



FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

INÊS ISABEL CORREIA PEDROSA

Desenvolvimento de nano-estruturas inteligentes para encapsular e transportar bactérias lácteas probióticas

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, orientada pelo Doutor Pedro Nuno Neves Lopes Simões e pela Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves, para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química

Coimbra, 2016

Agradecimentos

Em primeiro lugar queria agradecer aos meus orientadores, Doutor Pedro Nuno Neves Lopes Simões e Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves, por todo o apoio, competência e compreensão ao longo do desenvolvimento deste trabalho. De outro modo não era possível.

Ao Doutor Jorge Rocha, gratifico a disponibilização do laboratório e de todos os recursos essenciais à realização deste trabalho.

À Engenheira Mónica Simões, agradeço o apoio, difusão de conhecimentos e grande ajuda ao longo de todos estes meses de trabalho.

Ao Grupo de Polímeros, agradeço a disponibilização de todos os materiais e equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

À Engenheira Cátia Mendes reconheço e gratifico a ajuda, disponibilidade e ensinamento de muitas técnicas e estratégias indispensáveis para a concretização deste trabalho.

Ao Engenheiro Pedro Santos deixo uma palavra de agradecimento por todo o apoio e esclarecimento de dúvidas ao longo do curso. Muito obrigada “Maxi”.

Ao Nuno: o meu pilar e apoio incondicional. Obrigada por teres vindo para Coimbra e pela pessoa admirável que és.

À Ana Alves, uma saudação especial pela ajuda em todas as circunstâncias da minha vida, pela alegria que proporciona quando chega e por todas as nossas brincadeiras. Obrigada “Tinita”.

Aos meus grandes amigos que tornaram esta jornada de 5 anos tão especial: Ana Rita Oliveira, Andreia Amador, Bárbara Valente, Diana Bregieiro, João Sarabando e Sylvia Sousa. Um bem-haja à nossa amizade.

Por último, mas não menos importante, um OBRIGADA aos meus pais. Sempre lutadores pelo meu sucesso e merecedores de toda a minha gratidão.

Resumo

O objetivo deste trabalho consistiu na síntese e caracterização de sistemas inteligentes para encapsular bactérias lácteas probióticas, designadamente *Lactobacillus acidophilus*, de modo a aumentar a sua resistência ao pH ácido do estômago e conseqüente libertação no pH básico do intestino (conseqüente da ingestão oral dos alimentos). Os sistemas de encapsulamento basearam-se num complexo polímero natural-copolímero sintético, Quitosano-(Poli(ácido acrílico)-Pluronic-Poli(ácido acrílico)) e estudou-se a influência de diferentes peso moleculares do copolímero acrílico na manutenção da viabilidade celular das bactérias.

Os copolímeros Poli(ácido acrílico)-Pluronic-Poli(ácido acrílico) (PAA-PLU-PAA) foram sintetizados através de uma reação de polimerização por emulsão e apresentaram um peso molecular de 24 kDa e 12 kDa, determinados por H-RMN, sendo ambos constituídos pela mesma fração de segmentos PAA e Pluronic (50/50).

O encapsulamento das bactérias foi realizado através da técnica *layer-by-layer* (LbL) e as condições de encapsulamento (concentração e pH da solução salina de NaCl e dos polieletrólitos, tempo de centrifugação nas lavagens, tempo de incubação para a deposição de cada camada) foram primeiramente estudadas e otimizadas para este sistema particular em estudo. As condições ótimas foram alcançadas para pH=6, uma concentração de solução salina igual a 0,15M, uma concentração molar de Quitosano e de PAA-PLU-PAA igual a $4,11 \times 10^{-8}$ mol/mL, centrifugação a 8000 rpm durante 5 min e 1h de incubação, a 37°C e 100 rpm, para a deposição de cada camada de polieletrólito.

Os resultados demonstraram que para o copolímero acrílico de peso molecular 24 kDa, os sistemas de revestimento constituídos por 2 e por 4 camadas foram os que melhor permitiram a difusão de nutrientes, assegurando o crescimento das bactérias encapsuladas próximo do crescimento obtido para as bactérias livres. A taxa de sobrevivência dos probióticos revestidos com 2 camadas, após a passagem em fluido gástrico simulado (FGS) e em fluido intestinal simulado (FIS), foi de 84 % e a taxa de sobrevivência das bactérias revestidas com 4 camadas foi de 67%.

Para o copolímero de peso molecular 12 kDa, apenas o sistema constituído por 2 camadas de revestimento permitiu que as bactérias tivessem acesso à quantidade necessária de nutrientes para exercerem a sua atividade metabólica e, neste caso, a taxa de sobrevivência das bactérias após o processo de digestão simulado foi de 83%.

Relativamente à informação existente na literatura, os aspetos inovadores deste trabalho compreendem o desenvolvimento de um sistema inteligente ao pH para o encapsulamento dos

probióticos, a combinação dos polímeros usados e a avaliação de diferentes pesos moleculares poliméricos na estrutura de encapsulamento.

Abstract

The aim of this work was the development and characterization of intelligent systems to encapsulate probiotic lactic bacteria, namely *Lactobacillus acidophilus*, to increase their resistance to stomach acid pH and subsequent release in the basic pH of the intestine, as consequence of the oral ingestion of food. The encapsulation systems were based on natural polymer-synthetic copolymer complexes, Chitosan-(Poly(acrylic acid)-Pluronic-Poly(acrylic acid)), and the influence of the polymeric molecular weight was performed to evaluate the bacteria cellular viability.

The Poly(acrylic acid)-Pluronic-Poly(acrylic acid) (PAA-PLU-PAA) copolymers were synthesized by an emulsion polymerization reaction and had a molecular weight of 24 kDa and 12 kDa, determined by H-RMN, both composed with the same fraction of PAA and Pluronic segments (50/50).

The bacteria encapsulation was performed with layer-by-layer assembly (LbL) and the encapsulation conditions (pH and concentration of NaCl buffer solution and polyelectrolyte solutions, centrifugation time, incubation time of each layer) were firstly studied and optimized. The best conditions were reached for pH=6, buffer solution concentration of 0.15M, molar concentration of Chitosan and PAA-PLU-PAA solutions equal to 4.11×10^{-8} mol/mL, centrifugation at 8000 rpm for 5 minutes, and 1h incubation at 37°C and 100 rpm for the deposition of each polyelectrolyte layer.

The results revealed that for the acrylic copolymer of molecular weight 24 kDa, coating systems consisting of 2 and 4 layers were those that best allow the diffusion of nutrients, ensuring the cellular growth next to the free bacteria growth. The survival rate of probiotics coated with 2 layers, after passage in simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF), was 84 % and the survival rate of bacteria coated with 4 layers was 67 %.

For the 12 kDa molecular weight copolymer, only the system consisting of two coating layers enabled the bacteria access to the right amount of nutrients to exert their metabolic activity and, in this case, the survival rate of the bacteria after the simulated digestion process was 83%.

Regarding the existing information that can be found in the literature, the innovative aspects of this work include the development of an intelligent system to encapsulate probiotics, the combination of the used polymers (organic polymer-inorganic polymer) and the evaluation of different polymeric molecular weights in the encapsulation structure.

Índice

INTRODUÇÃO	1
1. Motivação e objetivo do trabalho	2
2. Estratégias adotadas	4
CAPÍTULO 1.....	10
Parte I – Probióticos.....	11
1. Definição de probiótico	11
2. Benefícios dos probióticos na saúde.....	12
3. Mecanismos de ação das bactérias probióticas.....	13
4. Regulamentações no mercado dos probióticos	14
Parte II – Encapsulamento dos probióticos	15
1. Definição e objetivos do encapsulamento.....	15
2. Materiais mais usados no encapsulamento de probióticos	16
2.1. Alginato.....	16
2.2. Quitosano	17
2.3. Carragenina	18
2.4. Goma gelana e xantana.....	18
3. Técnicas de encapsulamento de probióticos	18
3.1. Extrusão.....	18
3.2. Emulsão.....	19
3.3. Secagem por atomização (<i>Spray-drying</i>)	20
3.4. <i>Layer-by-layer</i> (LbL)	21
Parte III- Polímeros	23
1. Definição de polímero	23
1.1. Polímeros Inteligentes.....	23
1.1.1. Polímeros sensíveis ao pH.....	24
2. Mecanismos de polimerização	25
3. Polimerização radicalar livre	25
3.1. Polimerização em emulsão.....	26
4. Polimerização radicalar viva (LRP).....	27
4.1 Tipos de polimerização radicalar viva	27
4.1.1. ATRP	28
CAPÍTULO 2.....	31
1. Materiais	32

2. Equipamentos	32
3. Técnicas	33
3.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	33
3.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR)	33
3.3. Dynamic Light Scattering (DLS).....	34
4. Métodos	34
Parte I- Síntese do copolímero PAA-Pluronic-PAA.....	35
1.1. Síntese do iniciador Bromo-Pluronic-Bromo (Br-PLU-Br)	35
1.2. Síntese do copolímero Poli(<i>tert</i> -acrilato de butilo)-Pluronic- Poli(<i>tert</i> -acrilato de butilo) (PtBA-PLU-PtBA).....	36
1.3. Síntese do copolímero Poli(ácido acrílico)-Pluronic-Poli(ácido acrílico) (PAA-PLU-PAA) 37	37
1.4. Síntese do copolímero Poli(ácido acrílico)-Pluronic-Poli(ácido acrílico) (PAA-PLU-PAA) por polimerização de emulsão	37
Parte II- Encapsulamento das bactérias lácteas probióticas.....	39
1. Otimização das condições de encapsulamento.....	39
1.1. Inóculo	39
1.2. Volume inicial de meio de cultura para o encapsulamento	39
1.3. Concentração e pH das soluções de NaCl, de quitosano e do copolímero PAA-PLU-PAA 40	40
1.4. Tempo e velocidade de centrifugação	41
1.5. Tempo de incubação entre camadas	41
2. Descrição do procedimento experimental	41
2.1. Crescimento das bactérias <i>Lactobacillus acidophilus</i>	41
2.2. Encapsulamento das bactérias <i>Lactobacillus acidophilus</i>	42
2.3. Liofilização das bactérias encapsuladas	43
2.4. Quantificação da concentração celular através da análise espectrofotométrica de densidade ótica (D.O).....	44
2.5. Análise quantitativa de açúcares redutores	44
2.6. Simulação da resistência ao processo de digestão.....	45
2.7. Efeito do tratamento térmico nos sistemas de encapsulamento	45
2.8. Diâmetro dos sistemas de encapsulamento	46
2.9. Método das placas.....	46
Capítulo 3.....	48
1. Síntese dos copolímeros Br-PLU-Br, PtBA-PLU-PtBA e PAA-PLU-PAA	49
2. Síntese do copolímero PAA-PLU-PAA através de polimerização por emulsão	51
3. Encapsulamento das bactérias <i>Lactobacillus acidophilus</i> com Quitosano e com o copolímero PAA-PLU-PAA.....	52

3.1	Avaliação do potencial zeta	52
3.2.	Análise espectrofotométrica de densidade ótica (D.O) e análise quantitativa de açúcares redutores	55
3.3.	Simulação da resistência ao processo de digestão	58
3.4.	Viabilidade celular durante o armazenamento	62
3.5.	Efeito do tratamento térmico nos sistemas de encapsulamento	63
3.6.	Diâmetro dos sistemas de encapsulamento	65
Apreciações Finais		68
Conclusões		69
Trabalho Futuro		69
Bibliografia e Netografia		70
ANEXOS		77
ANEXO I		i
ANEXO II		ii
ANEXO III		iii
ANEXO IV		iv
ANEXO V		v

Índice de Figuras

Figura 1. Ilustração do princípio de encapsulamento de células probióticas, no qual as membranas protegem as bactérias das condições adversas e permitem o transporte de metabolitos e de compostos antimicrobianos (substâncias antagônicas, ex: bacteriocinas) (Kailasapathy 2002).	3
Figura 2. Estrutura química do poli(ácido acrílico).	5
Figura 3. Estrutura química do Pluronic.	5
Figura 4. Representação esquemática da esterificação do Pluronic.	6
Figura 5. Representação esquemática da síntese do copolímero PtBA-PLU-PtBA.	6
Figura 6. Representação esquemática da hidrólise do copolímero PtBA-PLU-PtBA.	6
Figura 7. Estrutura química do ácido D-manurónico (esquerda) e do ácido L-gulurónico (direita).	16
Figura 8. Estrutura química do quitosano.	17
Figura 9. Mecanismos inerentes à técnica de extrusão. À direita o gerador de gotas, constituído por agulhas, onde normalmente ocorre a circulação de ar e à esquerda o dispositivo de disco rotativo (Burgain et al. 2011).	19
Figura 10. Esquema do procedimento envolvido na técnica de emulsão para encapsular bactérias probióticas (Burgain et al. 2011).	20
Figura 11. Representação do mecanismo envolvido na técnica Spray-drying (Burgain et al. 2011).	21
Figura 12. Representação do mecanismo inerente à técnica LbL para encapsular bactérias probióticas (Priya et al. 2011).	22
Figura 13. Ilustração do mecanismo inerente ao transporte e libertação de substâncias bioativas (fármacos, células) por um polímero carboxílico sensível ao pH (Almeida et al. 2012).	25
Figura 14. Equilíbrio geral do mecanismo de ativação/desativação ATRP alcançado entre espécies ativas e dormentes (Siegwart et al. 2012);(Mendes 2011);(Mishra & Kumar n.d.). .	29
Figura 15. Representação esquemática da reação de esterificação do Pluronic.	35
Figura 16. Representação esquemática da polimerização por ATRP para sintetizar o copolímero PtBA-PLU-PtBA.	36
Figura 17. Representação esquemática da hidrólise do copolímero PtBA-PLU-PtBA, para sintetizar o copolímero PAA-PLU-PAA.	37
Figura 18. Representação esquemática das reações envolvidas na polimerização em emulsão para sintetizar o copolímero PAA-PLU-PAA.	38

Figura 19. Resultados do potencial zeta respectivo ao encapsulamento das bactérias com o copolímero de peso molecular 24 kDa, para 30 min (a) e 1h (b) de incubação entre camadas. (As barras de incerteza correspondem ao desvio padrão.).....	53
Figura 20. Resultados do potencial zeta respectivo ao encapsulamento das bactérias com o copolímero de peso molecular 12 kDa, para 30 min (a) e 1h (b) de incubação entre camadas. (As barras de incerteza correspondem ao desvio padrão.).....	54
Figura 21. Imagem obtida por microscopia digital, com a objetiva de imersão, relativa ao sistema com 1h de incubação entre as várias camadas.	55
Figura 22. (a) Curva de crescimento das bactérias <i>Lactobacillus acidophilus</i> , em meio MRS, revestidas com o copolímero de peso molecular 24 kDa e (b) consumo de glucose ao longo do cultivo em meio MRS. (As barras de incerteza correspondem ao desvio padrão.).....	56
Figura 23. (a) Curva de crescimento das bactérias <i>Lactobacillus acidophilus</i> , em meio MRS, revestidas com o copolímero de peso molecular 12 kDa e (b) consumo de glucose ao longo do cultivo em meio MRS. (As barras de incerteza correspondem ao desvio padrão.).....	57
Figura 24. (a) Viabilidade celular das bactérias <i>L. acidophilus</i> , livres e encapsuladas com o copolímero de 24 kDa, após a liofilização e após o processo de digestão simulada e (b) viabilidade celular das bactérias <i>L. acidophilus</i> , livres e encapsuladas com o copolímero de 12 kDa. Os resultados estão expressos em log UFC/mL e as barras de incerteza correspondem ao desvio padrão.....	59
Figura 25. (a) Viabilidade celular das bactérias <i>L. acidophilus</i> liofilizadas, livres e encapsuladas, com o copolímero de 24 kDa, (b) viabilidade celular das bactérias <i>L. acidophilus</i> , livres e encapsuladas, com o copolímero de 12 kDa. Os resultados estão expressos em UFC/mL e as barras de incerteza correspondem ao desvio padrão.....	62
Figura 26. (a) Influência do tratamento térmico na viabilidade celular das bactérias <i>L. acidophilus</i> liofilizadas, livres e encapsuladas, com o copolímero de 24 kDa, e (b) com o copolímero de 12 kDa. Os resultados estão expressos em UFC/mL e as barras de incerteza correspondem ao desvio padrão.	64
Figura 27. (A) Imagens obtidas por microscopia digital relativas às bactérias livres, (B) ao sistema constituído por duas camadas de revestimento e (C) ao sistema constituído por quatro camadas de revestimento, para o copolímero de peso molecular 24 kDa. (D) Bactérias encapsuladas com duas camadas para o copolímero acrílico de peso molecular 12 k Da.....	66

Figura A I - Espectro FTIR-ATR do iniciador Br-PLU-Br.	i
Figura A II - Espectro H-RMN em THF-d ₈ do iniciador Br-PLU-Br.	i
Figura A III - Espectro FTIR-ATR do copolímero PtBA-PLU-PtBA.....	ii
Figura A IV - Espectro FTIR-ATR do copolímero PAA-PLU-PAA.	iii
Figura A V - Espectro FTIR-ATR do copolímero PAA-PLU-PAA.de peso molecular 24 kDa.	iv
Figura A VI - Espectro H-RMN em THF-d ₈ do copolímero PAA-PLU-PAA de peso molecular 24 kDa.	iv
Figura A VII - Espectro FTIR-ATR do copolímero PAA-PLU-PAA.de peso molecular 12 kDa.	v
Figura A VIII - Espectro H-RMN em THF-d ₈ do copolímero PAA-PLU-PAA de peso molecular 12 kDa.....	v

Índice de Tabelas

Tabela 1. Condições da reação, peso molecular ($M_{n,GPC}$), polidispersividade (\mathcal{D}) e massa do copolímero PAA-PLU-PAA, para diferentes proporções usadas na síntese.....	50
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Lista de Abreviaturas

2-BiB - Brometo de 2-bromoisobutirilo

ATRP – *Atom Transfer Radical Polymerization*

Br – Bromo

Br-PLU-Br – Copolímero Bromo-Pluronic-Bromo

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CH₂Cl₂ - Diclorometano

CMC – Concentração Micelar Crítica

Cu(0) – Cobre de valência zero

Cu(I)Br - Brometo de cobre (I)

CuBr₂ – Brometo de cobre (II)

Đ - Dispersividade

D.O – Densidade Ótica

d₈THF – THF deuterado

DCT – *Degenerative Chain Transfer*

DLS – *Dynamic Light Scattering*

DMAP - 4-(dimetil amino)piridina

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

EFSA – Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

FDA – Food and Drug Administration

FGS – Fluido Gástrico Simulado

FIS – Fluido Intestinal Simulado

FTIR – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

FTIR-ATR – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada

GPC – Cromatografia de permeação de gel

H-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de próton

I – Iniciador

LB – Langmuir-Blodgett

LbL – *Layer-by-layer*

LDM - *Laser Doppler Micro-electrophoresis*

Lg – Ligante
LRP – *Living Radical Polymerization*
M – Monómero
M3-PALS – *Phase Analysis Light Scattering*
Mn – Peso molecular numérico
Mtⁿ/L - Complexo de metal de transição
Mw - Peso molecular ponderal
NaCl – Cloreto de sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
NIBS – *Non-Invasive Back Scatter Technology*
OMS – Organização Mundial de Saúde
PAA – Poli(ácido acrílico)
PAA-PLU-PAA – Copolímero Poli(ácido acrílico)
PEO – Óxido de poli(etileno)
PLU – Pluronic
PMDETA – n,n,n',n',n-pentametildietilestearilamina
PPO – Óxido de poli(propileno)
PRE – *Persistent Radical Effect*
PtBA - Poli (terc-butil acrilato)
PtBA-PLU-PtBA – Poli(terc-butil acrilato) com Br-PLU-Br
QPS – Qualified Presumption of Safety
RAFT – *Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer*
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
SFRP – *Stable Free Radical Polymerization*
tBA – Terc-butil acrilato
TFA – Ácido trifluoroacético
THF - Tetraidrofurano
UFC – Unidade Formadora de Colónias
UFC – Unidade Formadora de Colónias
X – Grupo substituinte /Átomo Halogenado

INTRODUÇÃO

1. Motivação e objetivo do trabalho

Os probióticos são microrganismos comumente encontrados em produtos lácteos fermentados, tais como o iogurte e o leite. Contudo, devido ao reconhecimento científico crescente acerca dos seus benefícios na saúde humana, a indústria alimentar tem diversificado os seus produtos, isto é, tem introduzido no mercado alimentos não lácteos que também permitam o consumo de probióticos. Deste modo, o desenvolvimento de novos alimentos funcionais constitui um grande desafio e os laboratórios devem dispor de tecnologias economicamente viáveis e passíveis de serem usadas à escala industrial.

As vantagens associadas aos probióticos, quando ingeridos na quantidade recomendada, estão intimamente relacionados com benefícios nutricionais (aumento da biodisponibilidade de cálcio, zinco, ferro, manganésio e síntese de vitaminas) e com benefícios terapêuticos (prevenção de doenças gastrointestinais, atividade antimicrobiana, combate a reações alérgicas, tais como a intolerância à lactose e o estímulo da atividade anticancerígena). Assim, a condução de células viáveis até ao intestino, constitui um elemento muito importante na manutenção de uma flora intestinal saudável. Todavia, esse transporte constitui um dos desafios da atualidade, na medida em que as bactérias probióticas não resistem ao ambiente extremamente ácido do estômago e morrem antes de atingirem o intestino, não desempenhando portanto as funções requeridas.

No passado, os sistemas mais comuns para aumentar a viabilidade dos probióticos baseavam-se na imobilização das bactérias, que corresponde ao aprisionamento de biocatalisadores, organelos celulares ou células numa matriz. A imobilização é usada para a fixação química ou física das células sobre ou dentro de um suporte sólido, de modo a que a estabilidade das mesmas aumente (Kailasapathy 2002).

Ao refinar a técnica de imobilização, surgiu outro conceito para aumentar a viabilidade celular, que consiste no encapsulamento de probióticos. Este caracteriza-se por um processo físico-químico ou mecânico para reter uma substância num determinado material, sendo que as partículas resultantes podem apresentar diâmetros entre nanómetros até alguns milímetros. Neste caso, há a formação de um revestimento contínuo em torno dos agentes ativos e as células estão delimitadas pelas paredes membranares da matriz do revestimento, mas livres no seu interior, como ilustra a Figura 1 (Kailasapathy 2002). Esta técnica oferece uma barreira de proteção em torno das células, o que assegura a sua viabilidade prolongada durante o processamento e armazenamento dos alimentos. O encapsulamento, quando comparado com a imobilização, apresenta várias vantagens, tais como o facto de a cápsula ser constituída por uma membrana semipermeável, fina e resistente que permite a difusão de massa. A libertação do

material encapsulado ocorre quando há ruptura mecânica, dissolução ou fusão membranar e difusão através da membrana.

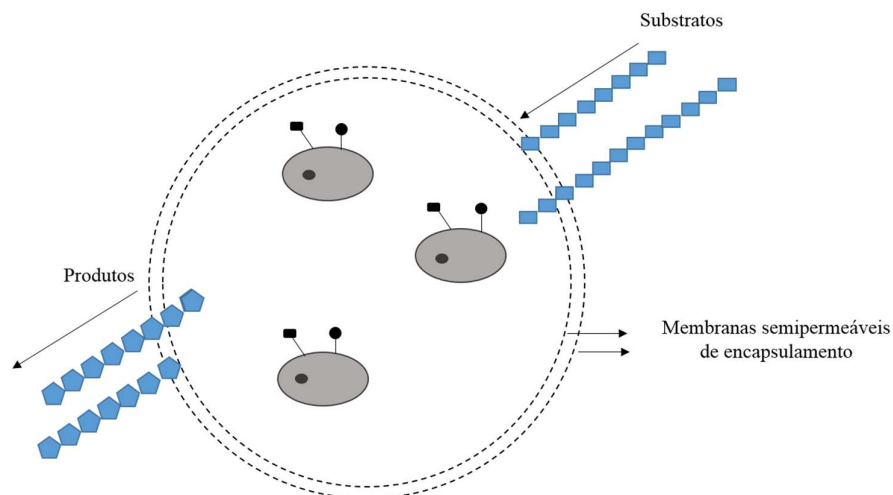


Figura 1. Ilustração do princípio de encapsulamento de células probióticas, no qual as membranas protegem as bactérias das condições adversas e permitem o transporte de metabolitos e de compostos antimicrobianos (substâncias antagónicas, ex: bacteriocinas) (Kailasapathy 2002).

Os materiais de encapsulamento mais usados até hoje baseiam-se em getatina, caboximetil celulose, alginato, na mistura de alginato com outros compostos, tais como proteína de milho, cálcio e sódio ou no revestimento de esferas de alginato com quitosano (Riaz & Masud 2013). As técnicas de encapsulamento mais usadas são a emulsão, extrusão e *spray drying* (Chávarri et al. 2012). Contudo, estes métodos não são os melhores no que diz respeito à estabilidade dos alimentos durante o tempo de armazenamento, à viabilidade celular dos probióticos e à proteção das bactérias durante a digestão dos alimentos, devido às condições de processamento envolvidas (temperatura), tamanho das cápsulas formadas e impossibilidade de produção à escala industrial (Kailasapathy 2002).

A presença de variadas condições no sistema digestivo humano (pH, força iónica, pressão) tornam o processo de síntese de sistemas de libertação de probióticos bastante complexo e, por tal, são necessárias estratégias altamente adaptadas/particularizadas para entregar as bactérias, vivas, no intestino. Esta necessidade constituiu a motivação deste trabalho, que se baseia no desenvolvimento e caracterização de sistemas de encapsulamento chamados inteligentes, constituídos por um polímero natural, sensível ao pH e força iónica, e por um copolímero com segmentos sensíveis ao pH. O polímero natural oferece vantagens como biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade, e o polímero dito inteligente permite uma resposta ativa perante as variações de pH intrínsecas do trato gastrointestinal.

Este estudo, para além da associação de um material orgânico a um material inorgânico, consistiu também na aplicação de uma técnica relativamente recente e inovadora no campo dos probióticos. A técnica em causa designa-se *Layer-by-Layer* e permite a obtenção de sistemas permeáveis, biofuncionais e biocompatíveis, dependendo do tipo de polielectrólito usado, número de camadas, força iónica, pH e temperatura (Priya et al. 2011).

O desenvolvimento de um sistema constituído por um polímero natural e por um copolímero sintético, para encapsular bactérias, constitui uma ideia inovadora que ainda não foi estudada e, por tal, este trabalho tem como objetivo avaliar as características e performance do sistema mencionado.

2. Estratégias adotadas

A seleção dos polímeros para encapsular bactérias, tendo em conta o ambiente onde vão ser aplicados os sistemas de encapsulamento, é o critério que requer mais estudo, na medida em que as propriedades intrínsecas dos polímeros, bem como os benefícios associados à combinação de determinados polímeros, ditam o comportamento do sistema e, portanto, a sua resposta pretendida. Adicionalmente, a técnica de encapsulamento dos probióticos, constitui também um parâmetro muito importante, pois a aplicação à escala industrial, o tamanho das matrizes de encapsulamento obtidas, a taxa de sobrevivência e estabilidade das bactérias durante o processamento e armazenamento dos alimentos e, finalmente, a libertação dos probióticos íntegros no intestino são parâmetros que dependem da técnica usada.

Por tal, a estratégia adotada neste trabalho consistiu no encapsulamento de bactérias lácteas probióticas da estirpe *Lactobacillus acidophilus*, as mais reconhecidas/importantes no desempenho de efeitos benéficos no trato gastrointestinal, através da técnica *layer-by-layer* (LbL), com quitosano e com um copolímero acrílico com segmentos de Pluronic. Para realizar um estudo mais completo e uma vez que as propriedades de um polímero (propriedades físicas, mecânicas, térmicas, de processamento, etc) podem ser completamente alteradas para pesos moleculares diferentes (Felipetto 2003), este trabalho avaliou também a influência de dois pesos moleculares distintos do copolímero acrílico no encapsulamento e na proteção das bactérias probióticas.

O poli(ácido acrílico), Figura 2, é um polímero biocompatível e sensível ao pH, devido ao grupo carboxílico, o que é de grande interesse quando se pretende uma resposta ativa na transição do meio ácido do estômago para o meio básico do intestino (local onde os probióticos devem ser libertados) (Bag & Rao 2006).

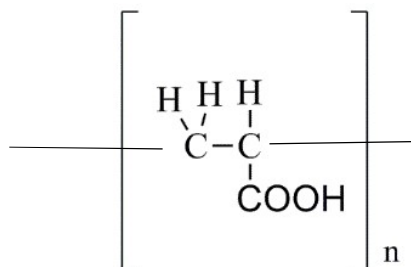


Figura 2. Estrutura química do poli(ácido acrílico).

O Pluronic, Figura 3, é um copolímero tribloco, constituído por óxido de poli(etileno) (PEO) e por óxido de poli(propileno) (PPO), (PEO-*b*-PPO-*b*-PEO). O óxido de etileno tem um carácter hidrofílico enquanto o óxido de propileno tem um carácter hidrofóbico, o que se traduz num copolímero anfifílico (Batrakova & Kabanov 2009).

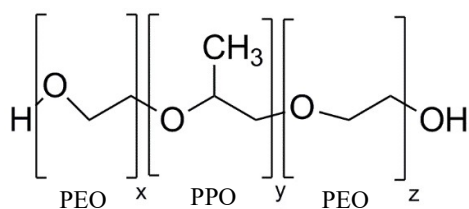


Figura 3. Estrutura química do Pluronic.

O facto de o Pluronic ser um copolímero não tóxico, biocompatível (devido à elevada fração de cadeias de óxido de poli(etileno)) e anfifílico explica a sua aplicação como excipiente farmacêutico, na medida em que aumenta a solubilidade aquosa, bem como a estabilidade do fármaco/ agente terapêutico (Zhang & Lam 2007). Contudo, a uma matriz constituída somente por Pluronic, está associada uma taxa de libertação da substância bioativa muito rápida, pelo que uma das metodologias utilizadas para ultrapassar esta desvantagem é a combinação do Pluronic a polímeros ditos inteligentes (Barreiro-Iglesias et al. 2005).

Deste modo, um sistema promissor consiste na ligação covalente do Pluronic ao polímero poli(ácido acrílico), PAA, através da ligação carbono-carbono entre o poliéter do Pluronic e o PAA (Zhang & Lam 2007 ; Bromberg 1998). Esta união combina a capacidade de

solubilização do surfactante poliéter e a sensibilidade ao pH e propriedades bioadesivas do PAA (Barreiro-Iglesias et al. 2005).

O primeiro método de síntese dos copolímeros PAA-PLU-PAA consistiu numa polimerização radicalar viva por transferência de cadeia (ATRP), na medida em que este método de polimerização é rápido e permite um controlo apertado das propriedades dos polímeros finais, tais como a estrutura, o peso molecular e a polidispersividade (Siegwart et al. 2012). Primeiramente os grupos hidroxilo (-OH) terminais do surfactante Pluronic foram modificados, através de uma reação de esterificação, de forma a obter-se um iniciador com grupos bromo (Br) (Figura 4), usado na polimerização por ATRP para sintetizar o copolímero poli(*tert*-acrilato de butilo)-Pluronic-poli(*tert*-acrilato de butilo) (PtBA-PLU-PtBA) (Figura 5) e, por último, o copolímero poli(ácido acrílico)-Pluronic-poli(ácido acrílico) (PAA-PLU-PAA) foi obtido por hidrólise do copolímero anterior (Figura 6) (Choo et al. 2011).

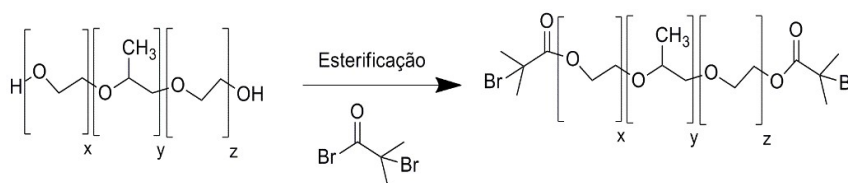


Figura 4. Representação esquemática da esterificação do Pluronic.

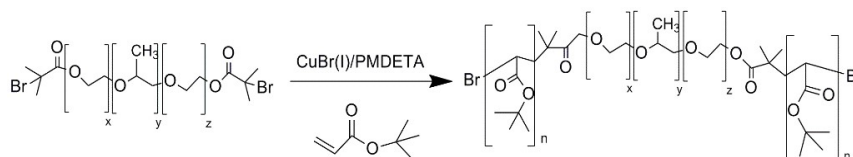


Figura 5. Representação esquemática da síntese do copolímero PtBA-PLU-PtBA.

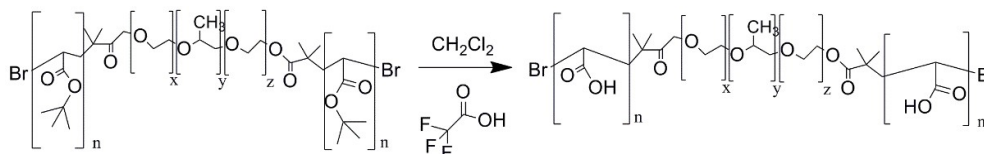


Figura 6. Representação esquemática da hidrólise do copolímero PtBA-PLU-PtBA.

Contudo, devido a problemas relacionados com a obtenção de pesos moleculares distintos do copolímero Poli(ácido acrílico)-Pluronic-Poli(ácido acrílico) e com a quantidade de polímero final obtido, recorreu-se à síntese dos copolímeros através de uma polimerização por emulsão, bastante descrita na literatura (Alakhov et al. 2004).

Depois de se obterem os copolímeros com os pesos moleculares pretendidos, procedeu-se ao encapsulamento das bactérias *Lactobacillus a.* através da técnica *layer-by-layer*, que se baseia na adsorção alternada de polímeros carregados, formando-se multicamadas de polieletrólitos através de interações electrostáticas (Decher 1997). É uma técnica simples, permite a formação de superfícies funcionais em substratos com diferentes formas e permite a síntese de filmes de revestimento com espessura nanométrica, fatores que a tornam tão valorizada na área farmacêutica e alimentar (Priya et al. 2011 ; Ben et al. 2014).

Os parâmetros do protocolo de deposição, tais como a concentração das soluções de polieletrólitos e o tempo de incubação para a deposição de cada camada foram primeiramente estudados e otimizados, sendo que depois de uma seleção criteriosa das condições ótimas para este sistema, os probióticos foram encapsulados com 6 camadas alternadas de revestimento.

A viabilidade da técnica LbL (camadas com cargas alternadas) foi avaliada através da medição do potencial zeta dos filmes de revestimento e, posteriormente, a determinação do número de camadas mais adequado para a proteção das bactérias foi realizada a partir de testes de densidade ótica.

Por último, avaliou-se a eficácia do sistema de encapsulamento, quando exposto às condições gastrointestinais, através do método das placas. Procedeu-se à incubação da mesma quantidade de bactérias encapsuladas liofilizadas e de bactérias não encapsuladas liofilizadas em fluido gástrico simulado (FGS), a pH=2 por um período de 2h, seguindo-se a incubação das mesmas bactérias em fluido intestinal simulado (FIS) a pH=8 durante 2h. Depois deste teste, as bactérias resultantes foram inoculadas em placas de agar para se proceder à contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) e, deste modo, saber a perda de bactérias em cada estágio para determinar a viabilidade das bactérias encapsuladas.

De um modo geral, a estratégia deste trabalho residiu nos seguintes passos:

- sintetizar copolímeros PAA-PLU-PAA com diferente peso molecular;
- otimizar as condições de encapsulamento (volume de inóculo, tempo de centrifugação, concentração de polieletrólitos, tempo de incubação) para a técnica LbL;

- encapsular as bactérias probióticas, através da técnica LbL, com quitosano e com os copolímeros sintetizados;
- estudar o efeito do peso molecular dos copolímeros acrílicos nos sistemas de encapsulamento;
- avaliar a perda da viabilidade celular após a liofilização das bactérias não encapsuladas e das encapsuladas com os copolímeros de diferente peso molecular;
- avaliar a viabilidade celular das bactérias não encapsuladas e encapsuladas com os copolímeros acrílicos de diferente peso molecular, quando expostas a FGS e a FIS.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Parte I – Probióticos

1. Definição de probiótico

Probiótico é um termo de origem grega que significa “para vida” (Coppola & Gil-Turnes 2004). Inicialmente, um probiótico era definido como um composto/extrato com a capacidade de estimular o crescimento microbiano (Kechagia et al. 2013). Contudo, nas duas últimas décadas, com as evidências científicas crescentes acerca do benefício destes microrganismos para a saúde humana, surgiu uma nova definição proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), na qual os probióticos são classificados como microrganismos benéficos para a saúde humana quando ingeridos na quantidade adequada, 10^7 UFC/g_{produto} (Corona-Hernandez et al. 2013 ; FAO 2001).

É por este motivo que os probióticos têm sido incorporados em vários produtos diários não fermentados, devido à intolerância à lactose e aos níveis de colesterol associados aos produtos diários fermentados, produtos estes caracterizados pela existência de probióticos (Saarela et al. 2000 ; Parvez et al. 2006).

O conceito de probiótico engloba bactérias lácteas, bactérias não lácteas e leveduras, microorganismos responsáveis pela manutenção de um balanço intestinal apropriado e pelo impedimento da colonização de microrganismos patogênicos; fortalecendo o sistema imunitário, reduzindo o colesterol e prevenindo o aparecimento de certos tipos de cancro (Kailasapathy 2002).

Apesar de as bactérias não lácteas e as leveduras estarem englobadas no leque dos probióticos, são as bactérias lácteas que apresentam um maior potencial na manutenção de uma microflora intestinal saudável, sendo que as mais estudadas e utilizadas em termos de nutrição pertencem aos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e, em particular, a espécie *Lactobacillus acidophilus* (Paula 2014). Assim, há que salientar a importância de mencionar a estirpe de bactéria a que corresponde uma determinada atividade, na medida em que esta varia consoante a estirpe (Chávarri et al. 2012).

Um probiótico deve respeitar determinados critérios de segurança, de funcionalidade e tecnológicos.

A segurança é um fator crucial quando estão envolvidos seres humanos, sendo que existem determinadas abordagens que devem ser seguidas de modo a estabelecer uma aplicação segura das bactérias, tais como estudos acerca das propriedades intrínsecas e da farmacocinética de uma determinada estirpe bacteriana, assim como estudos relativos à interação do probiótico com o hospedeiro. O conhecimento da sobrevivência destes microrganismos no trato

gastrointestinal, das suas propriedades de colonização e do destino dos componentes ativos resultantes dos mesmos são parâmetros que permitem inferir sobre possíveis efeitos, negativos ou positivos, associados ao consumo dos probióticos.

As características funcionais que um probiótico deve ter de modo a exercer efeitos benéficos são as seguintes: tolerância aos ácidos biliares, o que se tem mostrado uma dificuldade na administração oral; aderência a superfícies mucosas e epiteliais de modo a prevenir a adesão e colonização de agentes patogénicos; atividade antimicrobiana (sobre bactérias patogénicas); capacidade para hidrolisar sais biliares; propriedades antimutagénicas e anticarcinogénicas, através da produção compostos antimutagénicos.

Já os aspetos tecnológicos estão relacionados com a capacidade dos probióticos resistirem ao processamento industrial e de sobreviverem à etapa de armazenamento dos alimentos, salientando que a incorporação das bactérias lácteas nos alimentos não pode alterar o sabor nem a textura dos mesmos (Saarela et al. 2000).

Apesar das evidências científicas sobre a eficácia destes microrganismos e seus benefícios, existem ainda muitos aspetos desconhecidos. Por isso, são necessárias pesquisas adicionais de modo a estabelecer quais são as estirpes probióticas mais vantajosas, qual a dosagem mais eficaz para cada paciente e avaliar a segurança e limitações das mesmas, assim como os seus aspetos nutricionais (Kechagia et al. 2013).

2. Benefícios dos probióticos na saúde

No intestino existem mais de 100 triliões de microrganismos, sendo que as bactérias intestinais desempenham um papel vital na saúde (Binns 2013). A realização de estudos em animais livres de germes provou que os mesmos não necessitam de uma colonização microbiana para sobreviver mas, quando comparados com animais com microrganismos, são evidentes diferenças psicológicas e bioquímicas, bem como o maior aparecimento de infeções (Gibson & Fuller 2000).

Assim, existem evidências científicas crescentes acerca dos benefícios dos probióticos no que diz respeito a doenças associadas ao trato gastrointestinal, a doenças alérgicas, a doenças cardiovasculares, a distúrbios do trato urogenital e à imunidade da mucosa (Marteau et al. 2001). Dentro das doenças associadas ao trato gastrointestinal é possível identificar um efeito positivo dos probióticos no controlo de infeções gastrointestinais e complicações associadas a gastrite do tipo B, úlcera péptica e cancro gástrico, na prevenção de diarreia causada por algumas bactérias patogénicas e vírus, no aumento da tolerância à lactose, no tratamento de

doenças hepáticas, no tratamento de doenças inflamatórias do intestino (doença de Crohn), no controlo da obstipação e na prevenção de alguns tipos de cancro (Chávarri et al. 2012).

O cancro é, sem dúvida, uma das doenças que mais afeta negativamente a sociedade dos nossos dias, sendo mesmo classificado como a “doença do século XXI” e, por tal, muitos dos estudos recentes focam-se no estudo das propriedades anticancerígenas dos probióticos (Hirayama & Rafter 2000 ; Parvez et al. 2006). Não existem evidências experimentais diretas para a supressão de cancro nos seres humanos como resultado do consumo de alimentos com bactérias lácteas probióticas, mas há um vasto leque de evidências indiretas baseadas em experiências laboratoriais e na literatura (Hirayama & Rafter 2000).

Em suma, uma microbiota intestinal saudável e equilibrada traduz-se num desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro e, portanto, garante uma melhoria da qualidade de vida.

3. Mecanismos de ação das bactérias probióticas

Existem centenas de espécies de micróbios que foram identificadas como comensais humanos, sendo que a concentração de bactérias no corpo humano atinge 10^{14} células (Gibson & Fuller 2000). O sistema gastrointestinal humano constitui um ecossistema dinâmico complexo, colonizado maioritariamente por bactérias anaeróbias estritas, sendo que cada pessoa tem uma flora intestinal diferente, que permanece estéril até ao nascimento do indivíduo. O local onde se vive e, conseqüentemente, a alimentação são fatores que afetam o balanço entre bactérias boas e más (Fons et al. 2000).

A microbiota intestinal envolve uma melhoria na barreira epitelial, aumentando a aderência à mucosa intestinal e a permeabilidade intestinal, inibindo a aderência de organismos patogénicos e a de compostos nocivos através do lúmen do intestino.

O modo de ação dos probióticos não foi ainda completamente esclarecido, embora se conheçam vários mecanismos, tais como a conversão de vitaminas essenciais e nutrientes em formas absorvíveis, a produção de certas vitaminas do tipo B, a produção de enzimas (β -Dgalactosidase, por exemplo) que digerem determinadas substâncias e a capacidade de metabolizar substâncias cancerígenas (Gogineni et al. 2013 ; Holzapfel 2001).

O efeito dos probióticos na manutenção de uma resposta imunitária ativa, específica e não-específica, tem sido alvo de vários estudos, na medida em que não envolve um processo inflamatório. Este fenómeno resulta da resposta imunitária, pelos probióticos, através da atividade fagocítica desencadeada por macrófagos, como consequência do aumento dos níveis de citocinas e do aumento do número de células destruidoras naturais.

Adicionalmente, e como reportado na seção 2 (*Benefícios na Saúde*), os probióticos têm também um efeito positivo no que diz respeito à inibição do crescimento de células cancerígenas, sendo que os mecanismos de ação subjacentes a esta atividade incluem o aumento da resposta imunitária do hospedeiro, a degradação de potenciais agentes cancerígenos, alterações quantitativas ou qualitativas na microflora intestinal, a produção de compostos antimutagênicos e antitumorais no intestino e a inibição da conversão de sais biliares a sais biliares secundários (Hirayama & Rafter 2000).

A idade, o *stress*, determinadas doenças e a dieta são fatores que levam à perda de integridade da mucosa intestinal e, por tal, uma dieta equilibrada com alimentos funcionais que englobem uma combinação de probióticos, prebióticos e simbióticos, permite a manutenção de uma microbiota intestinal equilibrada e saudável (Saad 2006).

4. Regulamentações no mercado dos probióticos

Atualmente, o mercado da indústria alimentar associado aos probióticos dispõe de regulamentações globais bastante rigorosas, pelo que as autoridades ligadas à saúde em colaboração com a indústria alimentar têm a responsabilidade de realizar procedimentos para autorizar os produtos. A avaliação dos documentos que contêm todos os resultados científicos devem ser realizados por uma equipa multidisciplinar (Pineiro & Stanton 2007). Na Europa, a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) desenvolveu o QPS (*Qualified Presumption of Safety*), definida como uma ferramenta para avaliar a segurança dos microorganismos usados nos alimentos. A EFSA é a entidade responsável por averiguar a veracidade das alegações relacionadas com a saúde feitas pelos produtores alimentares industriais, sendo que em Dezembro de 2006 a União Europeia aprovou um regulamento relacionado com as reivindicações associadas aos benefícios para a saúde dos alimentos e, desde então, muitas dessas alegações foram rejeitadas. Tal recusa baseia-se na falta de informação no que diz respeito à caracterização das estirpes probióticas e até mesmo na discordância entre as estirpes mencionadas e as estirpes realmente presentes nos alimentos (Burgain et al. 2011 ; Jankovic et al. 2010).

Nos Estados Unidos da América, não existem documentos de orientação no campo industrial dos probióticos, pelo que é fundamental comprovar cientificamente junto da FDA (Food and Drug Administration) as alegações que os produtores fazem. Em 2009 foi publicado um documento de orientação, intitulado “Evidence-based review system for the scientific evaluation of health claims” para ajudar os produtores a sustentarem as suas alegações (FAO/WHO 2002).

São raros os casos reportados em relação a efeitos adversos causados pelos probióticos, especialmente para os géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*. Contudo, é necessário dedicar especial atenção a determinadas populações, tais como recém-nascidos e pacientes hospitalizados.

Parte II – Encapsulamento dos probióticos

1. Definição e objetivos do encapsulamento

A tecnologia de encapsulamento consiste na incorporação de compostos bioativos em partículas milimétricas, micrométricas ou nanométricas, isolando os mesmos e garantindo a sua libertação controlada no local/ambiente requerido (Chávarri et al. 2012).

Na indústria alimentar, os principais fatores que justificam a proteção dos probióticos são as duras condições de processamento dos alimentos (temperatura, oxidação, tensão), a dessecação no caso de alimentos secos, as condições de armazenamento, tais como a oxigenação e a temperatura. Por outro lado, a degradação das bactérias no trato gastrointestinal, devido ao pH do estômago e à presença de sais biliares no intestino delgado não só explicam como impõem essa proteção (Corona-Hernandez et al. 2013 ; Anal & Singh 2007). Por este conjunto de razões, o encapsulamento das bactérias probióticas tornou-se uma tecnologia emergente e eficiente, visto que esta metodologia permite a imobilização das bactérias e a criação de um micro ambiente que garante a sobrevivência das mesmas durante o processamento e armazenamento dos alimentos, mantém a sua integridade na passagem ao longo do trato gastrointestinal e, por último, permite a sua libertação no local requerido. i.e. no intestino (Kailasapathy 2002).

O encapsulamento de probióticos apresenta dois problemas de grande foco: o tamanho e a manutenção da viabilidade dos mesmos, sendo que este último aspeto tem sido crucial na escolha da técnica e materiais de encapsulamento. De um modo geral, o encapsulamento pode ser um processo físico-químico ou mecânico e, dependendo da tecnologia e material utilizados, leva à formação de cápsulas com um diâmetro que pode ir de algumas unidades a largas centenas de micrómetros. A parte interior das cápsulas contém o ingrediente ativo e a superfície externa consiste numa membrana fina, forte, semipermeável e esférica (Riaz & Masud 2013). Existem diversos materiais que podem ser usados no encapsulamento, tais como polímeros, proteínas e lípidos, sendo que a natureza química e as propriedades físico-químicas do material escolhido ditam a técnica a usar (Corona-Hernandez et al. 2013).

2. Materiais mais usados no encapsulamento de probióticos

2.1. Alginato

O alginato é um polissacarídeo aniônico, de origem natural, extraído da parede celular das algas marinhas, podendo também encontrar-se na parede celular de algumas bactérias (Riaz & Masud 2013). Este produto natural é um copolímero linear, constituído pelos ácidos D-manurónico e L-gulurónico (Figura 7), sendo que estes se unem formando uma cadeia rígida com partes flexíveis. Assim, a composição e a estrutura em bloco do alginato estão fortemente relacionadas com as propriedades funcionais deste para formar sistemas de encapsulamento (Desai & Jin Park 2005).

Este biopolímero é o mais usado e investigado no encapsulamento, pois forma facilmente matrizes em torno das bactérias, o seu processamento é fácil e envolve baixas temperaturas, é não tóxico e biocompatível. Adicionalmente, o alginato é facilmente desintegrado no intestino, permitindo assim a libertação dos probióticos neste (Chávarri et al. 2012).

Contudo, existem desvantagens associadas a este material, designadamente a ineficácia na proteção dos probióticos em ambientes muito ácidos, como no estômago, ocorrendo uma perda da estabilidade mecânica, que se traduz na desintegração da cápsula de alginato ao longo da sua passagem no trato gastrointestinal. O *scale-up* dos sistemas de encapsulamento com alginato, para aplicações industriais, constitui também um problema, na medida em que o alginato é caro e leva à formação de superfícies muito porosas, diminuindo a proteção das células contra condições adversas do meio (Solanki et al. 2013 ; Mortazavian et al. 2007).

Foram desenvolvidas metodologias para ultrapassar os inconvenientes mencionados, tais como a mistura do alginato com outros compostos poliméricos, como por exemplo o milho, o revestimento das cápsulas de alginato com outros compostos ou a modificação da estrutura do alginato com aditivos diferentes (Riaz & Masud 2013). Porém, estas metodologias estão ainda a ser estudadas e aperfeiçoadas, pelo que há vários parâmetros a otimizar (Burgain et al. 2011).

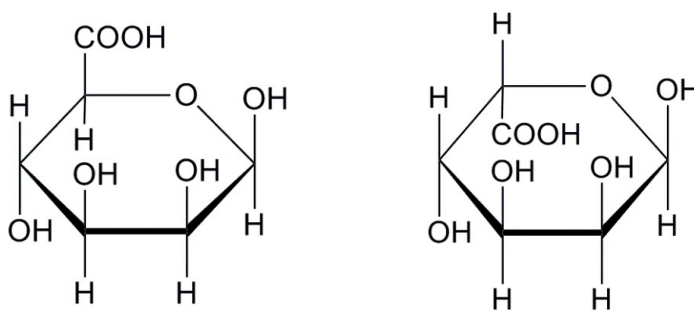


Figura 7. Estrutura química do ácido D-manurónico (esquerda) e do ácido L-gulurónico (direita).

2.2. Quitosano

O quitosano, Figura 8, é um polissacarídeo catiónico obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina (elemento estrutural do exoesqueleto dos crustáceos), considerando-se quitosano todos os derivados da quitina com um grau de desacetilação igual ou superior a 60% (Krasakoopt et al. 2003 ; Gonsalves & Araújo 2011). O peso molecular e o grau de desacetilação deste polímero são parâmetros determinantes nas suas propriedades físico-químicas e biológicas, na medida em que grau de desacetilação influencia a biodegradabilidade e a atividade imunológica, que atua ao nível da solubilidade, hidrofiliçidade e viscosidade do polímero (Chávarri et al. 2012 ; Guzmán et al. 2011).

A constante de dissociação ácida, pK_a , do quitosano é aproximadamente 6,5, ou seja, este polímero é solúvel em meio ácido, solubilização esta promovida pela protonação dos grupos NH_2 (Burgain et al. 2011).

De entre as várias características do quitosano, o facto de ser barato, biocompatível, não tóxico, biodegradável, apresentar boa resistência química e formar filmes de revestimento com excelentes propriedades, tornam-no adequado e promissor em aplicações biomédicas, nas quais o quitosano deve apresentar um grau de desacetilação igual ou superior a 90 % (Sun 2015). O facto de, por si só, apresentar uma baixa eficiência, no que diz respeito à manutenção da viabilidade de bactérias probióticas e uma elevada capacidade na formação de filmes, levam a que o quitosano seja maioritariamente usado como material de revestimento e não como cápsula (Anal & Singh 2007).

A natureza fortemente catiónica do quitosano permite a sua interação com polímeros carregados negativamente (alginate, carreganano e poli(ácido acrílico)). Esta característica, aliada às propriedades intrínsecas do quitosano, permite o desenvolvimento de sistemas que, teoricamente, resistem às condições gástricas severas, aumentam a viabilidade dos probióticos durante o armazenamento dos alimentos, e, conseqüentemente, permitem a entrega de bactérias lácteas viáveis ao intestino (Mortazavian et al. 2007).

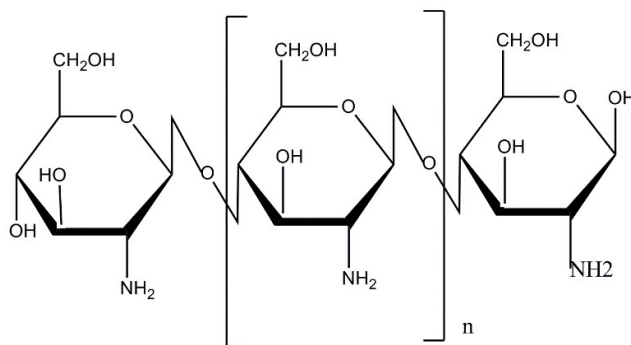


Figura 8. Estrutura química do quitosano.

2.3. Carragenina

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado, de elevado peso molecular, obtido a partir de algas marinhas vermelhas (Chávarri et al. 2012). Este polímero natural é usado como espessante, agente de gelificação, potenciador de textura, aditivo alimentar e em formulações cosméticas e farmacêuticas (Mortazavian et al. 2007).

Como material de encapsulamento, k-carragenina é o polissacarídeo mais utilizado, sendo que a sua dissolução exige elevadas temperaturas (60-90°C), especialmente quando as concentrações são da ordem dos 2-5 % (Krasaekoopt et al. 2003). Por tal, para encapsular substâncias bioativas, estas são adicionadas à solução polimérica a temperaturas na gama 40-50°C, seguindo-se a gelificação, através da adição de uma solução de cloreto de potássio, à temperatura ambiente, obtendo-se no final géis termoreversíveis (Heidebach et al. 2012).

O encapsulamento de bactérias probióticas em k-carragenina mantém a viabilidade celular, contudo os géis são frágeis e quebradiços (Chávarri et al. 2012).

2.4. Goma gelana e xantana

A goma gelana é um polieletrólito aniónico, obtido a partir da fermentação anaeróbia de uma cultura pura de *Pseudomonas elodea*. Já a goma xantana é um heteropolissacarídeo, muito solúvel em água, obtido a partir da fermentação pela bactéria *Xanthomonas campestris* (Anal & Singh 2007). Apesar de a goma gelana ter a capacidade de formar uma estrutura para encapsulamento, o fato de implicar uma temperatura de gelificação elevada, 80-90°C, por um período de 1h, resulta na morte das células probióticas (Chávarri et al. 2012).

Assim, a mistura de goma gelana e xantana tem sido usada para encapsular células probióticas, reforçando a resistência das cápsulas em condições ácidas (Mortazavian et al. 2007).

3. Técnicas de encapsulamento de probióticos

3.1. Extrusão

A extrusão, Figura 9, é um dos métodos de microencapsulamento mais simples e barato, e apresenta biocompatibilidade e flexibilidade elevadas, o que se traduz num aumento da viabilidade das bactérias probióticas (Mortazavian et al. 2007). Nesta técnica, os microrganismos são adicionados a uma solução de alginato e, posteriormente, formam-se gotículas ao extrudir a mistura com células suspensas, através de agulhas, numa solução de

cloreto de cálcio (CaCl_2) para endurecimento, resultando cápsulas com diâmetro na gama dos 2-5 mm (Heidebach et al. 2012). A remoção do material em excesso é um passo crucial, pois a presença de matéria residual nas cápsulas pode alterar as propriedades sensoriais do alimento (Mortazavian et al. 2007).

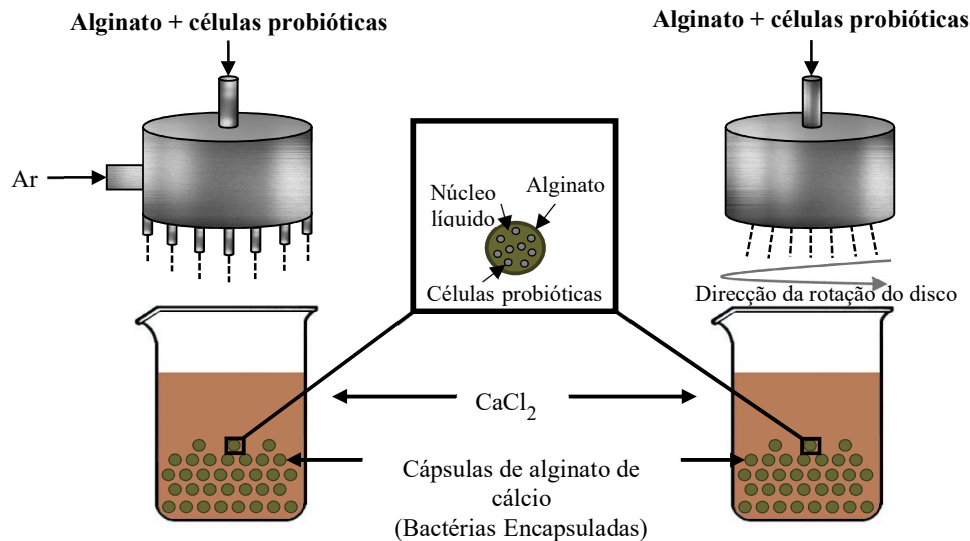


Figura 9. Mecanismos inerentes à técnica de extrusão. À direita o gerador de gotas, constituído por agulhas, onde normalmente ocorre a circulação de ar e à esquerda o dispositivo de disco rotativo (Burgain et al. 2011).

A composição do alginato é um parâmetro que também influencia o tamanho das cápsulas, sendo que quanto maior for a concentração e a viscosidade da solução de encapsulamento, menores são as cápsulas (Riaz & Masud 2013 ; Krasaekoopt et al. 2003). A grande desvantagem do método de extrusão é a impossibilidade de ser utilizado em produções de larga escala, devido às limitações do equipamento e ao elevado tempo para a formação das cápsulas (Chávarri et al. 2012).

3.2. Emulsão

A técnica de emulsão, Figura 10, tem sido particularmente usada para encapsular bactérias lácteas probióticas (Kailasapathy 2002 ; Mortazavian et al. 2007). Esta técnica, envolve a dispersão de uma fase aquosa, que contém as células bacterianas e uma suspensão polimérica, numa fase orgânica, tal como óleo, resultando assim numa emulsão água/óleo (Kailasapathy 2002). O endurecimento das gotas aquosas dispersas é realizado através de arrefecimento ou pela adição, sob agitação, de uma solução de cloreto de cálcio. No final da

gelificação, as cápsulas são lavadas para remover o óleo (Heidebach et al. 2012). Contudo, a presença de óleo residual, na superfície das cápsulas, prejudica a textura e as propriedades sensoriais dos alimentos.

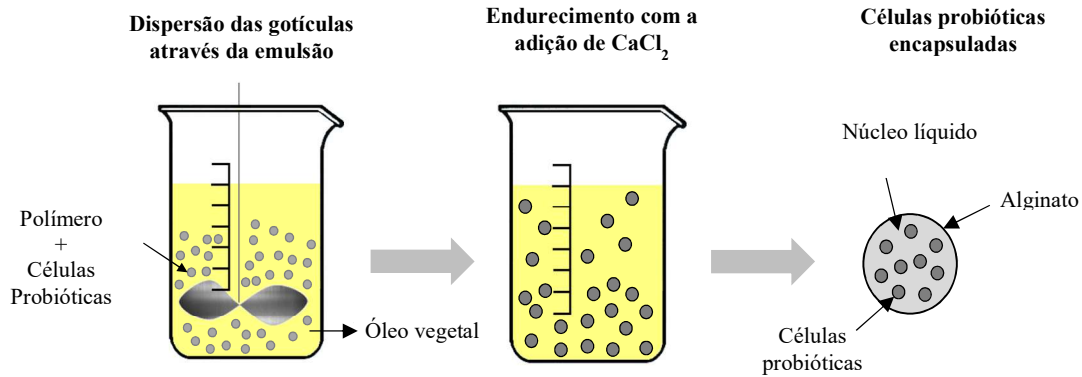


Figura 10. Esquema do procedimento envolvido na técnica de emulsão para encapsular bactérias probióticas (Burgain et al. 2011).

Relativamente à extrusão, a técnica de emulsão tem como vantagens a formação de cápsulas de menor dimensão, na gama 20µm-2mm, e o fato de poder ser aplicada em produções industriais (Mortazavian et al. 2007). Contudo, os custos associados a esta metodologia constituem uma desvantagem, pois são necessárias quantidades significativas de óleo vegetal para as emulsões (Chávarri et al. 2012 ; Riaz & Masud 2013).

3.3. Secagem por atomização (*Spray-drying*)

A secagem por atomização, Figura 11, é um método muito usado na indústria alimentar, pois é económico, flexível e garante a qualidade do produto. Para além de ser aplicado na conversão de líquidos em pós secos, também é usado no encapsulamento de bactérias probióticas (Heidebach et al. 2012 ; Kailasapathy 2002).

Esta técnica consiste na dispersão do ingrediente ativo (microrganismos) numa solução polimérica, formando-se uma emulsão ou dispersão, que depois de homogeneizada é atomizada numa câmara de secagem, sendo que a evaporação do solvente (água) leva à formação das cápsulas (Kailasapathy 2002). Teoricamente, a secagem por liofilização permite a obtenção de cápsulas com um diâmetro inferior a 100 µm (Mortazavian et al. 2007; Chávarri et al. 2012).

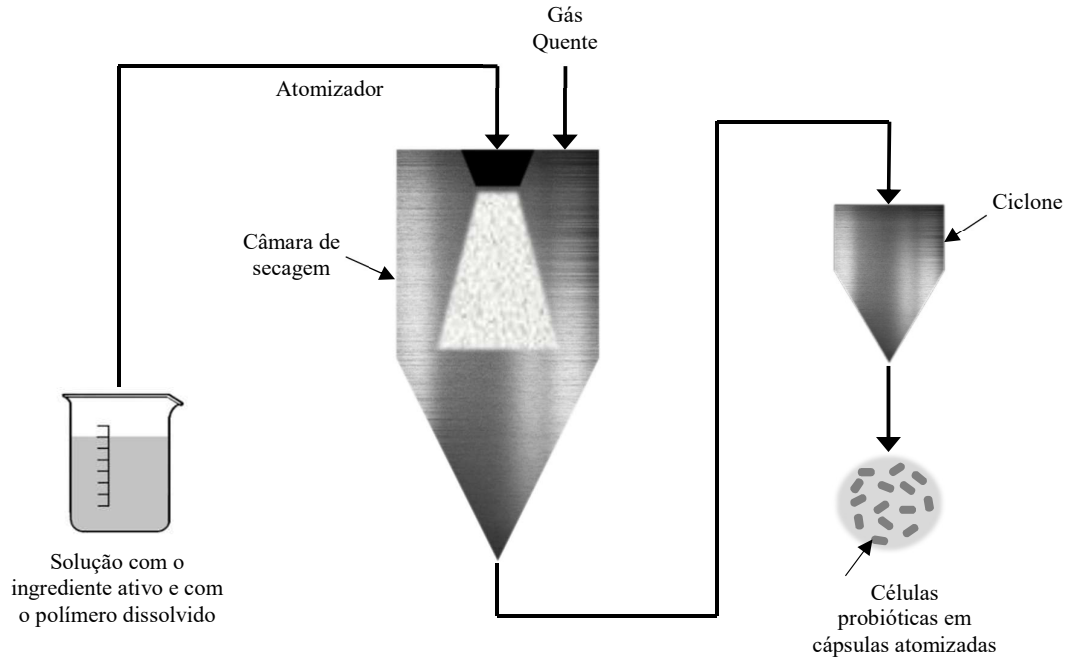


Figura 11. Representação do mecanismo envolvido na técnica *Spray-drying* (Burgain et al. 2011).

Apesar de ser uma técnica altamente reprodutível e rápida, as elevadas temperaturas e a desidratação durante a secagem traduzem-se na diminuição da estabilidade das bactérias durante o armazenamento e numa perda muito elevada de células viáveis, ou seja, a taxa de sobrevivência associada a este método é muito reduzida (Desai & Jin Park 2005).

3.4. Layer-by-layer (LbL)

A técnica *layer-by-layer* (LbL) foi originalmente proposta por Decher, na década de 90, como consequência da intensa pesquisa na obtenção de filmes ultrafinos planares (Sukhorukov et al. 2004 ; Svaldo-Lanero et al. 2006). Esta técnica, como ilustra a Figura 12, baseia-se na adsorção alternada de polielectrólitos, em substratos carregados negativa ou positivamente (Krol et al. 2003 ; Kahraman et al. 2009). As forças responsáveis pela formação de filmes LbL não são apenas interações electrostáticas. Apesar de menos comuns, existem outras interações que também permitem a formação de multicamadas, destacando-se as pontes de hidrogénio, a transferência de carga, as ligações covalentes, o reconhecimento biológico e as interações hidrofóbicas (Tang et al. 2006 ; Cook et al. 2013).

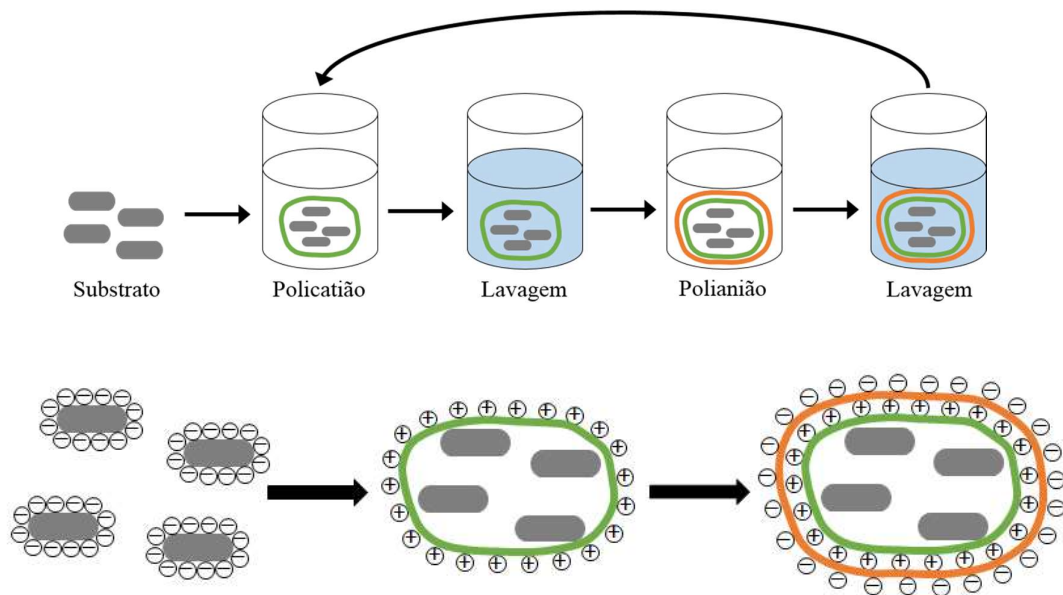


Figura 12. Representação do mecanismo inerente à técnica LbL para encapsular bactérias probióticas (Priya et al. 2011).

As grandes vantagens do procedimento LbL relativamente às estratégias clássicas, tal como a técnica Langmuir-Blodgett (LB), é o fato daquele permitir um controlo da espessura dos filmes de revestimento à escala nanométrica e poder ser extrapolado para substratos com diferentes formas e natureza química, tais como partículas coloidais, interfaces fluidas e lipossomas, não se limitando apenas a substratos sólidos e planos (Guzmán et al. 2011 ; Tang et al. 2006 ; Krol et al. 2003). A flexibilidade subjacente a esta estratégia permite a aplicação de uma ampla variedade de materiais de revestimento. Não se restringindo somente a sistemas polieletrólito/polieletrólito, permite também o uso de um largo espectro de substratos, tais como: partículas inorgânicas ou orgânicas, com tamanhos desde 20 nm até dezenas de micrones, fármacos, corantes orgânicos, polissacarídeos biológicos, polipéptidos, ácidos nucleicos e ainda células biológicas (Svaldo-Lanero et al. 2007; Sukhorukov et al. 2004). Por tal, recentemente, no âmbito de pesquisas biomédicas, o encapsulamento de proteínas, lipossomas, bem como de substratos vivos (enzimas e bactérias) tornaram-se sistemas muito promissores (Sukhorukov et al. 2004 ; Svaldo-Lanero et al. 2007 ; Kahraman et al. 2009).

Esta flexibilidade associada às várias interações dos filmes LbL traduz-se num potencial aumento da estabilidade dos mesmos quando expostos a ambientes fisiológicos ou a condições ambientais adversas, promovendo o encapsulamento de células vivas em matrizes poliméricas, devido ao seu impacto no ramo biotecnológico e médico (Tang et al. 2006; Svaldo-Lanero et al., 2006).

O desempenho do sistema de encapsulamento está intrinsecamente relacionado com protocolo de deposição, isto é, com o tipo de polieletrólito usado, com o número de camadas de revestimento, com a força iônica, pH, temperatura. Destaca-se que a porosidade dos filmes de revestimento, essencial para a sobrevivência e proteção de enzimas/bactérias, depende do pH e da concentração dos polieletrólitos durante a deposição das camadas (Krol et al. 2003).

Parte III- Polímeros

1. Definição de polímero

Os polímeros são macromoléculas, com uma estrutura bem definida, que consistem na repetição de várias unidades estruturais, designadas por monómeros. A classificação dos polímeros é variada e tem por base diferentes parâmetros, tais como a origem, a composição, a estrutura básica, as propriedades térmicas, as propriedades mecânicas e os métodos de polimerização envolvidos (Ghosh, P. 2014).

Quanto à origem, os polímeros podem ser classificados como naturais (produzidos pela natureza), sintéticos (produzidos pelo Homem) ou artificiais (polímeros naturais modificados pelo Homem). Já a composição está relacionada com o tipo de monómeros que constituem o polímero, sendo que um homopolímero é constituído por um só tipo de monómero e um copolímero é constituído por duas ou mais unidades monoméricas diferentes. Os copolímeros podem ser alternados, aleatórios, em bloco ou em enxerto (J. Mendes 2011); Ghosh, P. 2014).

A estrutura de um polímero está relacionada com a disposição espacial das cadeias poliméricas. Nesta categoria os polímeros são qualificados como lineares, ramificados, com ligações cruzadas ou em rede. As propriedades térmicas distinguem polímeros termoplásticos (polímeros lineares ou ramificados) de polímeros termoendurecíveis (polímeros com ligações cruzadas ou em rede).

1.1. Polímeros Inteligentes

Os polímeros ditos inteligentes são macromoléculas que apresentam uma resposta ativa perante alterações do meio circundante. Os que são biocompatíveis, fortes, resistentes, flexíveis, não trombogênicos, fáceis de processar e mantêm a estabilidade da substância bioativa transportada constituem um recurso muito promissor na resolução de problemas

biológicos. Adicionalmente, estes polímeros são versáteis e têm sensibilidades ajustáveis (Bag & Rao 2006 ; Dai et al. 2008).

A classificação dos polímeros inteligentes está relacionada com o tipo de estímulo a que respondem, destacando-se os **estímulos físicos** (temperatura, ultrassons, luz e força mecânica), os **estímulos químicos** (pH e força iónica) e os **estímulos biológicos** (enzimas) (Kumar et al. 2007). Estes últimos podem ser controlados artificialmente, através de um campo magnético ou elétrico, ou podem ocorrer naturalmente, como consequência dos diferentes ambientes fisiológicos do corpo humano (Kopecek 2007). Dependendo das características intrínsecas de cada polímero, as respostas destes podem ser variadas, tais como precipitação/dissolução, degradação, libertação de substâncias bioativas, alteração no estado de hidratação, “inchaço”/colapso, alterações conformacionais e formação de micelas (Schmaljohann 2006).

Em suma, os polímeros inteligentes mimetizam os sistemas biológicos de um modo grosseiro, pois a resposta a estímulos, através de um mecanismo de *feedback*, é uma característica intrínseca dos seres vivos (Cavalcante et al. 2011).

1.1.1. Polímeros sensíveis ao pH

Os polímeros sensíveis ao pH são sistemas em que a solubilidade, volume e conformação das cadeias podem ser manipulados, reversivelmente, por alterações no valor do pH, de acordo com o tipo de co-solvente e de eletrólito usados (Dai et al. 2008). Genericamente, um polímero sensível ao pH é um polieletrólito que tem na sua constituição grupos ácidos fracos (carboxílico, fosfórico, sulfónico) ou grupos básicos fracos (amina), que exibem uma mudança no seu estado de ionização perante alterações do pH (Almeida et al. 2012).

A mudança no estado de ionização decorre do facto de os grupos ácidos e básicos aceitarem ou libertarem protões, respetivamente, quando se verificam alterações do pH do meio. Assim, o tipo de grupo funcional presente na cadeia polimérica é um dos fatores que dita o comportamento destes materiais (Schmaljohann 2006).

Os sistemas desencadeados por alterações no valor do pH podem ser conseguidos pela incorporação de porções sensíveis ao pH no polímero, pela desestabilização dos agregados poliméricos e pela conjugação química de uma ligação, sensível ao pH, entre o polímero e fármaco (You et al. 2010).

Por exemplo, os grupos carboxílicos (COOH) aceitam protões a baixos valores de pH e libertam protões a elevados valores de pH, pelo que à medida que o valor de pH do meio aumenta o polímero “incha” devido à repulsão electrostática dos grupos carregados

negativamente (COO^-) (Mech 2014). Como ilustra a Figura 13, é esta ionização dos grupos ácidos carboxílicos do polímero, como por exemplo do PAA, que possibilita a retenção dos componentes bioativos no estômago e a sua libertação no intestino (Schmaljohann 2006).

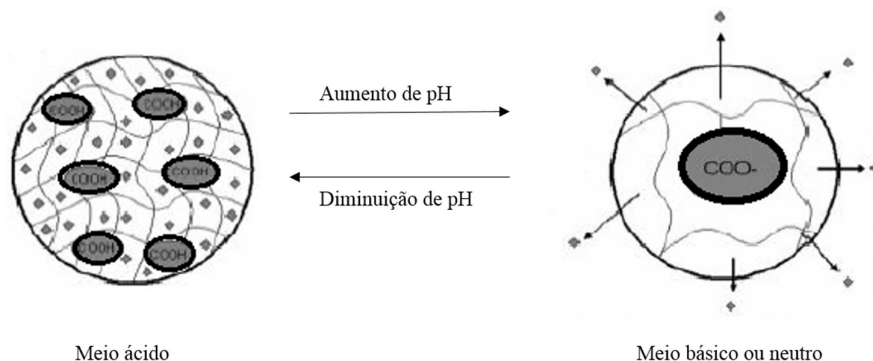


Figura 13. Ilustração do mecanismo inerente ao transporte e libertação de substâncias bioativas (fármacos, células) por um polímero carboxílico sensível ao pH (Almeida et al. 2012).

2. Mecanismos de polimerização

Existem dois métodos principais na síntese de polímeros: polimerização por reação gradual (*step-growth*) e polimerização de reação em cadeia (*chain-growth*).

A polimerização por reação gradual ocorre quando monómeros, iguais ou diferentes, ou oligómeros se unem aleatoriamente, formando-se dímeros, trímeros ou macromoléculas. A reação ocorre através de grupos funcionais complementares, pelo que a molécula formada não tem o mesmo número de átomos dos reagentes. Esta polimerização engloba os mecanismos de polimerização radicalar (inicia-se através de um radical livre), polimerização catiónica, polimerização aniónica e polimerização por coordenação (Mendes 2011).

Na polimerização de reação em cadeia, a síntese ocorre pela interação sucessiva entre monómeros e iniciadores (espécies ativas), sendo que a decomposição destes pode formar radicais livres (polimerização radicalar) ou espécies iónicas (polimerização iónica). A este tipo de reação estão associados três estágios, designadamente iniciação, terminação e propagação.

3. Polimerização radicalar livre

A polimerização radicalar livre é uma reação que envolve três passos sequenciais: iniciação, propagação e terminação. A iniciação compreende uma primeira fase que consiste na produção de radicais livres, através da dissociação do iniciador (I), e uma segunda fase que

consiste na adição dos radicais formados ao monómero (M). Na propagação ocorre a adição sucessiva de unidades monoméricas, sendo que o crescimento da cadeia é extremamente rápido e cessa quando o monómero esgota. Já a terminação pode ser por combinação, quando os radicais livres se combinam, ou por dismutação, quando há transferência de elétrons entre as cadeias (J. Mendes 2011); Siegwart et al. 2012 ; Mishra & Kumar 2012).

A polimerização radicalar livre permite a obtenção de polímeros de elevado peso molecular para baixas percentagens de conversão, existindo um excesso de monómero ao longo de todo o processo (Santos 2015 ; Mishra & Kumar n.d.). Apesar de este método ser bastante versátil, uma vez que permite o uso de diferentes temperaturas (consoante o iniciador usado) e poder ser aplicado a monómeros com diversos grupos funcionais, tem como desvantagens a inexistência de taticidade polimérica e o deficiente controlo do peso molecular e da polidispersividade (Carlmark 2002 ; Mishra & Kumar 2012 ; Siegwart et al. 2012).

3.1. Polimerização em emulsão

A polimerização em emulsão é um tipo de polimerização heterogénea, isto é, em que sistema reacional apresenta duas fases imiscíveis: a fase contínua é composta por um solvente e a fase descontínua é constituída por gotículas que contêm o monómero e o iniciador.

No caso particular da emulsão, o monómero é insolúvel na fase contínua, formando-se gotículas, enquanto o iniciador é solúvel nessa fase. A dispersão das gotículas é assegurada por agitação e pela adição de um surfactante (emulsificador), que é uma molécula anfifílica. Deste modo, à medida que o surfactante é adicionado à mistura, as moléculas do mesmo vão-se posicionando nas interfaces disponíveis, ou seja, na interface monómero-solvente e à superfície da mistura, estabilizando assim as interfaces através de efeitos electrostáticos, no caso de surfactantes iónicos, efeitos estéreos, no caso de surfactantes não iónicos, ou ambos no caso de polielectrólitos (Arshady 1992 ; Chern 2006).

Quando se atinge a concentração micelar crítica (CMC) de surfactante, as interfaces disponíveis ficam saturadas e formam-se micelas, que consistem em agregados esféricos.

De um modo geral, a polimerização em emulsão inicia-se com a decomposição do iniciador no solvente, formando-se radicais. O monómero, ao migrar das gotas para a fase contínua, reage com os radicais existentes, formando-se oligoradicaís, que se tornam insolúveis no solvente e difundem em conjunto com o monómero para dentro das micelas. É nas micelas que ocorre a propagação e o crescimento das cadeias poliméricas, sendo que as mesmas sofrem terminação por reações de transferência de cadeia dentro da micela ou ao migrarem para fora desta (Chern 2006 ; Smith & Ewart 1999).

4. Polimerização radicalar viva (LRP)

A polimerização radicalar, quando comparada com outras técnicas, apresenta diversas vantagens, nomeadamente menor sensibilidade à presença de impurezas, condições de reação (temperatura) moderadas e uma vasta gama de processos envolvidos (massa, solução, precipitação, emulsão). Contudo, a esta polimerização está associado um pobre controlo das propriedades finais do polímero, tais como o peso molecular, devido à alta reatividade dos radicais (Mishra & Kumar 2012 ; Mendes 2011).

É nesta linha que em 1956 surge a polimerização radicalar viva, desenvolvida por Szwarc (Mishra & Kumar 2012), com o objetivo de ultrapassar as desvantagens da polimerização radicalar convencional, verificando-se a síntese de polímeros com propriedades bem definidas (customizadas), tais como uma arquitetura controlada.

Na polimerização radicalar viva ocorre a adição de um agente químico com a capacidade de se ligar reversivelmente à cadeia em propagação. O consumo total do iniciador no início da reação, assim como o fato de a velocidade de geração de espécies ativas igualar a velocidade de geração de espécies dormentes são os fatores que garantem o controlo das propriedades estruturais do polímero. Todas as cadeias começam a crescer no mesmo instante e o tempo de vida de uma cadeia polimérica, em fase de propagação, pode atingir horas. Adicionalmente, o tempo de vida útil de um radical ativo é pequeno, sendo estes os fatores que explicam a baixa probabilidade de terminação associada à polimerização radicalar viva (Mishra & Kumar 2012 ; Mendes 2011 ; Santos 2015).

Assim, um sistema de polimerização verdadeiramente vivo não envolve reações de transferência nem de terminação, isto é, a reação cessa quando o monómero do sistema esgota. Como consequência, esta polimerização permite a obtenção de uma distribuição de peso molecular estreita, com índices de polidispersividade próximos de 1.0 (Siegwart et al. 2012 ; Mishra & Kumar 2012).

4.1 Tipos de polimerização radicalar viva

Em todas as polimerizações radicalares vivas o agente de estabilização tem como funcionalidade transformar, reversivelmente, a cadeia polimérica em crescimento numa espécie dormente, a fim de se estabelecer um equilíbrio entre espécies ativas e espécies dormentes. Os tipos de equilíbrio que podem ocorrer no sistema permitem distinguir os vários tipos de polimerizações vivas (Mishra & Kumar 2012 ; Mendes 2011).

De um modo geral, existem duas classes de LRP de acordo com o tipo de equilíbrio estabelecido, nomeadamente ativação/desativação reversível de radicais e processo degenerativo de transferência reversível de cadeia.

Na primeira classe, o equilíbrio de ativação/desativação é definido pelo efeito do radical persistente (PRE), um efeito de auto-regulação. Nesta polimerização o número de espécies desativadoras é superior ao número de radicais em crescimento, verificando-se, por tal, um deslocamento do equilíbrio dinâmico no sentido das espécies dormentes, o que cessa a transferência de cadeia. A este tipo de equilíbrio PRE estão associadas as técnicas ATRP (*Atom Transfer Radical Polymerization*) e SFRP (*Stable Free Radical Polymerization*) (Araujo 2010 ; Mendes 2011 ; Mishra & Kumar 2012 ; Siegwart et al. 2012 ; Santos 2015).

No processo degenerativo de transferência reversível de cadeia não ocorrem alterações no número de radicais e a reação é possibilitada pela presença de espécies iniciadoras de radicais. Neste caso, o equilíbrio é alcançado através de agentes de transferência de cadeia entre cadeias em crescimento. As técnicas RAFT (*Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer*) e DCT (*Degenerative Chain Transfer*) são as que se destacam neste tipo de equilíbrio (Araujo 2010 ; Mendes 2011 ; Mishra & Kumar 2012 ; Siegwart et al. 2012 ; Santos 2015).

Neste trabalho, o mecanismo de polimerização LRP utilizado para a síntese do copolímero foi o ARTP, pelo que vai ser descrito de seguida.

4.1.1. ATRP

A polimerização radicalar por transferência de átomos (ATRP) é atualmente das mais usadas, pois permite a polimerização de diversos monómeros (estirenos, metacrilatos, acrilatos e acrilamidas), pode ocorrer a temperaturas moderadas e leva à formação de polímeros com uma ampla gama de arquiteturas: copolímeros em bloco, copolímeros ramificados e copolímeros de enxerto, entre outros (Carlmark 2002 ; Siegwart et al. 2012).

Como o próprio nome indica, a transferência do átomo é o passo chave da reação. Deste modo, a reação inicia-se quando a cadeia halogenada (P_n-X) é ativada através da libertação do halogéneo pelo complexo metálico (Mt^n), formando-se um iniciador de radicais (P_n^\bullet) e um desactivador (XM_t^{n+1}/L), como mostra a Figura 14. No sistema ATRP, o equilíbrio está geralmente deslocado no sentido da formação de espécies dormentes, o que se traduz numa concentração de radicais ativos muito reduzida e, por tal, as reações de terminação são minimizadas (Siegwart et al. 2012 ; Mendes 2011 ; Santos 2015).

CAPÍTULO 2

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Materiais

A síntese e caracterização inclui os seguintes materiais: Brometo de 2-bromoisobutirilo (2-BiB) (Alfa Aesar, 97%), Ácido trifluoroacético (TFA) (VWR Chemicals, 99%), Tetrahidrofurano (THF) (VWR Chemicals, 99,6%), Tolueno (Fisher Scientific, 99,9%), Etanol (Panreac, 96%), Hexano (VWR Chemicals), Brometo de cobre (I) (Cu(I)Br) (Sigma–Aldrich), *n,n,n',n',n*-pentametildietilestearylamina (PMDETA) (Sigma–Aldrich), Pluronic F68 (Sigma–Aldrich), Ácido Acrílico (C₃H₄O₂) (Sigma–Aldrich), TWEEN 80 (Sigma–Aldrich), Nonano (C₉H₂₀) (Sigma–Aldrich, 98%), Peróxido de lauroil (Sigma–Aldrich, 97%), Pluronic F127 (BASF Chemicals), 4,4'-Azobis (4-ácido cianoaléico) (Sigma–Aldrich, 75%), THF deuterado (d₈THF) (Euriso-Top, 99,5%), Cloreto de sódio (NaCl) (SigmaAldrich, 99%), Hidróxido de sódio (NaOH) (Panreac; pellets), Quitosano (Acros Organics, Mw: 100 000-300 000), HCl (Fisher Scientific, 37%), Agar powder, Bacteriological (HIMEDIA), Lactobacillus MRS Broth (HIMEDIA).

A Trietilamina (TEA) (Merck, 99%) e o Diclorometano (CH₂Cl₂) (VWR Chemicals) foram previamente destilados antes de serem aplicados nas reações.

O Terc-butil acrilato (tBA) (Alfa Aesar, 99%) foi previamente purificado, em colunas de sílica-alumina, para eliminar os estabilizantes e aplicá-lo nas reações de polimerização.

A 4-(dimetil amino)piridina (DMAP) (Merck, 99%) foi previamente recristalizado em tolueno.

2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram os seguintes:

- Balança de precisão: Sartorius da Entris;
- Vórtex: Speed da VWR Internacional;
- Centrífuga: Universal 32 da Hettich;
- Liofilizador: Alpha 1-2 LD Plus da CHRIST;
- Medidor de pH: Inolab da WTW;
- Incubadora: Orbital incubator SI500 da Stuart;
- Estufa: Incudigit da J.P. SELECTA;
- Microscópio digital: Olympus;
- Autoclave: Trade Raypa.

3. Técnicas

3.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica analítica que explora as propriedades magnéticas dos núcleos atômicos, permitindo obter informação sobre a estrutura, dinâmica e ambiente químico das moléculas. É uma técnica que se baseia na transição entre níveis de energia, quando uma amostra é submetida a uma radiação eletromagnética na gama de radiofrequência, permitindo determinar o número e o tipo de grupos químicos num composto.

Esta técnica pode ser aplicada a sólidos, soluções e líquidos, sendo que no caso das soluções os solventes são deuterados a fim de minimizar a interação com a amostra (Luzyanin & Abrantes 2010).

Neste trabalho, a técnica RMN foi utilizada para confirmar a estrutura química dos copolímeros sintetizados, através de um espectrómetro Bruker Avance III de 400 MHz. A partir dos espectros resultantes (espectro de sinal em função da frequência aplicada), o peso molecular dos copolímeros foi determinado pela integração dos picos relativos ao monómero (ácido acrílico) e ao copolímero, no *software MestRenova*®.

3.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR)

A técnica espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR) é um tipo de espectroscopia de absorção útil para identificar um composto ou apurar a composição de uma amostra, em que se faz passar um feixe de radiação infravermelha através da amostra, sendo que parte dela é absorvida e outra parte é transmitida. Uma vez que cada material dispõe de uma combinação de átomos única, não há dois compostos com o mesmo espectro de infravermelho; portanto ao aplicar o método dos mínimos quadrados e a lei de Beer é possível identificar qualitativamente os espectros de absorvância das amostras, através da área/altura dos picos do gráfico (Hatsopoulos 2016).

A grande vantagem do FTIR-ATR reside no facto de não ser necessária uma preparação prévia da amostra, da quantidade de amostra a analisar ser reduzida e de se poder recuperar a mesma no final da análise, uma vez que não é degradada durante o processo (Perkin 2016).

Neste trabalho, analisaram-se, por FTIR-ATR, os polímeros PLU, Br-PLU-Br, PtBA-PLU-PtBA e PAA-PLU-PAA através do equipamento FT/IR-4200 da Jasco Analytical

Instruments, a fim de os avaliar qualitativamente. Esta análise foi realizada com o apoio do *software Spectra Manager*.

3.3. Dynamic Light Scattering (DLS)

A técnica não invasiva *Dynamic Light Scattering* (DLS) consiste em fazer incidir um feixe de luz polarizada em partículas sujeitas a movimentos Brownianos, suspensas num líquido. A flutuação da intensidade da luz, resultante dos movimento Brownianos, contém toda a informação acerca da hidrodinâmica da partícula, designadamente o coeficiente de difusão translacional, a partir do qual se calcula o tamanho médio das partículas, numa gama de diâmetros entre 0,3nm-10 μ m. É através da equação de Stokes-Einstein, que se converte a dispersão das partículas numa distribuição de tamanhos (Malvern Instruments 2016).

Neste trabalho, recorreu-se ao equipamento *Zetasizer Nano ZS* da Malvern Instruments, que possui um sistema patenteado NIBS (*Non-Invasive Back Scatter technology*) responsável pela maximização na deteção da luz dispersa, para determinar o potencial zeta das camadas de polielectrólitos constituintes da matriz de encapsulamento dos probióticos, tendo estes parâmetros sido avaliados a uma temperatura de 37°C.

Há que salientar que para determinar o potencial zeta das suspensões, o equipamento recorreu á técnica LDM (*Laser Doppler Micro-electrophoresis*), a qual mede a velocidade das partículas carregadas num campo eléctrico, através do método M3-PALS (*Phase analysis Light Scattering*), que calcula a mobilidade eletroforética, à qual corresponde um certo valor de potencial zeta (Malvern Instruments 2016).

4. Métodos

Nesta seção descreve-se a componente laboratorial que se dividiu essencialmente em duas partes: a primeira correspondeu à síntese de dois copolímeros PAA-PLU-PAA, com pesos moleculares diferentes, de forma a estudar a influência da massa molar e da estrutura de polímeros acrílicos no produto final; a segunda parte do trabalho consistiu no encapsulamento das bactérias *Lactobacillus acidophilus* com quitosano (polímero natural) e com os copolímeros sintetizados na primeira etapa.

Parte I- Síntese do copolímero PAA-Pluronic-PAA

1.1. Síntese do iniciador Bromo-Pluronic-Bromo (Br-PLU-Br)

Esta etapa consistiu na síntese do iniciador Br-Pluronic-Br através de uma reação de esterificação do Pluronic com brometo de 2-bromoisobutirilo (2-BiB) (Choo et al. 2011).

A reação de esterificação (Figura 15) realizou-se num balão de fundo redondo de 250 mL com três tubuladuras. A este balão associou-se um condensador, um agitador magnético, uma ampola de adição e uma entrada e saída de azoto de forma a garantir uma atmosfera inerte no seu interior.

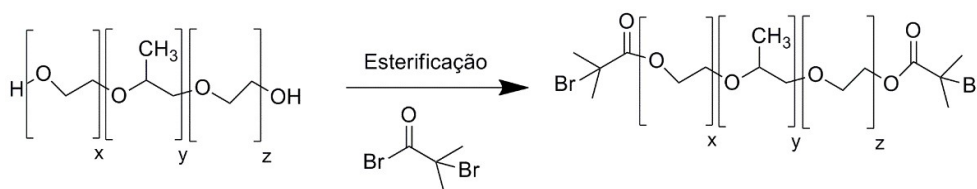


Figura 15. Representação esquemática da reação de esterificação do Pluronic.

Primeiramente, adicionou-se uma solução de 0,9 mg de 4-(dimetil amino)piridina (DMAP) recristalizado em tolueno, em 10 mL de diclorometano destilado (CH_2Cl_2), num banho a 0°C . Gota-a-gota adicionou-se a esta solução 0,7 mL de TEA destilada, o mais lentamente possível.

Em seguida, introduziu-se 1,5 mg de 2-BiB em 10 mL de CH_2Cl_2 destilado, também gota-a-gota. E por último, da mesma forma, 21 g de PluronicF127 em 50 mL de CH_2Cl_2 seco. A reação ocorreu a 28°C durante 22h em atmosfera inerte (N_2), através da qual se obteve um líquido transparente. No final da esterificação, evaporou-se metade do solvente da mistura num evaporador rotativo e precipitou-se o iniciador, Br-Pluronic-Br, em hexano, através do qual se obteve uma pasta branca. Por fim, decantou-se produto final, que foi seco numa estufa de vácuo, a 30°C .

O resultado final do iniciador consistiu num pó branco, que foi posteriormente analisado por H-RMN (Anexo I, Figura A II) e por FTIR-ATR (Anexo I, Figura A I) para caracterizar o material e verificar se a reação ocorreu como planeado.

1.2. Síntese do copolímero Poli(*tert*-acrilato de butilo)-Pluronic- Poli(*tert*-acrilato de butilo) (PtBA-PLU-PtBA)

A síntese do PtBA por polimerização radical viva com o iniciador Br-PLU-Br (Figura 16), realizou-se com base em informação da literatura (Choo et al. 2011).

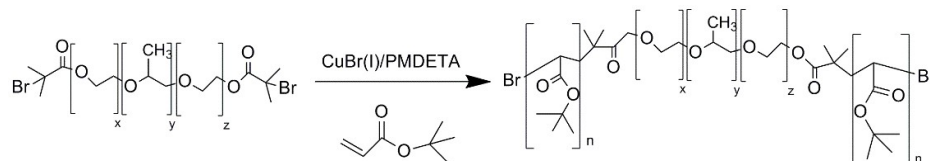


Figura 16. Representação esquemática da polimerização por ATRP para sintetizar o copolímero PtBA-PLU-PtBA.

Inicialmente, introduziu-se e congelou-se o iniciador num reator do tipo *Schlenk* de 25 mL. Em seguida adicionou-se o monómero purificado em colunas de sílica-alumina e o conteúdo do reator foi novamente congelado. Por fim adicionou-se uma mistura CuBr(I) e PMDETA em tolueno, previamente borbulhado em azoto, em diferentes proporções. A mistura contida no reator foi de novo congelada. Em atmosfera inerte passou-se à sua degaseificação e no final este foi novamente preenchido com azoto.

A reação deu-se num banho de óleo a 80°C por 24 horas. De forma a terminar a reação adicionaram-se 4 mL de acetona ao reator. Posteriormente purificou-se a mistura reacional com recurso a colunas de alumina e diálise, seguida de liofilização. O produto final consistiu num pó branco.

De forma a avaliar o desempenho da polimerização e as características do polímero conseguido, analisou-se o mesmo por FTIR (Anexo II, Figura A III).

1.3. Síntese do copolímero Poli(ácido acrílico)-Pluronic-Poli(ácido acrílico) (PAA-PLU-PAA)

A síntese do copolímero PAA-PLU-PAA foi realizada através da hidrólise do PtBA-PLU-PtBA (Figura 17), de acordo com informação da literatura (Choo et al. 2011).

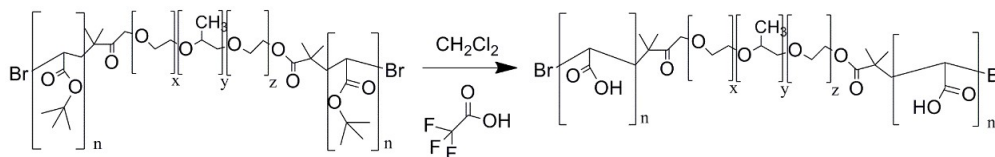


Figura 17. Representação esquemática da hidrólise do copolímero PtBA-PLU-PtBA, para sintetizar o copolímero PAA-PLU-PAA.

Esta etapa foi realizada num balão de fundo redondo com três tubuladuras, provido de uma entrada e saída contínuas de azoto, de um condensador, de um agitador magnético e de uma ampola de adição. A este balão foi adicionado o PtBA, obtido na fase anterior, e 10 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) num banho a 0°C . De seguida, a partir da ampola de adição, foram adicionados 10 mL de TFA, gota-a-gota, ao balão. Posteriormente, removeu-se a ampola de adição e garantiu-se que o balão operava sob atmosfera inerte, de modo a iniciar a hidrólise a 30°C por um período de 48h.

Por fim, o polímero obtido foi precipitado em hexano, filtrado sob vácuo, com o auxílio de um filtro de nylon de $0,22\ \mu\text{m}$ e seco numa estufa de vácuo a 30°C durante 48h. O resultado final caracterizou-se como um pó muito fino, esbranquiçado, avaliado por FTIR (Anexo III, Figura A IV).

1.4. Síntese do copolímero Poli(ácido acrílico)-Pluronic-Poli(ácido acrílico) (PAA-PLU-PAA) por polimerização de emulsão

A síntese de PAA-PLU-PAA foi realizada através de uma polimerização por emulsão (Figura 18), de acordo com informação existente na literatura (Alakhov et al. 2004).

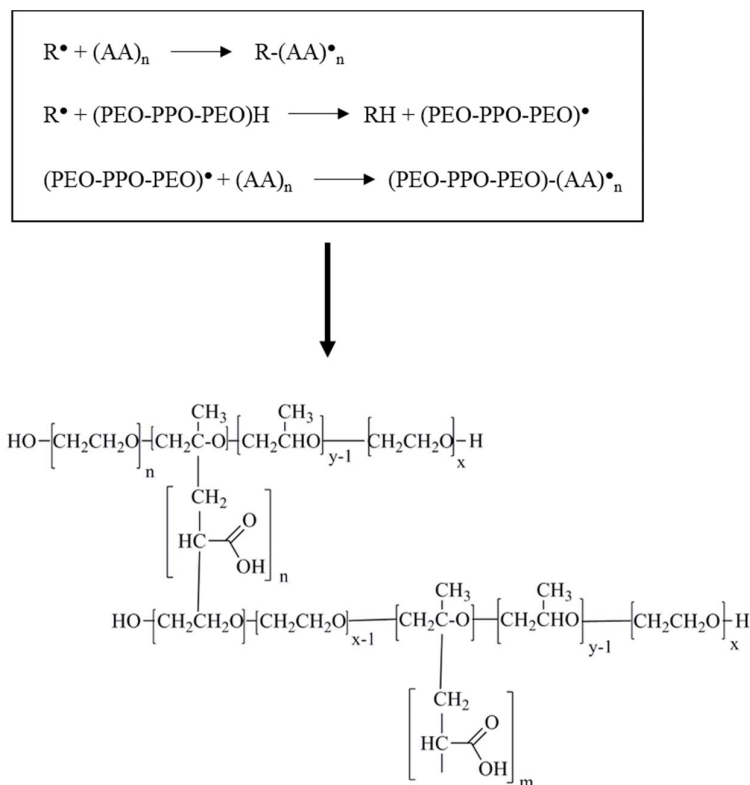


Figura 18. Representação esquemática das reações envolvidas na polimerização em emulsão para sintetizar o copolímero PAA-PLU-PAA.

Primeiramente, introduziram-se 250 mL de uma solução aquosa de TWEEN 80 em nonano (1% v/v) num balão de fundo redondo de 500 mL com três tubuladuras, equipado com um agitador magnético, com uma entrada e saída contínua de azoto. Este balão foi desoxigenado durante 1h, através de um fluxo de azoto constante. Paralelamente prepararam-se duas soluções. Na primeira neutralizaram-se, parcialmente, 40g de ácido acrílico em 0,5 mL de uma solução de NaOH (5M), garantindo uma agitação contínua e entrada e saída de azoto. De seguida, nas mesmas condições, foram dissolvidos 24 g de Pluronic na solução de ácido acrílico. Já a solução com o iniciador da reação, foi sintetizada através da adição de 100 mg de peróxido de lauroil, 100 mg de 4'-4-azobis e 5 mL de ácido acrílico, sendo que esta solução foi posteriormente adicionada à solução de Pluronic em ácido acrílico parcialmente neutralizado. Por último, adicionou-se a solução resultante ao balão e a reação mantida a 70°C durante 10h.

O polímero final, caracterizado por um aglomerado elástico esbranquiçado, foi lavado em hexano e em água, para remover as impurezas, e seco em estufa de vácuo a 40°C durante 48h. Posteriormente foi avaliado por FTIR-ATR (Anexo IV, Figura A V; Anexo V, Figura A VII) e por H-RMN (Anexo IV, Figura A VI; Anexo V, Figura A VIII).

Parte II- Encapsulamento das bactérias lácteas probióticas

Esta etapa foi realizada de acordo com informação existente na literatura (Priya et al. 2011) e de acordo com um trabalho previamente desenvolvido no nosso laboratório. Os vários parâmetros (percentagem de inóculo, concentração das soluções, tempo e velocidade da centrifugação e tempo de incubação) foram primeiramente testados e otimizados antes de se iniciar o encapsulamento das bactérias.

Todo o material utilizado (frascos, solução salina, pontas de pipetas, tubos de Eppendorf, água destilada, água MiliQ, meio MRS, agar, placas de Petri) foi previamente esterilizado por autoclavagem, a 121°C durante 15 min. Todo o procedimento envolvido nesta etapa foi realizado em condições assépticas, para prevenir contaminações.

1. Otimização das condições de encapsulamento

1.1. Inóculo

Antes de iniciar o encapsulamento das bactérias foi necessário multiplicá-las, sendo que as mesmas se encontravam armazenadas em congelador, segundo o método de repique contínuo.

Nesta fase estudou-se a percentagem do inóculo de bactérias a introduzir no meio de cultura MRS, para depois incubar durante 13h (período em que se atinge a fase estacionária de crescimento da bactéria *L.acidophilus*). Iniciaram-se os testes com um inóculo de 5% (v/v) do volume total do meio de cultura, na medida em que a literatura refere que o volume de inóculo normalmente utilizado é entre 3 e 10% (v/v) (Neves 2008). Contudo, esta percentagem de inóculo traduziu-se numa quantidade muito grande de bactérias e criou dificuldade no processo de encapsulamento, visto que as bactérias agregaram e não ficaram dispersas para adsorver os polielectrólitos. Em virtude disso testou-se um valor fora do intervalo descrito na literatura, designadamente 1% (v/v) de inóculo, sendo que este valor permitiu obter uma quantidade de bactérias aceitável e preveniu a sua agregação durante o processo de encapsulamento. Cada ensaio foi objeto de duas réplicas.

1.2. Volume inicial de meio de cultura para o encapsulamento

Para iniciar o processo de encapsulamento, fracionou-se uma determinada quantidade do meio de cultura, já com as bactérias crescidas, pelos tubos de Falcon. Assim, testaram-se as quantidades iniciais de 3, 5 e 7 mL (valor adotado do trabalho previamente desenvolvido no

nosso laboratório), sendo que 5 mL foi o valor que se mostrou mais adequado para o sistema de encapsulamento em causa. Uma vez que no processo de lavagem das bactérias, que consiste em centrifugar e descartar o sobrenadante, se perdem sempre bactérias, 3 mL mostrou-se uma quantidade inicial insuficiente para compensar estas perdas. Já 7 mL revelou ser uma quantidade inicial de bactérias demasiado elevada, traduzindo-se em aglomerados durante a etapa de encapsulamento, pondo em causa a viabilidade da técnica. Cada ensaio foi objeto de duas réplicas.

1.3. Concentração e pH das soluções de NaCl, de quitosano e do copolímero PAA-PLU-PAA

Os polielectrólitos usados para encapsular as bactérias foram o quitosano (policatião) e o copolímero PAA-PLU-PAA (polianião). Uma vez que a constante de dissociação ácida (pKa) do quitosano é igual a 6,5 e a do copolímero PAA-PLU-PAA é igual a 4,95, aplicando a equação de Henderson-Hasselbalch aos dois polímeros (equações 1 e 2), é possível concluir que para um pH igual a 6 os grupos amina do quitosano estão protonados (NH_3^+), ao passo que os grupos carboxílicos do copolímero estão desprotonados (COO^-), ou seja, existem cargas positivas e negativas no meio, possibilitando a deposição alternada de polielectrólitos.

Para o quitosano:

$$pH = pKa + \log \frac{[\text{NH}_2]}{[\text{NH}_3^+]} \leftrightarrow 6 = 6,5 + \log \frac{[\text{NH}_2]}{[\text{NH}_3^+]} \leftrightarrow \frac{[\text{NH}_2]}{[\text{NH}_3^+]} = 0,32 \leftrightarrow [\text{NH}_3^+] > [\text{NH}_2] \quad (1)$$

Para o PAA-PLU-PAA:

$$pH = pKa + \log \frac{[\text{COO}^-]}{[\text{COOH}]} \leftrightarrow 6 = 4,95 + \log \frac{[\text{COO}^-]}{[\text{COOH}]} \leftrightarrow \frac{[\text{COO}^-]}{[\text{COOH}]} = 11,2 \leftrightarrow [\text{COO}^-] > [\text{COOH}] \quad (2)$$

Depois de estabelecido um pH igual a 6 para as soluções, testaram-se duas concentrações para a solução de NaCl, nomeadamente 0,01g/mL (proveniente do trabalho previamente desenvolvido) e 1mg/mL (Priya et al. 2011). A primeira concentração levou à formação de um único aglomerado de bactérias, não existindo bactérias dispersas para encapsular, o que pode ser explicado pelo facto de a concentração ser demasiado elevada, levando à formação de aglomerados de bactérias. Uma vez que todos os polímeros apresentam pesos moleculares diferentes (Quitosano: 100-300 kDa, PAA-PLU-PAA: 24 322 Da e PAA-PLU-PAA: 11 671 Da), optou-se por preparar as soluções de quitosano e do copolímero PAA-PLU-PAA com a mesma concentração molar ($4,11 \times 10^{-8}$ mol/mL), em vez de mássica. De facto, esta

concentração molar resultou e permitiu que se formassem os filmes de revestimento em torno das bactérias através da técnica LbL, conforme pretendido.

A solução salina utilizada foi adotada da literatura (Priya et al. 2011), e consistiu numa solução de NaCl (0,15M) a pH 6 (de acordo com o pH das soluções polielectrolíticas). A solução salina foi necessária para preparar as soluções de quitosano e do copolímero PAA-PLU-PAA e para lavar as bactérias entre as várias camadas.

1.4. Tempo e velocidade de centrifugação

Para centrifugar as bactérias, de modo a verter o sobrenadante e recuperar as mesmas, testou-se uma velocidade de centrifugação de 8000 rpm durante 15 (Priya et al. 2011) e 5 minutos. O teste de 5 minutos deveu-se ao facto de a centrífuga Universal 32 da Hettich não possuir refrigeração e, por consequência, ocorrer um sobreaquecimento propenso a afetar negativamente o sistema de encapsulamento. De facto, 8000 rpm durante 5 minutos mostrou-se suficiente para sedimentar as bactérias.

1.5. Tempo de incubação entre camadas

Para se formarem os filmes de revestimento em torno das bactérias, obtidos através da adsorção gradual das moléculas de polielectrolito até se atingir um equilíbrio das forças electrostáticas, realizaram-se testes com 30 min e 1h de incubação. A escolha do tempo mais adequado, residiu na observação das várias camadas de revestimento ao microscópio digital Olympus, para avaliar a formação de várias estruturas de encapsulamento e na medição do potencial zeta das várias camadas, para inferir sobre a homogeneidade do sistema. Quantas mais forem as estruturas de encapsulamento existentes, mais homogénea é a amostra (com poucas bactérias livres) e, por tal, há consistência e proximidade dos valores de potencial zeta obtidos.

2. Descrição do procedimento experimental

2.1. Crescimento das bactérias *Lactobacillus acidophilus*

Primeiramente, preparou-se e esterilizou-se o meio de cultura MRS (55g/L), seguindo-se o inóculo das bactérias (1% do volume total do meio) e a sua incubação por um período de 13h, a 37°C e 100 rpm. Após o crescimento aeróbio das bactérias, a suspensão foi fracionada em tubos de Falcon, 5 mL em cada um, e as células foram centrifugadas 5 min a 8000 rpm, para as separar do sobrenadante.

No fim, as bactérias foram ressuspensas em 15 mL de água destilada desionizada esterilizada e, de seguida, centrifugadas a 8000 rpm durante 5 min, sendo que este ciclo de lavagem foi repetido três vezes, a fim de preparar as células probióticas para serem encapsuladas.

2.2. Encapsulamento das bactérias *Lactobacillus acidophilus*

Depois de lavar e recolher as bactérias, como mencionado atrás, iniciou-se a técnica de encapsulamento LbL, sendo que o protocolo de deposição consistiu em:

- adicionar 15 mL da solução de quitosano às bactérias lavadas;
- incubar as bactérias durante 30 min/1h a 37°C e 100 rpm para se formar a cápsula em torno das mesmas;
- centrifugar 5 min a 8000 rpm e verter o sobrenadante;
- ressuspender as bactérias em 15 mL de solução NaCl e lavá-las três vezes com a mesma, de modo a garantir a remoção do excesso de polieletrólito;
- adicionar 15 mL do copolímero PAA-PLU-PAA às bactérias já revestidas com a primeira camada e repetir o procedimento anterior até se atingir o número de camadas pretendido, assegurando sempre uma adsorção alternada do poliacetato e do polianião;
- no final do encapsulamento, ressuspender as bactérias em 5 mL (de acordo com a quantidade inicial de meio de cultura fracionada pelos tubos) de solução salina.

O quitosano foi o primeiro polieletrólito a ser adsorvido, na medida em que as bactérias são carregadas negativamente, devido à presença de grupos ácidos ionizados na parede celular. No total, sintetizaram-se 6 camadas de revestimento e para cada camada realizaram-se duas réplicas.

Seria desejável incluir o número inicial de células probióticas e deveria ser usada a mesma quantidade de bactérias para cada sistema de encapsulamento (1, 2, 3, 4, 5 e 6 camadas), de modo a eliminar variabilidade entre as amostras e se poderem tirar conclusões com mais significado estatístico. Isso permitiria, também, determinar a quantidade de bactérias não revestidas no final do processo de encapsulamento e, assim determinar a eficiência de encapsulamento. Na impossibilidade de dispor dos equipamentos necessários para fazer a contagem do número de células, a metodologia adotada para reduzir a variabilidade amostral

consistiu em partir sempre da mesma amostra de *Lactobacillus acidophilus* e inocular e distribuir pelos tubos de Falcon a mesma quantidade de bactérias, 1% e 5 mL, respetivamente.

No final do encapsulamento, coligiram-se 5 amostras de cada sistema, incluindo as duas réplicas com o intuito de observar ao microscópio digital a formação de sistemas de revestimento nas 6 camadas sintetizadas; testar a viabilidade da técnica, através da medição do potencial zeta de cada camada; estudar a conservação e viabilidade das bactérias, depois de encapsuladas, através da liofilização e armazenamento durante 7 e 30 dias no frigorífico (T=8°C); simular as condições gastrointestinais através de uma solução ácida com pH=2 (estômago) e de uma solução básica com pH=8 (intestino), e, assim, testar a resistência e viabilidade das bactérias encapsuladas no trato gastrointestinal.

2.3. Liofilização das bactérias encapsuladas

Na liofilização dos probióticos, estes são expostos a condições processuais severas, tal como temperaturas extremamente baixas. As células são primeiramente congeladas e, subsequentemente, a água sublimada sob vácuo, com aumento gradual da temperatura, pelo que a água congelada passa diretamente do estado sólido para o estado gasoso, minimizando assim os danos na parede celular causados pela evaporação (Burden 2016).

A liofilização garante a estabilidade das bactérias nos alimentos durante o seu armazenamento, mas não durante o seu consumo. Assim, esta técnica é usada como um processo secundário de encapsulamento, isto é, aplica-se após o encapsulamento dos probióticos por outra técnica (emulsão, aprisionamento em microsferas de gel, etc), garantindo uma melhoria da estabilidade no trato gastrointestinal e otimizando os efeitos benéficos relativos ao consumo dos probióticos (Chávarri et al. 2012 ; Riaz & Masud 2013). Esta combinação do encapsulamento e liofilização das células probióticas é ainda um conceito novo. Todavia, estão-lhe associados resultados positivos no que diz respeito à estabilidade e viabilidade celular durante o armazenamento, processo onde a maioria das bactérias morre (Solanki et al. 2013). Adicionalmente, a inativação do metabolismo das bactérias encapsuladas conduz à fixação do sabor dos produtos não influenciando, portanto, o seu perfil de sabores especialmente durante o período de armazenamento (Mortazavian et al., 2007).

Este processo de desidratação, comparativamente a outros, tende a danificar menos o tecido que está a ser desidratado. Contudo não é 100% eficaz, designadamente porque ocorre sempre uma taxa de danificação dos constituintes da parede celular das bactérias, traduzindo-se na sua morte. Adicionalmente, no congelamento pode haver lugar à formação de cristais de gelo que danificam as membranas celulares das bactérias (Burden 2016).

Assim, a avaliação da viabilidade celular, das bactérias encapsuladas liofilizadas, foi efetuada em placas de agar, de acordo com as diluições prévias necessárias e cada ensaio foi objeto de duas réplicas.

2.4. Quantificação da concentração celular através da análise espectrofotométrica de densidade ótica (D.O)

A concentração celular de bactérias *Lactobacillus a.* pode ser medida, de forma rápida e indireta, através da determinação da sua densidade ótica (D.O) ao longo do tempo. Esta técnica não permite distinguir células viáveis de células mortas, pois faz uma avaliação do número total de células na amostra e é especialmente utilizada quando se pretende saber se uma cultura se encontra em crescimento, estando este crescimento relacionado com o aumento da densidade ótica medida a um comprimento de onda particular (Rocha 1993).

Para avaliar a recuperação e crescimento celular das bactérias, colocou-se a mesma massa (1% m/v) de bactérias imobilizadas liofilizadas em frascos Erlenmeyer com 50 mL de meio MRS, previamente esterilizado, que foram incubadas a 37°C e 200 rpm, durante 48h. Procedeu-se à mesma metodologia para as bactérias não encapsuladas, como teste de referência. O crescimento das células encapsuladas está diretamente relacionado com o transporte de nutrientes para dentro dos filmes de revestimento. Assim, este teste permite identificar o número ótimo de camadas de revestimento das bactérias, pois a curva de D.O relativa a um determinado número de camadas de revestimento que mais se aproximar à da curva de D.O das bactérias livres é, de fato, o melhor sistema de proteção e manutenção da atividade metabólica das bactérias.

As amostras coligidas foram imediatamente avaliadas a 540 nm por espectrofotometria, sendo que para valores de absorvância superiores a 0,6, aquelas foram diluídas, de modo a garantir uma relação linear entre a absorvância e o número total de células por mL de suspensão (Mendes 2010). Cada ensaio foi objeto de duas réplicas.

2.5. Análise quantitativa de açúcares redutores

Para avaliar o consumo de glucose pelas bactérias, informação complementar às curvas de D.O, procedeu-se a uma análise quantitativa de açúcares redutores através do método DNS, método no qual ocorre uma reação de oxidação-redução entre o açúcar redutor e o agente oxidante (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Define-se açúcar redutor como um açúcar no qual o carbono do grupo carbonilo pode ser oxidado a ácido carboxílico (Mendes 2010).

Primeiramente preparou-se a amostra cuja concentração de glucose se pretendia analisar, efetuando a diluição com água destilada, de modo a que a absorvância medida se encontrasse na gama de valores 0.1 – 0.6. Pipetou-se 1 mL de água destilada e 0.5 mL da amostra diluída para um tubo de 25 mL, adicionam-se 3 mL de reagente de DNS e agitou-se, colocando-se, no fim, o tubo num banho de água a ferver durante 5 minutos.

Findo esse tempo, arrefeceu-se o tubo em água fria e pipetaram-se 0.2 mL da amostra tratada para uma cuvete de plástico e adicionam-se 2.5 mL de água destilada. A medição da absorvância da amostra no espectrofotómetro UV-Vis, a 540 nm (espectro visível), foi realizada contra o “branco” (1.5 mL de meio MRS tratado com o reagente DNS do mesmo modo que as amostras). No final, determinou-se a quantidade de açúcares redutores na amostra, expressa em equivalentes de glucose, aplicando-se a curva de calibração de glucose elaborada previamente e tendo em conta o fator de diluição usado.

2.6. Simulação da resistência ao processo de digestão

Depois da identificação do número de camadas de revestimento mais adequado para as bactérias, através das curvas de D.O, e da caracterização do diâmetro dos sistemas de encapsulamento, procedeu-se ao estudo de maior enfoque: a tolerância das bactérias encasuladas, às condições do trato gastrointestinal humano, para colonizar o lúmen intestinal e exercer as suas funções terapêuticas.

Para tal, simularam-se as condições do estômago com uma solução salina (0,15M) a pH=2 e as condições intestinais com uma solução salina (0,15M) a pH=8. Primeiramente, colocaram-se as bactérias liofilizadas em solução salina ácida (50 mg_{bactérias}/mL_{solução salina}) (Priya et al. 2011) e incubaram-se por um período de 2h a 37°C e 200 rpm. De seguida, centrifugou-se a suspensão a 8000 rpm durante 5 min, verteu-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as bactérias na mesma quantidade de solução salina básica para incubar por um período de 2h a 37°C e 200 rpm. No final deste estudo, procedeu-se à avaliação da viabilidade celular das células quando expostas somente ao ácido e ao ácido e base, através da contagem de UFC/mL em placas de agar, de acordo com as diluições prévias necessárias. Cada ensaio foi objeto de duas réplicas.

2.7. Efeito do tratamento térmico nos sistemas de encapsulamento

O processamento dos alimentos inclui tratamentos térmicos, pelo que é fundamental avaliar a estabilidade térmica dos filmes de revestimento constituintes da matriz de encapsulamento. Adicionalmente, muitos dos produtos alimentares, que contém probióticos, são aquecidos antes de serem consumidos, tais como o leite e bolos, pelo que a temperatura

pode provocar a destruição do sistema de encapsulamento e, conseqüentemente, das bactérias lácteas probióticas. Esta perda, para além de diminuir a funcionalidade dos alimentos pode alterar o sabor e textura dos mesmos (Saarela et al. 2000).

Assim, para avaliar o efeito da temperatura na viabilidade celular das bactérias, livres e encapsuladas, procedeu-se a um estudo, no qual se colocaram as bactérias liofilizadas em água destilada esterilizada (1 g bactérias liofilizadas/mL água destilada). Seguidamente, o tubo esterilizado contendo a suspensão foi colocado em água a 90°C, durante 30 segundos e, findo este tempo, procedeu-se a um arrefecimento rápido em gelo (Alves 2013).

No final, procedeu-se à contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) em placas de agar (de acordo com a diluição prévia necessária), a fim de avaliar a perda de bactérias probióticas durante este tratamento térmico.

2.8. Diâmetro dos sistemas de encapsulamento

O diâmetro dos sistemas de revestimento dos probióticos não deve exceder 100 µm, na medida em que tamanhos superiores a este afetam as propriedades sensoriais dos alimentos, tais como a textura e o sabor (Burgain et al. 2011).

Para caracterizar fisicamente as estruturas obtidas através da técnica LbL, procedeu-se a análise dos vários sistemas de encapsulamento (1, 2, 3, 4, 5 e 6 camadas) em microscópio digital (objetiva 100x). Os resultados foram expressos em micrómetros (µm).

2.9. Método das placas

Para avaliar a viabilidade das bactérias encapsuladas após a liofilização e passagem pelas soluções ácida e básica, procedeu-se à contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) em placas de agar. Primeiramente, preparou-se e esterilizou-se a mistura de agar (15 g/L) com meio MRS (55 g/L), sendo que no fim da esterilização a mistura, ainda quente, foi distribuída pelas placas em condições assépticas. Depois do agar solidificar e arrefecer, procedeu-se ao inóculo de 1mL de bactérias, diluído previamente, de modo a que cada placa contivesse um número de células compreendido entre 30 e 300 (Rocha 1993), ficando a incubar a 37°C durante 48h. Há que salientar que a esta contagem de UFC está associado um erro por defeito, pois podem ocorrer sobreposições de células, originando uma única colónia. O resultado final foi expresso em UFC/mL e repetiu-se três vezes esta contagem, constituída por duas réplicas.

Capítulo 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Síntese dos copolímeros Br-PLU-Br, PtBA-PLU-PtBA e PAA-PLU-PAA

Como mencionado no Capítulo 2, um dos objetivos experimentais deste trabalho era a síntese de dois copolímeros, PAA-PLU-PAA, com pesos moleculares diferentes através de uma polimerização ATRP. Para tal, primeiramente sintetizou-se o iniciador Br-PLU-Br, através de uma reação de esterificação do Pluronic, seguindo-se a polimerização por ATRP deste iniciador com tBA de forma a sintetizar o copolímero PtBA-PLU-PtBA. Por fim, procedeu-se à sua hidrólise com TFA para obter o copolímero pretendido (PAA-PLU-PAA). Há que salientar que a polimerização não pode ser realizada diretamente com ácido acrílico, na medida em que ocorrem reações paralelas com os grupos carboxílicos, prejudicando a espécie ativa. A síntese deste copolímero teve por base diferentes proporções, sendo no final avaliado o peso molecular e a polidispersividade em cada caso, como resume a Tabela 1.

O método de síntese do copolímero baseou-se no trabalho de Choo et al (Choo et al. 2011). Contudo, neste não existe informação precisa acerca da temperatura de reação, visto que são referidos dois valores, 50 e 80°C, para o mesmo procedimento. Assim, começou-se por uma temperatura de 50°C (reações 1 e 2; Tabela 1), mas como não houve a formação de polímero na fase de precipitação admitiu-se que a polimerização não ocorreu. Realizaram-se então duas reações a 80°C (reações 3 e 4; Tabela 1), que conduziram à formação de polímero, donde se infere ser essa a temperatura adequada.

As reações 3 a 8, 12 e 13 com as mesmas quantidades de iniciador, catalisador, ligante e solvente, apresentaram pesos moleculares entre 12 000 e 16 500 Da e polidispersividades que variaram entre 1.0 e 1.3, revelando uma repetibilidade bastante aceitável. Nas reações 9, 10 e 11 as quantidades foram duplicadas e obtiveram-se três copolímeros com pesos moleculares e polidispersividades próximas dos polímeros obtidos inicialmente. Ou seja, as características dos polímeros não foram afetadas pelo efeito escala, o que é um dado interessante sobre a viabilidade da técnica de polimerização.

Tabela 1. Condições da reação, peso molecular ($M_{n,GPC}$), polidispersividade (\mathcal{D}) e massa do copolímero PAA-PLU-PAA, para diferentes proporções usadas na síntese.

Reação	T/°C	t/h	Tolueno/tB A (v/v)	[tBA]/[PLU- Br]/[CuBr(II)]/[PM DETA]	$M_{n,GPC}$	\mathcal{D}	m/mg PtBA- PLU- PtBA	m/mg PAA- PLU- PAA
1	50	24	1	64/0.25/1.545/0.707	-	-		
2	50	24	1	64/0.25/1.545/0.707	-	-		
3	80	24	1	64/0.25/1.545/0.707	13258	1.139	85.5	52.3
4	80	24	1	64/0.25/1.545/0.707	12603	1.343	156.3	128.6
5	80	24	1	64/0.25/1.545/0.707	15829	1.133	91.7	32.6
6	80	24	1	64/0.25/1.545/0.707	12615	1.189		
7	80	24	1	64/0.25/1.545/0.707	16535	1.317		
8	80	24	1	64/0.25/1.545/0.707	15218	1.044		
9	80	24	1	64/0.25/1.545/0.707	14192	1.075		246
10	80	48	1	64/0.25/1.545/0.707	15189	1.099		
11	80	48	1	64/0.25/1.545/0.707	14651	1.129		
12	80	24	1	64/0.25/1.545/0.707	15089	1.035		
13	80	24	1	64/0.25/1.545/0.707	14663	1.040		
14	80	48	1	64/0.25/1.545/0.707	14084	1.051		
15	80	48	1	64/0.25/1.545/0.707	14223	1.087		
16	80	89	1	64/0.25/1.545/0.707	14301	1.093	749.5	351.8
17	80	24	1,15	328/0.25/1.545/0.707	14623	1.035		
18	80	48	1	328/0.25/1.545/0.707	14558	1.029		
19	80	48	1	64/0.25/1.545/0.707	13022	1.095		
20	80	24	1	328/0.25/2/2	14612	1.034		
21	80	24	1	466/0.35/20/10	17980	2.137		
22	80	24	1,15	189/0.25/3/1.5	14871	1.033		
23	80	48	1	64/0.25/1.545/0.707	12946	1.089		
24	80	24	1	64/0.125/3/1.5	16105	1.043		

Uma vez que a perda de massa na etapa da hidrólise era significativa, a quantidade de copolímero era muito reduzida, pelo que se aumentou cinco vezes a quantidade de todos os componentes (reações 16, 19 e 23; Tabela 1). Apesar de os valores de dispersividade serem semelhantes, o peso molecular do polímero decresceu e revelou-se diferente nas três reações em questão. Na hidrólise da reação 16, houve uma perda de cerca de 400 mg, obtendo-se uma massa final de 351.8 mg, ou seja, a quantidade de copolímero obtido continuava a ser muito reduzida.

Nas reações 17, 18, 20 a 22 e 24 pretendia-se obter o copolímero com o dobro do peso molecular, para o que se manipularam as quantidades de monómero, iniciador e de catalisador, duplicou-se o tempo de reação e ainda se testaram novas proporções. Contudo não foi possível obter o resultado pretendido, sendo que o maior peso molecular foi aproximadamente 18 000 Da na reação 21.

Apesar de não se ter alcançado o peso molecular de 30 000 Da, o maior inconveniente deste tipo de polimerização foi, de facto, a obtenção de uma quantidade muito reduzida de copolímero e perdas significativas na etapa de hidrólise e purificação. Como no encapsulamento das bactérias é necessário uma quantidade substancial de copolímero (testes de otimização e encapsulamento), só seria possível com amostras de lotes diferentes, pelo que se decidiu optar por outro tipo de polimerização, nomeadamente a polimerização por emulsão.

2. Síntese do copolímero PAA-PLU-PAA através de polimerização por emulsão

O Pluronic F127 usado na primeira polimerização por emulsão tem um peso molecular de 12 kDa. A análise do espectro H-RMN do produto da reação (Anexo IV, Figura A VI), permitiu inferir sobre a obtenção de um copolímero com um peso molecular de 24 322 Da e conversão de 62% (resultado obtido de forma indireta através da integração dos picos por RMN). Assim, de cada lado do Pluronic há uma cadeia de poli(ácido acrílico) com um peso molecular de aproximadamente 6000 Da, traduzindo-se num copolímero final com 50% de Pluronic e 50% de PAA.

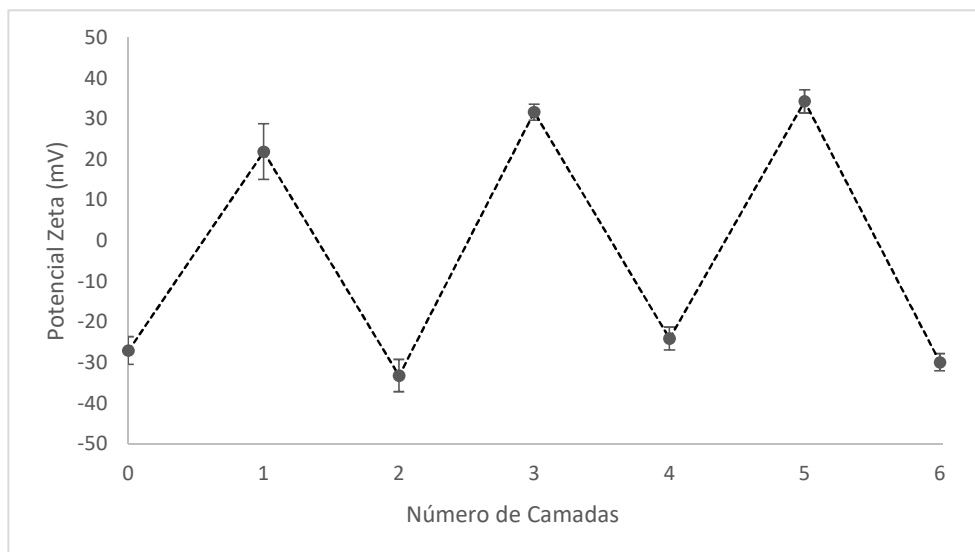
Para avaliar o efeito de segmentos poliméricos com características diferentes, no encapsulamento de bactérias, decidiu sintetizar-se um copolímero com metade do peso molecular obtido na primeira emulsão, para que se usou o Pluronic F68. Como este composto tem um peso molecular de 8000 Da, e de modo a manter a proporção 50/50 de PLU/PAA, teoricamente o copolímero final deveria apresentar um peso molecular final de 16 000 Da (cada cadeia de PAA com cerca de 4000 Da).

Assim, a quantidade de monómero (ácido acrílico) teve de ser ajustada, pois ao usar um surfactante 1/3 mais pequeno relativamente ao Pluronic F127, a quantidade de grupos OH na mistura é maior e, por isso, é necessário mais monómero para obter as proporções requeridas. Deste modo, realizou-se uma segunda emulsão com as quantidades iguais às da primeira emulsão, exceto para o ácido acrílico, cuja quantidade foi 1/3 superior à usada na primeira emulsão. Analisando o espectro H-RMN desta segunda reação (Anexo V, Figura A VIII) foi possível concluir, de forma indireta, que o copolímero final apresentava um peso molecular de 11 671 Da, tal como pretendido, e conversão de 65%.

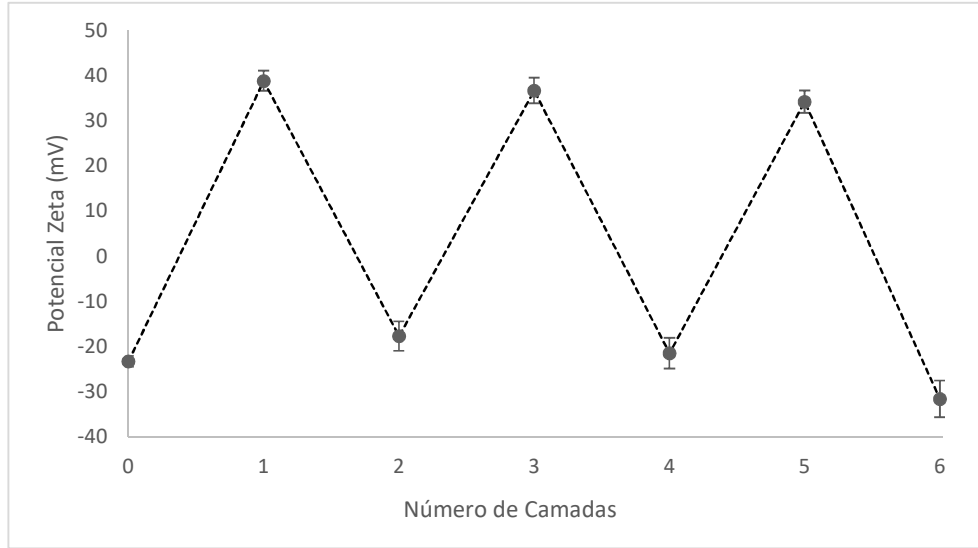
3. Encapsulamento das bactérias *Lactobacillus acidophilus* com Quitosano e com o copolímero PAA-PLU-PAA

3.1 Avaliação do potencial zeta

A medição do potencial zeta é muito importante para aferir a viabilidade da técnica LbL, isto é, para verificar se o protocolo de deposição, conforme as condições selecionadas como ótimas, realmente se traduz em camadas com cargas alternadas. Uma vez que o quitosano se encontra protonado, as camadas correspondentes a este polielectrólito devem apresentar um potencial positivo (camadas 1, 3 e 5), ao passo que as camadas correspondentes ao copolímero PAA-PLU-PAA devem apresentar um potencial negativo (camadas 2, 4 e 6). Os resultados apresentados nas Figuras 19 e 20 são referentes a uma concentração de 200 $\mu\text{L}_{\text{bactérias}}/\text{mL}_{\text{água MiliQ}}$ e cada ponto do gráfico resultou de um conjunto de 7 medições, com duas réplicas cada, para os dois tempos de incubação (30 min e 1h).

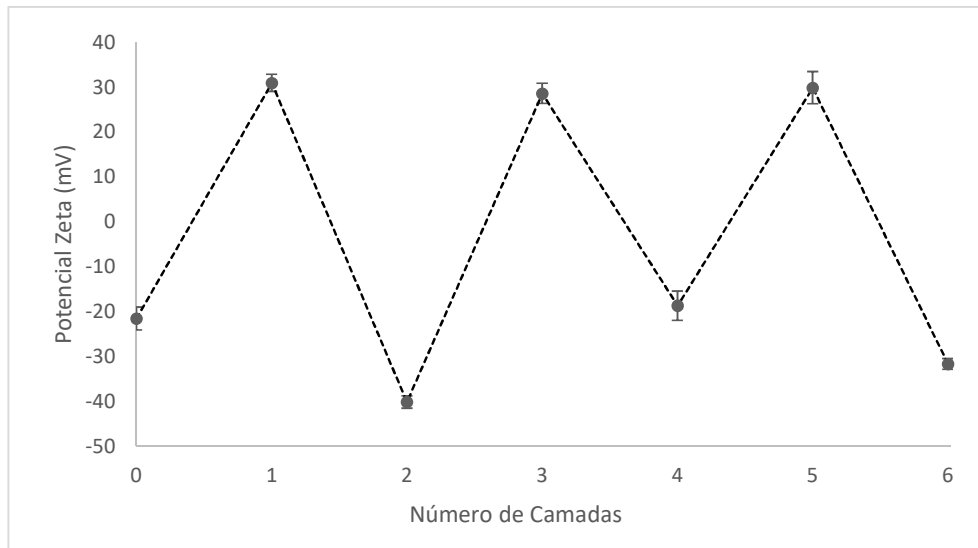


(a)

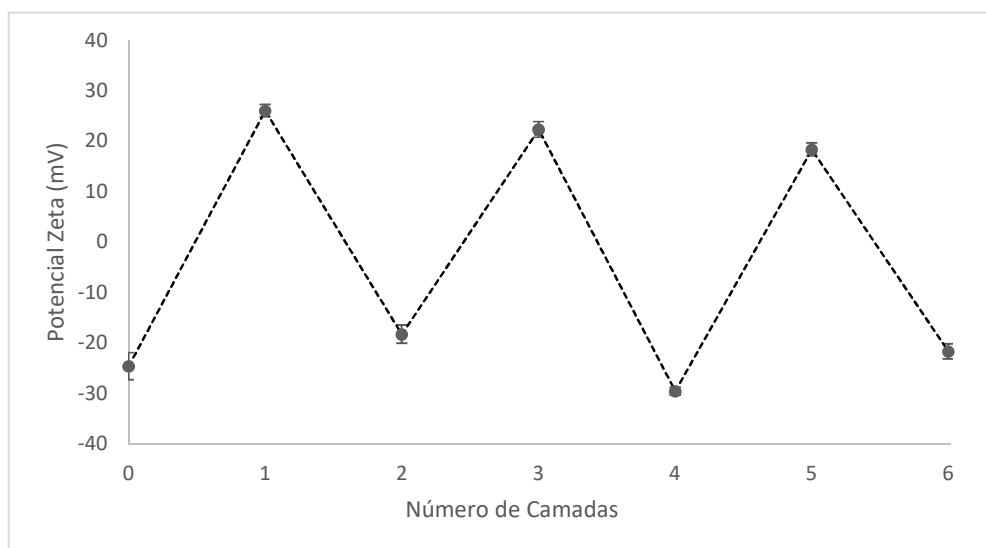


(b)

Figura 19. Resultados do potencial zeta respectivo ao encapsulamento das bactérias com o copolímero de peso molecular 24 kDa, para 30 min (a) e 1h (b) de incubação entre camadas. (As barras de incerteza correspondem ao desvio padrão.)



(a)



(b)

Figura 20. Resultados do potencial zeta respetivo ao encapsulamento das bactérias com o copolímero de peso molecular 12 kDa, para 30 min (a) e 1h (b) de incubação entre camadas. (As barras de incerteza correspondem ao desvio padrão.)

Os resultados das Figuras 19 e 20 permitem concluir que o protocolo de deposição decorreu como pretendido: as camadas de quitosano e do copolímero acrílico apresentam alternativamente um potencial zeta positivo e negativo, respetivamente. Esta alternância de cargas traduz-se em gráficos com um padrão zig zag, característico do método LbL (Ben et al. 2014).

Apesar de os desvios padrão não apresentarem alterações significativas para 30 min e 1h de incubação de cada camada (Figuras 19 (a) e (b) e 20 (a) e (b)), os valores de potencial zeta das 7 medições, efetuadas para cada ponto dos gráficos, foram mais uniformes e concordantes para 1h de incubação, o que se traduz num gráfico com um padrão mais regular, evidente nas Figuras 19 (b) e 20 (b). Adicionalmente, a observação ao microscópio digital de várias amostras referentes aos dois tempos de incubação estudados permitiu a identificação clara de vários sistemas de encapsulamento e, portanto, de poucas bactérias livres nas amostras referentes a 1h de incubação para as várias camadas de polieletrólitos (Figura 21).

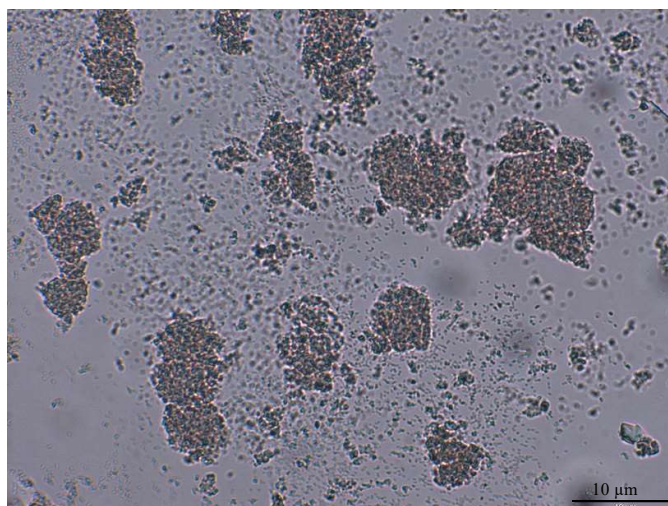
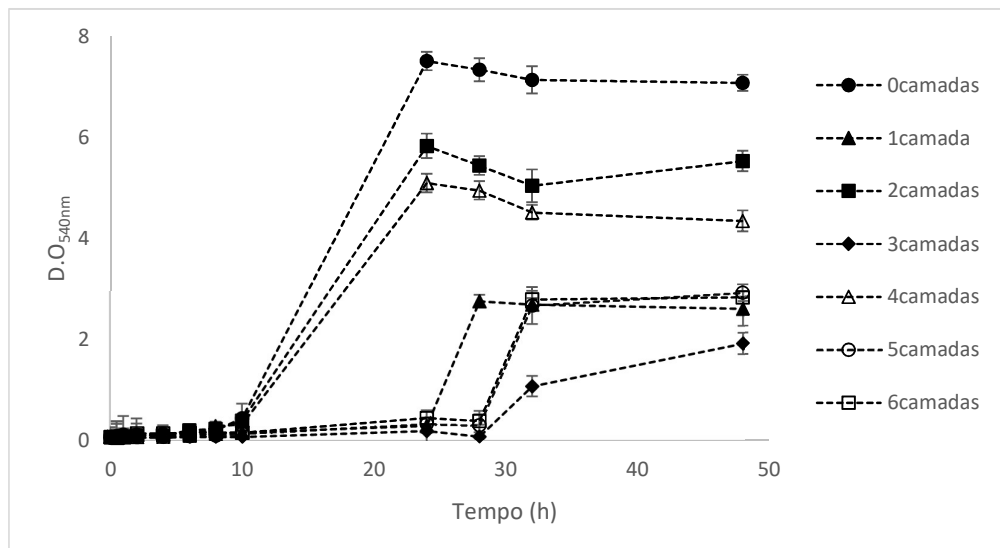


Figura 21. Imagem obtida por microscopia digital, com a objetiva de imersão, relativa ao sistema com 1h de incubação entre as várias camadas.

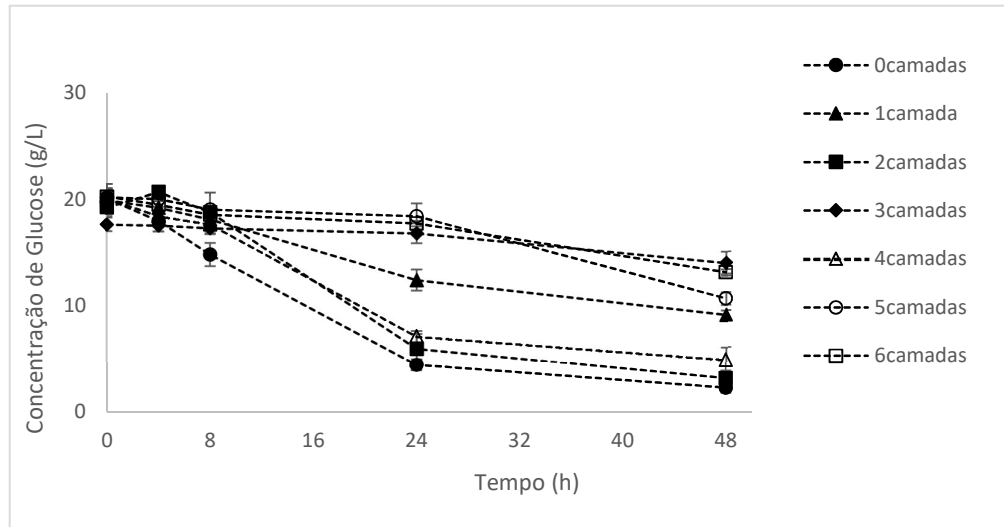
Deste modo, para ambos os copolímeros, 1h de incubação de cada camada de polieletrólito, mostrou ser o tempo mais indicado e eficiente, pelo que **todos** os estudos seguintes foram realizados com amostras correspondentes a este tempo.

3.2. Análise espectrofotométrica de densidade ótica (D.O) e análise quantitativa de açúcares redutores

Depois da incubação das bactérias livres e das bactérias encapsuladas, por um período de 48h, procedeu-se à avaliação da densidade ótica para compreender o efeito do revestimento no crescimento das células e, assim, tirar conclusões acerca do número de camadas de revestimento mais adequado: o número de camadas que permite a difusão de nutrientes e, por conseguinte, assegura o crescimento das bactérias (Figuras 22 e 23).

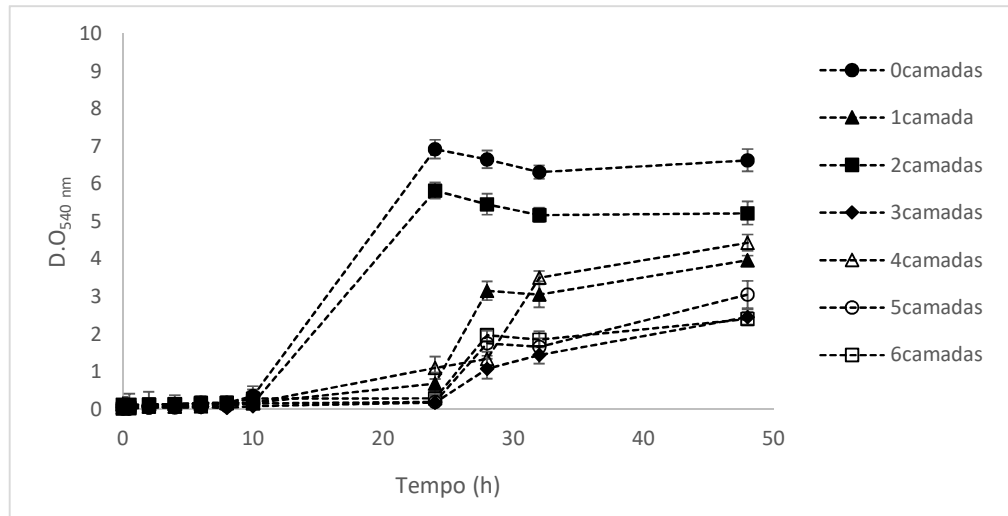


(a)

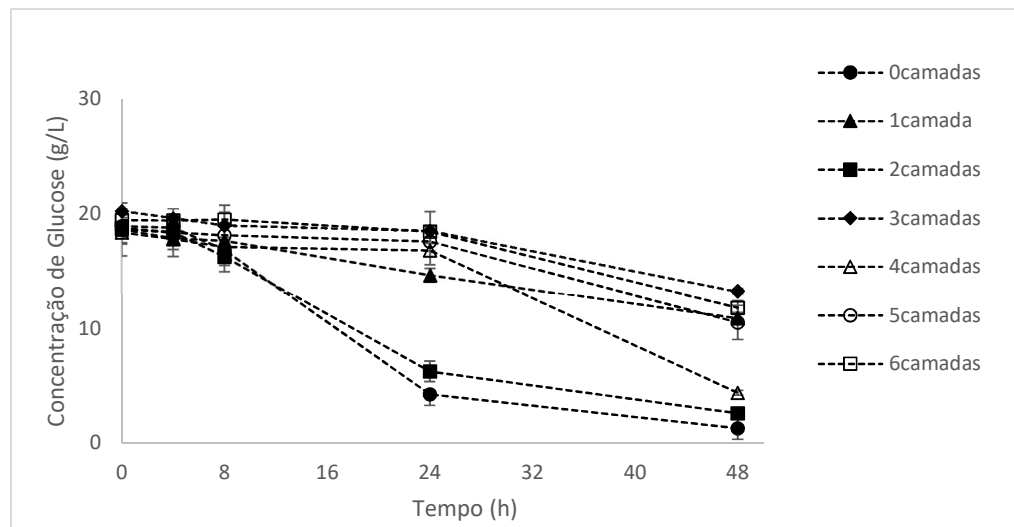


(b)

Figura 22. (a) Curva de crescimento das bactérias *Lactobacillus acidophilus*, em meio MRS, revestidas com o copolímero de peso molecular 24 kDa e (b) consumo de glicose ao longo do cultivo em meio MRS. (As barras de incerteza correspondem ao desvio padrão.)



(a)



(b)

Figura 23. (a) Curva de crescimento das bactérias *Lactobacillus acidophilus*, em meio MRS, revestidas com o copolímero de peso molecular 12 kDa e (b) consumo de glicose ao longo do cultivo em meio MRS. (As barras de incerteza correspondem ao desvio padrão.)

A cinética de crescimento das bactérias foi acompanhada durante 48h e a concentração bacteriana foi avaliada através da densidade ótica por espectrofotometria a 540 nm. Os resultados mostram diferenças significativas no crescimento celular para as bactérias livres e para as bactérias revestidas (Figuras 22 (a) e 23 (a)), como era previsível.

Para o copolímero de peso molecular 24 kDa (Figura 22 (a)), os sistemas de encapsulamento constituídos por duas e por quatro camadas foram os que possibilitaram um

crescimento bacteriano semelhante ao das bactérias livres. Contudo, a fase *lag* (fase de adaptação metabólica ao meio) das bactérias revestidas foi mais extensa, visto que o encapsulamento oferece resistência à difusão de nutrientes e a adaptação das células é mais lenta. Adicionalmente, o tempo necessário para a cultura atingir a fase estacionária, mencionada como a fase que melhor preserva a viabilidade celular, foi semelhante para as bactérias livres e para as revestidas com duas e quatro camadas, o que mais uma vez suporta a eficácia destes dois sistemas.

Já a variação da concentração de glucose (valor inicial de 20 g/L) ao longo das 48h, Figura 22 (b), complementa a informação obtida pelo gráfico da Figura 2 (a), na medida em que o consumo de glucose é maior para as bactérias livres e para as bactérias revestidas com 2 e com 4 camadas, i.e. as que apresentam maior crescimento celular.

No que diz respeito ao sistema de encapsulamento com o copolímero acrílico de peso molecular 12 kDa, Figura 23 (a), a evolução da concentração celular para as bactérias revestidas com duas camadas, foi a que mais se aproximou à das bactérias não encapsuladas, sendo, portanto, o caso mais apropriado para a manutenção da atividade metabólica celular. É possível observar que para mais do que duas camadas de revestimento, o crescimento celular é muito reduzido, o que pode ser explicado pelo fato de o copolímero apresentar na sua constituição um surfatante com grupos hidrofóbicos e hidrofílicos menores, isto é, um surfactante de menor peso molecular, apresentando assim maior tensão interfacial, limitando a entrada de nutrientes através dos filmes de revestimento das bactérias (Rosen, Milton J., Kunjappu 2012).

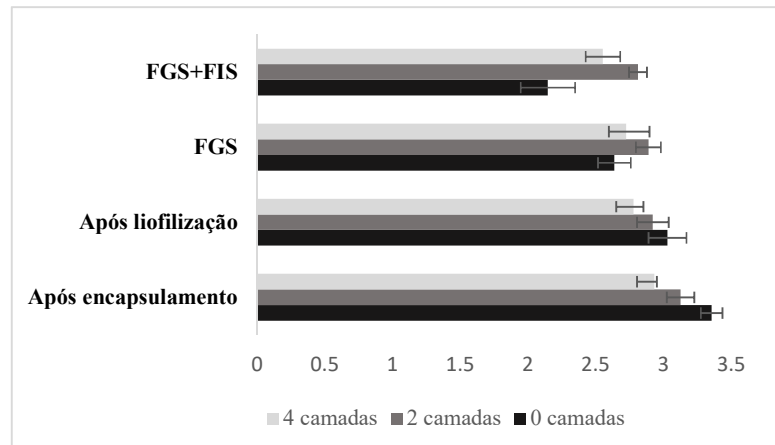
Importa referir que uma característica muito importante deste estudo foi o facto de o número de camadas apontado como ótimo ser externamente constituído pelos copolímeros acrílicos sintetizados, sensíveis ao pH, o que sustenta a sua aplicabilidade e eficiência em sistemas biológicos, nomeadamente no crescimento de células probióticas.

3.3. Simulação da resistência ao processo de digestão

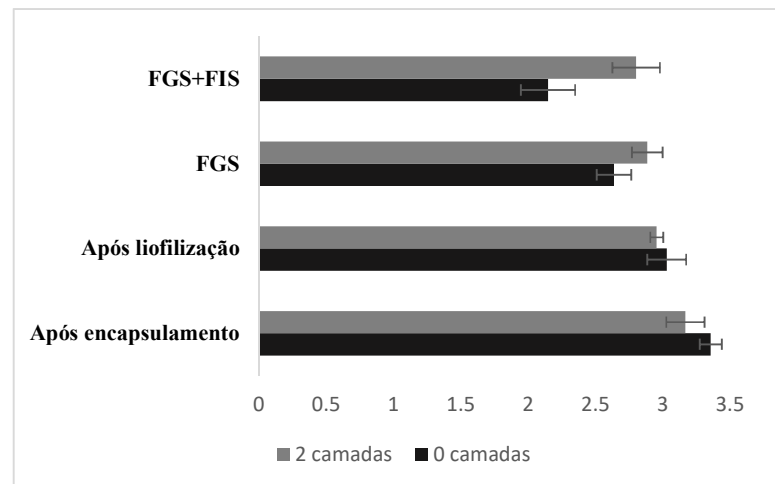
Para avaliar a eficácia dos sistemas de encapsulamento apontados na **Secção 3.2** como os mais adequados à manutenção da viabilidade celular das bactérias *Lactobacillus acidophilus* procedeu-se ao método das placas, no qual se testa a capacidade de as bactérias se reproduzirem, determinando-se assim o número de células viáveis no volume de suspensão inoculado.

Este teste foi realizado para avaliar a perda de células probióticas durante o processo de liofilização, usado na indústria alimentar para a preservação celular, e para avaliar a perda de bactérias quando expostas a fluido gástrico simulado (FGS), como aproximação às condições

do estômago, e quando expostas a fluido intestinal simulado (FIS), como aproximação às condições intestinais. Os resultados estão expressos na Figura 24.



(a)



(b)

Figura 24. (a) Viabilidade celular das bactérias *L. acidophilus*, livres e encapsuladas com o copolímero de 24 kDa, após a liofilização e após o processo de digestão simulada e (b) viabilidade celular das bactérias *L. acidophilus*, livres e encapsuladas com o copolímero de 12 kDa. Os resultados estão expressos em log UFC/mL e as barras de incerteza correspondem ao desvio padrão.

Saliente-se que seria desejável partir da mesma quantidade de bactérias probióticas, livres e encapsuladas, antes de se proceder ao inóculo das mesmas em placas de agar, de modo a eliminar a variabilidade entre as amostras e tirar conclusões com mais significado estatístico.

Na Figura 24 é possível distinguir os valores de sobrevivência associados às bactérias livres e às bactérias encapsuladas, o que suporta a eficácia do sistema em estudo (Quitosano + PAA-PLU-PAA) na proteção das células probióticas no processo de liofilização e no processo de digestão simulado. Apenas 32% das bactérias não encapsuladas sobrevivem após o processo de digestão simulado.

Na Figura 24 (a), relativa ao copolímero de maior peso molecular, 24 kDa, o decréscimo de células viáveis durante o processo de liofilização foi maior para as bactérias revestidas com duas camadas (3.13 ± 0.10 log UFC/mL para 2.92 ± 0.12 log UFC/mL) do que para as bactérias revestidas com quatro camadas (2.98 ± 0.02 log UFC/mL para 2.78 ± 0.07 log UFC/mL). Contudo o sistema constituído por dois filmes de revestimento foi o que garantiu maior proteção dos probióticos quando expostos, durante 2h, ao fluido gástrico simulado (93% de sobrevivência) e ao fluido gástrico simulado mais fluido intestinal simulado (84% de sobrevivência). No caso das bactérias revestidas com quatro camadas poliméricas, ocorreu um decréscimo de 2.72 ± 0.18 log UFC/mL para 2.55 ± 0.12 log UFC/mL quando expostas a FGS+FIS. Este resultado pode ser explicado pelo facto de um maior número de camadas de revestimento se traduzir num aumento da espessura, pelo que a difusão de nutrientes presentes no meio MRS é mais lenta, tal como é também suportado pelos resultados expressos na Figura 22 (a).

Para o copolímero de peso molecular 12 kDa (Figura 24 (b)), os valores de viabilidade celular para as duas camadas de revestimento foram bastante positivos, pois na liofilização ocorreu uma perda de somente 3.17 ± 0.14 log UFC/mL para 2.95 ± 0.05 log UFC/mL e no final do processo de digestão simulada verificou-se uma taxa de sobrevivência dos probióticos de 83%.

Os fluidos simulados (FGS e FIS) deviam ter na sua composição sais biliares (sais constituintes dos suco entérico), pois estes são os elementos maioritariamente responsáveis pela morte dos probióticos e, por tal, só assim se faria um estudo mais realista (Ben et al. 2014). A ausência de sais biliares e a grande resistência da estirpe *Lactobacillus acidophilus* podem ter originado valores de viabilidade celular afastados da realidade. Com efeito, aquela estirpe consegue, por si só, adaptar-se progressivamente à presença de sais biliares e seus derivados,

através do efluxo ativo de sais/ácidos biliares, da hidrólise sais biliares e de mudanças conformacionais ou da composição da parede celular (Ruiz et al. 2013).

Em suma, caso fosse necessário apresentar um único sistema de encapsulamento, e uma vez que para os dois copolímeros estudados a proteção das bactérias com duas camadas de revestimento foi a melhor, o copolímero de maior peso molecular, 24 kDa, seria o selecionado por questões económicas (necessita de menor quantidade monomérica).

Explicação da metodologia adotada: Existem duas estratégias distintas para encapsular bactérias através da técnica LbL. A primeira, usada neste trabalho, baseia-se no facto de a parede celular das bactérias ser carregada negativamente e, assim, as bactérias poderem ser diretamente revestidas/encapsuladas com complexos polieletrólíticos, devido às interações iónicas. A outra estratégia, designada por *matrix-assisted LbL*, consiste em primeiramente reter as bactérias em matrizes porosas, tais como esferas de alginato, e depois revestir a superfície da matriz com polieletrólitos carregados alternadamente, de acordo com o protocolo de deposição inerente ao método LbL (Bejarano et al. 2014). Esta última estratégia apesar de permitir uma melhoria na vida de prateleira das bactérias e assegurar a sua libertação controlada, apresenta uma baixa eficiência de encapsulamento (Bai et al. 2009).

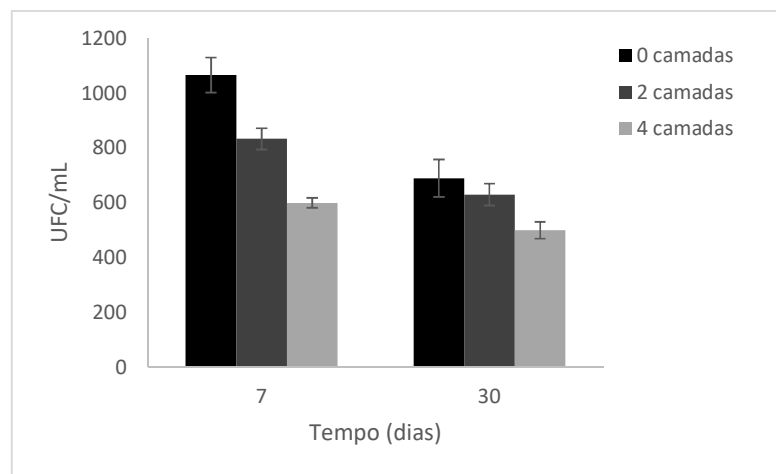
No método *matrix-assisted LbL*, assim como nos outros métodos de encapsulamento que envolvem cápsulas (emulsão, extrusão) para proceder à contagem de células viáveis em placas de agar, primeiramente é necessário dissolver a matriz de encapsulamento com uma solução salina; caso contrário não é possível identificar o número real de células.

Já no método LbL, apesar de não existir nenhuma justificação na literatura para não se destruírem os filmes de revestimento antes de se proceder à contagem de UFC em placas de agar, supõe-se que a razão para isso seja o facto de aos filmes resultantes estarem associadas interações electroestáticas muito difíceis de destruir, e pelo facto de os filmes serem de escala nanométrica, dentro dos quais as bactérias se encontram livres. Assim, a decisão de não se destruírem os filmes de revestimento, antes da contagem de UFC teve por base o protocolo de dois artigos respeitantes ao encapsulamento de probióticos através da técnica LbL (Priya et al. 2011 ; Ben et al. 2014).

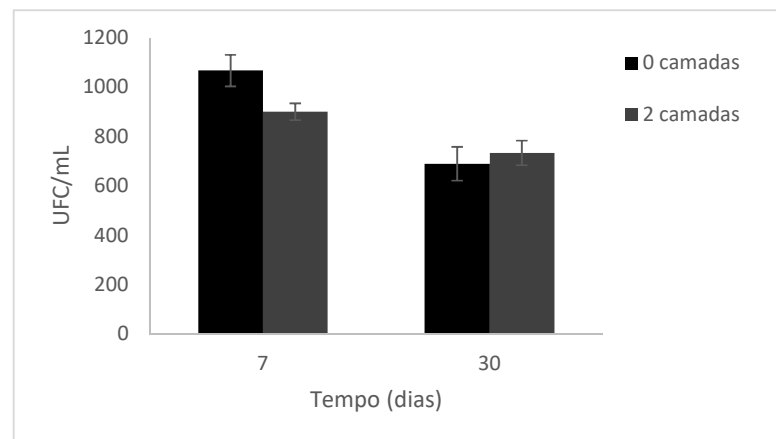
3.4. Viabilidade celular durante o armazenamento

Os produtos alimentares são armazenados durante longos períodos de tempo, de acordo com a sua validade, pelo que as condições (temperatura) e o tempo de armazenamento afetam largamente a viabilidade das bactérias encapsuladas.

Deste modo, as bactérias liofilizadas, livres e encapsuladas, foram armazenadas num frigorífico a 8°C durante 30 dias, procedendo-se à contagem de UFC ao fim de 7 dias (tempo relacionado com a organização das experiências laboratoriais) e ao fim de um mês, como ilustra a Figura 25. Verifica-se que a 8°C ao fim de 30 dias, há uma perda de 35% de células viáveis para as bactérias não encapsuladas.



(a)



(b)

Figura 25. (a) Viabilidade celular das bactérias *L. acidophilus* liofilizadas, livres e encapsuladas, com o copolímero de 24 kDa, (b) viabilidade celular das bactérias *L. acidophilus*, livres e encapsuladas, com o copolímero de 12 kDa. Os resultados estão expressos em UFC/mL e as barras de incerteza correspondem ao desvio padrão.

Para o copolímero de 24 kDa (Figura 25 (a)), o sistema de encapsulamento constituído por 2 camadas apresentou um decréscimo de 833 ± 39 UFC/mL para 630 ± 42 UFC/mL (24%), ao passo que o sistema constituído por 4 camadas de revestimento evidenciou um decréscimo de células viáveis de somente 17%.

No caso do copolímero de 12 kDa (Figura 25 (b)), o sistema de encapsulamento constituído por duas camadas de polielectrólitos proporcionou uma sobrevivência das células bacterianas probióticas de 81% (900 ± 34 UFC/mL para 733 ± 50 UFC/mL).

Assim, é evidente a elevada proteção conferida pelo complexo quitosano/(PAA-PLU-PAA) no que diz respeito ao armazenamento das bactérias probióticas encapsuladas, o que mais uma vez revela a eficácia deste sistema na proteção dos probióticos perante condições adversas.

3.5. Efeito do tratamento térmico nos sistemas de encapsulamento

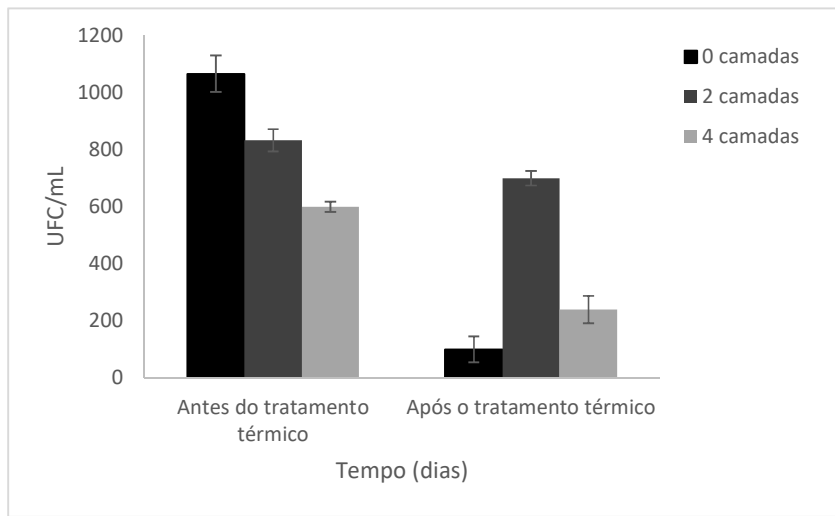
Para avaliar a resistência das camadas de revestimento, constituintes da matriz de encapsulamento, ao processamento térmico que os alimentos sofrem na indústria, procedeu-se a um teste que consiste em submeter as bactérias liofilizadas a um choque térmico. Posteriormente, inocularam-se as bactérias em placas de agar a fim de determinar a viabilidade celular, como ilustra a Figura 26.

Como se pode observar, a perda de células viáveis no caso das bactérias não encapsuladas é bastante significativa, pois só sobrevive uma percentagem de 10%, o que suporta a necessidade de um sistema de encapsulamento não só para libertar os probióticos no intestino, mas também para os proteger até serem ingeridos.

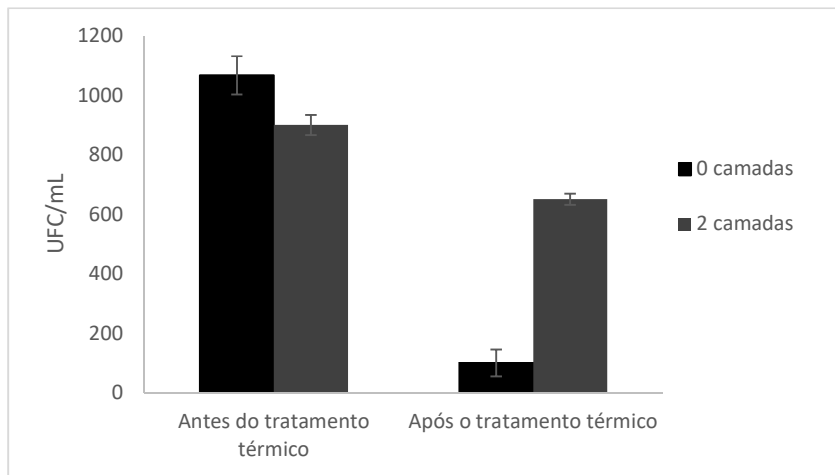
Na Figura 26 (a), relativa ao copolímero de 24 kDa, verifica-se que o sistema constituído por duas camadas de revestimento foi bastante eficaz na proteção das bactérias encapsuladas, na medida em que só ocorreu uma perda de 833 ± 39 UFC/mL para 700 ± 25 UFC/mL (16%).

Para o copolímero de 12 kDa, Figura 26 (b), sobreviveram 72% das bactérias lácteas probióticas revestidas com duas camadas.

Em conclusão, o sistema de encapsulamento constituído por dois filmes poliméricos, para ambos os copolímeros, não só permitiu a proteção das bactérias quando expostas aos fluidos simulados (FGS+FIS), mas como também garantiu uma elevada proteção dos probióticos nos alimentos quando processados e armazenados, evidenciando assim um sistema bastante eficaz ao longo de todo o processo, desde a indústria até à ingestão dos alimentos.



(a)



(b)

Figura 26. (a) Influência do tratamento térmico na viabilidade celular das bactérias *L. acidophilus* liofilizadas, livres e encapsuladas, com o copolímero de 24 kDa, e (b) com o copolímero de 12 kDa. Os resultados estão expressos em UFC/mL e as barras de incerteza correspondem ao desvio padrão.

3.6. Diâmetro dos sistemas de encapsulamento

Depois de estabelecido o número de camadas de revestimento mais adequado para os dois pesos moleculares avaliados, duas e quatro camadas no caso do copolímero de 24 kDa e duas camadas para o copolímero de 12 kDa, procedeu-se à avaliação do diâmetro destes sistemas de encapsulamento. Esta avaliação teve como objetivo confirmar se as estruturas possuíam um diâmetro inferior a 100 μm , como mencionado no Capítulo 2, Secção 2.6, e foi realizada com um microscópio digital da Olympus com a objetiva de imersão (ampliação 100x). A Figura 27 ilustra as bactérias antes de encapsuladas e a forma e diâmetro dos sistemas de encapsulamento obtidos.

Em primeira análise, podemos concluir com base na Figura 27 que o diâmetro dos sistemas de revestimento para os dois copolímeros acrílicos é bastante inferior a 100 μm (limite máximo recomendado), de modo a que a introdução destes probióticos encapsulados nos alimentos não afetará as propriedades sensoriais.

Adicionalmente, podemos também verificar que o complexo bactérias+filmes de revestimento não exhibe uma forma esférica, característica dos outros métodos de encapsulamento com cápsulas (Anal & Singh 2007 ; Ben et al. 2014). Comprova-se que, nesta metodologia LbL, as bactérias não se encontram dentro de uma estrutura rígida e assumem uma posição espacial livre dentro dos filmes de revestimento de espessura nanométrica.

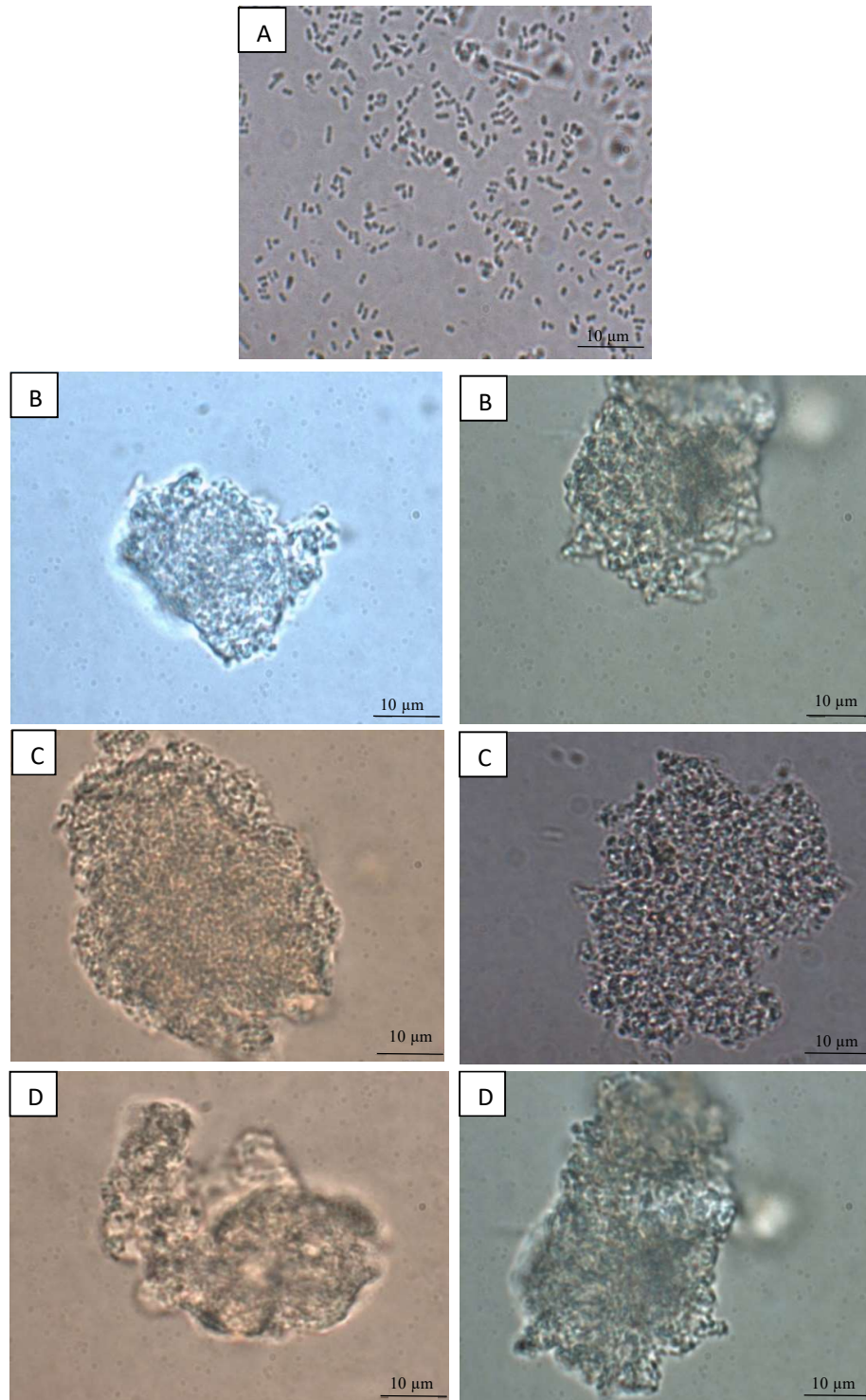


Figura 27. (A) Imagens obtidas por microscopia digital relativas às bactérias livres, (B) ao sistema constituído por duas camadas de revestimento e (C) ao sistema constituído por quatro camadas de revestimento, para ao copolímero de peso molecular 24 kDa. (D) Bactérias encapsuladas com duas camadas para o copolímero acrílico de peso molecular 12 kDa.

Apreciações Finais

Conclusões

No que diz respeito à síntese dos copolímeros PAA-PLU-PAA, o método de polimerização por ATRP permitiu a obtenção dos polímeros PtBA-PLU-PtBA e, por hidrólise destes, os copolímeros PAA-PLU-PAA. Contudo, só foi possível obter um peso molecular e as quantidades do polímero final foram bastante reduzidas. Por tal, realizou-se uma polimerização em emulsão, a partir da qual se obtiveram os polímeros com as características desejadas.

O encapsulamento das bactérias *Lactobacillus acidophilus* em multicamadas de Quitosano e de PAA-PLU-PAA, através da técnica LbL, mostrou ser um procedimento promissor no que diz respeito ao aumento da viabilidade das bactérias quando liofilizadas, quando expostas aos fluidos que simulam o trato gastrointestinal e quando armazenadas. A associação de um polímero natural a um copolímero acrílico sintético permitiu a obtenção de elevados valores de sobrevivência dos probióticos, confirmando a eficiência deste sistema de encapsulamento na proteção dos probióticos e na prevenção e tratamento de doenças gastrointestinais. Adicionalmente o tamanho das estruturas de encapsulamento obtidas mostrou também ser um parâmetro muito promissor. Neste estudo, o diferente peso molecular dos copolímeros sintetizados não apresentou diferenças muito significativas no encapsulamento e na proteção das bactérias probióticas, contudo o copolímero de 24 kDa foi o melhor a nível global para os estudos realizados.

Em suma, é possível concluir que os resultados obtidos destacam o complexo polímero natural-polímero sintético de Quitosano-(PAA-PLU-PAA) como um potencial sistema de encapsulamento e proteção de bactérias lácteas probióticas.

Trabalho Futuro

Destaca-se como trabalho futuro, para complementar este estudo, a determinação da quantidade de bactérias livres antes e depois do encapsulamento, de modo a calcular a eficiência da técnica de encapsulamento; a realização de outra técnica de encapsulamento, como por exemplo emulsão, com os polímeros avaliados; a realização deste estudo para uma estirpe bacteriana mais sensível; a utilização de fluidos simulados (FGS e FIS) mais completa, através da introdução de sais biliares e a realização de mais testes de viabilidade celular como testes *in vivo*.

Bibliografia e Netografia

Alakhov, V. et al., 2004. Pluronic block copolymers and Pluronic poly(acrylic acid) microgels in oral delivery of megestrol acetate. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(10), pp.1233–1241.

Almeida, H., Amaral, M.H. & Lobão, P., 2012. Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and selfregulated drug delivery. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(6), pp.01–10.

Alves, M.S., 2013. *Microencapsulação de bactérias lácticas com potencial probiótico para produção de pasta de azeitona*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biológica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Anal, A.K. & Singh, H., 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18(5), pp.240–251.

Araujo, C.L., 2010. *Polimerização radical controlada de estireno com alfa-metil-estireno e metacrilato de metila mediada por nitróxido em reator tubular*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Arshady, R., 1992. Suspension, emulsion, and dispersion polymerization: a methodological survey. *Colloid and polymer science*, 270(8), 717-732.

Bag, D. & Rao, K., 2006. Smart polymers and their applications. *Journal of Polymer Materials*, 23(3), pp.225–248.

Bai, J., Mak, W. C., Chang, X. Y., & Trau, D., 2009. Organic Phase Coating of Polymers onto Agarose Microcapsules for Encapsulation of Biomolecules with High Efficiency. In *13th International Conference on Biomedical Engineering*, pp. 821-824.

Barreiro-Iglesias, R., Bromberg, L., Temchenko, M., Hatton, T.A., et al., 2005. Pluronic-g-poly(acrylic acid) copolymers as novel excipients for site specific, sustained release tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(5), pp.374–385.

Batrakova, E. V. & Kabanov, A. V., 2009. Pluronic Block Copolymers. *Control*, 130(2), pp.98–106.

Bejarano, A., Mitter, B. & Preininger, C., 2014. *Encapsulation of plant-growth promoting*

bacteria in polymer matrix: development of new biofertilizers. Austrian Institute of Technology, Department of Health & Environment, Bioresources Unit, Tulln, Austria.

Ben, M. et al., 2014. Enhanced viability of probiotic *Saccharomyces boulardii* encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan – dextran sulfate polyelectrolytes. *Journal of Food Engineering*, 136, pp.1–8.

Binns, N., 2013. Probióticos, Prebióticos E a Microbiota Intestinal. *Internacional Life Sciences Institute Do Brasil*, pp.1–42.

Bromberg, L., 1998. Novel family of thermogelling materials via CC bonding between poly (acrylic acid) and poly (ethylene oxide)-b-poly (propylene oxide)-b-poly (ethylene oxide). *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(11), pp. 1956-1963.

Burgain, J. et al., 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), pp.467–483.

Carlmark, A., 2002. *Atom Transfer Radical Polymerization from Multifunctional Substrates*. Dissertação de Merstrado, Department of Polymer Technology, Royal Institute of Technology, Stockholm.

Cavalcante, J.D.S., Cavalcante, J.C. & Lichston, J.E., 2011. *Percepção e Sensibilidade nos Seres Vivos* 2ª ed. EDUFERN.

Chávarri, M., Marañón, I. & Villarán, M.C., 2012. Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. *Probiotics*, pp.501–540.

Chern, C.S., 2006. Emulsion polymerization mechanisms and kinetics. , 31, pp.443–486.

Choo, E.S.G., Yu, B. & Xue, J., 2011. Synthesis of poly(acrylic acid) (PAA) modified Pluronic P123 copolymers for pH-stimulated release of Doxorubicin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 358(2), pp.462–470.

Ghosh, P., 2006. Fundamentals of polymer science. Available at: <http://nsdl.niscair.res.in/jspui/bitstream/123456789/404/2/Basic%20concepts.pdf> [Accessed June 7, 2016].

Cook, M.T. et al., 2013. Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan–alginate for the improved survival and targeted delivery of probiotic bacteria after oral administration. *J. Mater. Chem. B*, 1(1), pp.52–60.

Coppola, M.D.M. & Gil-Turnes, C., 2004. Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*, 34(4),

pp.1297–1303.

Corona-Hernandez, R.I. et al., 2013. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(6), pp.614–628.

Dai, S., Ravi, P. & Tam, K.C., 2008. pH-Responsive Polymers: Synthesis, Properties and Applications. *Soft Matter*, 4(3), pp.435–449.

Decher, G., 1997. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science*, 277(5330), pp.1232–1237.

Desai, K.G.H., & Jin Park, H. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*, 23(7), pp.1361-1394.

FAO/WHO working group., 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. *FAO/WHO, London, ON*.

Food and Agriculture Organization, & World Health Organization., 2006. *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. FAO.

Felipetto, E., 2003. Processamento de polímeros. Faculdade de Engenharia da Pontifícia Universidade Católica, Rio Grande do Sul.

Fons, M. G. & Karjalainen, T., 2000. Mechanisms of Colonisation and Colonisation Resistance of the Digestive Tract Part 2: Bacteria/Bacteria Interactions. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12(2), pp.240–246.

Gibson, G.R. & Fuller, R., 2000. Symposium: Probiotic Bacteria: Implications for Human Health. , pp.391–395.

Gogineni, V.K., Morrow, L.E. & Malesker, M., 2013. Probiotics & Health Probiotics: Mechanisms of Action and Clinical Applications Immune modulation. *Journal of Probiotic and Health*, 1(1), pp.1–11.

Gonsalves, A. et al., 2011. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. *Quim. Nova*, 34(7), pp.1215-1223.

Guzmán, E. et al., 2011. PH-induced changes in the fabrication of multilayers of poly(acrylic acid) and chitosan: Fabrication, properties, and tests as a drug storage and delivery system. *Langmuir*, 27(11), pp.6836–6845.

Heidebach, T., Forst, P. & Kulozik, U., 2012. Microencapsulation of probiotic cells for food

- applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(4), pp.291–311.
- Hirayama, K. & Rafter, J., 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection*, 2(6), pp.681–686.
- Holzappel, W., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, p.36S–73S.
- Jankovic, I. et al., 2010. Application of probiotics in food products — challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), pp.175–181.
- Kahraman, M. et al., 2009. Layer-by-layer coating of bacteria with noble metal nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(8), pp.2559–2567.
- Kailasapathy, K., 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current issues in intestinal microbiology*, 3(2), pp.39–48.
- Kechagia, M. et al., 2013. Health benefits of probiotics: a review. *ISRN nutrition*, 2013.
- Kopecek, J., 2007. Hydrogel biomaterials: A smart future? *Biomaterials*, 28(34), pp.5185–5192.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. & Deeth, H., 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), pp.3–13.
- Krol, S. et al., 2003. Encapsulated yeast cells inside *Paramecium primaurelia*: A model system for protection capability of polyelectrolyte shells. *Journal of Microscopy*, 212(3), pp.239–243.
- Kumar, A. et al., 2007. Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 32(10), pp.1205–1237.
- Luzyanin, K. & Abrantes, M., 2010. Ressonância Magnética Nuclear- Ferramenta versátil em química farmacêutica e Imagiologia médica. , pp.25–30.
- Malvern Instruments, 2016. Available at: <http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs/> [Accessed July 13, 2016].
- Marteau, P.R., Vrese, M. De & Cellier, C.J., 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics 1–3. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, pp.430–436.
- Mech, L.D., 2014. A Gray Wolf (*Canis lupus*) Delivers Live Prey to a Pup. *Canadian Field-Naturalist*, 128(2), pp.189–190.

Mendes, C., 2010. Análise de substâncias químicas por Espectrofotometria Ultra-Violeta / Visível (UV-Vis). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Departamento de Engenharia Química.

Mendes, J., 2011. *Síntese de hidrogéis de base acrílica recorrendo a técnicas de polimerização radicalar viva. Potencial aplicação como fármacos poliméricos*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Mishra, V., & Kumar, R., 2012. Living radical polymerization: A review. *Journal of Scientific Research*, 56, pp.141-176.

Mortazavian, A. et al., 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian journal of biotechnology*, 5(1), pp.1-18.

Neves, B., 2008. Frascos agitados e preparo de inóculo. Available at: <http://www.ebah.pt/content/ABAAAAXDoAD/frascos-agitados-preparo-inoculo?part=2#> [Accessed July 26, 2016].

Burden, D., 2016. Available at: http://opsdiagnostics.com/notes/ranpri/bacteria_lyophilization_overview.htm [Accessed August 15, 2016].

Parvez, S. et al., 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), pp.1171–1185.

Paula, M., 2014. *Avaliação do risco da ocorrência de resistência a antibióticos e/ou bacteremia causadas por bactérias ácido lácticas: revisão sistemática*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Perkin, R., 2016. Available at: http://www.utsc.utoronto.ca/~traceslab/ATR_FTIR.pdf [Accessed July 26, 2016].

Pineiro, M., & Stanton, C., 2007. Probiotic bacteria: legislative framework—requirements to evidence basis. *The Journal of nutrition*, 137(3), pp. 850S-853S.

Priya, A.J., Vijayalakshmi, S.P. & Raichur, A.M., 2011. Enhanced survival of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by encapsulation with nanostructured polyelectrolyte layers through layer-by-layer approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), pp.11838–11845.

Riaz, Q.U. & Masud, T., 2013. Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 53(3), pp.231–244. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23215997>.

Rocha, J.M., 1993. *Aulas de Engenharia Bioquímica* 1ª Edição., Coimbra.

Rosen, M. J., & Kunjappu, J. T., (2012). *Surfactants and interfacial phenomena*. 4th ed. John Wiley & Sons.

Ruiz, L., Margolles, A. & Sánchez, B., 2013. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. , 4(December), pp.1–8. Ruiz, L., Margolles, A., & Sánchez, B., 2013.

Saad, S.M.I., 2006. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42, pp.1–16.

Saarela, M. et al., 2000. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), pp.197–215.

Santos, P., 2015. *Green Solvents for Reversible Deactivation Radical Polymerization*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Schmaljohann, D., 2006. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), pp.1655–1670.

Siegwart, D.J., Kwon, J. & Matyjaszewski, K., 2012. ATRP in the design of functional materials for biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), pp.18–37.

Smith, W. V., & Ewart, R. H., 1948. Kinetics of emulsion polymerization. *The journal of chemical physics*, 16(6), pp. 592-599.

Solanki, H.K. et al., 2013. Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *BioMed Research International*.

Sukhorukov, G.B. et al., 2004. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds. *Journal of Materials Chemistry*, 14(14), pp.2073.

Sun, J., 2015. *Layer-by-layer self-assembly of nanofiltration membrane for water and wastewater treatment*. Dissertação de Mestrado, University of Waterloo, Canada.

Svaldo Lanero, T. et al., 2006. Mechanical properties of single living cells encapsulated in polyelectrolyte matrixes. *Journal of Biotechnology*, 124(4), pp.723–731.

Svaldo-Lanero, T. et al., 2007. Morphology, mechanical properties and viability of encapsulated cells. *Ultramicroscopy*, 107(10-11), pp.913–921.

Tang, Z. et al., 2006. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering. *Advanced Materials*, 18(24), pp.3203–3224.

Hatsopoulos, G., 2016. Available at: <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf> [Accessed July 13, 2016].

You, J.O. et al., 2010. Bioresponsive matrices in drug delivery. *Journal of biological engineering*, 4(1), pp.15.

Zhang, Y. & Lam, Y.M., 2007. Controlled synthesis and association behavior of graft Pluronic in aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 306(2), pp.398–404.

ANEXOS

ANEXO I

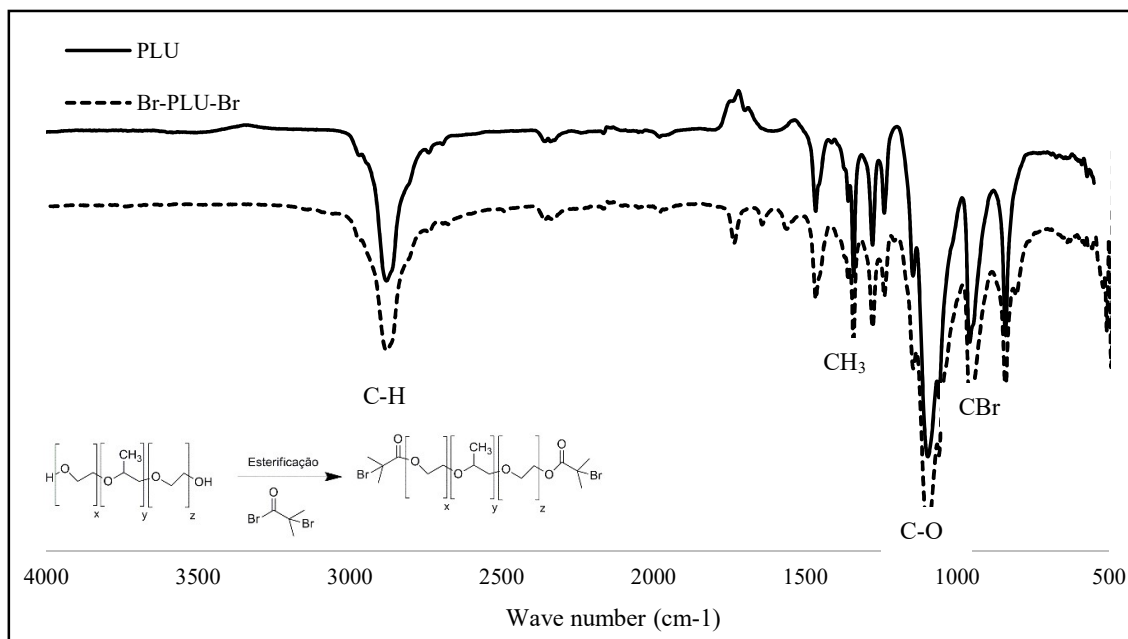


Figura A I - Espectro FTIR-ATR do iniciador Br-PLU-Br.

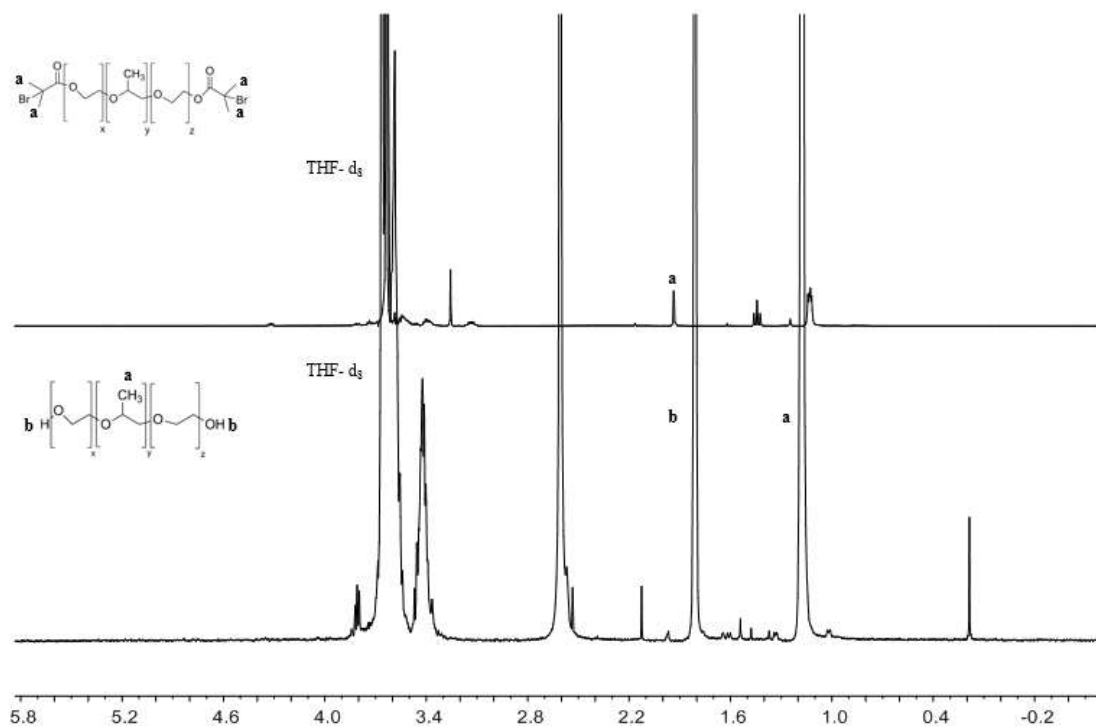


Figura A II - Espectro H-RMN em THF-d₈ do iniciador Br-PLU-Br.

ANEXO II

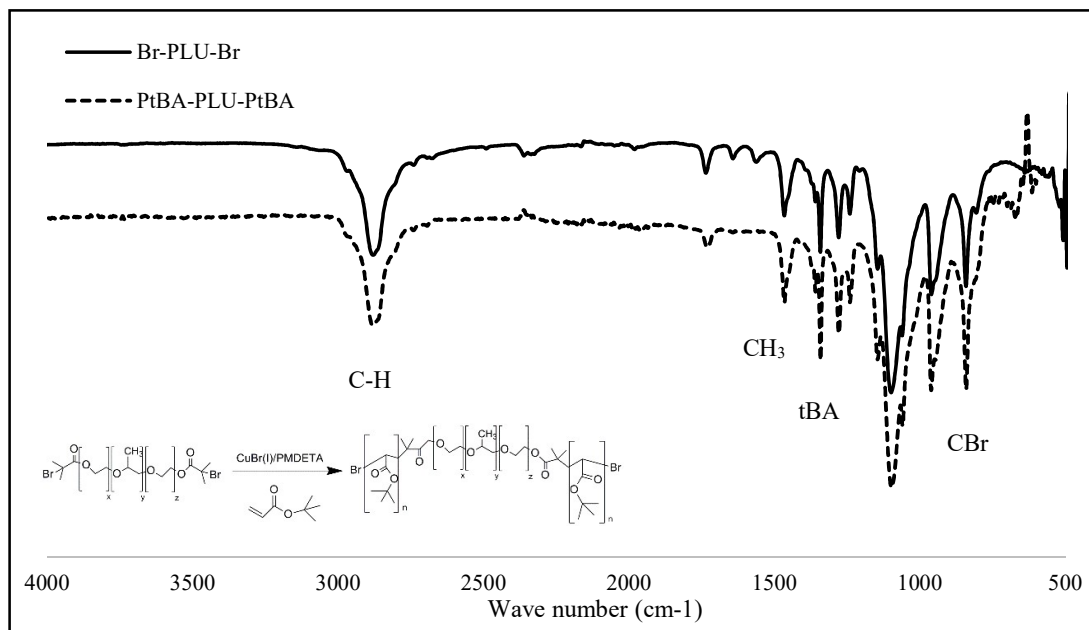


Figura A III - Espectro FTIR-ATR do copolímero PtBA-PLU-PtBA.

ANEXO III

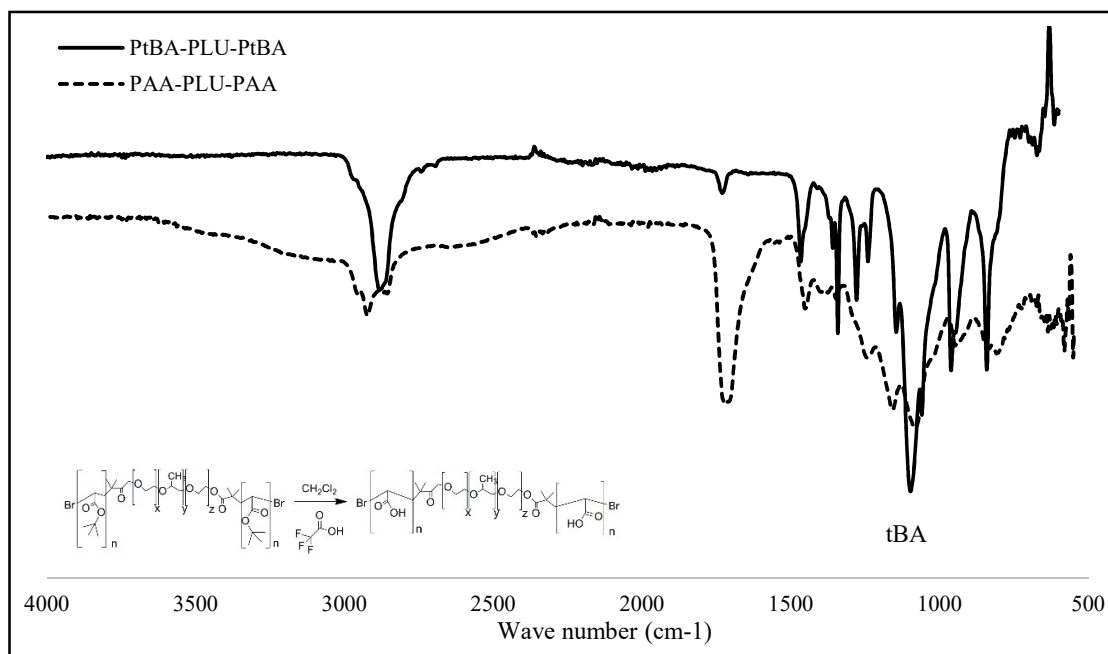


Figura A IV - Espectro FTIR-ATR do copolímero PAA-PLU-PAA.

ANEXO IV

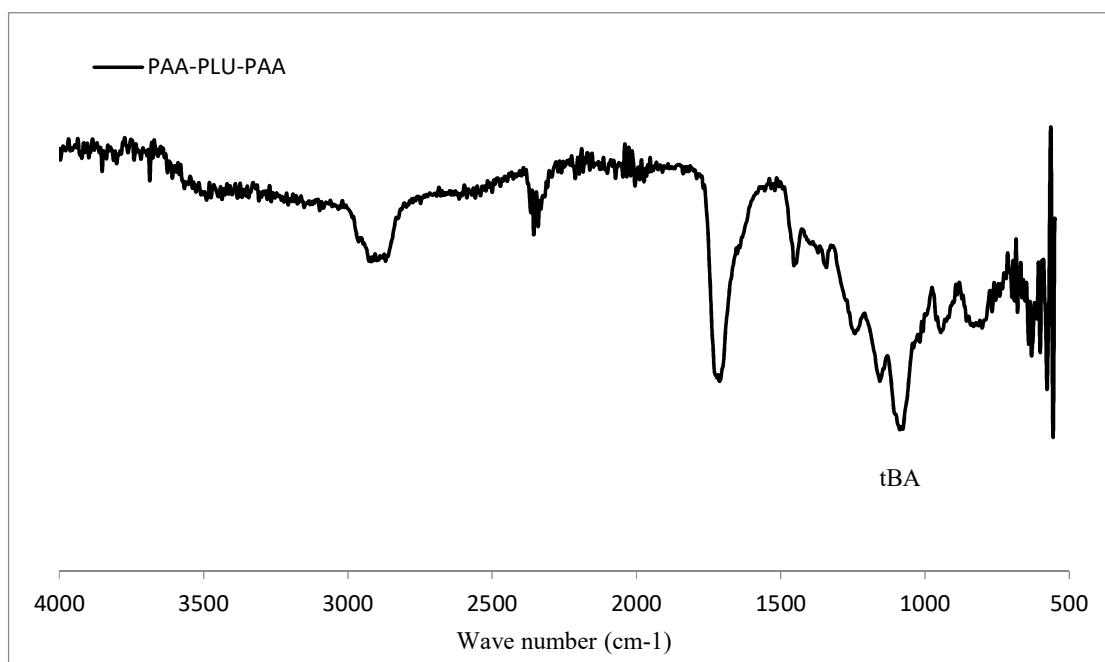


Figura A V - Espectro FTIR-ATR do copolímero PAA-PLU-PAA, de peso molecular 24 322 Da.

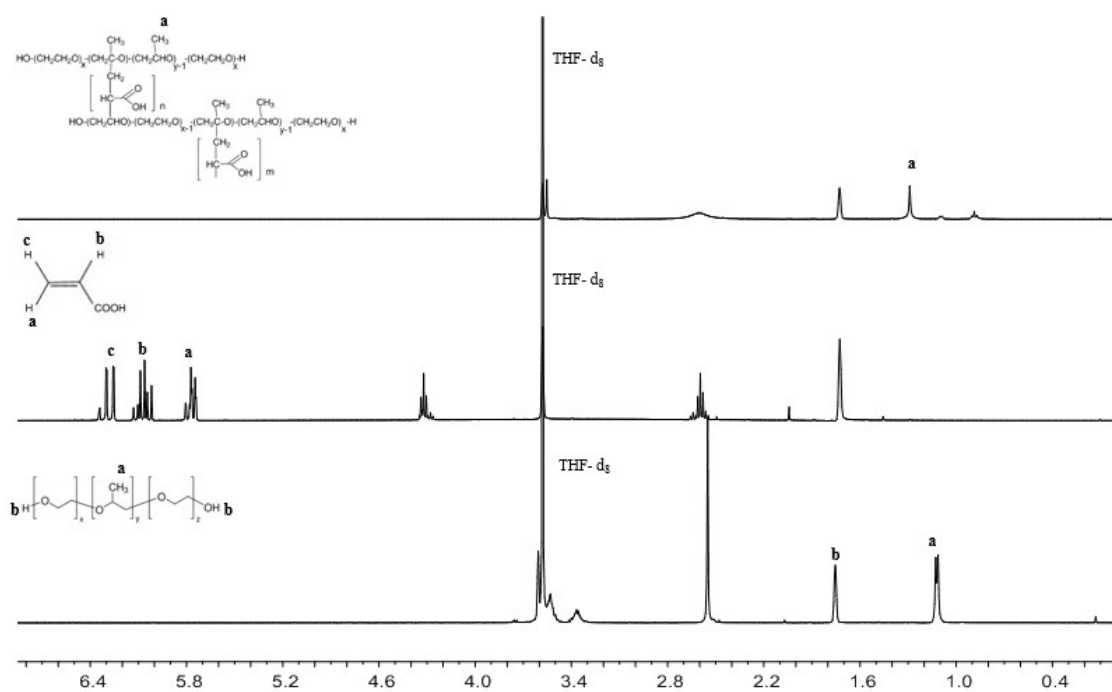


Figura A VI - Espectro H-RMN em THF- d_8 do copolímero PAA-PLU-PAA de peso molecular 24 322 Da.

ANEXO V

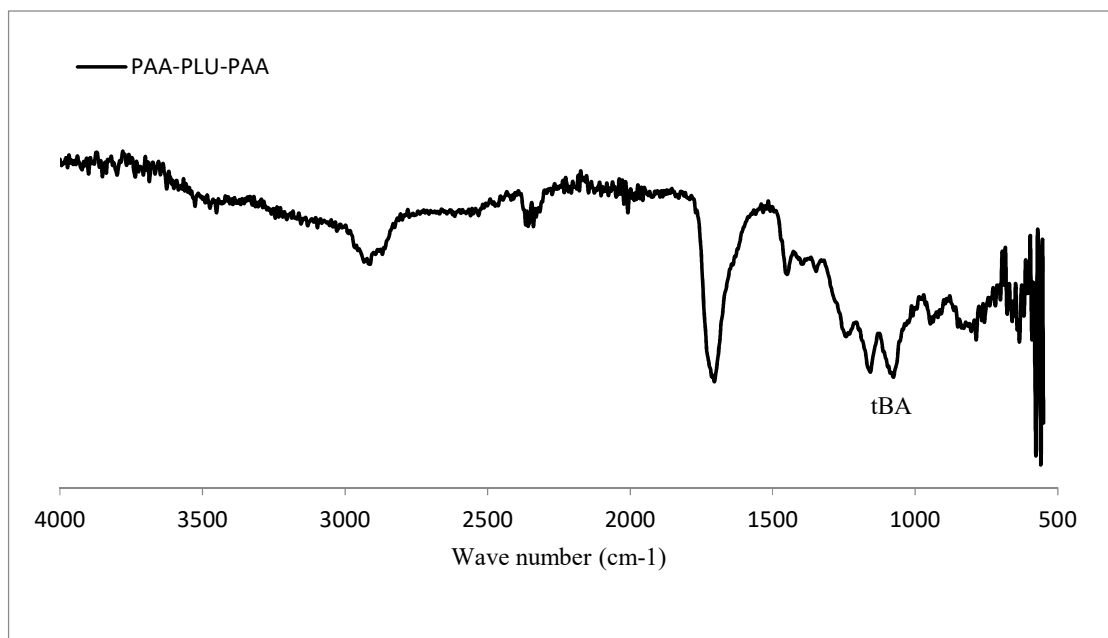


Figura A VII - Espectro FTIR-ATR do copolímero PAA-PLU-PAA, de peso molecular 11 671 Da.

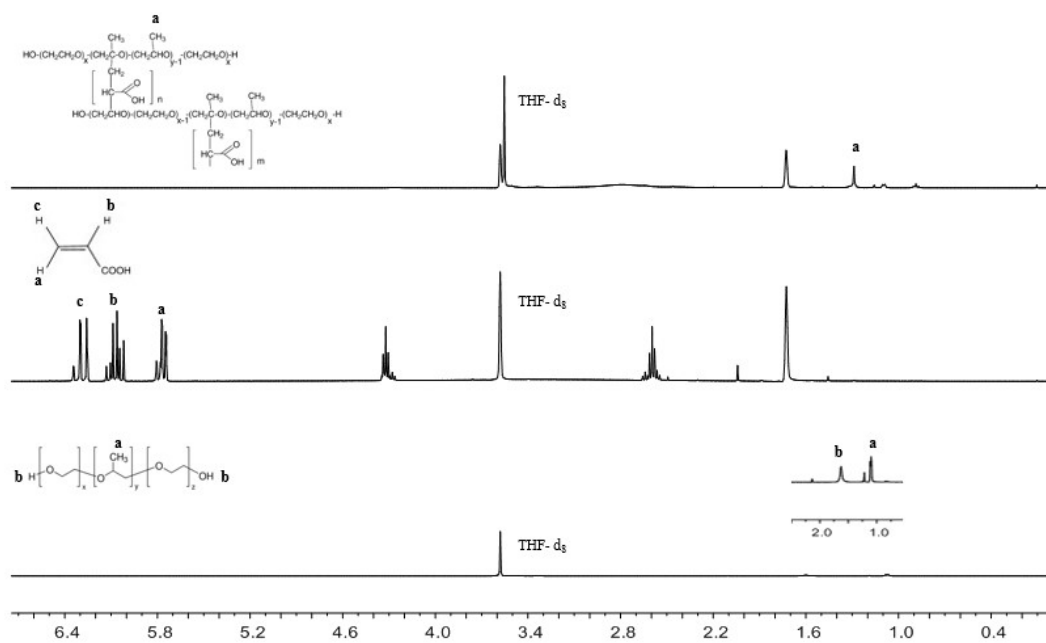


Figura A VIII - Espectro H-RMN em THF- d_3 do copolímero PAA-PLU-PAA de peso molecular 11 671 Da.