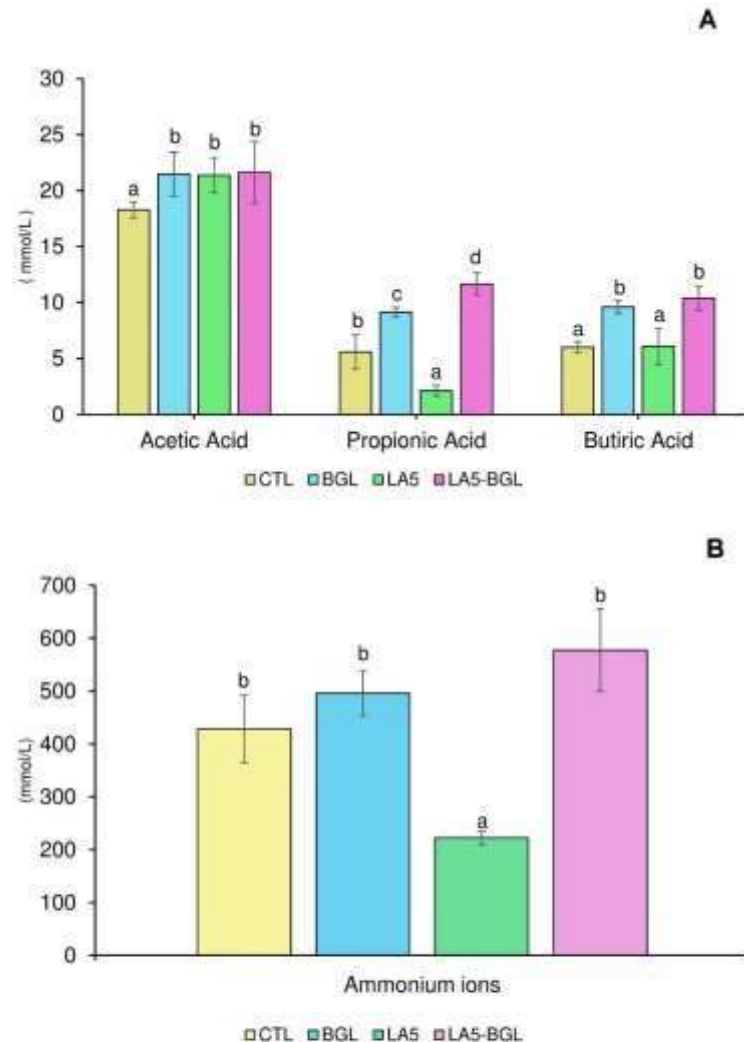
On the other hand, butyric acid was positively correlated ($p < 0.05$) with the genera *Anaerofilum*, *Anaerotruncus*, *Candidatus soleiferrea*, *Colidextribacter*, *Dorea*, DTU089, *Eisenbergiella*, and the families Defluviitaleaceae UCG-011, Lachnospiraceae UCG-004, UCG-002, and UCG-003.

Finally, propionic acid did not significantly correlate with the evaluated bacterial genera or families.

Discussion

Individuals with T2DM have lower microbial diversity compared to healthy controls, in terms of taxon abundance, they have less microorganisms beneficial to the intestine [35]. Our results demonstrated that after treatments with BGL, LA5 and LA5-BGL in SHIME® model, both the diversity and richness of intestinal microbial communities in fecal pooled samples increased, resulting in a microbiota with a more significant number of species, which is considered positive considering that these

Fig. 5 Production of intestinal microbiota metabolites (mmol/L). **A** Short chain fatty acids [acetic, propionic and butyric acids], **B** Ammonium ion content (NH_4^+). a, b, c different letters indicate a statistical difference ($p < 0.01$). CTL: Control Period; BGL: treatment with β -glucan; LA5: treatment with *L. acidophilus*—LA-5; LA5-BGL: treatment with LA-5 combined with β -glucan



individuals generally have impaired species diversity due to the pathology of T2DM. The increase in diversity may be mainly related to the presence of β -glucan, which possibly served as a substrate stimulating bacterial growth [19]. The in vitro prebiotic effect of β -glucans obtained from spent brewer's yeast against lactobacillus strains during in vitro digestion was previously demonstrated [23]. Clinical trials have also shown that β -glucan had a positive effect on glucose homeostasis, in addition to stimulating the growth of *Faecalibacterium*, *Lactobacillus* and

Bifidobacterium genus in the gut microbiome of patients with T2DM [19].

Furthermore, Salgaço et al. [16] and Singh et al. [18] recorded an increased microbial richness in treatment with only β -glucan compared to control and combined therapy with probiotics. These results may be related to the source of β -glucan, as its structure varies according to different sources. This suggests that the β -glucan obtained from spent brewer's yeast used in our study performed better as a prebiotic.

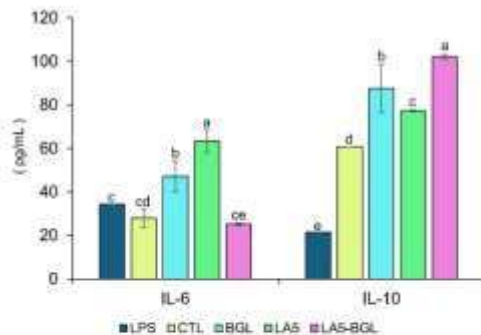


Fig. 6 Secretion of the anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines (pg/mL). a, b, c different letters indicate a statistical difference ($p < 0.01$). CTL: Control Period; BGL: treatment with β -glucan; LA5: treatment with *L. acidophilus*—LA-5; LA5-BGL: treatment with LA-5 combined with β -glucan

Patients with T2DM frequently have intestinal dysbiosis, which is generally associated with inflammation, overweight, and obesity [7, 36]. Gut microbiome dysbiosis has been associated with alterations in homeostasis and the worsening of several diseases, such as T2DM, mainly leading to changes in glucose metabolism, worsened insulin resistance, and increased levels of pro-inflammatory cytokines [7].

In healthy adult individuals, the gut microbiota is primarily dominated by bacteria from the *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla. In patients with T2DM, although the *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla remain dominant, the genus-level composition differs significantly. Generally, there are decreased levels of *Bifidobacterium*, *Akkermansia*, *Faecalibacterium*, and *Bacteroides*, whereas the abundance

of the genera *Blautia*, *Ruminococcus*, and *Fusobacteria* is increased [3].

When analyzing the microbiome of T2DM patients before treatments with BGL, LA5, or LA5-BGL, we observed that our phylum-level results corroborate the literature data, with a predominance of *Firmicutes*. The phylum *Firmicutes* encompasses the largest number of genera in the gut microbiota, covering around 200 genera, including *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, and *Clostridium*. Bacteria from this phylum are recognized as excellent producers of butyric acid in the intestinal lumen and are essential for degrading prebiotic carbohydrates such as β -glucan [4].

Regarding the microbiota identified before treatments, *Lactobacillus*, *Lachnospira*, *Lactococcus*, *Clostridium sensu stricto* and *Roseburia* genera are part of the *Firmicutes* phylum and play a fundamental role in the metabolism of fermentable carbohydrates to SCFAs, producing mainly acetic and butyric acids [4]. On the other hand, the genera *Enterococcus* and *Escherichia-Shigella* belong to the *Enterobacteriaceae* family and are considered facultative aerobic translocating bacteria and possible pathobionts. Bacteria from these genera can become pathogens in genetically susceptible individuals or through factors such as lifestyle, as is the case of individuals with T2DM, directly related to dysbiosis and inflammatory bowel diseases [15].

Recent trials observed that the intestinal abundance of the genera *Lachnospira*, *Roseburia* [5, 9], *Clostridium sensu stricto* [8], *Escherichia-Shigella*, and *Enterococcus* [10] is increased in individuals with T2DM when compared to healthy individuals; in addition, the last two were positively correlated to the presence of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6 and HOMA-IR, suggesting that the increase in these genera may be associated with an increase in insulin resistance [10]. It is essential to highlight

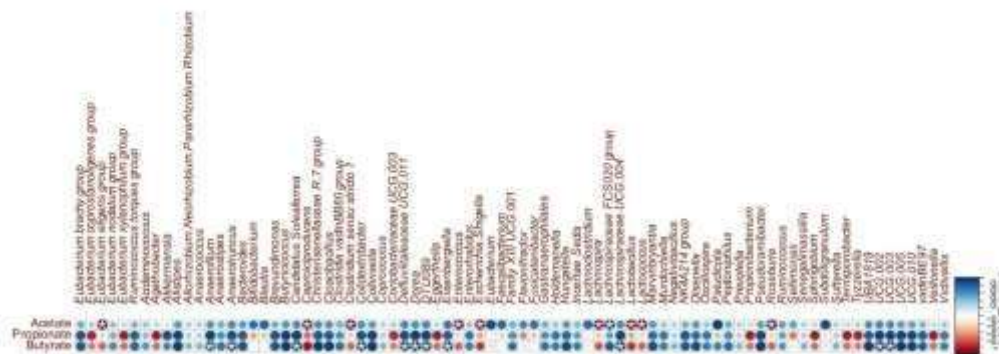


Fig. 7 Correlation analysis between bacterial families and genera, and levels of short chain fatty acids. Positive correlations are represented by blue and negative correlations by red. The significance of the correlation is indicated by * ($p < 0.1$) (Spearman correlation)

that the role of these genera in T2DM is still controversial due to the variability of samples and techniques applied, which impairs the specificity and precision of the results.

The increase in microbial diversity observed after treatments with BGL, LA5 and LA5-BGL directly impacted changes in the intestinal microbial communities of individuals with T2DM, with the prevalence of the genera *Bacteroides*, *Alistipes*, *Acidaminococcus* in BGL, *Lactobacillus*, *Subdoligranulum* and *Bacteroides* in LA5, and *Bacteroides*, *Alistipes* and *Subdoligranulum* in LA5-BGL. Salgado et al. [16] also observed an increase in the abundance of genera considered essential for maintaining the integrity of the intestinal mucosa such as *Subdoligranulum* and *Faecalibacterium*, however, in their study the genus *Bacteroides* decreased after treatment with LA-5 for 14 days using SHIME® in the fecal microbiome of patients with T2DM.

In our study, the genus *Bacteroides* was one of the most abundant after all treatments, mainly in the combined LA5-BGL treatment. *Bacteroides* spp. are important fermenters of polysaccharides to SCFAs and can protect against systemic inflammatory, immunological, and metabolic diseases such as T2DM. They improve glucose tolerance and insulin resistance and reduce the release of pro-inflammatory cytokines [16, 37].

Another important genus stimulated by treatments with BGL and LA5-BGL was *Alistipes*. The increase in the abundance of this genus has been positively correlated with hypoglycemic and lipid-lowering effects, an improvement in the SCFA-GPR/PYY pathways, and the regulation of the expression of glucose-lipid metabolic enzymes (p-AMPK, FAS, ACO and DGAT2) in diabetic mice [38]. Species of the genus *Acidaminococcus* are considered important fermenters of glutamate, an important fuel for the intestinal epithelium. The influence of these species on improving intestinal barrier function and consequently improving dysbiosis has been demonstrated [39].

In the LA5 treatment, the highest abundances were of the genera *Lactobacillus* and *Subdoligranulum*; the latter's abundance was also increased in the combined LA5-BGL treatment. *Lactobacillus* spp. is recognized as probiotic and several in vitro [37] and in vivo [24, 40] studies have shown the ability of strains of this genus to restore the microbiota in dysbiosis, in addition to improving insulin resistance, oxidative stress and the inflammatory response in individuals with T2DM. Furthermore, it has been demonstrated that, more specifically, *L. acidophilus* strains, including LA-5, may play an important role in enhancing immunity by increasing CD4+ and IgA levels and decreasing TNF- α and IL-6 levels [41]. The genus *Subdoligranulum* includes the species *Subdoligranulum variabile*, the most studied and a well-known important producer of butyric acid. Furthermore, the increase in abundance of this genus has been closely related to a healthier metabolic state [40, 42]. A negative correlation

has been observed between the genus *Subdoligranulum* and the levels of C-reactive protein (CRP), fatty liver index and Homeostasis Model Assessment-Insulin (HOMA-IR), which is considered desirable in patients with T2DM [42].

In addition, in the current study there was an increase in the abundance of species considered important producers of SCFAs, including *Eubacterium*, *Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Parabacteroides*, *Bifidobacterium* and *Olsenella*. In vitro and in vivo studies [4, 43–46] demonstrate that species of these genera can act in modulating intestinal inflammation and immunity through the production of butyric, acetic and propionic acids. Furthermore, there are reports of mucin stimulation and reduction of translocation bacterial [4, 43–46]. Therefore, increasing the abundance of these bacteria in the microbiome of patients with T2DM may relieve some of the disease's symptoms.

On the other hand, we observed a lower abundance of some genera positively correlated with the alteration of the intestinal epithelium and the production of pro-inflammatory cytokines, including *Sutterella*, *Tyzerella*, *Lachnospirillum*, *Veillonella*, and *Holdemanella*. In vitro studies associated abundant levels of these genera with diarrhea and worsening glucose metabolism [5, 47]. It is important to highlight that the treatments with BGL, LA5 and LA5-BGL were able to suppress or considerably reduce the abundance of the genus *Escherichia-Shigella*, which includes a range of species considered intestinal pathogens indicators of intestinal dysbiosis [15]. This reduction is probably related to the increase in beneficial bacteria, such as *Bacteroides* spp., *Alistipes* spp., *Lactobacillus* spp. and *Subdoligranulum* spp., stimulated mainly by treatments with BGL alone or in combination with LA-5, as well as by the consequent production of metabolites by these bacteria, mainly acetic acid, which inhibit the growth of pathogens, creating an intestinal environment less favorable for their development [40].

The impact of the changes observed in the fecal microbiome after treatments was reflected in the production of metabolites, with increased levels of acetic, butyric, and propionic acids and changes in cytokines (IL-6 and IL-10). This effect was particularly notable in treatments with β -glucan, which had an immunomodulatory effect characterized by a significant increase in IL-10 and a decrease in IL-6. Interleukin-10 (IL-10) is a cytokine with potent anti-inflammatory properties, playing a crucial role in immune regulation by inhibiting the synthesis of pro-inflammatory cytokines [48]. Therefore, IL-6 may have a dual role depending on the gut microbiota pattern. When there is an increase in bacterial pathogen species and a disturbance in the microbiome balance, IL-6 is involved in heightened inflammatory responses that contribute to these destructive processes. Conversely, in normal gut microbiota and sufficient beneficial bacterial species, IL-6 is more involved in maintaining homeostasis and reducing pathological inflammation [49].

These results can be explained by the fact that β -glucan, more precisely the one derived from the brewer yeast used in our study, when fermented by a variety of intestinal bacterial species, can be converted into biologically active SCFAs, in addition to the anti-inflammatory and immunomodulatory effects [22]. The effects of prebiotics and probiotics in SFCAs on T2DM have been scarcely studied. Birkeland et al. [14] reported through in vivo trials that the probiotic ingredients oligofructose and inulin (16 g/d) administered for 6 weeks induced an increase in fecal levels of acetic acid and propionic acid, and bifidobacteria in patients with T2DM aged between 41 and 71 years. Salgado et al. [16] reported higher levels of butyric acid but did not observe changes in the levels of acetic and propionic acids after 14 days of treatment with LA-5 using SHIME® in the gut microbiota of adults with T2DM.

More outstanding production of acetic, propionic and butyric acids observed is considered positive, as these SFCAs can act as signalers, binding to receptors on enteroendocrine cells, facilitating postprandial secretion of hormones in the intestine and improving glucose homeostasis [14]. Acetic acid is the most abundant SCFAs synthesized by the gut microbiota through the fermentation of non-digestible polysaccharides, being produced mainly by species of the genera *Bacteroides* and *Prevotella* [50]. Acetic acid was negatively correlated with glycemia and insulin resistance indicators, and with serum concentrations of IL-6 in murine models of T2DM [51]. Furthermore, it is a potent inhibitor of species' growth from the *Enterobacteriaceae* family [15]. Our results correlated increased concentrations of acetic and butyric acids with the *Lachnospiraceae* family, which includes species capable of using acetic acid to produce butyric acid through the butyryl-CoA or acetate CoA transferase pathways or via butyrate kinase [52].

Butyric acid is considered the main energy source for colonocytes and has anti-inflammatory effects, being produced mainly by the species *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* and *Roseburia intestinalis* [53]. Some studies have reported that the levels of butyrate-producing bacteria in diabetic patients are reduced, leading to impaired glucose metabolism [54, 55]. The potential protective effect of butyrate against T2DM has been mainly attributed to improved insulin sensitivity [54]. Mollica et al. [55], using a mouse model induced by obesity and insulin resistance, found that butyrate attenuated the changes induced by a high-fat diet in lipid profiles and the hormones adiponectin and leptin, restoring glucose homeostasis and expression GLUT2 and reducing inflammation through the reduction of pro-inflammatory markers.

Furthermore, propionic acid is associated with improved β -cell function with increased insulin secretion independent of changes in GLP-1 levels [56].

The production of ammonia ions is carried out mainly by the kidneys and intestinal bacteria that participate in deamination processes by degrading amino acids and other amino compounds [57]. It has been reported that insulin resistance could increase protein catabolism, leading to greater ammonia production. Therefore, patients with T2DM would be more susceptible to hyperammonemia [58]. The lower production of ammonium ions observed in our results after treatment with LA5 is considered positive, as when at high levels, they can harm the morphology of colonocytes, increasing their permeability and facilitating bacterial translocation, making the organism more susceptible to the presence of infections and chronic inflammations [59]. Furthermore, excess ammonia can lead to hepatic encephalopathy, as it compromises the detoxification process by the liver, leading to the accumulation of these ions in the systemic circulation and causing toxicity when they reach the central nervous system [59]. It has been proposed that probiotic bacteria may facilitate increased ammonia excretion and reduce blood urea nitrogen concentration [11]. Salgado et al. [16] also observed lower production of ammonium ions by the gut microbiota of adults with T2DM after 14 days of treatment with LA-5 using SHIME®.

Conclusion

This study demonstrates that prebiotics and probiotics, particularly spent brewer's yeast β -glucan and *Lactobacillus acidophilus* LA-5, can positively influence gut microbiota composition and improve metabolic indicators in adults with type 2 diabetes mellitus (T2DM). The research revealed that BGL, LA5, and their combination (LA5-BGL) enhance the richness and diversity of microbial communities. These treatments also increased the abundance of beneficial bacteria such as *Bacteroides*, *Alistipes*, *Lactobacillus*, *Subdoligranulum*, and *Acidaminococcus*, along with elevated levels of SCFAs and the anti-inflammatory cytokine IL-10. Notably, BGL treatments were particularly effective in boosting microbial diversity, SCFAs production (butyric, propionic, and acetic acids), and IL-10 levels. LA5 was most effective in reducing ammonium ion levels. These findings underscore the role of BGL as a potent prebiotic and immunomodulator, suggesting its potential as an adjuvant therapy to alleviate symptoms of T2DM in adults. Further research is recommended to explore the long-term benefits and mechanisms underlying these effects.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12602-025-10491-9>.

Acknowledgements The authors would like to thank the "Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel" (CAPES; Financial code 001) and "National Council for Scientific and

Technological Development* (CNPq; 402745/2021-3, 303384/2022-0 and 404506/2023-2).

Author Contribution JRC, MM, and KS participated in the conceptualization of the study; MKS, FLO, VM, JFT, LSP, BVBR, KCO and AIM performed the investigation, JRC, LIGO, FAS and MM wrote the original draft of the manuscript. All authors were involved in review, editing and visualization. MM and KS provided the resources for development of the study and worked in the supervision and were responsible by the project administration.

Data Availability No datasets were generated or analysed during the current study.

Declarations

Conflict of Interest The authors declare no competing interests.

References

- Henson J, Anyiam O, Vishnubala D (2023) Type 2 diabetes. Exercise Manage Referred Med Conditions 223–252. <https://doi.org/10.4324/9781315102399-12>
- Zheng Y, Ley SH, Hu FB (2018) Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. Nat Rev Endocrinol 14(2):88–98. <https://doi.org/10.1038/NREND0.2017.151>
- Bielka W, Przekaz A, Pawlik A (2022) The role of the gut microbiota in the pathogenesis of diabetes. Int J Mol Sci 23(1):480. <https://doi.org/10.3390/IJMS23010480>
- Ganesan K, Chung SK, Vanamala J, Xu B (2018) Causal relationship between diet-induced gut microbiota changes and diabetes: a novel strategy to transplant faecalibacterium prausnitzii in preventing diabetes. Int J Mol Sci 19(12):3720. <https://doi.org/10.3390/IJMS19123720>
- Li H, Li C (2023) Causal relationship between gut microbiota and type 2 diabetes: a two-sample Mendelian randomization study. Frontiers Microbiol 14:1184734. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1184734/BIBTEX>
- Nogal A, Valdes AM, Menni C (2021) The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. Gut Microbes 13(1):1–24. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1897212>
- Harsch JA, Konturek PC (2018) The role of gut microbiota in obesity and type 2 and type 1 diabetes mellitus: new insights into “old” diseases. Med Sci 6(2):32. <https://doi.org/10.3390/MEDSC16020032>
- Chen Z, Radjabzadeh D, Chen L, Kurilshikov A, Kavousi M, Ahmadizar F, Ikram MA, Uitterlinden AG, Zernakova A, Fu J, Kraaij R, Voortman T (2021) Association of insulin resistance and type 2 diabetes with gut microbial diversity: a microbiome-wide analysis from population studies. JAMA Netw Open 4(7):e2118811. <https://doi.org/10.1001/JAMANETWORKOPEN.2021.18811>
- Wei B, Wang Y, Xiang S, Jiang Y, Chen R, Hu N (2021) Alterations of gut microbiome in patients with type 2 diabetes mellitus who had undergone cholecystectomy. Am J Physiol Endocrinol Metab 320(1):E113–E121. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00471.2020>
- Xu T, Ge Y, Du H, Li Q, Xu X, Yi H, Wu X, Kuang T, Fan G, Zhang Y (2021) Berberis kunsuensis extract alleviates type 2 diabetes in rats by regulating gut microbiota composition. J Ethnopharmacol 273:113995. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2021.113995>
- Wang J, Ji H (2018) Influence of probiotics on dietary protein digestion and utilization in the gastrointestinal tract. Curr Protein Pept Sci 20(2):125–131. <https://doi.org/10.2174/1389203719666180517100339>
- Yaday MK, Kumari I, Singh B, Sharma KK, Tiwari SK (2022) Probiotics, prebiotics and synbiotics: safe options for next-generation therapeutics. Appl Microbiol Biotechnol 106(2):505–521. <https://doi.org/10.1007/S00253-021-11646-8>
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME (2014) Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 11:506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Birkeland E, Gharagozian S, Birkeland KI, Valeur J, Mäge L, Rud L, Aas AM (2020) Prebiotic effect of inulin-type fructans on faecal microbiota and short-chain fatty acids in type 2 diabetes: a randomised controlled trial. Eur J Nutr 59(7):3325–3338. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02282-5>
- Bongonovi TF, Salgado MK, Oliveira GLV, Carvalho LAL, Pinheiro DG, Todorov SD, Sivieri K, Casarotti SN, Penna ALB (2022) Functional fermented milk with fruit pulp modulates the in vitro intestinal microbiota. Foods 11(24):4113. <https://doi.org/10.3390/FOODS11244113/S1>
- Salgado MK, de Oliveira FL, Sartoratto A, Mesa V, Mayer MPA, Sivieri K (2023) Impact of *Lactobacillus acidophilus*—La5 on composition and metabolism of the intestinal microbiota of type 2 diabetics (t2d) and healthy individuals using a Microbiome Model. Fermentation 9:740. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION9080740>
- Santamarina AB, Moraes RCM, Nehmi Filho V, Murata GM, de Freitas JA, de Miranda DA, Cerqueira ARA, Costa SKP, Ferreira AFF, Brito LR, de Camargo JA, de Oliveira DR, de Jesus FN, Ochoa JP, Pessoa AFM (2022) The symbiotic effect of a new nutraceutical with yeast β -glucan, prebiotics, minerals, and *Silybum marianum* (silymarin) for recovering metabolic homeostasis via pgc-1 α , il-6, and il-10 gene expression in a type-2 diabetes obesity model. Antioxidants 11(3):447. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11030447>
- Singh V, Muthuramalingam K, Kim YM, Park S, Kim SH, Lee J, Hyun C, Unno T, Cho M (2021) Synbiotic supplementation with prebiotic *Schizophyllum commune* derived β -(1,3/1,6)-glucan and probiotic co-concoction benefits gut microbiota and its associated metabolic activities. Appl Biol Chem 64(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00572-4>
- Sivieri K, de Oliveira SM, Marquez AS, Pérez-Jiménez J, Diniz SN (2022) Insights on β -glucan as a prebiotic coadjutant in treatment of diabetes mellitus: a review. Food Hydrocolloid Health 2:100056. <https://doi.org/10.1016/J.FHIFH.2022.100056>
- Pino JL, Mujica V, Arredondo M (2021) Effect of dietary supplementation with oat β -glucan for 3 months in subjects with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, controlled clinical trial. J Funct Foods 77. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104311>
- Tessari P, Lante A (2017) A multifunctional bread rich in beta glucans and low in starch improves metabolic control in type 2 diabetes: A controlled trial. Nutrients 9(3). <https://doi.org/10.3390/nu9030297>
- Xin Y, Ji H, Cho E, Roh KB, You J, Park D, Jung E (2022) Immune-enhancing effect of water-soluble beta-glucan derived from enzymatic hydrolysis of yeast glucan. Biochem Biophys Rep 30:101256. <https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2022.101256>
- Silva Guedes J, Pimentel TC, Diniz-Silva HT, da Cruz T, Almeida E, Tavares JF, Leite de Souza E, Garcia EF, Magnani

- M (2019) Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. *LWT* 116:108496. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108496>
24. Rustanti N, Murtiati A, Juffrie M, Rahayu ES (2022) Effect of probiotic *Lactobacillus plantarum* dad-13 on metabolic profiles and gut microbiota in type 2 diabetic women: a randomized double-blind controlled trial. *Microorganisms* 10(9):1806. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10091806>
 25. Magnani M, Calliari CM, de Macedo FC, Mori MP, de Syllos Cólus IM, Castro-Gomez RJH (2009) Optimized methodology for extraction of (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. *Carbohydr Polym* 78(4):658–665. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.05.023>
 26. Oliveira LIG, Clementino JR, Salgado MK, de Oliveira SPA, Lima MS, Mesa V, de Souza EL, Vinderola CG, Magnani M, Sivieri K (2023) Revealing the beneficial effects of a dairy infant formula on the gut microbiota of early childhood children with autistic spectrum disorder using static and SHIME® fermentation models. *Food Funct* 14(19):8964–8974. <https://doi.org/10.1039/D3FO01156A>
 27. Molly K, Woestyne MV, De Smet I, Verstraete W (1994) Validation of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) reactor using microorganism-associated activities. *Microb Ecol Health Dis* 7(4):191–200. <https://doi.org/10.3109/08910609409141354>
 28. Bianchi F, Rossi EA, Sakamoto IK, Adorno MAT, Van de Wiele T, Sivieri K (2014) Beneficial effects of fermented vegetal beverages on human gastrointestinal microbial ecosystem in a simulator. *Food Res Int* 64:43–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.072>
 29. Van de Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, Verstraete W (2004) Prebiotic effects of chicory inulin in the human intestinal microbial ecosystem simulator. *FEMS Microbiol Ecol* 51(1):143–153. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.07.014>
 30. Mesa V, Elena VDB, Amparo GGN, María JRA, Adriana GV, Irene AC, Alejandra YMM, Janeth BB, María AOG (2022) Gut microbiota alterations in critically ill older patients: a multi-center study. *BMC Geriatr* 22(1):1–12. <https://doi.org/10.1186/s12877-022-02981-0>
 31. Satsu H, Ishimoto Y, Nakano T, Mochizuki T, Iwanaga T, Shimizu M (2006) Induction by activated macrophage-like THP-1 cells of apoptotic and necrotic cell death in intestinal epithelial Caco-2 monolayers via tumor necrosis factor- α . *Exp Cell Res* 312:3909–3919. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.08.018>
 32. Wei T, Simko V (2021) R package “corrplot”: visualization of a correlation matrix. <https://github.com/taiyun/corrplot>
 33. Tian X, Yang P, Jiang W (2019) Effect of alkali treatment combined with high pressure on extraction efficiency of β -D-glucan from spent brewer's yeast. *Waste Biomass Valor* 10:1131–1140. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0130-8>
 34. Kim YT, Kim EH, Cheong C, Williams DL, Kim CW, Lim ST (2000) Structural characterization of β -D-(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. *Carbohydr Res* 328(3):331–341. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00105-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00105-1)
 35. Pircalabioru G, Liaw J, Gundogdu O, Corcionivoschi N, Ilie I, Oprea L, Musat M, Chifiriuc MC (2022) Effects of the lipid profile, type 2 diabetes and medication on the metabolic syndrome—associated gut microbiome. *Int J Mol Sci* 23(14):7509. <https://doi.org/10.3390/IJMS23147509/S1>
 36. Hashimoto Y, Hamaguchi M, Kaji A, Sakai R, Osaka T, Inoue R, Kashiwagi S, Mizushima K, Uchiyama K, Takagi T, Naito Y, Fukui M (2020) Intake of sucrose affects gut dysbiosis in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Investig* 11(6):1623. <https://doi.org/10.1111/BDI.13293>
 37. Lee YS, Lee D, Park GS, Ko SH, Park J, Lee YK, Kang J (2021) *Lactobacillus plantarum* HAC01 ameliorates type 2 diabetes in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice in association with modulating the gut microbiota. *Food Funct* 12(14):6363–6373. <https://doi.org/10.1039/D1FO00698C>
 38. Huang Z, Fang Z, Wu A, Shen F, Wu Z (2023) Fermented *Psidium guajava* leaves regulate the gut microbiota and improve metabolic alterations in diabetic mice. *Food Biosci* 51:102201. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102201>
 39. Xu AA, Kennedy LK, Hoffman K, White DL, Kamwal F, El-serag HB, Petrosino JF, Jiao L (2022) Dietary fatty acid intake and the colonic gut microbiota in humans. *Nutrients* 14(13):2722. <https://doi.org/10.3390/NU14132722/S1>
 40. Velayati A, Karoem I, Sedaghat M, Sohrab G, Nikpayam O, Hedayati M, Abhari K, Hejazi E (2023) Does symbiotic supplementation which contains *Bacillus Coagulans*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* and fructooligosaccharide has favorable effects in patients with type-2 diabetes? A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Arch physiol biochem* 129(6):1211–1218. <https://doi.org/10.1080/13813455.2021.1928225>
 41. Zhao W, Liu Y, Kwok LY, Cui T, Zhang W (2020) The immune regulatory role of *Lactobacillus acidophilus*: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Biosci* 36:100656. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100656>
 42. Louis S, Tappu RM, Dums-Machado A, Huson DH, Bischoff SC (2016) Characterization of the gut microbial community of obese patients following a weight-loss intervention using whole metagenome shotgun sequencing. *PLoS One* 11(2):e0149564. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0149564>
 43. Chen T, Long W, Zhang C, Liu S, Zhao L, Hamaker BR (2017) Fiber-utilizing capacity varies in *Prevotella*- versus *Bacteroides*-dominated gut microbiota. *Sci Rep* 7(1):1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02995-4>
 44. Cui Y, Zhang L, Wang X, Yi Y, Shan Y, Liu B, Zhou Y, Lü X (2022) Roles of intestinal Parabacteroides in human health and diseases. *FEMS Microbiol Lett* 369(1):1–11. <https://doi.org/10.1093/FEMSL/FPAC072>
 45. Deledda A, Palmas V, Heidrich V, Foschi M, Lombardo M, Cambarau G, Lai A, Melis M, Loi E, Loviselli A, Manzin A, Velluzzi F (2022) Dynamics of gut microbiota and clinical variables after ketogenic and Mediterranean diets in drug-naïve patients with type 2 diabetes mellitus and obesity. *Metabolites* 12(11):1092. <https://doi.org/10.3390/METABO12111092/S1>
 46. Zhong H, Deng L, Zhao M, Tang J, Liu T, Zhang H, Feng F (2020) Probiotic-fermented blueberry juice prevents obesity and hyperglycemia in high fat diet-fed mice in association with modulating the gut microbiota. *Food Funct* 11(10):9192–9207. <https://doi.org/10.1039/D0FO00334D>
 47. Nakajima H, Takewaki F, Hashimoto Y, Kajiyama S, Majima S, Okada H, Senmaru T, Ushigome E, Nakanishi N, Hamaguchi M, Yamazaki M, Tanaka Y, Oikawa Y, Nakajima S, Ohno H, Fukui M (2020) The effects of metformin on the gut microbiota of patients with type 2 diabetes: a two-center, quasi-experimental study. *Life* 10(9):195. <https://doi.org/10.3390/LIFE10090195>
 48. Papoutsopoulou S, Pollock L, Walker C, Tench W, Samad SS, Bergey F, Lenzi L, Shesbani-Tezzeri R, Rosenstiel P, Alam MT, Martins Dos Santos VAP, Müller W, Campbell BJ (2021) Impact of interleukin 10 deficiency on intestinal epithelium responses to inflammatory signals. *Front Immunol* 12:690817. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.690817>
 49. Shahini A, Shahini A (2023) Role of interleukin-6-mediated inflammation in the pathogenesis of inflammatory bowel disease: focus on the available therapeutic approaches and gut

- microbiome. *J Cell Commun Signal* 17:55–74. <https://doi.org/10.1007/s12079-022-00695-x>
50. Wang L, Cen S, Wang G, Lee Y-K, Zhao J, Zhang H, Chen W (2020) Acetic acid and butyric acid released in large intestine play different roles in the alleviation of constipation. *J Funct Foods* 69:103953. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103953>
 51. Qian X, Si Q, Lin G, Zhu M, Lu J, Zhang H, Wang G, Chen W (2022) *Bifidobacterium adolescentis* is effective in relieving type 2 diabetes and may be related to its dominant core genome and gut microbiota modulation capacity. *Nutrients* 14(12):2479. <https://doi.org/10.3390/NU14122479/S1>
 52. Devaux CA, Million M, Raoult D (2020) The butyrogenic and lactic bacteria of the gut microbiota determine the outcome of allogeneic hematopoietic cell transplant. *Front Microbiol* 11:559536. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01642/BIBTEX>
 53. Duncan SH, Holtrop G, Lobley GE, Calder AG, Stewart CS, Flint HJ (2004) Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br J Nutr* 91(6):915–923. <https://doi.org/10.1079/BJN20041150>
 54. Bridgeman SC, Northrop W, Melton PE, Ellison GC, Newsbome P, Mamotte CDS (2020) Butyrate generated by gut microbiota and its therapeutic role in metabolic syndrome. *Pharmacol Res* 160:105174. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105174>
 55. Mollica MP, Raso GM, Cavaliere G, Trinchese G, De Filippo C, Aceto S, Prisco M, Pirozzi C, Di Guida F, Lama A, Crispino M, Tronino D, Di Vaio P, Canani RB, Calignano A, Meli R (2017) Butyrate regulates liver mitochondrial function, efficiency, and dynamics in insulin-resistant obese mice. *Diabetes* 66(5):1405–1418. <https://doi.org/10.2337/DB16-0924>
 56. Pingitore A, Chambers ES, Hill T, Maldonado IR, Liu B, Bewick G, Morrison DJ, Preston T, Wallis GA, Tedford C, Castañera González R, Huang GC, Choudhury P, Frost G, Persaud SJ (2017) The diet-derived short chain fatty acid propionate improves human beta-cell function and stimulates insulin secretion from human islets in vitro. *Diab Obes Metab* 19(2):257–265. <https://doi.org/10.1111/DOM.12811>
 57. Torres N, Tobón-Cornejo S, Velázquez-Villegas LA, Noriega LG, Alemán-Escondrillas G, Tovar AR (2023) Amino acid catabolism: an overlooked area of metabolism. *Nutrients* 15(15):3378. <https://doi.org/10.3390/NU15153378>
 58. Ampuero J, Ranchal I, del Mar Díaz-Herrero M, del Campo JA, Bautista JD, Romero-Gómez M (2013) Role of diabetes mellitus on hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 28(2):277–279. <https://doi.org/10.1007/s11011-012-9354-2>
 59. Kroupina K, Bémeur C, Rose CF (2022) Amino acids, ammonia, and hepatic encephalopathy. *Anal Biochem* 649:114696. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114696>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

O Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “Impacto de Probiótico na Microbiota Oral e Intestinal, de Indivíduos com Periodontite e com Diabetes Mellitus Tipo 2 Utilizando Modelo Colônico In vitro (SEMH®)”. O objetivo deste trabalho é estudar a associação do Diabetes Mellitus tipo 2, com a presença de alterações nos dentes e gengiva que possam levar à periodontite que é a inflamação e infecção dos ligamentos e ossos que dão suporte aos dentes, é uma doença comum, porém perfeitamente possível de ser prevenida, comparando os achados em pacientes sem diabetes e sem periodontite, com os pacientes somente com Diabetes Mellitus tipo 2, com pacientes somente com Periodontite e com pacientes com a presença de ambas as doenças. Para tanto, deverei responder a um questionário de saúde, ser submetido a exame clínico de rotina dos dentes (avaliação da presença de lesões de cárie e restaurações) e da gengiva, coleta de amostras de saliva, de fluido do sulco gengival (líquido presente entre a gengiva e o dente) e de placa bacteriana (depósito de bactérias localizado abaixo da gengiva). O material será utilizado exclusivamente para essa pesquisa, não podendo ser reutilizado em pesquisa posterior. Os riscos são mínimos, terá o desconforto da coleta de fezes que pode levar apenas algum constrangimento e desconforto no momento da coleta, será fornecido ao senhor(a) recipiente apropriado para coleta, o desconforto da coleta de amostras de saliva, de fluido do sulco gengival (líquido presente entre a gengiva e o dente) e de placa bacteriana (depósito de bactérias localizado abaixo da gengiva), também são mínimos, pois as coletas serão realizadas por um profissional odontológico na própria clínica de periodontia localizada na UNESP-Araraquara, lembrando que esta clinica possui recursos e profissionais capacitados para oferecer assistência integral diante de possíveis reações adversas que, embora raras, possam vir a ocorrer durante a coleta, tais como: hematoma, náuseas, vômitos. Entretanto, fui informado de que os riscos serão minimizados com a realização da coleta de salivas, fluido do sulco gengival e de placa bacteriana, por um profissional devidamente treinado e habilitado para realizar o procedimento e que terei assistência integral em caso de ocorrência dos danos previstos, em virtude das informações coletadas serem utilizadas unicamente com fins científicos, sendo garantidos o total sigilo e confidencialidade, através da assinatura deste termo, o qual o(a) Sr.(a) receberá uma cópia e se desejar, será informado sobre os resultados dessa pesquisa.

A sua participação como voluntário terá a duração de apenas 1 dia e não terá nenhuma despesa ao participar desse estudo; caso ocorra algum dano em decorrência de sua participação, o participante fará jus à reparação.

O(a) Sr.(a) terá o direito e a liberdade de negar-se a participar desta pesquisa total ou parcialmente ou dela retirar-se a qualquer momento, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo ou punição.

Para qualquer esclarecimento no decorrer da sua participação, estarei disponível através do telefone: 16981630790 e e-mail: mateus.salgaco@unesp.br. O senhor (a) também poderá entrar em contato com o Comitê de

Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, na Rodovia Araraquara Jaú, Km 01 – s/n, Bairro: Campos Ville, 14800-903 – Araraquara, SP, telefone (16) 3301-4657 e e-mail: sta@fcfar.unesp.br.

Eu _____, RG _____, Estado Civil _____, Idade _____ anos, residente na _____, nº _____, Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____, declaro que após ter sido esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a), lido e assinado o presente termo em duas vias, e entendido tudo o que me foi explicado, concordo em participar da Pesquisa intitulada

“

_____”.

Araraquara, _____ de _____ de 20 ____.

—
Assinatura do Pesquisador

Assinatura do Voluntário

DECLARAÇÃO

Eu, Mateus Kawata Salgaço, pesquisador responsável pelo Projeto de Pesquisa “Impacto de Probiótico na Microbiota Oral e Intestinal, de Indivíduos com Periodontite e com Diabetes *Mellitus* Tipo 2 Usando Modelo Colônico *In vitro* (SEMH®)”, declaro que todas as informações ao sujeito da pesquisa serão fornecidas por mim ou pela minha equipe no momento da obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DE PROBIÓTICO NA MICROBIOTA ORAL E INTESTINAL DE INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE E COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 UTILIZANDO MODELO COLÔNICO IN VITRO

(SEHM®) **Pesquisador:** MATEUS KAWATA SALGACO **Área**

Temática:

Versão: 1

CAAE: 30156020.8.0000.5426

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP **Patrocinador Principal:** FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.015.359

Apresentação do Projeto:

Neste projeto será avaliado o efeito do *Lactobacillus acidophilus* LA5 sobre a composição da microbiota oral e intestinal de indivíduos com doença periodontal (Experimento 1), indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (Experimento 2) e com doença periodontal e diabetes *mellitus* tipo 2

(Experimento 3) utilizando o Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH), todos experimentos serão realizados em modelo in vitro. Como experimento controle será avaliado o efeito do *Lactobacillus acidophilus* LA5 em indivíduos saudáveis, ou seja, sem doença periodontal e diabetes (Experimento 4). Será avaliado a sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus* LA5 no SEMH, assim como será realizado a análises de sequenciamento do gene 16S rRNA, de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e íons amônio. Também será realizado análises de parâmetros imunológicos

Sendo assim, o projeto é apresentado contendo dados suficientes que justificam o uso de amostras humanas.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar o efeito do probiótico *Lactobacillus acidophilus* La-5 sobre o microbioma oral e do cólon, metabolismo da população microbiana do cólon e parâmetros imunológicos utilizando o Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH®)



Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos foram corretamente descritos no projeto e são considerados mínimos. Será utilizado material colhido da via oral e fecal de diferentes indivíduos.

Os benefícios são verificar o quão relacionado a periodontia esta com a diabetes tipo 2, e vice-versa, além da verificação da influência de probiótico nestas doenças isoladas e juntas, além de ser um estudo em um modelo in vitro que permite mimetizar todo ambiente oral e intestinal do ser humano.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto demonstra alta originalidade

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está adequado e contém todas informações necessárias. Recomenda-se apenas espaçar os parágrafos do TCLE para melhor visualização pelo participante da pesquisa

Recomendações:

Recomendações: Espaçar os parágrafos do TCLE para melhor visualização pelo participante da pesquisa

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, reunido no dia 30 de abril de

2020, analisou e aprovou o projeto de pesquisa em questão. O relatório parcial deverá ser entregue em NOVEMBRO DE 2020 e o Relatório Final junto aos Termos de Consentimento Livre Esclarecido (originais e assinados em todas as folhas) deverão ser entregues em JUNHO DE 2021 **Considerações Finais a critério do CEP:**

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1

Bairro: Campus Universitário

UF: SP

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-902

Telefone: (16)3301-4657

E-mail: sta@fcar.unesp.br

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1498042.pdf	19/03/2020 15:18:25		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	19/03/2020 15:17:31	MATEUS KAWATA SALGACO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	19/03/2020 15:16:49	MATEUS KAWATA SALGACO	Aceito

Página 02 de

Continuação do Parecer: 4.015.359

Cronograma	Cronograma.pdf	19/03/2020 15:14:11	MATEUS KAWATA SALGACO	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoAssinada.pdf	02/03/2020 09:30:31	MATEUS KAWATA SALGACO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 08 de Maio de 2020

Assinado por:
Christiane Pienna Soares
Coordenador(a)

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1

Bairro: Campus Universitário

UF: SP

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-902

Telefone: (16)3301-4657

E-mail: sta@fcfar.unesp.br