

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Eva Regina Santos Pereira Campos

**DESENVOLVIMENTO DE NANO-ESTRUTURAS PARA
ENCAPSULAR E TRANSPORTAR BACTÉRIAS LÁCTEAS
PROBIÓTICAS**

Dissertação de Mestrado na área científica de Engenharia Química, orientada pela Doutora Patrícia Manuela Almeida Coimbra e Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves com a colaboração do Doutor Pedro Nuno das Neves Lopes Simões e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2020

Eva Regina Santos Pereira Campos

DESENVOLVIMENTO DE NANO-ESTRUTURAS PARA ENCAPSULAR E TRANSPORTAR BACTÉRIAS LÁCTEAS PROBIÓTICAS

Dissertação de Mestrado na área científica de Engenharia Química submetida ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Supervisores:

Doutora Patrícia Coimbra
Doutora Patrícia Alves
Doutor Pedro Simões (colaboração)

Instituições:

Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Este projeto recebeu financiamento do programa de investigação e inovação Horizon 2020 da União Europeia, ao abrigo do acordo de subvenção n.º 777657

Coimbra 2020

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

*“Mudem-me os deuses os
sonhos, mas nunca a vontade de
sonhar.”*

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Chegou o fim de um capítulo que não seria possível sem aqueles que me acompanharam e apoiaram ao longo destes últimos anos, aos quais devo um enorme agradecimento.

Para começar, quero agradecer aos meus orientadores, à Doutora Patrícia Coimbra, à Doutora Patrícia Alves e ao Doutor Pedro Nuno Simões por me terem acompanhado ao longo destes meses de trabalho, pela sua dedicação, disponibilidade e acima de tudo pela paciência, e confiança em mim depositada.

À Florencia Ghibaudó (Flor) um agradecimento muito especial por todos os momentos memoráveis no laboratório, pela partilha de conhecimentos e ajuda mesmo à distância e por toda a orientação no laboratório. Mas acima de tudo isto, obrigada pela tua amizade. Foram dois meses que culminaram numa amizade inesquecível.

Aos que partilharam não só estes últimos meses, mas também estes últimos anos, aos que Coimbra me deu. Ao meu brasileiro, Eryk Fernandes, por todos os momentos de pausa, almoços, jantares e lanches. Pelos conhecimentos e aconselhamentos e pela força que dás em todos os momentos. À minha eterna companheira de casa, Claudia Gaspar, por todos os bons momentos e memórias inesquecíveis. Foste, sem dúvida, um grande apoio ao longo de todos estes anos. À Patrícia Almeida, por todo o apoio, por me encorajares e por acreditares sempre em mim. Por fim, mas não menos importante, à Jéssica Fernandes, um enorme obrigado por seres um apoio incansável e por dizeres sempre que tudo vai correr bem. Nada disto seria possível sem vocês.

À minha companheira de todos os momentos, ao meu Timon, Telma Vaz. Foste o meu maior apoio ao longo destes anos. Obrigada por estares lá em todos os momentos, desde o primeiro dia, por me aturares e ouvires todas as minhas lamentações. E não te esqueças, ganhámos!!

Ao meu companheiro de laboratório e de toda esta jornada desde o primeiro dia, João Pereira, pela companhia no laboratório até tarde, pela tua criatividade, por todas as boleias, momentos mais aleatórios e acima de tudo pelos nossos almoços ‘saudáveis’.

Ao amigo que mais suportou as minhas ausências, ao João Gonçalo, pela tua amizade incondicional. Mesmo à distância és capaz de me fazer ver o lado mais positivo.

Um especial obrigada aos meus padrinhos por serem uns segundos pais e por estarem sempre na linha da frente. Aos meus primos por estarem presentes em todos os momentos. Sei que estão lá para aplaudir as minhas conquistas e também para me amparar nas minhas quedas. À pessoa que já não esteve presente nesta fase. És uma inspiração e sei que neste momento estarias com o maior sorriso na cara e me dirias o quanto estarias orgulhosa de mim.

Por fim, mas o agradecimento mais importante, aos meus pais. A quem devo tudo aquilo no que me tornei hoje. São a minha maior inspiração e acima de tudo o meu maior exemplo. Sei que abdicarem de muito por mim e este capítulo da minha vida só foi possível porque vos tive sempre ao meu lado. Obrigada por nunca me deixarem desistir e por me mostrarem que no fim vale sempre a pena. Esta minha conquista, também é vossa! Conseguimos!

A todos, o meu sincero obrigada!

Resumo

O objetivo deste trabalho centrou-se no desenvolvimento de um sistema de proteção a longo prazo de bactérias probióticas por encapsulamento e/ou utilização de ingredientes prebióticos, neste caso fruto-oligossacarídeos (FOS).

O encapsulamento das bactérias foi realizado pelo método *Layer-by-Layer* (LbL), que consiste na deposição sobre um substrato – a superfície das bactérias – de várias camadas de polieletrólitos com cargas superficiais diferentes entre si. Os polímeros utilizados foram, de carga negativa o quitosano, de carga positiva a pectina, o alginato e a carboximetilcelulose, depositados alternadamente, através da suspensão das bactérias nas respetivas soluções (0,1 % m/v e pH 6). Foram encapsuladas três bactérias de estirpes diferentes: *Lactobacillus plantarum* WCFS1, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 e *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. Como primeira camada foi maioritariamente testado o quitosano; contudo para o caso em que o valor de potencial- ζ da suspensão de bactérias exibia valores próximos de zero (*Lactobacillus plantarum* WCFS1) foi adicionalmente testado o alginato. Foi também adicionado o FOS com concentração de 2% m/v para avaliar o efeito deste prebiótico na proteção das bactérias. As bactérias e as suas formulações com FOS e/ou polieletrólitos foram caracterizadas em termos de potencial- ζ , viabilidade celular antes e depois dos processos de encapsulamento, liofilização e armazenamento, e curva de crescimento antes e após o encapsulamento e liofilização.

Globalmente, os resultados sugerem que o encapsulamento é um método promissor para proteção de bactérias probióticas. Os valores de potencial- ζ revelaram uma deposição bem-sucedida, enquanto o estudo de viabilidade revelou uma menor perda de viabilidade das amostras encapsuladas após liofilização comparativamente com as não encapsuladas. Relativamente ao uso de alginato como primeira camada, os resultados não são conclusivos pelo menos para o caso da estirpe *Lactobacillus plantarum* WCFS1 formulada com esse biopolímero. Da mesma forma, os resultados obtidos sobre o efeito do FOS nos processos de liofilização revelaram-se inconclusivos. Por outro lado, ao longo do tempo de armazenamento, nem o FOS nem o encapsulamento demonstraram ser eficientes na minimização da perda de viabilidade.

Em suma, é possível concluir que os resultados são distintos de caso para caso e como tal, é necessária uma modulação das formulações ajustadas às características de cada estirpe.

Palavras-Chave: probióticos, encapsulamento, polieletrólitos, *Layer-by-Layer*, fruto-oligossacarídeos (FOS).

Abstract

This work was focused on the development of a long-term protection system for probiotic bacteria by means of encapsulating bacteria with and/or without of fructooligosaccharides (FOS) as prebiotic ingredient.

The encapsulation of bacteria was carried out by the Layer-by-Layer (LbL) method, which consists of depositing several layers of polyelectrolyte with different and alternating surface charges on a substrate – bacteria's surface. The negative charge polymer was chitosan, whereas pectin, alginate and carboxymethylcellulose were the selected positive charge polymers. The polymers were added alternately, by suspending the bacteria in each polymeric solution (0.1% w/v and a pH 6). Three different bacteria strains were encapsulated: *Lactobacillus plantarum* WCFS1, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 and *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. Chitosan was used as first layer in most formulations, but alginate was also tested as first layer for the case where the suspension of bacteria exhibited a ζ -potential close to zero (*Lactobacillus plantarum* WCFS1). FOS solutions (2% w/v) were also included in the formulations to assess the effect of a such prebiotic on bacteria protection. All formulations were characterized in terms of ζ -potential, cell viability before and after encapsulation, freeze-drying and storage processes, and through the growth curve before and after encapsulation and freeze-drying processes.

As a whole, the results suggest that encapsulation is a promising method for protecting probiotic bacteria. The ζ -potential values suggest a successful deposition, and the viability demonstrated that after freeze-drying the loss of viability of the encapsulates samples was lower than that of non-encapsulated samples. The results regarding the use of alginate as the first layer were inconclusive, at least for the case of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 formulated with this biopolymer. Also, the results obtained on the effect of FOS on freeze-drying processes have proved inconclusive. On the other hand, over the storage time, neither FOS nor encapsulation proved to be efficient in minimizing the viability loss.

Apart from the more detailed achievements, this work showed substantially different results from case to case, thus highlighting the need to modulate formulations according to the particular characteristics of each bacteria strain.

Keywords: Probiotics, encapsulation, polyelectrolytes, Layer-by-Layer, fructooligosaccharides (FOS).

Índice

Capítulo I - Introdução	1
1. Enquadramento.....	1
1.1. Motivação	1
1.2. Objetivos	2
1.3. Organização do trabalho	3
2. Conceitos Fundamentais e Estado de Desenvolvimento.....	5
2.1. Probióticos	5
2.1.1. Bactérias Probióticas	5
2.1.2. Propriedades	7
2.1.3. Segurança alimentar	8
Requisitos funcionais	8
Requisitos tecnológicos.....	9
2.1.4. Bactérias de Ácido Lático (BAL)	9
Género Lactobacillus	11
2.2. Prebióticos	11
2.2.1. Fruto-oligossacarídeos (FOS).....	12
2.3. Preservação de Probióticos por Encapsulamento	14
2.3.1. Layer-by-Layer (LBL).....	16
2.3.2. Materiais de Encapsulamento por LbL.....	19
Quitosano	19
Alginato.....	20
Pectina.....	22
Carboximetilcelulose (CMC).....	23

3.	Estado da Arte	25
3.1.	Encapsulamento de bactérias por LbL.....	25
3.2.	Fruto-oligossacarídeos na preservação de bactérias probióticas	31
Capítulo II – Parte Experimental		35
1.	Materiais.....	35
2.	Equipamentos	35
3.	Métodos.....	35
3.1.	Preparação de soluções (NaCl, polímeros e FOS).....	36
3.2.	Preparação do meio de cultura com e sem agar.....	37
3.3.	Encapsulamento	37
3.3.1.	Reativação das bactérias e inóculo	37
3.3.2.	Encapsulamento por LbL.....	38
3.4.	Liofilização	41
3.5.	Caracterização.....	41
3.5.1.	Viabilidade bacteriana	42
3.5.2.	Potencial zeta (ζ).....	42
3.5.3.	Leitor de microplacas	43
Capítulo III – Resultados e Discussão		45
1.	Potencial zeta- ζ	45
2.	Viabilidade bacteriana.....	47
2.1.	Viabilidade após encapsulamento e após liofilização.....	48
2.2.	Viabilidade após 15 dias de armazenamento	50
3.	Crescimento celular.....	51
Capítulo IV – Apreciações finais		55
1.	Conclusões	55
2.	Trabalhos futuros.....	56

Bibliografia	57
Anexos	69
Anexo A – Potencial- ζ	69
Anexo B – Viabilidade.....	73
Anexo C – Curvas de crescimento	75

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura química dos FOS.	13
Figura 2 - Estrutura química dos FOS de cadeia curta.....	13
Figura 3 - Representação esquemática dos diferentes tipos de encapsulamento [adaptado de Burgain et al., 2011].	15
Figura 4 - Representação esquemática do processo de Layer-by-Layer assembly [adaptado de Richardson et al., 2016].	18
Figura 5 - Estrutura química do quitosano.....	20
Figura 6 - Estrutura química do alginato e os seus respetivos monómeros..	21
Figura 7 - Estrutura química da pectina.	22
Figura 8 - Estrutura química do CMC dependente do grupo R: β -D-glucose (a); sal monossódico β -D-glucopiranosose 2-O-(carboximetil) (b).	24
Figura 9 - Potencial zeta com absorção alternada das camadas na superfície de bactérias <i>Lactobacillus acidophilus</i> [retirado de Priya et al., 2011].	26
Figura 10 - Curva de crescimento das bactérias encapsuladas e não encapsuladas das amostras liofilizadas [retirado de Priya et al., 2011].	26
Figura 11 - Ressuspensão após a adição de polímeros com concentrações de 1% m/v (direita) e 0.1% m/v (esquerda).	36
Figura 12 - Representação esquemática da multiplicação das bactérias: diretamente das amostras congeladas (a); e através da reativação prévia das bactérias (b).	38
Figura 13 - Representação esquemática da deposição das camadas de revestimento pelo método Layer-by-Layer.	39
Figura 14 - Representação esquemática do procedimento de encapsulamento das bactérias por LbL.	40
Figura 15 - Placa contendo MRS agar dividida em 8 secções antes da inoculação (esquerda) e placa inoculada após incubação (direita).	42

Figura 16 - Resultados do potencial- ζ relativos ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CFL1, sem FOS (a); e com FOS (b).....	46
Figura 17 - Resultados do potencial- ζ relativos ao Ensaio 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com quitosano na primeira camada, sem FOS (a); e com FOS (b); e com alginato na primeira camada, sem FOS (c); e com FOS (d).	46
Figura 18 - Viabilidade celular antes e após o processo de encapsulamento relativa ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado (a); Ensaio 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado (b); Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado (c). As barras pretas correspondem à viabilidade antes de liofilização, ou seja, após encapsulamento, e as barras cinza à viabilidade após liofilização.	48
Figura 19 - Meio MRS inoculado após incubação para o caso em que a inoculação é realizada a partir de bactérias congeladas (direita) e quando é realizada a partir da reativação previa das bactérias (starter)(esquerda).....	49
Figura 20 - Viabilidade celular após 15 dias de armazenamento das bactérias encapsuladas e não encapsuladas relativa ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado (a); Ensaio 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem starter, e sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado (b); Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com starter, e sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado (c). As barras pretas correspondem à viabilidade após liofilização e as barras cinza à viabilidade após liofilização.....	50
Figura 21 - Curvas de crescimento relativas ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado. Bactérias não encapsuladas (B); bactérias encapsuladas com quitosano (B CHI).	51
Figura 22 - Curvas de crescimento relativas ao Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com starter, e sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado. Bactérias não encapsuladas (B); Bactérias encapsuladas com quitosano na primeira camada (B CHI); Bactérias encapsuladas com alginato na primeira camada (B ALG); Bactérias encapsuladas com quitosano na segunda camada (B ALG CHI).	52

Figura 23 - Curvas de crescimento relativas ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado. Bactérias após encapsulamento (esquerda); Bactérias após liofilização (direita).	53
Figura A.1 - Resultados do potencial- ζ relativos ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1, sem FOS (a); e com FOS (b).	69
Figura A.2 - Resultados do potencial- ζ relativos ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114, sem FOS (a); e com FOS (b).	70
Figura A.3 - Resultados do potencial- ζ relativos ao Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com starter, com quitosano na primeira camada, sem FOS (a); e com FOS (b); e com alginato como primeira camada, sem FOS (c); e com FOS (d).	71
Figura B.1 - Viabilidade celular antes e após o processo de encapsulamento relativa ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado (a); Ensaio 2: <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CFL1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado (b).	73
Figura C.1 - Curvas de crescimento antes e após o processo de encapsulamento relativas ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.	75
Figura C.2 - Curvas de crescimento antes e após o processo de encapsulamento relativas ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CFL1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.	77
Figura C.3 - Curvas de crescimento antes e após o processo de encapsulamento relativas ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.	78
Figura C.4 - Curvas de crescimento antes e após o processo de encapsulamento relativas ao Ensaio 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado.	80
Figura C.5 - Curvas de crescimento antes e após o processo de encapsulamento relativas ao Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado.	81

Figura C.6 - Curvas de crescimento após o processo de liofilização relativas ao Ensaio 1: Lactobacillus plantarum WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.	83
Figura C.7 - Curvas de crescimento após o processo de liofilização relativas ao Ensaio 2: Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus CFL1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.	84
Figura C.8 - Curvas de crescimento após o processo de liofilização relativas ao Ensaio 3: Lactobacillus plantarum CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.	85
Figura C.9 - Curvas de crescimento após o processo de liofilização relativas ao Ensaio 4: Lactobacillus plantarum WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado.	87
Figura C.10 - Curvas de crescimento após o processo de liofilização relativas ao Ensaio 5: Lactobacillus plantarum WCFS1 com starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado.	89

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Potencial de infecção característico de cada organismo probiótico [adaptado de Donohue & Salminen, 1996].....	9
Tabela 2 - Estudos do processo de encapsulamento através do método Layer-by-Layer.	29
Tabela 3 - Estudos do uso de fruto-oligossacarídeos para melhoria da viabilidade bacteriana.....	33
Tabela 4 - Composições dos FOS usados expressas em % (m/m).....	37
Tabela 5 - Variáveis de estudo presentes em cada ensaio LbL.....	45
Tabela 6 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano antes e após o processo de encapsulamento relativos ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.	51
Tabela 7 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano após liofilização relativos ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.....	53
Tabela A.1 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem FOS.	69
Tabela A.2 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com FOS.....	69
Tabela A.3 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. CFL1 sem FOS.....	69
Tabela A.4 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. CFL1 com FOS.	69
Tabela A.5 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114 sem FOS.....	70
Tabela A.6 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114 com FOS.	70

Tabela A.7 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem FOS.....	70
Tabela A.8 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com FOS.....	70
Tabela A.9 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem FOS com alginato na primeira camada.....	70
Tabela A.10 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com FOS com alginato na primeira camada.	71
Tabela A.11 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem starter e sem FOS.....	71
Tabela A.12 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com starter e com FOS.....	71
Tabela A.13 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem starter e sem FOS com alginato na primeira camada.	72
Tabela A.14 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com starter e com FOS com alginato na primeira camada.....	72
Tabela B.1 - Valores de viabilidade relativos ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 após encapsulamento, após liofilização e após 15 dias de armazenamento.....	73
Tabela B.2 - Valores de viabilidade relativos ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CFL1 após encapsulamento e após liofilização.	73
Tabela B.3 - Valores de viabilidade relativos ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114 após encapsulamento e após liofilização.	74
Tabela B.4 - Valores de viabilidade relativos ao Ensaio 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 após encapsulamento, após liofilização e após 15 dias de armazenamento.....	74
Tabela B.5 - Valores de viabilidade relativos ao Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 após encapsulamento, após liofilização e após 15 dias de armazenamento.....	74
Tabela C.1 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano antes e após o processo de encapsulamento relativos ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.	76

Tabela C.2 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano antes e após o processo de encapsulamento relativos ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CFL1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.	77
Tabela C.3 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano antes e após o processo de encapsulamento relativos ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.	78
Tabela C.4 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano antes e após o processo de encapsulamento relativos ao Ensaio 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem starter, sem e com a presença FOS candidato 6 purificado.	80
Tabela C.5 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano antes e após o processo de encapsulamento relativos ao Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado.	82
Tabela C.6 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano após o processo de liofilização relativos ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.	83
Tabela C.7 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano após o processo de liofilização relativos ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CFL1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.	84
Tabela C.8 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano após o processo de liofilização relativos ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.	86
Tabela C.9 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano após o processo de liofilização relativos ao Ensaio 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado.	87
Tabela C.10 - Parâmetros da cinética de crescimento após o processo de liofilização relativos ao Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado.	89

Siglas

ADP	Adenosina Difosfato
AGCC	Ácidos Gordos de Cadeia Curta
ALG	Alginato
ATP	Adenosina Trifosfato
BAL	Bactérias de ácido láctico
CFU	<i>Colony-forming unit</i>
CHI	Quitosano
CMC	Carboximetilcelulose
D.O.	Densidade ótica
D.O. _i	Densidade ótica inicial
D.O. _f	Densidade ótica final
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of United Nations</i>
FOS	Fruto-oligossacarídeos
GI	Gastrointestinal
GOS	Galacto-oligossacarídeos
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HG	Homogalacturonano
ISAPP	<i>International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics</i>
k	Taxa de crescimento microbiano (h ⁻¹)
LBL	<i>Layer-by-Layer</i>
MC	Metilcelulose
MRS	Man, Rogosa & Sharpe <i>broth</i>
M _w	Peso molecular

NaCl	Cloreto de sódio
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
PEC	Pectina
PLU	Plurônico
PLA	Ácido poliacrílico
QPS	<i>Qualified Presumption of Safety</i>
RG-I	Ramnogalacturonano I
RG-II	Ramnogalacturonano II
SAMS	<i>Self-assembled monolayers</i>
T	Temperatura (°C)
T _g	Temperatura de transição vítrea
t _{lag}	Tempo de atraso (<i>lag time</i>) (h)
US FDA	<i>Food and Drug Administration of United States</i>
ζ	Potencial Zeta (mV)
ΔN	Variação percentual do número de bactérias (%)
Y	Absorbância (nm)
Y _i	Absorbância inicial (nm)
Y _f	Absorbância final (nm)
sβG	β-glucano sulfatado

1. Enquadramento

1.1. Motivação

Existe um conjunto de microrganismos com grande impacto na vida humana, na forma de alimentos fermentados, produtos medicinais (como antibióticos), aminoácidos, etc. As vantagens associadas a estes microrganismos, chamados de probióticos, estão relacionadas com efeitos terapêuticos como a prevenção de doenças cardíacas, gastrointestinais, de reações alérgicas, e com a sua atividade anti-bacteriana, anti-mutagénica e anti-carcinogénica. Dentro desta gama de microrganismos são encontradas as bactérias de ácido láctico que têm sido usadas durante séculos para a fermentação de vários produtos, que podem ser consumidos diariamente, e que são tipicamente associadas ao trato gastrointestinal (Anal & Singh, 2007).

Desta forma, é importante assegurar a viabilidade destes microrganismos até ao momento do seu consumo, e garantir a sua sobrevivência durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Esta sobrevivência é essencial para que ocorra proliferação destes microrganismos no intestino, de maneira a desempenharem as suas funções e os efeitos benéficos. Isto passa por garantir a eficácia e preservação a longo prazo destas culturas bacterianas através de métodos que permitam protegê-las tanto das condições que lhes são adversas no trânsito gastrointestinal, como nos processos usados para a estabilização destas para que não haja uma perda de viabilidade devida às condições e ao tempo de armazenamento. O encapsulamento dos probióticos, ao providenciar uma barreira física entre estes e o ambiente que as rodeia, ajuda a garantir uma proteção contra condições adversas. Esta abordagem, que ao longo dos anos tem vindo a ganhar algum interesse, tem evoluído a partir do simples processo de imobilização celular (Kailasapathy, 2002).

O encapsulamento consiste num processo de revestimento de diversos tipos de materiais podendo ser vivos ou não vivos, de várias estruturas ou de partículas coloidais de várias formas, tamanhos e superfícies químicas, de maneira a produzir partículas de diâmetros que podem variar da escala nanométrica à milimétrica (Burgain et al., 2011). Existem vários métodos de encapsulamento que permitem aumentar a sobrevivência das bactérias e que baseiam essencialmente em interações eletrostáticas dos materiais usados. Destaca-se nesse domínio o método camada-por-camada (*Layer-by-Layer*; LbL). É um método versátil para formação de

estruturas de revestimento usando procedimentos simples, baratos e robustos, capazes de produzir camadas de revestimento de vários tipos de materiais. Consiste na deposição alternada de polieletrólitos de cargas opostas sob uma superfície também ela carregada (Svaldo Lanero et al., 2006). Esta deposição permite a cobertura de toda a célula individual com um revestimento cuja espessura e propriedades podem ser controladas a uma escala nanométrica, fazendo variar as condições de deposição (Borges & Mano, 2014).

Uma maneira adicional de contribuir para a estabilidade das bactérias durante processos de liofilização e armazenamento é através da adição de fruto-oligossacarídeos (FOS). Estes componentes exibem propriedades prebióticas e quando são incorporados em produtos alimentares acrescentam valor, permitindo uma melhoria do bem-estar e da saúde do hospedeiro. Estes ingredientes funcionais quando atingem o colón são fermentados pelas bactérias de ácido láctico, aumentando a sua população celular, com a consequente produção de energia e acidificação do intestino (Anadón et al., 2016).

Em suma, este trabalho consiste em desenvolver estratégias que permitam a proteção, a longo prazo, das bactérias produtoras de ácido láctico. Estratégias essas que passam pelo desenvolvimento de processos de encapsulamento de bactérias ou pela utilização de componentes com propriedades prebióticas como o uso de fruto-oligossacarídeos (FOS).

1.2. Objetivos

Este trabalho centra-se no desenvolvimento de uma estratégia de preservação de longo prazo, de diferentes estirpes de bactérias de ácido láctico. A estratégia adotada consiste no encapsulamento por *Layer-by-Layer* das bactérias *Lactobacillus plantarum* WCFS1, *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1.

Numa primeira fase é feita uma avaliação do método de encapsulamento alternando várias camadas de revestimento, com diferentes polieletrólitos de origem natural. Desta forma, está-se a avaliar o uso de 4 polieletrólitos como o quitosano, o alginato, a pectina e o carboximetilcelulose (CMC). Como primeira camada é usado o quitosano, porém quando as bactérias apresentam uma carga superficial negativa, mas próxima de zero, é adicionalmente usado o alginato. Quando é usado o quitosano como primeira camada avalia-se a influência do alginato, da pectina e do CMC como segunda camada. No caso do alginato como primeira camada apenas é avaliado o quitosano como segunda camada. Posteriormente, é realizada uma comparação da estabilidade destas bactérias com e sem a presença de fruto-oligossacarídeos.

Por fim, é testada a eficiência da proteção do método de encapsulamento através da viabilidade bacteriana após os métodos de liofilização e após 15 dias de armazenamento.

1.3. Organização do trabalho

Esta dissertação encontra-se dividida em 4 capítulos principais. O **capítulo I** está subdividido em 3 secções. Na primeira secção é feito uma introdução ao tema, indicado a motivação do trabalho e definidos os seus objetivos. Na segunda secção é feito um enquadramento onde são apresentados os principais conceitos teóricos e feito um estado de desenvolvimento, de maneira a que permita uma melhor compreensão do tema. Na terceira secção é realizada uma revisão bibliográfica relacionada com o tema. No **capítulo II** são descritos todos os materiais e métodos usados para desenvolver este estudo. No **capítulo III** são apresentados os resultados e a respetiva discussão. Por fim, no **capítulo IV** resumem-se as principais conclusões e apresentam-se algumas sugestões de trabalhos futuros.

2. Conceitos Fundamentais e Estado de Desenvolvimento

2.1. Probióticos

O termo probiótico deriva etimologicamente do grego e significa “para a vida” e tem sido usado ao longo dos anos com diferentes aceções, sendo que as primeiras se focavam nas interações probióticas com a microbiota intestinal indígena (Kailasapathy, 2002; Kechagia et al., 2013). Essas definições coincidiam geralmente no princípio de que os probióticos eram organismos vivos benéficos ao hospedeiro (Food and Agriculture Organization, 2006; Kechagia et al., 2013). Contudo, a definição de probiótico tem evoluído com o aumento do interesse no uso de suplementos bacterianos viáveis e com o progresso feito na compreensão dos seus mecanismos de ação (Kechagia et al., 2013). Atualmente, de acordo com a *Food and Agriculture Organization of United Nations/Organização Mundial da Saúde (FAO/OMS)*, os probióticos são definidos com o significado de “nova vida” e são usados para nomear microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades suficientes, conferem efeitos benéficos para os humanos e animais (Food and Agriculture Organization, 2006). Essas quantidades dependem da estirpe em questão, mas, normalmente, enquadram-se na gama 10^6 - 10^7 CFU/g (Chavarri et al., 2012).

2.1.1. Bactérias Probióticas

Embora os benefícios do consumo de alimentos fermentados sejam conhecidos há séculos, cada vez há mais evidências dos efeitos positivos que a administração de microrganismos apresenta para a saúde humana (Fijan, 2014). Existe uma grande preocupação sobre a capacidade de a indústria desenvolver antibióticos mais eficientes, a uma taxa suficiente, de maneira a fazer face à bem conhecida e dramática resistência antimicrobiana. Este fator contribuiu para o aumento do consumo de microrganismos benéficos para o ser humano como alternativa aos antibióticos, designadamente em doenças gastrointestinais. Esta é uma alternativa atrativa pois permite evitar o atraso da recolonização da flora intestinal normal, causada pelos antibióticos (Rolfe, 2000).

De maneira a entender melhor os benefícios dos probióticos, é essencial conhecer a importância do trato gastrointestinal e do processo digestivo. O processo digestivo começa com a entrada da comida na boca e a sua passagem pelo trato gastrointestinal (GI) onde atuam microrganismos de forma favorável, danosa ou neutra. Certos microrganismos intestinais são conhecidos por produzirem vitaminas e por serem não-patogénicos. A sua presença é

responsável pelo bom funcionamento da flora intestinal e pela capacidade de o intestino de responder a variações anatómicas e físico-químicas (Parvez et al., 2006; Saad, 2006). Os produtos finais metabólicos do crescimento destes microrganismos são os ácidos orgânicos lácticos ou ácido acético e seus derivados que têm tendência a baixar o pH do intestino, criando, assim, condições menos favoráveis às bactérias nocivas (Parvez et al., 2006). Do mesmo modo, a microbiota intestinal em equilíbrio impede que os agentes patogênicos exerçam os seus efeitos nocivos, mas quando esse equilíbrio se altera poderá haver proliferação desses patogênicos na corrente sanguínea, causando infecções bacterianas. Sucede que é possível contornar esses desequilíbrios através do desenvolvimento de estratégias alimentares, como a introdução de probióticos na alimentação, de maneira a aumentar o número de microrganismos promotores do equilíbrio da microflora intestinal (Saad, 2006).

O uso de probióticos pode também influenciar outras funções protetoras da mucosa intestinal, como a síntese e secreção de péptidos anti-bacterianos. Reforçam também a função de barreira do revestimento intestinal, diminuindo a passagem de antígenos para a corrente sanguínea. Os antígenos, quando colonizam ou passam no trato GI, interagem com componentes do sistema imunológico, preparando-o e estimulando-o no sentido de um funcionamento ótimo. Essa estimulação do sistema imunitário é chamada de tolerância. No entanto, quando essa tolerância é excedida, ou seja, quando há uma resposta exagerada por parte do sistema imunitário, ocorre uma hipersensibilidade, designada alergia. Desta forma, é sugerido o uso destes microrganismos para diminuir as infecções e as reações alérgicas possíveis a alimentos antígenos (Parvez et al., 2006; Wakabayashi et al., 2006).

Vários estudos (Baricault et al., 1995; Hirayama & Rafter, 2000; Reddy et al., 1973, 1983) sugerem que os probióticos poderão desempenhar um papel na diminuição da incidência do cancro. Os mecanismos de atuação continuam a ser objeto de investigação, mas alguns estudos demonstram que algumas bactérias probióticas apresentam a capacidade de diminuir o nível de enzimas carcinogênicas produzidas pela microbiota intestinal (Kechagia et al., 2013). Presume-se que tal aconteça através da normalização da permeabilidade intestinal, que leva à diminuição da população ou das atividades metabólicas das bactérias que geram compostos carcinogênicos. Outra tese é a de que possam levar à produção de metabólicos e compostos que inibem o crescimento de células tumorais, ou ao estímulo do sistema imunitário e consequente defesa do organismo contra a proliferação de células cancerígenas (M. Kumar et al., 2010; Parvez et al., 2006).

Além disso, alguns estudos têm provado que o uso de probióticos poderá contribuir para a prevenção de doenças cardíacas através da redução dos níveis de colesterol ou do controle da pressão sanguínea. Os mecanismos subjacentes a estes efeitos envolvem a interferência na absorção do colesterol pelo intestino e a produção de produtos finais que afetam os níveis sistêmicos de lípidos no sangue conduzindo, assim, a um efeito anti-hipertensivo (Kechagia et al., 2013; Nakamura et al., 1995). No entanto, estes efeitos dependem do tipo de probiótico e esta é a razão pelo qual é tão importante especificar a estirpe probiótica (Chavarri et al., 2012). Desta maneira, é possível definir a sua função e desempenho para uma aplicação industrial específica (Kechagia et al., 2013).

Quando falamos em probióticos, estamos a incluir uma larga gama de microrganismos, podendo ser eles bactérias produtoras de ácido láctico (BAL), bactérias não produtoras de ácido láctico e leveduras (Chavarri et al., 2012; Coppola & Turnes, 2004). As BAL são as mais estudadas e usadas na área de nutrição, e as mais importantes por apresentarem efeitos benéficos no trato GI. As BAL mais comuns são as *Lactobacillus*, as *Bifidobacterium* que são muitas vezes referidas como “bifidus” e, em menor escala, as *Enterococcus faecium* (Chavarri et al., 2012; Kechagia et al., 2013).

2.1.2. Propriedades

É esperado que os probióticos sejam capazes de exercer os seus efeitos benéficos no hospedeiro através do seu crescimento e atividade no corpo humano. Assim, devem apresentar determinadas propriedades de maneira a que seja possível cumprir os seus requisitos. Foi demonstrado (Johansson et al., 1993; Lehtto & Salminen, 1997; Tuomola et al., 1999) que alguns probióticos apresentam uma excelente adesão na superfície mucosa e epitelial, formando uma cobertura nas superfícies e nas cavidades do corpo que previne a entrada de organismos patogênicos. A propriedade de adesão na superfície intestinal e a subsequente colonização no trato GI têm sido sugeridas como um pré-requisito importante para a ação probiótica. Estirpes de bactérias probióticas que aderem à superfície persistem mais tempo no trato intestinal e têm maior probabilidade de conferir efeitos metabólicos e de modulação imunitária comparativamente como as estirpes não aderentes. Esta propriedade contribui também como um meio de exclusão patogénica e previne a adesão e colonização dos patogênicos. Os probióticos apresentam ainda um comportamento antagónico contra as bactérias patogênicas através da atividade anti-microbiana, bem como propriedades anti-mutagénicas e anti-carcinogénicas. Devem também apresentar uma tolerância a meios ácidos como ao fluido

gástrico e uma tolerância biliar que é crucial para a sobrevivência no intestino, facilitando a sua administração por via oral (Kechagia et al., 2013; Saarela et al., 2000).

2.1.3. Segurança alimentar

Há um interesse considerável no uso de alimentos que incluam organismos probióticos. Antes da sua incorporação nos alimentos, as estirpes bacterianas devem ser avaliadas e testadas quanto à sua segurança e eficiência. Assim, é necessário realizar um escrutínio prévio de modo a determinar as propriedades intrínsecas das estirpes a usar, avaliar os efeitos dos produtos metabólicos e a toxicidade de ingestão de grandes quantidades de bactérias, e estimar, através de testes *in vitro*, eventuais propriedades infecciosas dos organismos probióticos. É determinada também a eficiência de ingestão de bactérias probióticas como medida de dose-resposta. Neste caso são avaliadas as doses máxima e mínima requeridas e os consequentes efeitos na saúde. Outras avaliações incluem a determinação do efeito do uso excessivo de probióticos na composição da microflora intestinal humana e a avaliação dos efeitos secundários durante os testes clínicos ao longo de vários estados específicos das doenças (Donohue & Salminen, 1996; Saarela et al., 2000).

Para além de se avaliarem e assegurarem os critérios/requisitos funcionais de segurança necessários, deve-se garantir o cumprimento de requisitos relacionados com a produção e processamento dos probióticos. Para isso, deve-se garantir que os probióticos apresentem boas propriedades tecnológicas para que possam ser produzidos e incorporados em alimentos sem perderem viabilidade e funcionalidade, e sem criarem textura ou sabor indesejáveis nos alimentos. Devem também ser capazes de sobreviver ao longo da sua passagem pelo meio ácido do trato GI e atuar no local específico de ação, no ambiente intestinal (Saarela et al., 2000).

Requisitos funcionais

O uso de probióticos em alimentos tem uma longa história e muitas estirpes têm sido consideradas inofensivas e sem potencial patogénico. A Tabela 1 resume o potencial infeccioso das estirpes de BAL mais comuns. A presença destes microrganismos no trato GI e o seu tradicional uso em alimentos fermentados atestam a sua segurança. Ainda assim, a segurança de probióticos tem sido questionada e, com isso, realizados testes clínicos (*in vitro*) em adultos e crianças com doenças gastrointestinais.

Tabela 1 - Potencial de infecção característico de cada organismo probiótico [adaptado de Donohue & Salminen, 1996].

Organismo	Potencial de infecção
<i>Lactobacillus</i>	Maioritariamente não patogênicos, algumas infecções (em paciente com o sistema imunitário comprometido)
<i>Bifidobacterium</i>	Maioritariamente não patogênicos, alguns casos isolados de infecções
<i>Enterococcus</i>	Algumas estirpes são patogênicas com atividade hemolítica e resistência a antibióticos

Um dos requisitos mais importantes dos organismos probióticos é que sejam não invasivos. Os estudos *in vitro* são comumente usados para medir a capacidade dos probióticos para aderir às células intestinais humanas e para degradar o muco intestinal protetor. É, portanto, um teste de medida indireta do seu potencial dos organismos probióticos para invadir células intestinais e danificar as glicoproteínas protetoras do muco intestinal. Este último tem sido igualmente usado como marcador de toxicidade. A produção de componentes antimicrobianos e a inibição de patogênicos também têm sido avaliadas através de testes *in vitro*, demonstrando que muitas estirpes diminuem o pH do intestino e reduzem o número de agentes patogênicos no trato GI, assegurando a proteção do hospedeiro e suportando a segurança dos organismos probióticos. No geral, as estirpes mais seguras são de origem humana e funcionam melhor em ambientes semelhantes de onde foram originalmente isolados, como por exemplo no trato GI humano (Donohue & Salminen, 1996; Saarela et al., 2000).

Requisitos tecnológicos

As principais propriedades tecnológicas alvo incluem as boas propriedades sensoriais, a resistência a fagos (vírus que apenas afeta bactérias), a viabilidade durante a fase de processamento e estabilidade durante o armazenamento, tanto na forma de culturas congeladas e liofilizadas como na formulação do produto final. A embalagem usada e as condições de armazenamento a que os produtos estão sujeitos são também importantes para garantir a segurança dos produtos (Saarela et al., 2000).

2.1.4. Bactérias de Ácido Lático (BAL)

As bactérias de ácido lático (BAL) podem ser encontradas em ambientes ricos em hidratos de carbono, como plantas, alimentos fermentados e superfícies humanas mucosas. No

corpo humano podem ser encontradas na microflora intestinal, que é um ambiente constituído por um grande número de espécies bacterianas de diversas estirpes (Florou-Paneri et al., 2012). Estão também muito presentes em alimentos consumidos diariamente, como por exemplo, iogurtes, queijo, leite, vegetais, carnes, pães fermentados, etc. (Mozzi et al., 2010).

A *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* são exemplos de estirpes das BAL (Adams, 1999; Daniel et al., 2011). As BAL são espécies bacterianas caracterizadas como Gram-positivas, catalase negativas (enzima que está presente em organismos aeróbicos que é conhecida por catalisar H_2O_2 (peróxido de hidrogénio) em água e oxigénio (Sharma & Ahmad, 2014)), e são capazes de produzir ácido láctico como produto final da fermentação láctica de hidratos de carbono (Kechagia et al., 2013). São não formadoras de esporos e anaeróbias. No entanto, a maioria não é sensível ao oxigénio mas podem crescer na sua presença, sendo assim chamadas de anaeróbias aerotolerantes (Lahtinen et al., 2011). De acordo com a sua morfologia, podem ser classificadas e divididas em *rods* apresentando uma estrutura cilíndrica, como por exemplo a *lactobacillus*, e *cocci* apresentando uma estrutura esférica, como a *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostocs* (Florou-Paneri et al., 2012; Sybesma et al., 2006).

As BAL não possuem um sistema respiratório funcional e, como tal, têm de obter a sua energia através de processos de fosforilação a nível de substrato. De uma maneira geral, esta reação metabólica consiste na transferência de um grupo fosfato de um substrato para uma molécula de Adenosina Difosfato (ADP), convertendo-a em Adenosina Trifosfato (ATP). O principal metabolismo dos hidratos de carbono com recurso às BAL consiste na degradação de diferentes tipos de hidratos de carbono produzindo ácido láctico e energia. Deste modo, a classificação das BAL de acordo com o modo de fermentação divide-as em homofermentativas e heterofermentativas. As primeiras convertem hidratos de carbono em ácido láctico como único produto final, enquanto as segundas originam ácido láctico e outros produtos adicionais, como por exemplo etanol, ácido acético e dióxido de carbono (Florou-Paneri et al., 2012; Lahtinen et al., 2011). A produção de ácido promove a redução do pH do meio envolvente (Adams & Nicolaidis, 1997). As condições ácidas e a consequente redução de pH ao longo do processo de fermentação, assim como a atividade anti-microbiana das moléculas de ácido láctico, previnem o crescimento e a sobrevivência de bactérias patogénicas (Narvhus & Axelsson, 2003).

O crescimento ótimo destas bactérias produtoras de ácido láctico ocorre numa gama de valores de pH específicos, que depende da estirpe e da espécie de cada bactéria. De um modo geral, são mais resistentes em condições ácidas pois conseguem tolerar um pH intracelular mais baixo do que a maioria das outras bactérias. Apesar de o pH do meio apresentar um papel importante no crescimento e metabolismo das bactérias, é o pH intracelular que representa o efeito mais relevante na atividade celular. Um pH intracelular ótimo para as BAL encontra-se na gama de valores entre 7,5 e 6,0. Por outro lado, o valor ótimo de pH extracelular encontra-se acima de 5,0 (Adams & Nicolaidis, 1997; Nannen & Hutkins, 1991).

Quanto à temperatura de crescimento, as bactérias podem ser classificadas como mesofílicas, termofílicas e psicrófilas. As mesofílicas crescem e produzem ácido láctico a uma temperatura ótima de cerca de 30°C e conseguem atingir uma temperatura máxima de fermentação entre os 37°C e 40°C. As BAL termofílicas apresentam uma temperatura ótima de crescimento de cerca de 42°C. Por outro lado, as psicrófilas apresentam uma temperatura ótima de crescimento de 10°C (Mozzi et al., 2010).

Por não terem sido associadas a efeitos patogénicos, a maioria das estirpes BAL são agora reconhecidas como GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Esta característica foi atribuída pela US FDA (*Food and Drug Administration of United States*) e cumprem os requisitos da “*Qualified Presumption of Safety*” (QPS) desenvolvida pela *European Food Safety Authority* (EFSA) (Daniel et al., 2011).

Género Lactobacillus

As BAL do género *Lactobacillus* são Gram-positivas anaeróbias de estrutura *rods* que apresentam um papel crucial na produção de alimentados fermentados, como queijos, iogurtes, vinhos, pickles, etc. Para além disso, podem também ser encontradas na microflora intestinal e na cavidade oral (Fijan, 2014). O género *Lactobacillus* pertence à filo *Fimicutes*, à classe *Bacilli* e à ordem *Lactobacillales*. *Lactobacillus* como a *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. johnsonii*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum*, entre outras, são muito usadas em produtos probióticos (Fijan, 2014).

2.2. Prebióticos

A primeira definição de prebiótico foi introduzida por Gibson et al. em 1995, mas com o passar dos anos, o conceito tem vindo a ser reformulado. A definição mais atual foi proposta pela *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) e refere que

prebiótico é um substrato que é seletivamente utilizado por microrganismos hospedeiros conferindo benefícios à saúde (Gibson et al., 2017). O conceito de substrato com efeito prebiótico tem vindo a ser atribuído a muitos componentes alimentares. Em particular, muitos oligossacarídeos e polissacarídeos (incluindo fibras dietéticas) têm sido indicados como prebióticos, mas nem todos os hidratos de carbono dietéticos são prebióticos. Desta forma, importa estabelecer alguns critérios para a classificação de um prebiótico. Um substrato para ser definido como prebiótico deve ser capaz de resistir ao processo digestivo (inclui resistência ao meio ácido do estômago, à hidrólise por enzimas e à absorção pelo trato GI superior), ser seletivamente fermentado por bactérias benéficas presentes no cólon, e deve estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias associadas a efeitos benéficos (bactérias colónicas não aeróbicas, como as *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) (Markowiak & Śliżewska, 2018; Y. Wang, 2009).

Os prebióticos podem ser encontrados naturalmente em frutas e vegetais, mas também podem ser biosintetizados. Os fruto-oligossacarídeos (FOS) e galacto-oligossacarídeos (GOS) são os prebióticos mais documentados por apresentarem efeitos benéficos ao hospedeiro. Podem ser incorporados em alimentos como agentes para melhorar ou manter o equilíbrio da microflora intestinal, e, conseqüentemente, a saúde e bem-estar do hospedeiro. Desta forma, é preciso ter em conta a segurança dos prebióticos e considerar as suas propriedades inerentes assim como os seus efeitos. Geralmente, assume-se que os prebióticos são seguros, mas alterações na flora intestinal podem resultar em efeitos adversos, dependendo do género de população bacteriana que se está a estimular (Anadón et al., 2016; Gibson et al., 2017; Sako & Tanaka, 2011; Sridevi et al., 2014; Y. Wang, 2009).

2.2.1. Fruto-oligossacarídeos (FOS)

Fruto-oligossacarídeos (FOS) são hidratos de carbono não digestivos que representam uma das maiores classes de oligossacarídeos bifidogénicos. A sua estrutura química, que está representada na Figura 1, consiste numa cadeia de unidades de frutose com unidades terminais de glucose associadas, ligadas entre si por ligações glicosídicas β -(2-1). Isto significa que não podem ser hidrolisadas pelas enzimas digestivas do trato GI humano (Sabater-Molina et al., 2009; Sako & Tanaka, 2011).

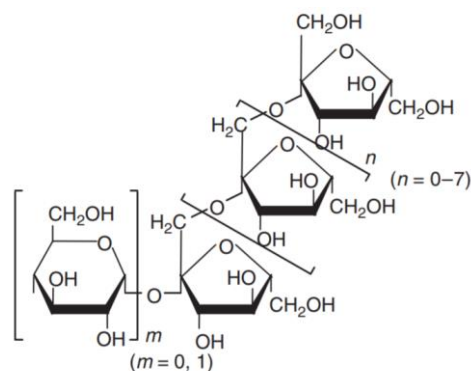


Figura 1 - Estrutura química dos FOS.

Há duas categorias possíveis de FOS: oligofrutose e os frutoligossacarídeos de cadeia curta, que diferem tanto na sua origem como na sua composição. A oligofrutose é produzida através da hidrólise enzimática da inulina e consiste em unidades lineares de frutossil de vários comprimentos, com unidades terminais de glicose ou frutose. Apresenta um grau de polimerização com uma média de 9 unidades funcionais. Os FOS de cadeia curta derivam de processos de reação de síntese enzimática de transfrutossilacção, que consiste na modificação da molécula de sacarose através da enzima β -D-frutossiltransferase. Este processo dá origem tanto a cadeias lineares como a cadeias ramificadas de frutossil com unidades terminais de glicose. Apresentam um grau de polimerização entre 1 a 5 unidades de repetição e podem ser compostos de 1-kestose, nistose ou frutofuranosil nistose (cf. Figura 2) (Passos & Park, 2003; Sabater-Molina et al., 2009).

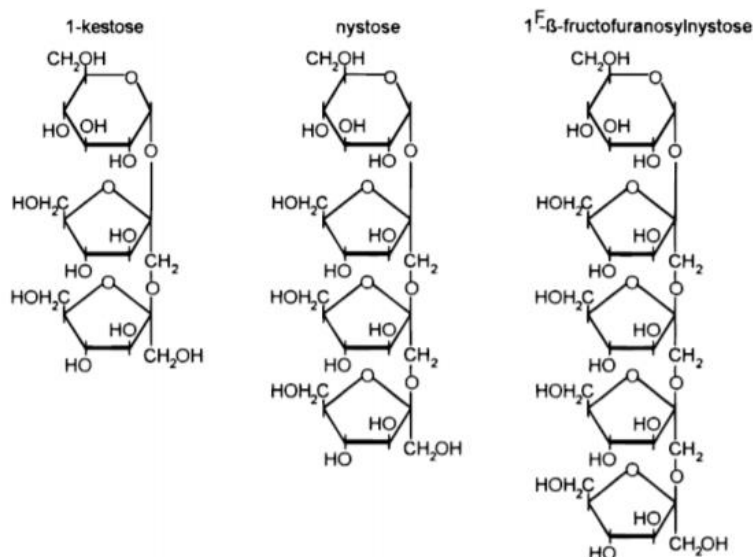


Figura 2 - Estrutura química dos FOS de cadeia curta.

São solúveis em água e são mais doces que a sacarose, dependendo da estrutura química e do grau de polimerização. Quanto mais pequena for a cadeia, mais doce se torna. São altamente higroscópicas e a viscosidade de uma solução de FOS é superior à de uma solução de sacarose com a mesma concentração. Isto deve-se ao maior peso molecular dos FOS. Para além da estabilidade térmica também ser maior do que a da sacarose, os FOS apresentam numa gama de valores de pH que varia entre 4,0 e 7,0 (Sabater-Molina et al., 2009). Os FOS possuem propriedades funcionais como a redução dos níveis séricos de colesterol e dos níveis de glucose no sangue, melhoram a absorção de Ca^{2+} e Mg^{2+} , inibem a produção de enzimas redutases que têm efeitos cancerígenos e contribuem para reduzir a pressão sanguínea (Sridevi et al., 2014). Apresentam um efeito protetor das BAL ao longo de processos de secagem e armazenamento. Existem duas hipóteses que podem explicar este efeito. Uma propõe que os FOS podem substituir parcialmente as moléculas de água durante o processo de desidratação, através da formação de ligações de hidrogénio em torno dos grupos polares presentes na membrana fosfolipídica, protegendo assim as células, e a outra é baseada na capacidade do FOS de aumentar a temperatura de transição vítrea (T_g) da matriz integrada pelos FOS. Para um armazenamento bem sucedido as amostras devem estar no estado amorfo, i.e. abaixo da T_g (Rajam & Anandharamakrishnan, 2015; Romano et al., 2016).

2.3. Preservação de Probióticos por Encapsulamento

A viabilidade das bactérias probióticas nos produtos que integram é uma característica fundamental para assegurar a sua eficácia no momento do seu consumo. É igualmente importante garantir a sobrevivência das culturas bacterianas durante o processo de fabrico, armazenamento, bem como a prevenção da sua degradação química durante a passagem pelo trato GI, causada pelas condições ácidas do estômago e pela atividade das enzimas e sais biliares do intestino (Anselmo et al., 2016; Kailasapathy, 2002). A sobrevivência de probióticos em produtos alimentares e suplementos diatéticos é afetada por um conjunto de vários fatores, incluindo o pH, pós-acidificação (durante o armazenamento) dos produtos fermentados, produção de H_2O_2 , oxidação (permeação do oxigénio através da embalagem), temperatura de armazenamento, etc. O oxigénio apresenta um papel fundamental na perda de viabilidade das bactérias probióticas (Kailasapathy, 2002).

O encapsulamento é um processo físico-químico ou mecânico em que as células, bactérias ou outras partículas vivas ficam retidas num material de maneira a reduzir uma posterior lesão ou perda destas. O encapsulamento de fermentos de culturas lácteas é de interesse industrial pois permite o controlo dos processos de fermentação, controlo das reações oxidativas,

mascarar sabores, cores ou cheiros, e providencia sustentabilidade e controlo da sua libertação, assim como uma melhoria na estabilidade e viabilidade durante a produção, armazenamento e manuseamento das culturas. Garante-se também uma proteção adicional durante as fases de liofilização e reidratação. Esta barreira física pode também minimizar as contaminações (Burgain et al., 2011; Kailasapathy, 2002; Shah, N.P. & Ravula, 2000).

No caso do encapsulamento de probióticos, o objetivo é não só proteger contra as condições externas adversas mas também permitir uma libertação controlada, de uma maneira viável e num estado metabolicamente ativo desses probióticos, em partes específicas do corpo, maioritariamente no intestino (Burgain et al., 2011). Os possíveis agentes de libertação estão relacionados com variações de pH, tensões mecânicas, atividades enzimáticas, pressão osmótica, difusão da humidade através das camadas, presença de alguns componentes químicos e tempo de armazenamento (Mortazavian et al., 2007).

Há vários tipos de encapsulamento (cf. Figura 3). O encapsulamento em reservatório consiste na formação de uma concha/cápsula em volta do núcleo/ agente ativo. Por outro lado, no encapsulamento em matriz o núcleo/ agente ativo está disperso no material a encapsular e pode também ser encontrado na superfície. A combinação destes dois tipos dá origem a uma terceira forma de encapsulamento em que a matriz que contém o núcleo/ agente ativo apresenta um revestimento à sua volta (Burgain et al., 2011).

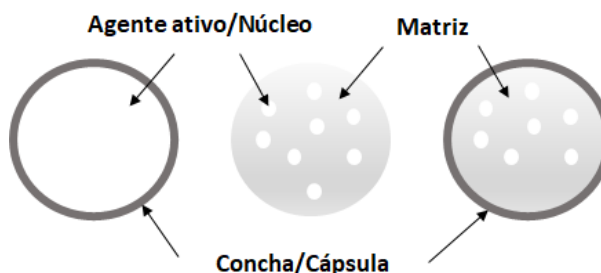


Figura 3 - Representação esquemática dos diferentes tipos de encapsulamento [adaptado de Burgain et al., 2011].

A cápsula esferóide formada é semipermeável, fina e com uma parede membranosa forte. Desta forma, os nutrientes podem difundir facilmente através da parede semipermeável (Anal & Singh, 2007). Deve também ser resistente à solubilização em água de maneira a manter a integridade na matriz dos alimentos e na parte superior do trato GI (Burgain et al., 2011).

Durante os processos de encapsulamento de probióticos é preciso ter em conta o tamanho e o facto de os probióticos terem de se manter vivos. Este último fator é muito importante para a seleção apropriada do método de encapsulamento. Podem ser aplicadas várias tecnologias,

mas cada uma apresenta características específicas em relação ao intervalo de tamanhos e ao tipo de cápsula (Burgain et al., 2011). A viabilidade do encapsulamento de probióticos depende das propriedades físico-químicas da cápsula. Para além disso, o tipo e a concentração do material, o tamanho da partícula, o número de células iniciais e a estirpe das bactérias a usar são parâmetros importantes que devem ser controlados (Burgain et al., 2011). Como referido, a natureza química do material de revestimento é um parâmetro importante a considerar no processo de encapsulamento probiótico. Para além das funções estruturais, a eficácia do material depende não só da capacidade de formação da cápsula, da resistência, mas também da disponibilidade e biocompatibilidade (Corona-Hernandez et al., 2013). Assim, para a seleção do tipo de material é preciso ter em conta as suas propriedades físico-químicas e bioquímicas, assim como as interações intermoleculares destes materiais entre si e com o tipo de bactéria a usar. Acresce que a aplicação final do encapsulamento deve prevenir a sua degradação ao longo do trato GI (Corona-Hernandez et al., 2013).

2.3.1. *Layer-by-Layer* (LBL)

A produção de materiais nano-estruturados funcionais pode ser realizada através de técnicas *top-down* ou *bottom-up*. Estas técnicas têm contribuído para o sucesso das nanotecnologias. A abordagem *top-down* é baseada em métodos físicos com recurso a ferramentas mais precisas que permitem uma redução de tamanho e uma modelação estrutural. Pelo contrário, uma abordagem *bottom-up*, cujas metodologias são baseadas na síntese química, envolve a construção de estruturas molécula a molécula através de métodos de auto-construção e auto-organização (Rehman et al., 2019). Como a abordagem *top-down* apresenta algumas limitações físicas, os materiais fabricados através da abordagem *bottom-up self-assembly* têm-se tornado cada vez mais importantes (Ariga et al., 2014). Têm sido desenvolvidas ao longo dos anos várias estratégias com base nessa abordagem para a preparação de filmes sólidos e de espessura fina que apresentam um elevado potencial em aplicações no campo da biologia e da medicina. Na segunda metade do século XX as duas tecnologias que dominavam as pesquisas nessa área eram a deposição *Langmuir-Blodgett* e *self-assembled monolayers* (SAMs). No entanto, ambos os métodos apresentavam algumas desvantagens e limitações e como alternativa foi desenvolvida a técnica de deposição *Layer-by-Layer* (Tang et al., 2006). Este método foi proposto pela primeira vez por Iler e Kirkland em 1966, após registar a deposição de várias camadas em superfícies sólidas, através da adsorção de partículas carregadas positivamente ou negativamente. No entanto, por falta de métodos adequados, apenas em 1991 foi realizada uma caracterização completa do processo de deposição de filmes de polieletrólitos por Decher e

Hong (Ariga et al., 2014). Enquanto os primeiros trabalhos de pesquisa se focavam em substratos de superfície planar e interações apenas eletrostáticas, nos finais dos anos 90 foram introduzidas superfícies não-planares e outros tipos de interações (Dierendonck et al., 2014). Desde então, tem havido um crescente interesse neste método, tanto do ponto de vista fundamental como prático (Borges & Mano, 2014).

O método *Layer-by-Layer* (LbL) é conhecido por ser simples e barato, pois não exige equipamentos muito complexos. É um método flexível e apresenta uma elevada versatilidade no sentido em que permite modificar superfícies e produzir camadas estruturais robustas de vários tipos de materiais. O seu desenvolvimento permitiu superar várias limitações associadas a outros métodos (Borges & Mano, 2014). Baseia-se na deposição alternada de polieletrólitos de cargas opostas na superfície de um substrato carregado positivamente ou negativamente, através de processos de adsorção onde podem ocorrer tanto interações eletrostáticas como interações não eletrostáticas (Borges & Mano, 2014; Svaldo Lanero et al., 2006). A espessura das camadas depositadas é de escala nanométrica. Trata-se de um método robusto de revestimento de substratos que pode ser utilizado em variadas aplicações, sendo as principais na área biomédica, entrega de fármacos e proteção de agentes sensíveis, como enzimas e proteínas (Richardson et al., 2016).

Na formação das multicamadas estão envolvidos passos de deposição de polieletrólitos. Cada passo consiste na deposição de uma solução polimérica sob as partículas coloidais. As multicamadas de polieletrólitos são formadas a partir da adsorção alternada de polieletrólitos de cargas opostas, em que os polieletrólitos não adsorvidos em cada passo de adsorção são removidos por lavagem. Este procedimento de lavagem, que muitas vezes requer um processo de centrifugação, evita contaminações das soluções de adsorção subsequentes, aderindo o líquido ao substrato e estabilizando as camadas fracamente adsorvidas. Os ciclos de deposição são repetidos as vezes necessárias de maneira a obter o número de camadas pretendidas, e, assim, controlar a espessura das multicamadas (Borges & Mano, 2014; Donath et al., 1998). Este processo está esquematizado na Figura 4. Cabe dizer que os processos de centrifugação são processos complexos, dificultam o *scale-up* e podem conduzir à agregação das partículas, porventura exigindo o recurso a métodos de sonicação durante a decomposição das camadas (Richardson et al., 2016).

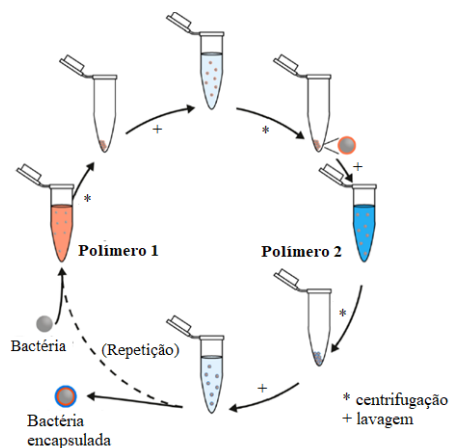


Figura 4 - Representação esquemática do processo de *Layer-by-Layer assembly* [adaptado de Richardson et al., 2016].

No entanto, o principal foco para o desenvolvimento desta tecnologia tem sido a redução do tempo de deposição das camadas, o controlo das propriedades dos filmes formados, a eliminação da centrifugação, e a redução da agregação das partículas do substrato. Assim, para além do método de imersão descrito anteriormente, têm sido exploradas diferentes abordagens convencionais que se baseiam no eletromagnetismo, no uso de movimentos giratórios (*spinnig*) de elevada velocidade e métodos de montagem com recurso ao uso de *spray* e vácuo (*assembly*). Numa abordagem não convencional recorre-se a tecnologias de impressão 3D, bio-impressão e nanolitografia em caneta de imersão (Richardson et al., 2016).

O método de imersão pode ser utilizado em vários tipos de substrato, vivo ou não vivo, planar, partículas coloidais, e de várias superfícies químicas, independentemente do tamanho e da forma (Quintana et al., 2017). É um processo que ocorre sob condições de processamento moderadas, que não requerem temperaturas elevadas, valores de pH extremos, e em que não há exposição a solventes orgânicos. Este aspeto é uma das grandes vantagens deste método, especialmente quando estamos a lidar com biomoléculas e microrganismos em que facilmente pode ocorrer perda da atividade biológica. Em contrapartida, esta técnica apresenta algumas desvantagens, nomeadamente o tempo de cada ensaio e a quantidade de material que é necessário para cada passo de deposição.

Como já foi referido, há um conjunto de parâmetros que influenciam o processo LbL, sendo eles a superfície do substrato, a escolha das matérias para as camadas, as condições experimentais do procedimento e os vários tipos de interações intermoleculares envolvidos no processo de deposição das multicamadas. As propriedades dos filmes depositados (como espessura, rigidez, composição química, estrutura, etc.), podem ser controladas a uma escala nanométrica fazendo variar as propriedades das espécies adsorvidas (como densidade de cargas,

composição e estrutura), as propriedades físico-químicas do meio líquido (como a composição de sal/solução tampão, qualidade do solvente, força iônica, pH e parâmetros de lavagem), bem como os parâmetros externos (como temperatura, tempo de adsorção e número de camadas depositadas) (Borges & Mano, 2014). O pH é um dos parâmetros de controlo mais importantes na construção das multicamadas pois determina a densidade de cargas das cadeias (Guzmán, Cavallo, et al., 2011).

As multicamadas de polieletrólitos formadas podem ser compostas por inúmeras espécies carregadas, não sendo assim necessariamente limitada apenas ao polieletrólito. Nanopartículas inorgânicas, lípidos, iões multivalentes e certos polímeros biológicos, como proteínas e ácidos nucleicos, têm sido usados como componentes do revestimento (Sukhorukov et al., 2004). Importa referir, no entanto, que nem todas as variantes descritas são de fácil aplicação industrial devido essencialmente à estabilidade limitada que os filmes formados apresentam, ao que acresce a elevada morosidade do procedimento experimental devido às inúmeras etapas que o caracterizam (Dierendonck et al., 2014).

2.3.2. Materiais de Encapsulamento por LbL

Um dos aspetos mais importantes que se deve considerar no encapsulamento de microrganismos é a estrutura química do material de revestimento, pois este pode influenciar de várias maneiras a capacidade de proteção dos microrganismos. Deve-se ter em conta que a camada de revestimento exterior deve apresentar propriedades sensoriais e funcionais com um nível extra de proteção. Deve também apresentar características de dissolução desejáveis, permitindo uma libertação controlada do interior do revestimento por exemplo perante uma mudança de pH. Têm sido usados muitos polímeros em processos de encapsulamento. Os mais utilizados são os biopolímeros devido à sua taxa de proteção sob condições de stress, de serem fáceis de preparar, baratos, biocompatíveis e podem ser utilizados para encapsular microrganismos com variadas características (Anal & Singh, 2007).

Quitosano

O quitosano é um biopolímero catiónico obtido geralmente por desacetilação da molécula da quitina de maneira a torná-la solúvel na maior parte dos ácidos diluídos (Prabaharan & Mano, 2005). É um polissacarídeo linear composto aleatoriamente por unidades de repetição de β -(1-4)-Linked-D-Glucosamina e N-acetil-D-Glucosamina (cf. Figura 5), e é um dos mais

abundantes na natureza que, devido à sua elevada quantidade de azoto (~7%), apresenta um grande interesse comercial (Kim & Venkatesan, 2013).

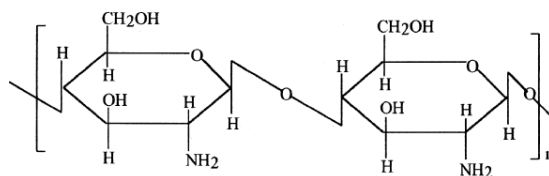


Figura 5 - Estrutura química do quitosano.

A percentagem de desacetilação é um parâmetro importante porque determina a densidade de carga e a conseqüente solubilidade, bem como a adsorção em superfícies carregadas e as propriedades mecânicas das multicamadas de LbL (Guzmán, Chuliá-Jordán, et al., 2011; Hejazi & Amiji, 2003). À medida que aumenta a percentagem de desacetilação (que deve variar entre 40 a 98%,) aumenta também a solubilidade do quitosano em meio aquoso, o que confere a este polímero uma carga positiva, favorecendo as interações com polímeros aniônicos ou superfícies com cargas negativas (Dias et al., 2013; Sinha et al., 2004). O peso molecular é também bastante importante para determinar as propriedades físico-químicas e biológicas do quitosano (Hejazi & Amiji, 2003).

O quitosano é uma base fraca, com um valor de pKa de aproximadamente 6,3 e é insolúvel em soluções com valores de pH neutros e alcalinos. Em meio ácido, os grupos amina estão protonados o que resulta num polissacarídeo solúvel e carregado positivamente com uma elevada densidade de carga (Hejazi & Amiji, 2003). Sendo biodegradável, biocompatível e não-tóxico, o quitosano é um bom candidato para aplicações biomédicas, farmacêuticas e alimentares, como, por exemplo, para imobilização de enzimas e células vivas (Sinha et al., 2004). No entanto, para ser usado para encapsulamento de bactérias probióticas é necessário considerar a atividade anti-bacteriana. Como a sua eficiência para aumentar a viabilidade das células probióticas não é satisfatória, é muitas vezes usado como revestimento exterior de uma cápsula de alginato. Esta aplicação do quitosano permite a sobrevivência das bactérias probióticas durante o armazenamento e no trato gastrointestinal, sendo, portanto, uma boa maneira de fornecer células bacterianas viáveis ao cólon (Chavarri et al., 2012; Mortazavian et al., 2007).

Alginato

O alginato é um polissacarídeo bastante abundante na natureza, onde se encontra principalmente como componente estrutural das algas marinhas. Está localizado na matriz intercelular como um gel que contém íons de cálcio, sódio, magnésico, estrôncio e bário, e está

também presente nas paredes celulares de algumas bactérias do solo (Stephen et al., 2006). É composto por dois monómeros diferentes, os ácidos β -D-manurónico (M) e α -L-gulurónico (G), ligados entre si através de ligações glicosídicas β entre os carbonos 1 e 4. As cadeias poliméricas são lineares e, como se ilustra na Figura 6, a sua estrutura sequencial apresenta três tipos de blocos: homopoliméricos M-M e G-G, e alternados M-G. Assim, a composição da cadeia polimérica varia em quantidade e distribuição sequencial de acordo com a fonte de alginato, influenciando as suas propriedades funcionais (Burgain et al., 2011; George & Abraham, 2006; Liu et al., 2004). O ácido gulurónico estabelece interações muito fortes com cátions divalentes, formando uma estrutura *egg-box* que resulta na formação de ligações cruzadas entre macromoléculas de alginato (Cook et al., 2013; Liu et al., 2004).

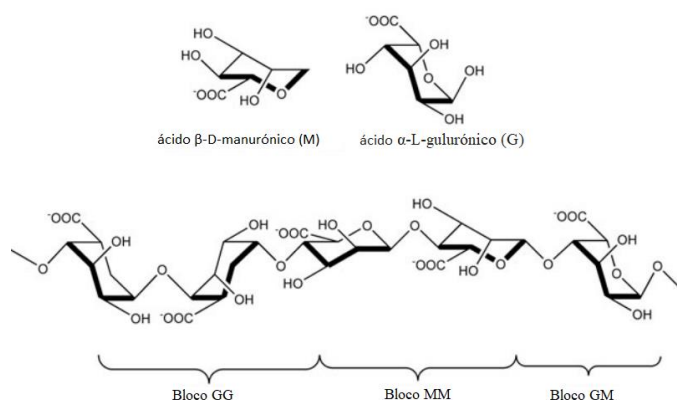


Figura 6 - Estrutura química do alginato e os seus respetivos monómeros.

Devido à sua capacidade de retenção de água, às propriedades biocompatíveis, gelificantes, emulsificantes, espessantes e estabilizantes, este polímero é bastante procurado para variadas aplicações industriais, especialmente no setor alimentar e farmacêutico, nomeadamente para encapsulamento de células e probióticos. Para além das propriedades já nomeadas, é fácil de preparar e manusear e envolve temperaturas de processamento baixas. Contudo, existem algumas desvantagens associadas ao seu uso, como a suscetibilidade a meios ácidos, o que se traduz numa perda de estabilidade mecânica dificultando a proteção da bactéria probiótica aquando da sua passagem por meios ácidos, como, por exemplo, no trato gastrointestinal. Apresenta um valor de pKa entre 3,3 e 3,5 que depende da sua composição química e da força iónica entre o solvente e a concentração de alginato (Stephen et al., 2006). Os revestimentos de base alginato são tipicamente muito porosos, o que é claramente indesejável quando um dos objetivos é proteger as células do ambiente envolvente. Por outro lado, o uso de alginato em produções de larga escala é algo caro e de difícil *scale up*, como o encapsulamento de bactérias probióticas em escala industrial. (Mortazavian et al., 2007). Ainda

assim, estas dificuldades podem ser compensadas através do revestimento das cápsulas por um outro composto polimérico ou modificação do alginato usando diferentes aditivos. Isto é possível pois o alginato é um polímero aniônico que interage com outros polímeros catiônicos, através de interações eletrostáticas, como é o caso do quitosano. Os polímeros de base quitosano formam complexos fortes com o alginato, aumentando assim a estabilidade química e mecânica, e, conseqüentemente, melhorando a eficiência do encapsulamento (Krasaekoopt et al., 2006; Liu et al., 2004).

Pectina

A pectina é um heteropolissacarídeo que pode ser encontrado nas células primárias das paredes celulares das plantas terrestres. É também um componente abundante nas cascas dos citrinos (Dafe, Etemadi, Dilmaghani, et al., 2017; Rehman et al., 2019). Quimicamente, a pectina é considerada um dos hidratos de carbono mais complexos da natureza devido à diversidade de ligações glicosídicas estereoquímicas. É um polissacarídeo cuja principal estrutura química é composta por uma cadeia linear de α -D-resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações glicosídicas α -(1-4) (cf. Figura 7). Os grupos carboxílicos podem permanecer como ácidos livres, podem ser esterificados com metanol ou açúcares neutros como a arabinose, galactose, glucose, manose e xilose (Aguilar et al., 2015; Moreira et al., 2010). No entanto, a pectina comercial é tipicamente menos complexa a nível estrutural devido às mudanças estruturais e aos processos que ocorrem durante a extração industrial (Stephen et al., 2006)

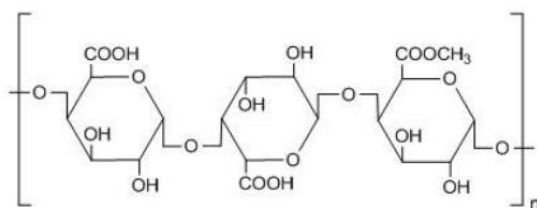


Figura 7 - Estrutura química da pectina.

Uma vez que a pectina é resistente a enzimas gástricas e intestinais, como a protéase e amilase, mas é facilmente degradada pelas enzimas produzidas pela microflora do colón, tem sido bastante estudado como uma matriz promissora para a administração de fármacos em locais específicos, como o colón (Cabrera et al., 2011). Devido às suas propriedades gelificantes e emulsificantes, é um polímero com várias aplicações farmacêuticas e alimentares (Valdés et al., 2015). Muitas das características da pectina são determinadas pelas interações iônicas, peso molecular e grau de esterificação dos grupos carboxílicos (Ashford et al., 1994; Rehman et al.,

2019). Apresenta um valor de pKa de 3,5 e em condições ácidas apresenta uma carga próxima de zero (Opanasopit et al., 2008).

A pectina ganhou uma atenção fundamental para o encapsulamento probiótico em produtos alimentares por apresentar características bem definidas como baixo custo, atoxicidade e biocompatibilidade (Dafe, Etemadi, Dilmaghani, et al., 2017). É um polímero predominantemente aniônico devido à presença de grupos carboxílicos que, durante o encapsulamento, formam complexos com outros polímeros com grupos protonados (Larsen et al., 2018; Menezes et al., 2019). Como resultado, a pectina tem sido associada a vários biopolímeros, por exemplo o alginato ou o amido, ou revestido por uma camada de polieletrólitos de cargas opostas de maneira a melhorar a funcionalidade do encapsulamento e a sobrevivência dos probióticos (Aguilar et al., 2015; Bepeyeva et al., 2017; Dafe, Etemadi, Dilmaghani, et al., 2017).

Carboximetilcelulose (CMC)

Os derivados da celulose são muito usados em variadas aplicações industriais. O mais importante éter de celulose que é produzido é a carboximetilcelulose (CMC), que é um biopolímero que apresenta um carácter aniônico (Singh et al., 2017). Em soluções com pH superior ao seu pKa (entre 4,2 e 4,4) os grupos carboximetil do CMC estão maioritariamente desprotonados, conduzindo a cadeias de polieletrólitos com cargas negativas, facilitando assim a deposição eletrostática das camadas durante o encapsulamento (Nussinovitch, 1997). O CMC é um polissacarídeo que tem sido preparado por modificação química da celulose, através da substituição de grupos hidroximetilo por grupos carboximetilo por meio de ligações β -(1-4) - glicosídicas. É de estrutura linear e, tal como o alginato, é composto por duas unidades (β -D-glucose e sal monossódico β -D-glucopiranosose 2-O-(carboximetil)) que depende do grupo R, como mostra a Figura 8 (Trevisol et al., 2019). Desta forma, exhibe um comportamento de polieletrólito devido aos grupos ácidos fracos presentes na estrutura principal (Roy et al., 2018). Devido ao número de grupos carboximetil de sódio (-CH₂COONa), é facilmente dissolvido em água (Zhu et al., 2013).

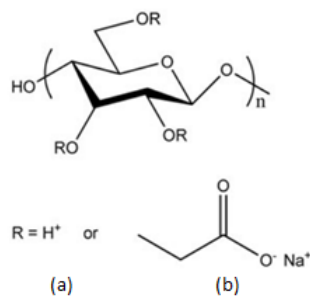


Figura 8 - Estrutura química do CMC dependente do grupo R: β -D-glucose (a); sal monossódico β -D-glucopiranosose 2-O- (carboximetil) (b).

O CMC apresenta excelentes atributos. É atóxico, biocompatível, biodegradável, hidrofílico e barato (Dafe, Etemadi, Zarredar, et al., 2017), o que o torna ideal para aplicações como imobilização enzimática (Emregül et al., 1996), cultivo de células (Chen et al., 2005) e encapsulamento e entrega controlada de probióticos (Priya et al., 2011) e de fármacos (Kaihara et al., 2011). A resistência ao ácido gástrico e as propriedades de solubilidade intestinal do CMC são uma vantagem para o seu uso na administração de fármacos e probióticos.

3. Estado da Arte

A procura de métodos que permitam prevenir ou reduzir a degradação celular causada por fatores de *stress* durante os processos de estabilização (congelamento e liofilização) e condições de armazenamento tem vindo a ganhar bastante interesse. Esta seção resume o levantamento bibliográfico dirigido a estudos respeitantes a duas estratégias de preservação de bactérias probióticas, cuja conjugação representa um dos elementos originais reclamados neste trabalho.

3.1. Encapsulamento de bactérias por LbL

Na literatura existem vários estudos que relatam uma melhoria da viabilidade de bactérias lácticas com base no encapsulamento por LbL. De um modo geral, os trabalhos realizados demonstram que se trata de um método promissor no sentido em que permite aumentar a viabilidade das bactérias durante o seu armazenamento e processamento. Isto é comprovado através da avaliação da viabilidade, em que foi possível concluir que a sobrevivência das bactérias probióticas encapsuladas é maior do que as não encapsuladas após o congelamento e a liofilização. Isto é atribuído ao fato de a encapsulação mitigar o dano causado pelos cristais de água na membrana celular das bactérias.

Priya et al. (2011) avaliaram a viabilidade do encapsulamento de bactérias *Lactobacillus acidophilus* através da deposição alternada de 3 e 7 camadas de quitosano (CHI) e carboximetilcelulose (CMC). A deposição de cada camada é traduzida numa alternância de cargas superficiais dos polímeros, e isto pode ser observado através da medição do potencial zeta. Com esta alternância positiva e negativa de potencial zeta de cada superfície é possível concluir se o encapsulamento permitiu uma deposição bem-sucedida, devendo apresentar um padrão característico em zig-zag como demonstra a Figura 9.

Como no caso descrito as bactérias são altamente negativas (ca. -40 mV), na deposição da primeira camada (CHI) não houve uma compensação completa de cargas, apesar de o potencial zeta apresentar um padrão em zig zag característico de uma deposição bem-sucedida.

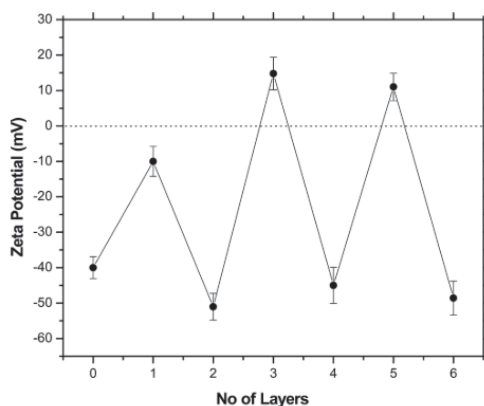


Figura 9 - Potencial zeta com absorção alternada das camadas na superfície de bactérias *Lactobacillus acidophilus* [retirado de Priya et al., 2011].

Uma maneira de provar a capacidade de multiplicação das bactérias é através do estudo da cinética do seu crescimento quer encapsuladas, quer não encapsuladas (cf. Figura 10). Priya et al. (2011) mostraram que o atraso no crescimento (tempo necessário para adaptação das bactérias ao meio) das amostras encapsuladas demonstrou ser mais longo comparativamente com as amostras não encapsuladas, e a adição de camadas demonstrou aumentar o tempo de atraso das amostras.

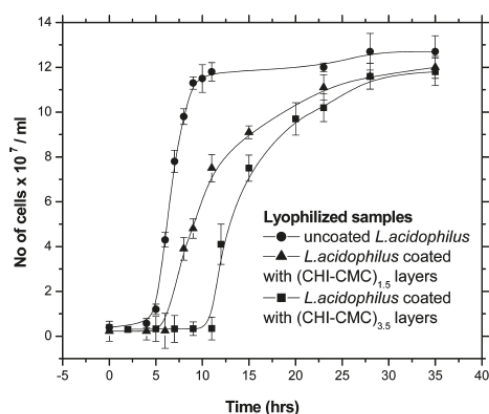


Figura 10 - Curva de crescimento das bactérias encapsuladas e não encapsuladas das amostras liofilizadas [retirado de (Priya et al., 2011)].

Por outro lado, foi possível concluir que a capacidade de sobrevivência das bactérias encapsuladas é superior à das bactérias não encapsuladas. No entanto, para as bactérias encapsuladas com 7 camadas o método de contagem de colônias falhou devido à elevada agregação das partículas. Do mesmo modo, foi demonstrado em Yucel Falco et al. (2017) que à medida que o número de camadas aumentava, havia uma maior perda de viabilidade devido ao conseqüente aumento da aglomeração ao longo do processo de encapsulamento. Para além disso, à medida que se aumentava o número de camadas tornava-se mais difícil a libertação das bactérias e o seu crescimento em meio agar.

Thomas et al. (2014) realizaram um encapsulamento de um probiótico *Saccharomyces boulardii* com polieletrólitos de cargas opostas como o quitosano e sulfato de dextrano. Foram depositadas 4 camadas. Os resultados indicaram que os probióticos encapsulados eram capazes de se multiplicar, crescendo de maneira similar aos não encapsulados, apresentando atrasos no crescimento idênticos. Probióticos não encapsulados atingiam uma fase estacionária mais cedo (18h) do que as encapsuladas (28h).

Quintana et al. (2017) estudaram o encapsulamento de bactérias *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* com polieletrólitos de quitosano e um polímero aniônico sintetizado a partir de ácido poliacrílico (PAA) e plurônico (PLU). Demonstraram que a adição das camadas aumentava o atraso no crescimento independentemente do número de camadas, mas aumentava a taxa de crescimento. A viabilidade foi avaliada na presença de 20% m/v de sacarose, tendo-se verificado não haver diferença significativa entre as bactérias antes e após a liofilização, confirmando-se assim a eficiência do método de encapsulamento. Na Tabela 2 resumem-se as condições experimentais e os respectivos resultados e conclusões do encapsulamento por LbL fazendo variar os polieletrólitos e as bactérias probióticas usadas.

Tabela 2 - Estudos do processo de encapsulamento através do método Layer-by-Layer.

Estudo	Condições experimentais	Resultados	Referência
Encapsulamento através do método <i>Layer-by-Layer</i> de bactérias <i>Lactobacillus acidophilus</i> com adsorção alternada de quitosano (CHI) e carboximetilcelulose (CMC)	<ul style="list-style-type: none"> • Condições de crescimento: 37°C a 220 rpm durante 13h em MRS <i>broth</i> • Concentração de polímeros: 1 mg/mL de CHI e CMC em 0,15 M de NaCl; pH=6 • LbL: bactérias centrifugadas a 4°C a 8000 rpm (3500 rpm para as lavagens) durante 15 min; tempo de deposição das camadas de 20 min sob agitação à T=37°C • Deposição de 3 e 7 camadas alternadas • Congelamento em azoto líquido à pressão atmosférica; liofilizadas e guardadas a 4°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Curva de crescimento: bactérias não encapsuladas apresentam um tempo de atraso de 4h e as encapsuladas com 3 e 7 camadas apresentam um tempo de atraso de 8h e 15h, respetivamente; • Potencial zeta: superfície da bactéria é altamente negativa (-40 mV) e na deposição das camadas dispõe de uma variação de potencial zeta entre positivo e negativo, à exceção da primeira camada de CHI; • Viabilidade: O número de células não encapsuladas viáveis diminui de log 9 CFU/mL para log 7,25 CFU/mL depois de congeladas e log 6,49 CFU/mL depois de liofilizadas. Houve uma redução das bactérias encapsuladas de log 9,25 CFU/mL para log 8,60 CFU/mL após o congelamento e para log 8,44 CFU/mL após a liofilização. 	Priya et al. (2011)
Encapsulamento através do método <i>Layer-by-Layer</i> de <i>Saccharomyces boulardii</i> com adsorção alternada de quitosano (CHI) e sulfato de dextrano	<ul style="list-style-type: none"> • Condições de crescimento: 30°C a 200 rpm durante 20h • Concentração de polímeros: 2,5 mg/ml de CHI e 1 mg/ml de sulfato de dextrano em 1 M de NaCl; pH=5,6 • LbL: bactérias centrifugadas a 4°C a 4100 rpm durante 5 min; tempo de deposição das camadas de 30 min sob agitação á temperatura ambiente • Deposição de 4 camadas alternadas • Congelamento em azoto líquido à pressão atmosférica; liofilizadas e guardadas a 4°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Potencial zeta: padrão em zig-zag indicando uma deposição alternada dos polieletrólitos; • Curva de crescimento: não há diferença entre o tempo de atraso dos probióticos encapsulados e não encapsulados apesar destes primeiros atingirem a fase estacionária mais cedo (18h) do que os outros (28h); • Viabilidade: após o congelamento foi observado uma redução na viabilidade tanto dos probióticos não encapsulados (de $9,24 \pm 1,21$ para $7,82 \pm 2,00$ log CFU/100 mg) como dos encapsulados (de $9,28 \pm 1,85$ para $8,78 \pm 2,16$ log CFU/100 mg). Após a liofilização houve uma redução dos probióticos não encapsulados para $5,53 \pm 1,85$ log CFU/100 mg e dos encapsulados para $7,74 \pm 2,00$ log CFU/100 mg. 	Thomas et al. (2014)

<p>Encapsulamento através do método <i>Layer-by-Layer</i> de bactérias <i>Lactobacillus acidophilus</i> com adsorção alternada de quitosano (CHI) e β-glucano sulfatado ($s\beta$G)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Condições de crescimento: 37°C durante 16h em MRS <i>broth</i> • Concentração de polímeros: 1 mg/mL de CHI e $s\beta$G em 0,15 M de NaCl; pH=5,6 • LbL: bactérias centrifugadas a 4°C durante 10 min; tempo de deposição das camadas de 20 min sob agitação à T=37°C a 225 rpm • Deposição de 8 camadas alternadas • Congelamento em azoto líquido à pressão atmosférica; liofilizadas e guardadas a 4°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Potencial zeta: o padrão em zig-zag indicam um sucesso na deposição alternada dos polieletrólitos; • Viabilidade: após a adição de 2 camadas apenas há redução de 1 log CFU/mL (de $8,4 \pm 0,1$ para $7,2 \pm 0,4$ log CFU/mL). Após a adição de 4 camadas há uma redução da viabilidade para $6,4 \pm 0,4$ log CFU/mL que se mantém perto deste valor até ser adicionada a camada 6 e 8 ($6,3 \pm 0,4$ e $6,1 \pm 0,6$ log CFU/mL, respetivamente). 	<p>Yucel Falco et al. (2017)</p>
<p>Encapsulamento através do método <i>Layer-by-Layer</i> de bactérias <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> com adsorção alternada de quitosano (CHI) e um polímero sintetizado a partir de plurônico (PLU) e ácido poliacrílico (PLA)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Condições de crescimento: 37°C a 250 rpm • Concentração de polímeros: 0,005 mM de CHI e 0,04 mM de PPP em 0,15 M de NaCl; pH=6 • LbL: bactérias centrifugadas a 4°C durante 5 min a 6000 rpm; tempo de deposição das camadas de 1h a 200 rpm à T=37°C • Deposição de 4 camadas alternadas • Liofilizadas e guardadas a 4°C • Viabilidade avaliada na presença de 20% m/v de sacarose 	<ul style="list-style-type: none"> • Potencial zeta: apresenta um padrão característico em zig zag apesar de não haver compensação completa de cargas após a adição do CHI; • Curva de crescimento: aumento de 2,8h no tempo de atraso após a adição da primeira camada de CHI. Após a adição da segunda e terceira camada o tempo de atraso manteve-se constante (12h) enquanto aumentou com a adição da quarta camada (19,5h). A taxa de crescimento aumenta de $0,18 \text{ h}^{-1}$ para $0,38 \text{ h}^{-1}$; • Viabilidade: resultados antes e após liofilização não demonstraram uma diferença significativa, à exceção das bactérias encapsuladas com 4 camadas que registou uma redução mais acentuada. 	<p>Quintana et al. (2017)</p>

3.2. Fruto-oligossacarídeos na preservação de bactérias probióticas

O efeito protetor de açúcares em processos que envolvam desidratação de bactérias é bastante conhecido. No entanto, o papel de substratos prebióticos, como os FOS, tem sido pouco explorado (Romano et al., 2015). Romano et al. (2018) usaram um xarope de *Prosopis nigra* para sintetizar FOS. Os *Prosopis nigra* contendo ou não o FOS sintetizado (*P. nigra* + FOS ou *P. nigra*) foram usados como matriz para estabilizar *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 durante o processo de liofilização e armazenamento. Ambas as matrizes apresentaram um efeito estabilizante durante a liofilização e o armazenamento durante 140 dias a 4°C, com resultados melhores comparativamente com a matriz de controle (20% m/v de sacarose).

Shu et al. (2012) estudaram o efeito de vários prebióticos com concentrações diferentes na sobrevivência e viabilidade de bactérias *Bifidobacterium bifidum* durante os processos de liofilização. Concluíram que um aumento da concentração de FOS conduzia a um aumento da percentagem de sobrevivência e da viabilidade de *Bifidobacterium bifidum* após liofilização, confirmando o efeito protetor do FOS durante os processos de liofilização.

Romano et al. (2016) sintetizaram FOS com várias composições a partir de um substrato inicial de sacarose e avaliaram o seu efeito protetor durante a liofilização e o armazenamento da bactéria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333. Foram estudados vários FOS sendo um deles comercial, dois FOS não purificados e dois FOS purificados. Este processo de purificação apresenta como principal objetivo a remoção de monossacarídeos. Foi demonstrado que os microrganismos liofilizados numa solução de FOS não purificado apresentaram atrasos no crescimento menores a resultados melhores do que os obtidos com a sacarose usado como referência. Pelo contrário, os FOS comercial e purificado originaram atrasos no crescimento mais elevados. Quando comparado a cultivabilidade após a liofilização com microrganismos não tratados foi observado que o uso de FOS não purificado e sacarose apresentam uma eficiência mais significativa que o uso de FOS purificado e comercial.

Romano et al. (2014) estudaram o efeito da adição de FOS em filmes de metilcelulose (MC) na estabilização de duas estirpes de *Lactobacilli*: a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 e *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. Este efeito foi estudado para várias concentrações de FOS e ao longo de dois efeitos que estão envolvidos na preparação do filme: o efeito osmótico da solução que vai formar o filme sobre as bactérias e o efeito da secagem num forno de ar forçado. A incorporação de 3% m/v de FOS na formulação do filme

de MC demonstrou um aumento a viabilidade da bactéria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333. A *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 demonstrou ser intrinsecamente mais resistente pois não foi observada perda de viabilidade na ausência de FOS.

Schwab et al. (2007) investigaram a influência da adição de vários crioprotetores incluindo o FOS na viabilidade de *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 durante o congelamento, liofilização e armazenamento. De um modo geral foi possível concluir que a proteção das membranas celulares com FOS preveniu danos durante o congelamento. A presença de FOS aumentou significativamente a sobrevivência das células na fase estacionária após a liofilização. Por outro lado, a sobrevivência das células na fase exponencial apresentou uma melhoria significativa após a liofilização. O mesmo acontece com as células na fase estacionária durante o armazenamento. Com isto, foi possível concluir que a presença de FOS apresentava um efeito protetor durante o congelamento, liofilização e armazenamento de bactérias *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 nas várias fases de crescimento.

Na Tabela 3 resumem-se as condições experimentais e os respectivos resultados e conclusões do uso de FOS como efeito protetor das bactérias.

Tabela 3 - Estudos do uso de fruto-oligossacarídeos para melhoria da viabilidade bacteriana.

Estudo	Condições experimentais	Resultados	Referência
<p>Uso de FOS sintetizado a partir de <i>Prosopis nigra</i> para estabilizar matrizes de <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> CIDCA 333 durante processos e liofilização e armazenamento</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Liofilização: amostras congeladas em azoto líquido; liofilizadas -45°C e a 0,04 mbar • Armazenamento a 4°C durante 140 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • Após liofilização, houve uma redução da viabilidade de $0,78 \pm 0,06$ e $0,83 \pm 0,06$ log CFU/ mL para matrizes sem e com FOS, respetivamente; • Após 140 dias de armazenamento a 4°C, houve um decaimento logaritmo da viabilidade de $< 0,8$ CFU/mL para todos os casos à exceção da sacarose que apresentou um decaimento de 2 CFU/mL após 100 dias. 	<p>Romano et al. (2018)</p>
<p>Efeito de várias concentrações de FOS na sobrevivência e viabilidade de bactérias <i>Bifidobacterium bifidum</i> durante os processos de liofilização</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Liofilização: amostras com várias concentrações de FOS foram congeladas num refrigerador criogénico (-80°C) durante 12h-24h; liofilizadas durante 24h 	<ul style="list-style-type: none"> • Percentagem de sobrevivência: aumento acentuado de 25,27% (0% de FOS) para 82,97% (12% de FOS), seguido de uma diminuição para 76,37% (16% de FOS) e um retorno para 81,87% (20% de FOS); • Viabilidade: atingiu o pico com um valor de $1,54 \times 10^{11}$ CFU/g (4% de FOS) e um valor de $1,18 \times 10^{11}$ CFU/g (20% de FOS). 	<p>Shu et al. (2012)</p>
<p>Síntese de FOS de várias composições a partir de um substrato inicial de sacarose e avaliado o seu efeito protetor durante a liofilização e o armazenamento da bactéria <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> CIDCA 333</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Liofilização: amostras congeladas em azoto líquido e liofilizadas a -45°C e a 0,04 mbar • Armazenamento a 4°C durante 80 dias 	<ul style="list-style-type: none"> • FOS não purificados apresentaram um tempo de atraso reduzido (aprox. 6h). Estes valores foram mais baixos que os microrganismos liofilizados na presença de sacarose (8,5h); • FOS purificado e comercial apresentam maiores tempos de atraso; • A cultivabilidade de microrganismos liofilizados com FOS não purificado e com sacarose não foi significativa quando comparado com microrganismos não tratados; • A cultivabilidade de microrganismos liofilizados com FOS purificados e FOS comercial foi significativamente mais baixa que os de controlo. 	<p>Romano et al. (2016)</p>

Efeito da inclusão de FOS em filmes de metilcelulose (MC) para estabilização de duas estirpes de *Lactobacilli*: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 e *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114

- Pellets diluídos em 17-25 mL da solução que vai formar o filme de maneira a obter $1,1 \times 10^{10}$ CFU/mL de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 e $2,7 \times 10^{12}$ CFU/mL de *L. plantarum* CIDCA 83114

• Após a adição das bactérias no filme não houve descida significativa da viabilidade mesmo na presença de FOS;

• Após o processo de desidratação houve uma redução na viabilidade da *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 na ausência de FOS ($\log N/N_0 = -3,18 \pm 0,33$). Um aumento da concentração de FOS até 3% m/v demonstrou um efeito protetor. No caso da *L. plantarum* CIDCA 83114 demonstrou uma maior resistência ao processo de desidratação que apresentou uma diminuição de $\log N/N_0 = -1,45 \pm 0,38$ sem FOS. A adição de FOS até 5% m/v não demonstrou um aumento significativo na viabilidade.

Romano et al. (2014)

Efeito da influência da adição de FOS na viabilidade de *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 durante congelamento, liofilização e armazenamento

- Congelamento a -80°C
- Liofilização: Células congeladas liofilizadas a -50°C
- Armazenamento das amostras embrulhadas em parafilme durante 14 dias à temperatura ambiente e no escuro

• Células na fase estacionária com FOS apresentaram uma pequena melhoria na viabilidade, mas não significativa após o congelamento;

• A adição de FOS providenciou a melhor proteção das células na fase estacionária durante a liofilização;

• A sobrevivência das células na fase exponencial foi significativamente melhorada na presença de FOS durante a liofilização;

• A presença de FOS melhorou significativamente a sobrevivência das células na fase estacionária durante o armazenamento;

• A contagem das células na fase exponencial durante o armazenamento não difere distintamente entre os vários crioprotetores.

Schwab et al. (2007)

Capítulo II – Parte Experimental

Neste capítulo é feita uma descrição detalhada de todos os materiais, bem como dos procedimentos experimentais e respectivos métodos de caracterização adotados neste projeto.

1. Materiais

Cloreto de Sódio (NaCl) (Sigma-Aldrich, 99%) Hidróxido de Sódio (NaOH) (VWR Chemicals), Ácido Clorídrico (HCl) (VWR Chemicals, 37%), Ácido Acético (CH₃COOH) (VWR Chemicals, 100%), Quitosano (Acros Organics, Mw: 100 000 - 300 000 g/mol), Alginato de sódio (Alfa Aesar), Pectina (Fisher Chemicals, Citrus – 121 grade), Carboximetilcelulose (CMC) (Fisher Chemicals), FOS (CIDCA – CONICET), Man, Rogosa & Sharoe (MRS) *broth* (Himedia), Agar powder (labkem).

2. Equipamentos

- Balança (Radwag)
- Medidor de pH (Ezdo PL-700PC)
- Câmara de fluxo laminar (Faster two 30)
- Autoclave (Trade Raypa)
- Vórtex (Thermolyne 37600 Mixer)
- Centrífuga (Hermle LaborTechnik Z366)
- Liofilizador (Telstar LyoQuest)
- Estufa (Mettler modell 600)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments 2016)
- Leitor de microplacas (Synergy HTX multi-mode microplate reader da BioTek)

3. Métodos

Nesta secção descreve-se a componente laboratorial deste projeto que se dividiu, essencialmente, em três fases: i) preparação e esterilização das soluções poliméricas bem como esterilização de todo o material a usar; ii) encapsulamento por LbL de três bactérias diferentes, a *Lactobacillus plantarum* WCFS1, *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 e *Lactobacillus*

delbrueckii subsp. *bulgaricus* CFL1 com os polímeros selecionados; iii) caracterização das bactérias encapsuladas e não encapsuladas.

3.1. Preparação de soluções (NaCl, polímeros e FOS)

A solução salina utilizada ao longo de todo o procedimento experimental consiste numa solução de NaCl de concentração 0,15 M, e foi utilizada para a preparação das soluções poliméricas e nos processos de lavagem entre cada etapa do encapsulamento.

Inicialmente foram preparadas todas as soluções poliméricas com concentração de 10 mg/mL (1% m/v). No entanto, ao longo do procedimento foi possível verificar uma elevada aglomeração das bactérias, o que dificultava o processo de encapsulamento devido à difícil desintegração dos aglomerados para obter uma ressuspensão homogênea (cf. Figura 11). Desta forma, as concentrações foram alteradas para 1 mg/mL (0,1% m/v) (Priya et al., 2011). As soluções de quitosano (CHI), alginato (ALG), pectina (PEC) e CMC foram assim preparadas dissolvendo cada polímero em soluções salinas de 0,15 M. No caso do quitosano (CHI), foi adicionado ácido acético na concentração de 1% v/v à solução salina para permitir a dissolução. O pH de todas as soluções foi ajustado para o valor de 6, com soluções de 0,1 M de NaOH e HCl, conforme o caso. Com efeito, a pH 6 os grupos amina do quitosano estão protonados (NH_3^+) e os grupos carboxílicos do alginato, pectina e do CMC estão desprotonados (COO^-), assegurando uma forte interação electrostática entre os polieletrólitos.

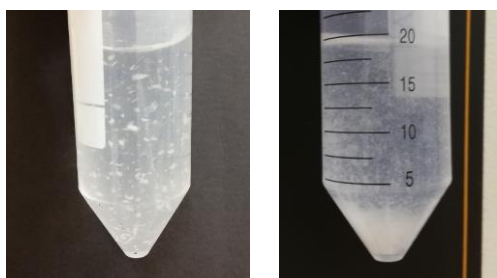


Figura 11 - Ressuspensão após a adição de polímeros com concentrações de 1% m/v (direita) e 0,1% m/v (esquerda).

A solução de FOS foi preparada em solução salina com uma concentração de 2% m/v. Foram utilizados o FOS 6024 purificado e o FOS candidato 6 purificado cujas composições encontram-se na Tabela 4, expressas em % (m/m).

Tabela 4 - Composições dos FOS usados expressas em % (m/m).

FOS	Frutose	Glicose	Sacarose	DP3	DP4	DP5	DP6
F6024 purificado	2,8 ± 1,6	10,4 ± 2,6	13,9 ± 4,2	18,4 ± 1,5	41,8 ± 8,4	12,7 ± 0,4	0,0
Candidato 6 purificado	3,5 ± 2,3	9,0 ± 3,2	9,0 ± 3,2	23,4 ± 4,3	36,7 ± 4,4	11,6 ± 3,2	0,0

*DP – Grau de polimerização

3.2. Preparação do meio de cultura com e sem agar

Para cada ensaio de encapsulamento foi necessário preparar cerca de 315 mL de meio de cultura MRS *broth* (55 g/L) de modo a assegurar: 280 mL para a inoculação das bactérias, 30 mL para a reativação das culturas *starter*, e 5 mL para a espectrofotometria de densidade ótica (D.O.).

Já para a avaliar a viabilidade das bactérias foi necessário preparar as placas de agar, para o que se usou uma mistura de agar (15g/L) em meio MRS (55 g/L), posteriormente esterilizada. Com a mistura ainda quente foram distribuídos cerca de 15 ml por cada placa em condições assépticas.

3.3. Encapsulamento

Todo o material (tubos de *ependorfs*, tubos de *falcon*, pontas de pipetas e frascos) e todas as soluções aquosas (soluções poliméricas, solução tampão salina e meio de cultura com e sem agar) usadas ao longo do procedimento experimental foram previamente esterilizadas na autoclave (Trade Raypa), durante 15 minutos a 121°C. Todo o procedimento experimental foi realizado sob condições assépticas numa câmara de fluxo laminar (Faster two 30), de modo a prevenir contaminações.

3.3.1. Reativação das bactérias e inóculo

Antes de iniciar o encapsulamento foi necessário multiplicar as bactérias uma vez que se encontravam congeladas numa solução de glicerina a 30% (v/v). Foram utilizadas bactérias congeladas a -20°C e para estirpe *Lactobacillus plantarum* WCFS1 foram também utilizadas bactérias congeladas a -80°C. Os microrganismos (1% v/v) foram reativados em 5 mL de meio MRS *broth*, incubados a 37°C (para a estirpe *L. plantarum*) ou 42°C (para a estirpe *L. bulgaricus*) e em condições aeróbicas sem agitação, durante um período de cerca de 14 horas. Esta reativação das bactérias (*starter*) foi realizada pelo menos duas vezes antes da inoculação e apenas num dos casos em que foi estudado o efeito do FOS candidato 6. Para os restantes

casos a inoculação foi realizada a partir das bactérias congeladas. A cultura resultante da reativação bacteriana (ou as bactérias congeladas) foi inoculada (1% v/v) em 280 mL de meio MRS *broth* e incubados sob as mesmas condições referidas anteriormente, até atingir a fase estacionária de crescimento das bactérias. Este processo de multiplicação bacteriano está esquematizado na Figura 12.

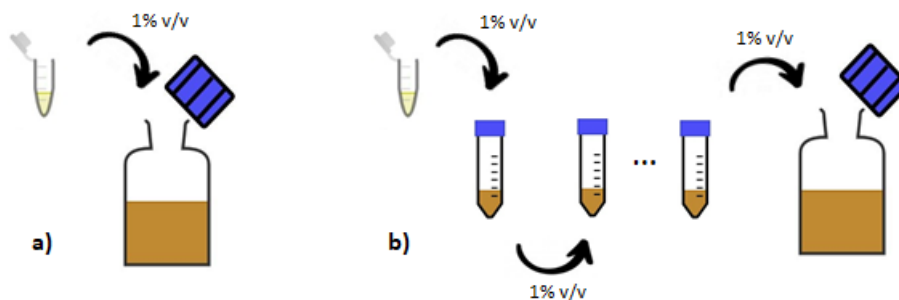


Figura 12 - Representação esquemática da multiplicação das bactérias: diretamente das amostras congeladas (a); e através da reativação prévia das bactérias (b).

Após este crescimento aeróbico das bactérias a suspensão foi dividida em 14 tubos de *falcon*, cada um com 20 mL, e centrifugada durante 10 min a 6000 rpm. O sobrenadante foi descartado, enquanto os *pellets* foram ressuspensos em 20 mL de solução salina com recurso a um vórtex (Thermolyne 37600 Mixer) e posteriormente centrifugados nas mesmas condições. Este processo de lavagem foi repetido duas vezes. Após os processos de lavagem e descarte do sobrenadante, foram separados dois tubos de *falcon* para futuros testes. Os *pellets* de um tubo foram ressuspensos em 4 mL de solução salina (B) e o outro tubo em 4 mL de solução de FOS (B|f), de maneira a fazer uma comparação das bactérias não encapsuladas com e sem FOS. O conteúdo de ambos os tubos de *falcon* foi dividido em tubos de *ependorf*, cada um contendo 0,5 mL. Dois destes tubos de *ependorf* foram armazenados no frigorífico para futuros testes enquanto os restantes foram congelados a -20°C para posterior liofilização. Os restantes 12 tubos de *falcon* seguiram para o processo de encapsulamento.

3.3.2. Encapsulamento por LbL

As bactérias foram maioritariamente encapsuladas com duas camadas poliméricas, com as combinações de polímeros esquematizados na Figura 13. Uma vez que as bactérias apresentam carga superficial negativa, foi escolhido o quitosano como primeira camada por ser um polieletrólito com carga positiva. No entanto, para bactérias com carga superficial negativa mas com valor absoluto próximo de zero, como era o caso da *Lactobacillus plantarum* WCFS1, foi ainda testado o alginato como primeira camada. Desta forma, para bactérias encapsuladas com quitosano como primeira camada foram testados três materiais diferentes (com cargas

superficiais negativas) para a segunda camada: alginato, pectina e CMC. Já no caso das bactérias encapsuladas com alginato na primeira camada, foi adicionado como segunda camada o quitosano.

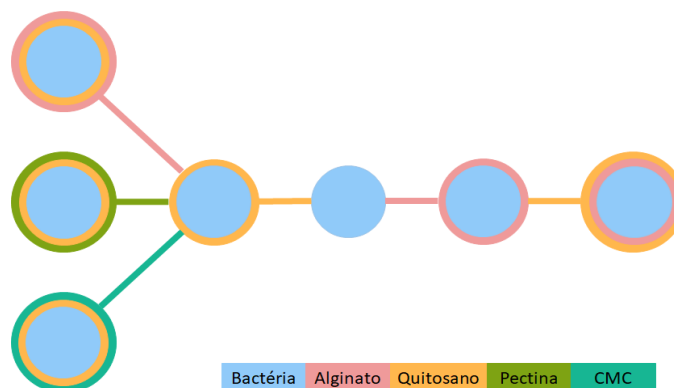


Figura 13 - Representação esquemática da deposição das camadas de revestimento pelo método Layer-by-Layer.

A Figura 14 esquematiza o processo de encapsulamento utilizado. Os 12 tubos de *falcon* (resultantes da fase anterior) contendo apenas *pellets* de bactérias foram usados para o encapsulamento por LbL. Para o encapsulamento da primeira camada foram adicionados 20 mL de quitosano em 8 tubos de *falcon* e 20 mL de alginato nos 4 tubos restantes. A deposição foi realizada numa estufa a 37°C (para a estirpe *L. plantarum*) ou 42°C (para a estirpe *L. bulgaricus*), durante 1 hora e sob agitação constante de 100 rpm. Após esta incubação, o quitosano e alginato em excesso foram removidos por centrifugação durante 10 min a 6000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* lavados duas vezes, como descrito anteriormente. Dois tubos com quitosano e dois tubos com alginato foram reservados para serem ressuspensos em 4 mL de solução salina (B|CHI e B|ALG) e em 4 mL de solução de FOS (B|CHI|f e B|ALG|f). Os conteúdos destes 4 tubos foram distribuídos em *ependorfs* e reservados nas mesmas condições que no caso das bactérias sem encapsulamento. A segunda camada foi depositada de modo semelhante. Aos 6 tubos com quitosano foram adicionados 20 mL de alginato em 2 tubos, 20 mL de pectina em outros 2, e, por fim, 20 mL de CMC nos restantes. A cada um dos 2 tubos com alginato foram adicionados 20 mL de quitosano. Estes 8 tubos foram incubados, centrifugados e lavados nas condições anteriormente descritas. Uma vez mais, para cada 2 tubos, um foi ressuspensado com solução salina (B|CHI|ALG, B|CHI|PEC e B|CHI|CMC, B|ALG|CHI) e outro com 4 mL de solução de FOS (B|CHI|ALG|f, B|CHI|PEC|f e B|CHI|CMC|f, B|ALG|CHI|f). Foram posteriormente distribuídos em *ependorfs* e armazenados como nas condições anteriores.

Nota: o f representa a presença de FOS.

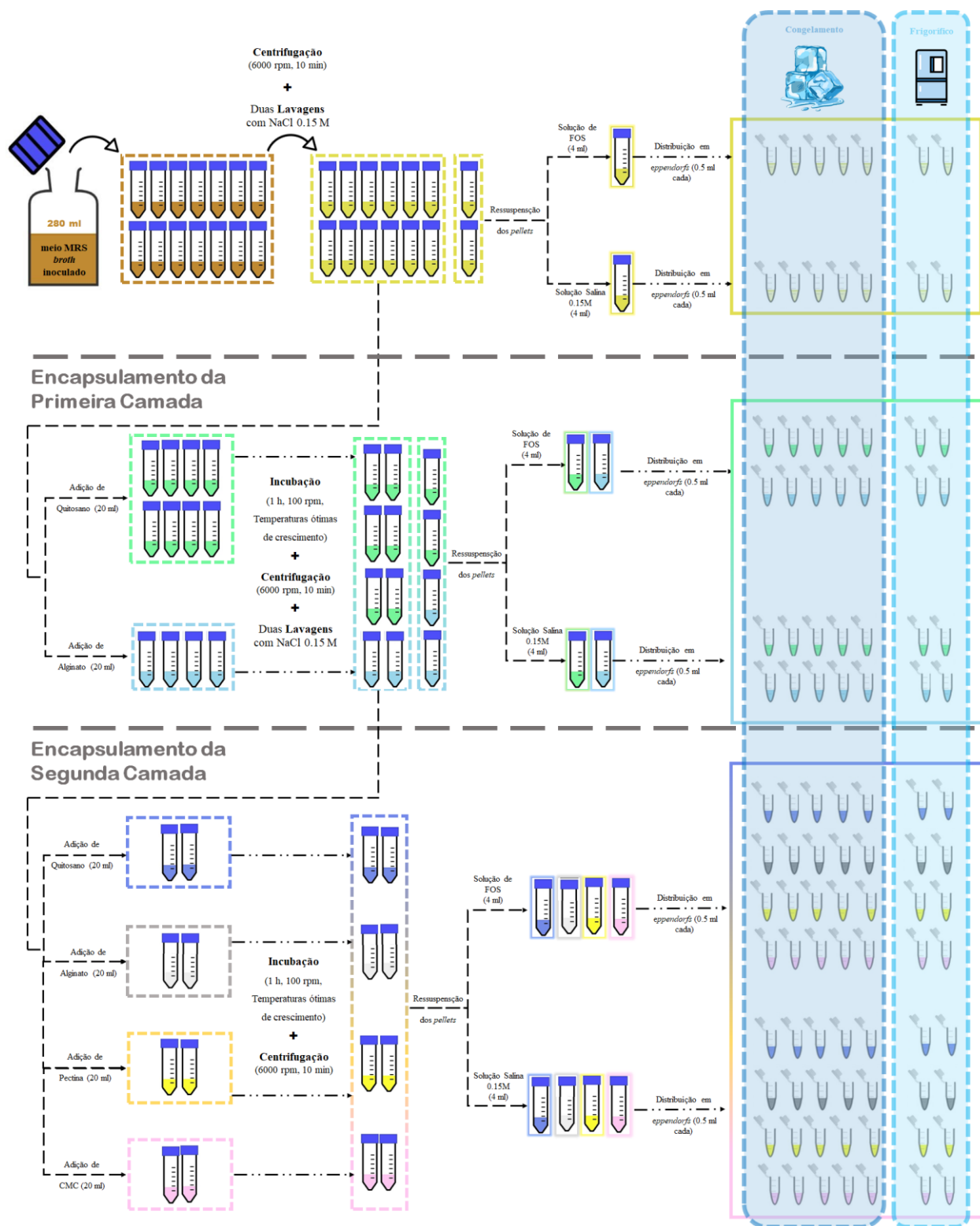


Figura 14 - Representação esquemática do procedimento de encapsulamento das bactérias por LbL.

3.4. Liofilização

O método de liofilização é muito usado na produção de culturas *starter* de BAL, e para preservar e permitir um armazenamento a longo prazo. Enquanto os processos de armazenamento a curto prazo, como o congelamento a -20°C , permitem manter a viabilidade durante um período que varia de alguns meses até 2 anos, apesar de a formação de gelo poder causar danos, a liofilização permite manter uma viabilidade durante cerca de 30 anos (Petti & She, 2015).

Este processo combina o método de congelamento com o método de desidratação; o congelamento dos organismos e posterior redução da pressão (com recurso a vácuo) promovem a sublimação da água congelada. Uma das vantagens deste processo é a de evitar a oxidação e a transição para a fase líquida (Chavarri et al., 2012; Petti & She, 2015). Apesar de ser uma tecnologia bastante cara e complexa, é a mais utilizada em processos de secagem de probióticos.

Durante os processos de secagem as células estão sujeitas a várias tensões, responsáveis pelos danos na membrana celular e consequente perda de viabilidade celular. No entanto, o processo de liofilização é o que apresenta menos riscos quando comparado com outros, pois as baixas temperaturas e a sublimação da água são menos prejudiciais do que, por exemplo, as elevadas temperaturas do *spray-drying* (Corona-Hernandez et al., 2013; Riaz & Masud, 2013). No entanto, o método de liofilização apenas oferece estabilidade durante o armazenamento e não durante o consumo. Esta é a razão pela qual os processos de encapsulamento têm sido desenvolvidos, isto é, para melhorar a estabilidade das bactérias no trato GI e assim otimizar os efeitos do consumo dos probióticos (Chavarri et al., 2012). Neste trabalho, as amostras foram liofilizadas durante 24 horas numa câmara de liofilização (Telstar LyoQuest) a uma pressão de 0,1 bar sob condições de vácuo. Após a liofilização foram guardadas a 25°C em sílica gel num exsiccador.

3.5. Caracterização

A eficiência do método de encapsulamento e do uso de FOS foi avaliada por diferentes métodos de caracterização, para cada formulação, designadamente através da determinação do potencial zeta, da curva de crescimento e da viabilidade das bactérias, estas últimas obtidas antes e depois do processo de liofilização.

3.5.1. Viabilidade bacteriana

A contagem de células viáveis para as bactérias encapsuladas e não encapsuladas, antes e depois da liofilizadas, foi realizada através de um método de placas. Neste, uma gota (10 μ L) de uma suspensão de células diluídas em solução salina é inoculada assepticamente numa secção de uma placa contendo MRS agar. A placa é dividida em 8 secções onde são inoculadas suspensões com duas diluições diferentes e em duplicado (cf. Figura 15). As placas são posteriormente incubadas aerobicamente a 37°C (para a estirpe *L. plantarum*) ou 42°C (para a estirpe *L. bulgaricus*) durante 48 horas. Cada célula viável originará uma colónia visível macroscopicamente. A viabilidade é avaliada antes e após cada adição de camada de revestimento e após a liofilização nos dias 0 e 15 com o intuito de inferir sobre a viabilidade das bactérias a longo prazo. Os dados são expressos em log (CFU/mL) e os resultados apresentados em termos da média dos valores obtidos das diferentes diluições \pm desvio padrão.

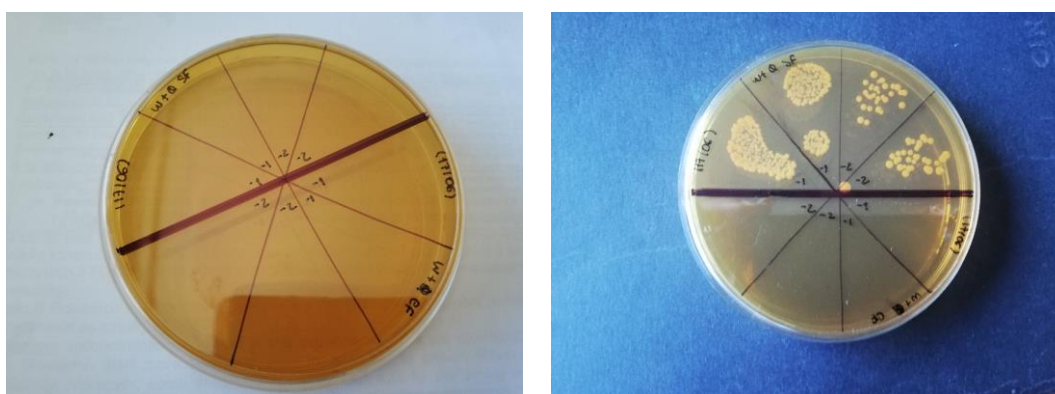


Figura 15 - Placa contendo MRS agar dividida em 8 secções antes da inoculação (esquerda) e placa inoculada após incubação (direita).

3.5.2. Potencial zeta (ζ)

As nanopartículas apresentam uma carga superficial que atraem uma fina camada de contra-íões à sua superfície. Essa camada (externa) é chamada camada *Stern*. Esta dupla camada de íões move-se com a nanopartícula à medida que esta se difunde com a solução. O potencial elétrico na fronteira dessa dupla camada é conhecido como potencial- ζ (A. Kumar & Dixit, 2017). Ou seja, é a diferença de potencial no plano de cisalhamento que ocorre entre o fluido na qual a partícula está dispersa e a camada de fluido que contém os íões de carga oposta que estão associados à partícula (Selvamani, 2018; Shah et al., 2017). O potencial- ζ é determinado a partir da mobilidade das partículas sob o efeito de um campo elétrico. Esta mobilidade dependerá da carga efetiva da superfície da partícula (Shah et al., 2017). Quando aplicada uma voltagem nos elétrodos as partículas vão se mover para o elétrodo com carga oposta. Quanto

maior a carga da partícula mais rapidamente esta se move. É medida a velocidade de deslocação da partícula (mobilidade eletroforética) cujo valor está relacionado com o potencial- ζ através do método M3 PALS (espalhamento de luz com análise de fases) (Malvern Panalytical, 2020). O potencial- ζ informa sobre a carga superficial das partículas e permite avaliar as interações eletrostáticas entre as bactérias e as camadas de revestimento (Larsen et al., 2018). A análise do potencial- ζ é empregue muitas vezes para acompanhar uma funcionalização ou modificação da superfície, permitindo assim verificar a viabilidade do método LbL (A. Kumar & Dixit, 2017).

A carga superficial das bactérias não encapsuladas e das bactérias encapsuladas após a adição de cada camada de revestimento foi medida usando um *zetasizer* Nano ZS (Malvern Instruments 2016) com o objetivo de verificar a deposição das camadas de revestimento. Foi introduzida uma solução diluída (10x em água destilada) na célula de medição. Cada resultado adiante reportado corresponde à média \pm desvio padrão de 5 leituras.

3.5.3. Leitor de microplacas

A avaliação do crescimento bacteriano é um elemento muito importante no presente contexto. Um dos métodos a que mais se recorre para acompanhar o crescimento destes microrganismos é espectrofotometria de densidade ótica (D.O.). Trata-se de um método ótico que se baseia na determinação da quantidade de luz que é dispersa por uma suspensão, neste caso de células. No entanto, apesar de ser rápido é um método indireto que não permite distinguir as células viáveis das não viáveis uma vez que apenas deteta a intensidade da luz que não é desviada pela suspensão de bactérias.

Para avaliar o efeito do revestimento no crescimento bacteriano foram realizadas as curvas de crescimento antes e após a adição de cada camada de revestimento e após a liofilização. Para isso, recorreu-se ao uso de um leitor de microplacas (Synergy HTX multi-mode microplate reader da BioTek) cuja absorvância foi ajustada para 600 nm. Foi utilizada uma microplaca com 96 poços em que em cada poço foram colocados 90 μ L de meio de cultura à qual foram adicionados 10 μ L de cada suspensão de bactérias. A cinética de crescimento foi avaliada durante 48 horas, registando valores hora a hora, através de uma densidade ótica (D.O.), ou absorvância, de 600 nm e a uma temperatura ótima de crescimento de cada bactéria. Cada ensaio foi realizado com duas réplicas.

As curvas de crescimento foram ajustadas ao modelo

$$Y(t) = \frac{Y_f}{1 - e^{-k(t-t_0)}} + Y_i \quad (3.1)$$

em que $Y(t)$ é a absorbância a 600 nm, Y_i o seu valor inicial, no tempo $t \rightarrow 0$, Y_f o seu valor final no tempo $t \rightarrow \infty$, t_0 o tempo correspondente ao ponto inflexão sigmóide, e k o parâmetro da taxa de crescimento. O tempo de atraso (t_{lag}) foi calculado com base na intersecção da tangente à curva em $t = t_0$ com o eixo $Y = Y_i$. Os valores de Y foram normalizados de modo a restringir a gama de variação ao intervalo $[0,1]$. ΔN (%), definido como

$$\Delta N(\%) = \left(\frac{D.O.f}{D.O.i} - 1 \right) * 100 \quad (3.2)$$

em que $D.O.f$ e $D.O.i$ representam as densidades óticas final e inicial, respetivamente, serve para comparar a variação percentual do número de bactérias entre amostras.

Capítulo III – Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e analisados comparativamente os resultados obtidos antes e após a liofilização. Esta análise é feita com base nas variáveis de estudo investigadas ao longo de cada ensaio LbL de cujo conjunto dá conta a Tabela 5.

Tabela 5 - Variáveis de estudo presentes em cada ensaio LbL.

Variáveis de Estudo						
Ensaio	Bactéria	FOS	1ª camada	2ª camada	Starter*	T congelamento
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	6024 purificado	CHI	PEC; ALG; CMC	Não	-20°C
2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CFL1	6024 purificado	CHI	PEC; ALG; CMC	Não	-20°C
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114	6024 purificado	CHI	PEC; ALG; CMC	Não	-20°C
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Candidato 6 purificado	CHI; ALG	PEC; ALG; CMC CHI	Não	-80°C
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Candidato 6 purificado	CHI; ALG	PEC; ALG; CMC CHI	Sim	-80°C

*Starter – Reativação prévia das bactérias

1. Potencial zeta- ζ

O potencial- ζ permite avaliar o método LbL, ou seja, verificar se a deposição das camadas de revestimento é bem-sucedida e se essa deposição é traduzida em camadas com cargas superficiais alternadas. Uma vez que as bactérias apresentam uma carga superficial negativa devido aos grupos ácidos ionizados presentes nas paredes celulares, estas atuam como um substrato para a adsorção do quitosano como primeira camada, visto que os grupos amina deste se encontram protonados nas condições de pH utilizadas (Priya et al., 2011). Depois de adsorverem o quitosano, a carga superficial das bactérias conjugadas com o quitosano deverá apresentar um valor de potencial- ζ positivo ou menos negativo. Da mesma forma, quando a última camada de revestimento for um polímero com carga negativa, como o alginato, a pectina ou a CMC, as bactérias formuladas com estes elementos deverão exibir um potencial- ζ mais negativo. Foi também avaliado o caso em que é adicionado alginato como primeira camada e quitosano como segunda, mas apenas para a bactéria *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem e

Capítulo III – Resultados e Discussão

com a presença de FOS candidato 6 purificado. Isto deve-se ao facto de esta estirpe apresentar uma carga superficial negativa mas com valor absoluto próximo de zero. Os resultados apresentados nas Figuras 16 e 17 são resultados representativos dos padrões encontrados e dizem respeito ao potencial- ζ das bactérias *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 sem e com a presença de FOS 6024 purificado e *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem starter, e sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado, respetivamente. Os restantes resultados encontram em anexo (anexo A).

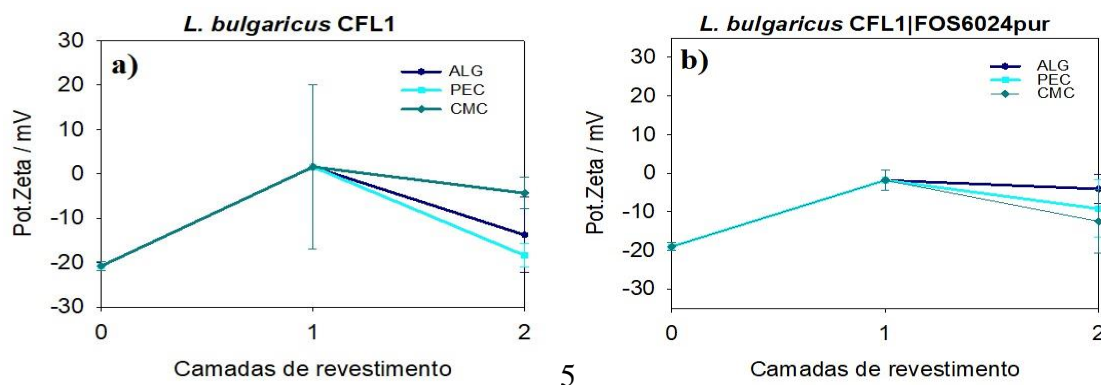


Figura 16 - Resultados do potencial- ζ relativos ao Ensaio 2: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1, sem FOS (a); e com FOS (b).

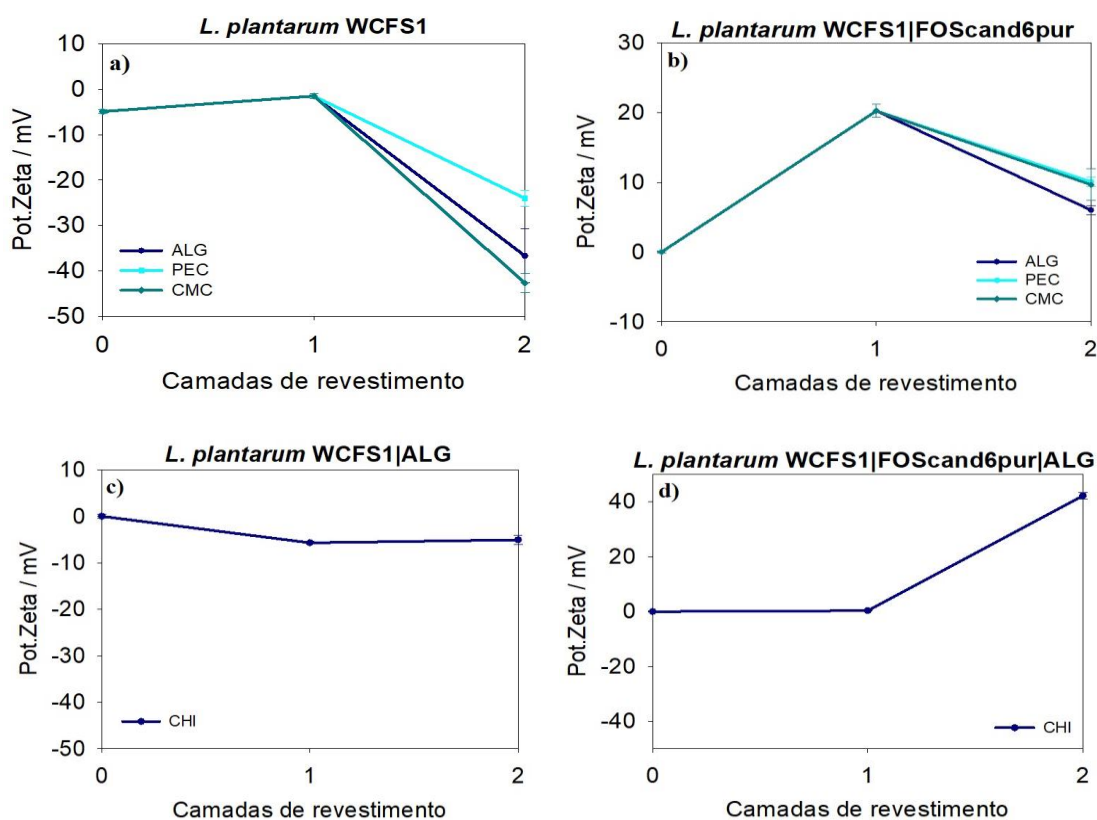


Figura 17 - Resultados do potencial- ζ relativos ao Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com quitosano na primeira camada, sem FOS (a); e com FOS (b); e com alginato na primeira camada, sem FOS (c); e com FOS (d).

De um modo geral, os resultados permitem concluir que a alternância de valores mais ou menos negativos sugere uma deposição dos polímeros na superfície das bactérias bem-sucedida, apresentando um padrão característico em zig-zag. Nem sempre há uma compensação de cargas durante a deposição do quitosano como primeira camada, uma vez que a pH 6 o quitosano encontra-se perto do seu pKa, e conseqüentemente uma fração significativa dos seus grupos amina não se encontra protonada, ou seja, há uma baixa densidade de cargas positivas do quitosano que conseqüentemente poderá levar à ocorrência de aglomeração de bactérias que ocorre durante a centrifugação (Jonas et al., 2018). O efeito da presença de FOS não é claro, e varia para os dois tipos utilizados. No caso do FOS candidato 6 purificado é possível verificar que a sua presença torna os valores do potencial- ζ mais positivos quando é usado o quitosano ou o alginato na primeira camada, o que não acontece com o FOS 6024 purificado. Em alguns casos (cf. Anexo A) a deposição das camadas relativamente à adição da primeira camada de quitosano não terá sido bem-sucedida. São disso exemplo o caso em que foi usada a bactéria *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com a adição de FOS 6024 purificado ou a *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com *starter* e sem adição de FOS candidato 6 purificado, em que o potencial- ζ apresentou valores ainda mais negativos (de $-4,96 \pm 0,19$ para $-9,57 \pm 1,99$ mV e de $-6,51 \pm 0,50$ para $-9,69 \pm 0,66$ mV, respetivamente). Um outro caso foi a adição de CMC com FOS à bactéria *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 que apresenta valor positivos (de $-2,63 \pm 0,73$ mV para $3,05 \pm 5,21$ mV). Analisando os gráficos que dizem respeito ao encapsulamento com alginato como primeira camada (Figura 17 – (c) e (d)), verifica-se uma diferença muito reduzida entre os valores, o que pode indicar uma deposição incompleta do alginato na superfície das bactérias e/ou sugerir que houve aglomeração das bactérias devido ao baixo valor absoluto do potencial- ζ (muito próximo de zero) que exibiram. De um modo geral, os valores do desvio-padrão (Anexo A) indicam que os resultados são precisos, ainda que tal não se aplique num importante número de casos, como CMC para a bactéria *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem e com FOS 6024 purificado, o ALG sem FOS 6024 purificado e PEC com FOS 6024 purificado para a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1, e CMC sem e com FOS 6024 purificado para a *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114.

2. Viabilidade bacteriana

A viabilidade bacteriana é um método na qual se atesta a capacidade de as bactérias se reproduzirem, determinando o número de células viáveis no volume de suspensão inoculado. Este teste foi realizado para avaliar como o método de encapsulamento, a liofilização (secção

2.1) e o tempo de armazenamento (secção 2.2) afetam a viabilidade das bactérias encapsuladas e não encapsuladas.

2.1. Viabilidade após encapsulamento e após liofilização

Na Figura 18 encontram-se os resultados de viabilidade antes e após liofilização para o ensaio 3 (Figura 18-(a)), 4 (Figura 18-(b)), e 5 (Figura 18-(c)).

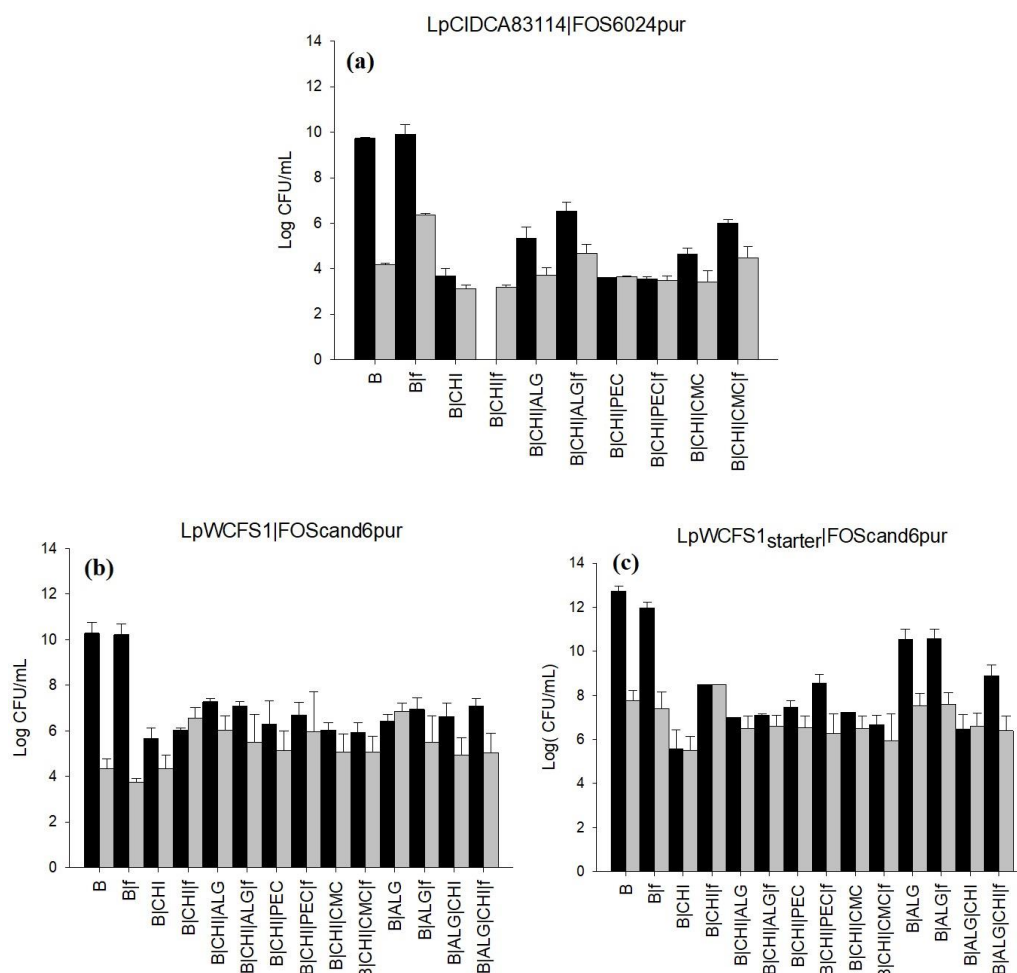


Figura 18 - Viabilidade celular antes e após o processo de encapsulamento relativa ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado (a); Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado (b); Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado (c). As barras pretas correspondem à viabilidade antes de liofilização, ou seja, após encapsulamento, e as barras cinza à viabilidade após liofilização.

Os resultados na Figura 18 sugerem que a adição da primeira e segunda camada, ainda que sem um impacto dramático na maioria dos casos, não apresentaram um efeito positivo na viabilidade bacteriana por comparação com as bactérias não encapsuladas. Isto poderá explicar-se pela aglomeração celular que pode ocorrer durante o encapsulamento, impedindo que a bactéria se liberte do material de encapsulamento e cresça (Yucel Falco et al., 2017). É também possível verificar que a adição da segunda camada demonstra ser essencial para a sobrevivência das bactérias, uma vez que de um modo geral apresentam valores de viabilidade superiores às

restantes bactérias encapsuladas. Isto é particularmente notório quando o quitosano é a primeira camada, e poderá explicar-se pelo seu efeito como inibidor de crescimento probiótico decorrente da sua ação citotóxica, ou seja, devido às suas propriedades anti-bacterianas. Esse efeito está relacionado com a força eletrostática entre o grupo amina protonado e a superfície negativa das bactérias, resultando numa inibição de crescimento (Groboillot et al., 1993; Jonas et al., 2018; Raafat & Sahl, 2009). O efeito protetor do FOS é observado na bactéria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 (cf. Anexo B: Figura B.1 (b) e Tabela B.2)) uma vez que apenas as bactérias com FOS sobreviveram ao processo de encapsulamento. Nos restantes casos não existem resultados para as condições estudadas que permitam tirar conclusões sobre o efeito do FOS. Por outro lado, o efeito do *starter* (Figura 18-(c)) favorece a viabilidade, conforme se conclui fazendo uma comparação com os resultados da Figura 18-(b). É também possível observar esse efeito na Figura 19, uma vez que o aumento de biomassa corre visivelmente logo após a incubação. Observa-se ainda que as bactérias guardadas a -20°C (cf. Anexo B) apresentam menor viabilidade que as bactérias guardadas a -80°C (cf. Figura 18-(b) e (c)), o que se explica pelo facto de os métodos de preservação a curto prazo (congelamento a -20°C) perdem viabilidade ao longo do tempo (Petti & She, 2015).



Figura 19 - Meio MRS inoculado após incubação para o caso em que a inoculação é realizada a partir de bactérias congeladas (direita) e quando é realizada a partir da reativação previa das bactérias (*starter*)(esquerda).

Fazendo uma análise comparativa entre os resultados após encapsulamento e após liofilização (cf. Figura 18), observa-se neste último caso uma menor perda de viabilidade nas bactérias encapsuladas do que nas não encapsuladas. Por outro lado, verifica-se que a viabilidade decresce por efeito da liofilização quando comparado com as bactérias encapsuladas. Isto poderá estar relacionado com a remoção dos cristais extracelulares de água durante o processo de liofilização, destabilizando a integridade estrutural das paredes celulares. Estes resultados indicam que as camadas poliméricas adicionadas no encapsulamento são capazes de proteger as bactérias durante os processos de congelamento e liofilização.

2.2. Viabilidade após 15 dias de armazenamento

Na Figura 20 apresentam-se os resultados de viabilidade após 15 dias de armazenamento para os ensaios em que este parâmetro foi avaliado, ensaios 1 (Figura 20-(a)), 4 (Figura 20-(b)), e 5 (Figura 20-(c)).

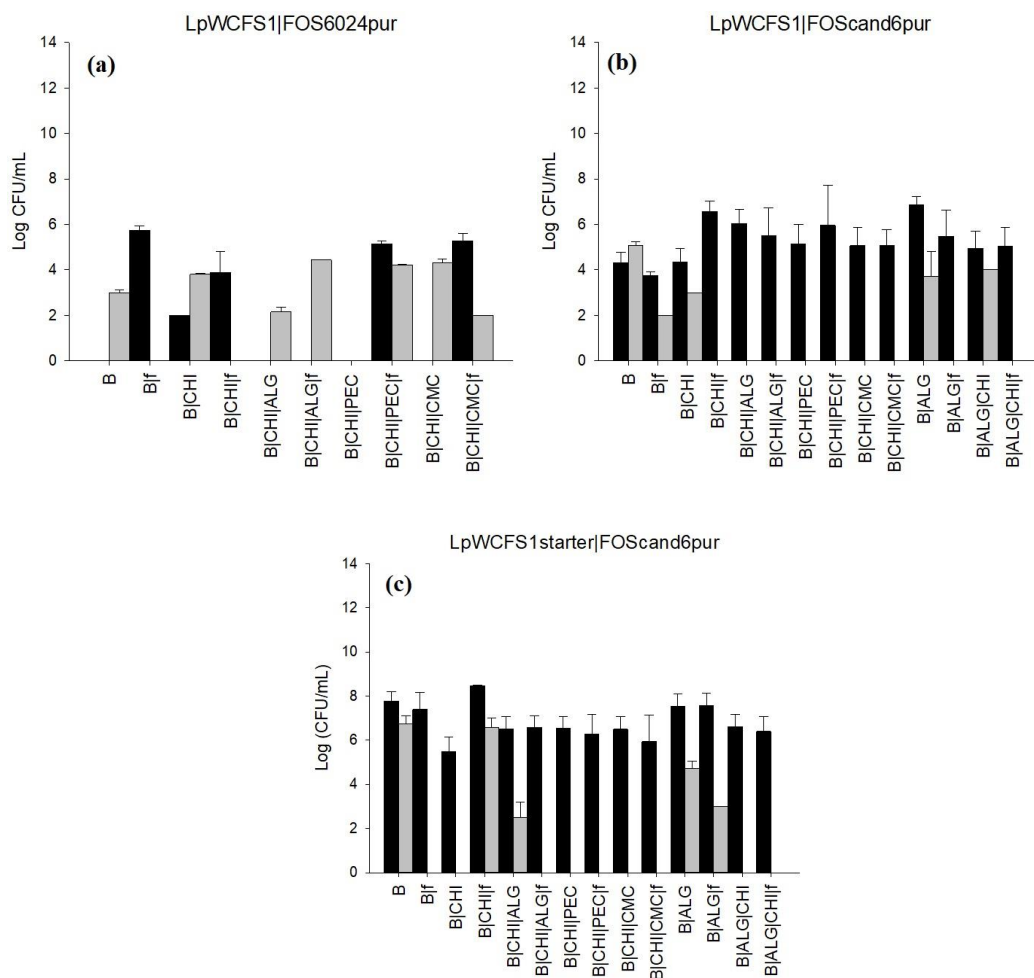


Figura 20 - Viabilidade celular após 15 dias de armazenamento das bactérias encapsuladas e não encapsuladas relativa ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado (a); Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem starter, e sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado (b); Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com starter, e sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado (c). As barras pretas correspondem à viabilidade após liofilização e as barras cinza à viabilidade após liofilização.

Após 15 dias de armazenamento não é registrada qualquer tendência nos casos estudados, demonstrando ainda que quando é estudado o efeito do FOS candidato 6 purificado, na maioria dos casos não é observada qualquer viabilidade. Com efeito, esperar-se-ia que o encapsulamento e a presença de FOS protegessem a integridade estrutural da bactéria e minimizassem a perda de viabilidade ao longo do tempo, conforme reportado em vários estudos comparáveis com o atual (Quintana et al., 2017; Romano et al., 2016, 2018; Schwab et al., 2007; M. Wang et al., 2019).

3. Crescimento celular

Após cada etapa de encapsulamento e liofilização mediu-se a densidade ótica das suspensões de bactérias ao longo do tempo de modo a avaliar o efeito da adição de cada camada e a liofilização no crescimento celular. Os resultados apresentados nas Figuras 21 a 23 representam os padrões que é possível observar ao longo dos vários ensaios realizados. Na Figura 21 está representado o efeito que a adição das camadas de revestimento apresenta na curva de crescimento. A Figura 22 permite observar o efeito da adição de alginato como primeira camada e na Figura 23 é possível observar o efeito da liofilização nas curvas de crescimento. As Tabelas 6 e 7 resumem os valores dos parâmetros da cinética de crescimento microbiano do ensaio 3 antes e após a liofilização.

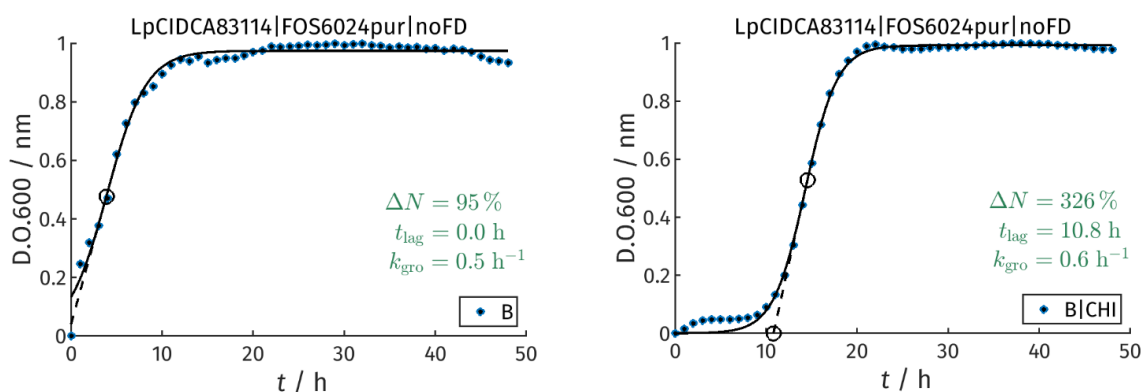


Figura 21 - Curvas de crescimento relativas ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado. Bactérias não encapsuladas (B); bactérias encapsuladas com quitosano (B|CHI).

Tabela 6 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano antes e após o processo de encapsulamento relativos ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.

<i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 após LbL	t_{lag} (h)	k (h ⁻¹)	R ²	ΔN (%)
B	0,00	0,47	0,9833	95
B f	2,70	0,89	0,9880	67
B CHI	10,80	0,57	0,9982	326
B CHI f	20,40	0,56	0,9991	160
B CHI ALG	9,10	0,32	0,9791	431
B CHI ALG f	1,20	0,50	0,9951	880
B CHI PEC	16,10	0,41	0,9872	647
B CHI PEC f	9,80	0,20	0,9923	603
B CHI CMC	20,20	0,74	0,9987	164
B CHI CMC f	4,00	0,69	0,9953	208

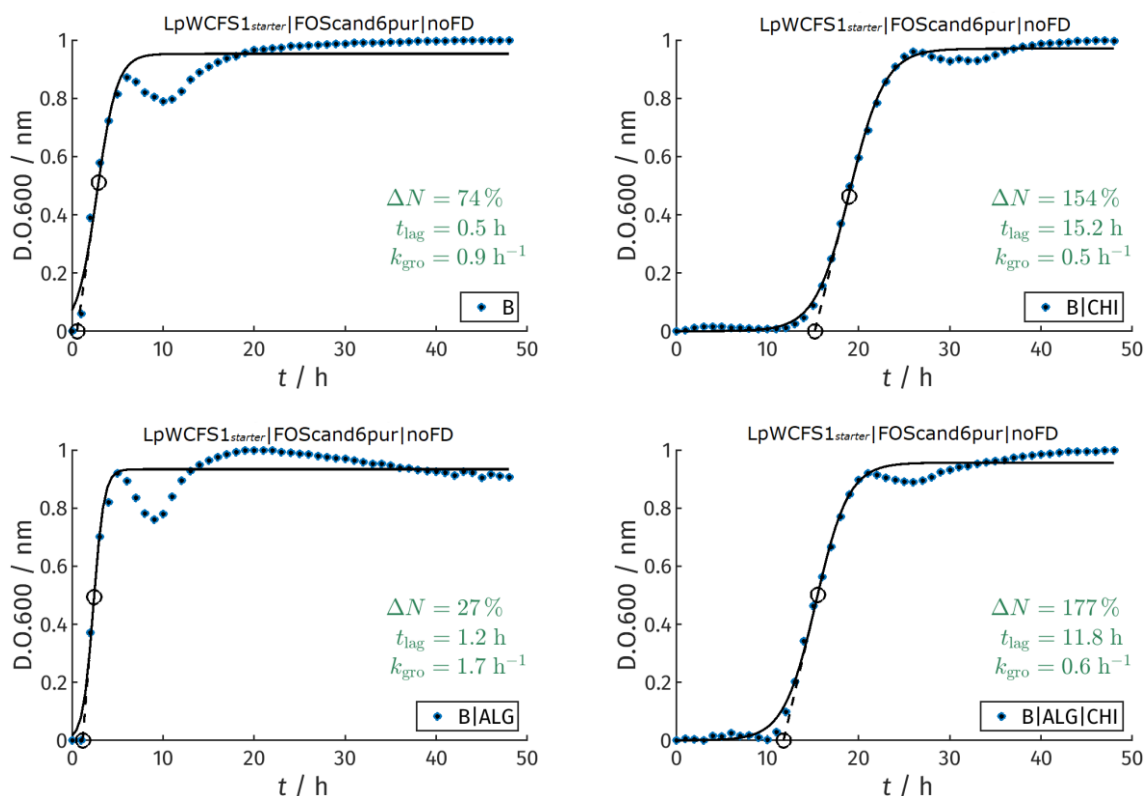


Figura 22 - Curvas de crescimento relativas ao Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com starter, e sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado. Bactérias não encapsuladas (B); Bactérias encapsuladas com quitosano na primeira camada (B|CHI); Bactérias encapsuladas com alginato na primeira camada (B|ALG); Bactérias encapsuladas com quitosano na segunda camada (B|ALG|CHI).

De um modo geral, verifica-se que a adição das camadas leva a um aumento nos valores do tempo de atraso. Isto significa que o processo de adaptação ao meio é maior, ou seja, é necessário mais tempo para haja hidratação das camadas de polieletrólito e absorção de nutrientes presentes no meio de cultura, por parte das bactérias. No entanto, os resultados apresentados não permitem perceber se esse aumento do tempo de atraso depende do número de camadas. Tomando como referência estudos idênticos ao atual (Anselmo et al., 2016; Jonas et al., 2018; Priya et al., 2011), esperar-se-ia um aumento do tempo de atraso com o número de camadas. Observa-se também que as bactérias não encapsuladas apresentam uma menor variação percentual do número de bactérias (ΔN) comparativamente com as encapsuladas. Este parâmetro permite ter uma noção em valor absoluto acerca do crescimento das bactérias. Assim sendo, estes resultados sugerem uma atividade metabólica normal por parte das bactérias encapsuladas, uma vez que apesar de demorarem mais tempo a adaptar-se ao meio (por apresentarem tempos de atraso mais longos), assim que há hidratação das camadas e os microrganismos são libertados crescem mais do que os não encapsulados, ou seja, há uma maior variação percentual de bactérias nas amostras encapsuladas do que as não encapsuladas.

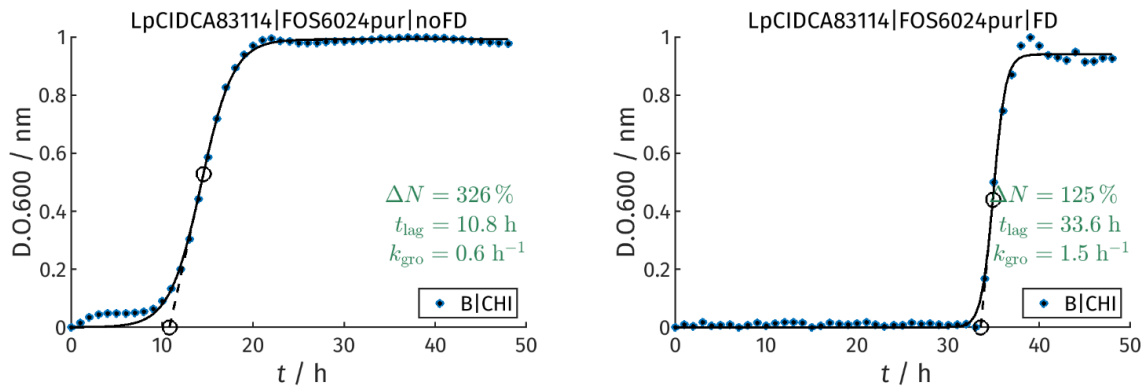


Figura 23 - Curvas de crescimento relativas ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado. Bactérias após encapsulamento (esquerda); Bactérias após liofilização (direita).

Tabela 7 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano após liofilização relativos ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.

<i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 após liofilização	t_{lag} (h)	k (h ⁻¹)	R ²	ΔN (%)
B	18,10	0,56	0,9768	111
B f	37,90	1,02	0,9979	40
B CHI	33,60	1,51	0,9979	125
B CHI f	28,10	0,90	0,9982	131
B CHI ALG	19,10	0,64	0,9983	136
B CHI ALG f	11,80	0,75	0,9975	78
B CHI PEC	30,80	0,88	0,9963	111
B CHI PEC f	26,90	0,58	0,9849	135
B CHI CMC	26,00	0,74	0,9990	184
B CHI CMC f	11,40	0,77	0,9989	160

Através da análise dos parâmetros da cinética de crescimento das Tabelas 6 e 7, é possível concluir que o tempo de atraso das bactérias liofilizadas é maior do que as bactérias após o encapsulamento. Este efeito é também visível nas curvas de crescimento da Figura 23, onde é feita uma comparação das bactérias *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 encapsuladas com quitosano antes e depois do processo de liofilização. Relativamente aos valores dos restantes parâmetros, taxa de crescimento (k) e variação percentual (ΔN), há uma variabilidade aparentemente aleatória, não sendo possível retirar conclusões.

Alguns valores experimentais relativos à bactéria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 (anexo C: Figura C.2 e C.7 e Tabela C.2 e C.7) não permitiram ajustar o modelo de crescimento de forma minimamente aceitável, o que pode ser atribuído à elevada sensibilidade dessa bactéria a fatores de *stress*, ou seja, aos processos de congelamento e liofilização (Fonseca et al., 2000). Isto significa que as curvas de crescimento não apresentam

Capítulo III – Resultados e Discussão

padrões idênticos aos que seria de esperar, ou seja, à de uma curva característica de crescimento microbiano.

A adição de alginato como primeira camada, tanto após encapsulamento (cf. Figura 22) como após liofilização (anexo C: Figura C.10 e Tabela C.10), deu origem a valores dos parâmetros cinéticos de crescimento com padrões idênticos ao das bactérias não encapsuladas. Por sua vez, as bactérias encapsuladas com quitosano na segunda camada levaram a parâmetros cinéticos tendencialmente idênticos ao caso das bactérias com quitosano na primeira camada. O cruzamento destes resultados com os resultados do potencial- ζ sustenta a tese de que, nesta formulação, o encapsulamento não terá ocorrido como se esperaria.

Este conjunto de resultados permite algumas inferências importantes. No geral, os valores de potencial- ζ sugerem uma deposição bem-sucedida das camadas. Por sua vez, o encapsulamento permitiu uma proteção das bactérias durante a liofilização. Estes resultados são sustentados pela menor perda de viabilidade das bactérias encapsuladas comparativamente com as bactérias não encapsuladas. No entanto, nem encapsulamento nem a presença de FOS revelaram efeitos detetáveis durante o armazenamento. De todas as estirpes estudadas, a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 confirmou-se como a mais sensível aos processos de liofilização e congelamento. Isto é sustentado pelos valores de viabilidade baixos e muitas vezes nulos e pelas curvas e parâmetros de crescimento muito distintos de um padrão característico de crescimento microbiano. Os resultados sobre o efeito do FOS nas condições estudadas revelaram-se inconclusivos. O mesmo se aplica ao uso de alginato como primeira camada, pois não foi possível concluir se as bactérias foram encapsuladas ou se simplesmente se aglomeraram (conforme o sugere o potencial- ζ próximo de zero da estirpe testada), o que é suportado pelos resultados do potencial- ζ praticamente invariáveis, e pelas curvas de crescimento. Uma vez que os resultados são distintos de caso para caso, é nos permitido concluir que este tipo de abordagem carece de uma certa modulação das características das bactérias, ou seja, não existe um procedimento comum a todas as bactérias. Este é o reverso de um trabalho exploratório em que se privilegia a abrangência em sacrifício de um objetivo mais focado, que, no entanto, será agora mais fácil de especificar.

Capítulo IV – Apreciações finais

Neste capítulo são apresentadas as principais conclusões retiradas ao longo de todo o documento e indicadas propostas de trabalhos futuros.

1. Conclusões

O trabalho desenvolvido centrou-se no desenvolvimento de estratégias que permitam uma proteção a longo prazo de bactérias probióticas. Uma corresponde ao encapsulamento das bactérias com polieletrólitos através do método *Layer-by-Layer*; outra à utilização de ingredientes com propriedades prebióticas, como é o caso de fruto-oligossacarídeos (FOS). Desta forma, a eficiência do método de encapsulamento e do uso de FOS foi avaliada em três estirpes de bactérias probióticas *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum* WCFS1, *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1) e por diferentes métodos de caracterização, designadamente a determinação do potencial- ζ , curva de crescimento e viabilidade das bactérias.

De um modo geral, os resultados sugerem que o encapsulamento por LbL é um processo promissor, protegendo as bactérias na liofilização, conforme revelado pelos valores de viabilidade após liofilização, em que ficou demonstrado que há menor perda de viabilidade nas amostras encapsuladas por comparação com as não encapsuladas. Quanto ao uso de alginato como primeira camada, ficam dúvidas sobre a sua eficácia, pelo menos no caso da estirpe formulada com esse biopolímero.

A bactéria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 evidenciou grande sensibilidade ao processo de liofilização, conforme revelado tanto pelos valores de viabilidade como pelas curvas de crescimento. Os resultados apresentados não nos permitem retirar qualquer conclusão acerca do efeito que o FOS apresenta no processo de liofilização. Nem o efeito do FOS nem o efeito do encapsulamento demonstraram ser eficazes no armazenamento.

Em suma, apesar do encapsulamento sugerir um efeito protetor no processo de liofilização, é possível concluir que cada caso é distinto e, desse modo, é necessária uma modulação, das formulações ajustadas às características de cada estirpe de bactérias.

2. Trabalhos futuros

Uma vez que este é um trabalho exploratório em que é privilegiada a abrangência, devem ser efetuados alguns estudos e otimizações. Assim, futuramente, este trabalho pode ser complementado através:

- Modulação das formulações em função das características das bactérias;
- Estudo detalhado de cada variável de estudo;
- Realização de testes adicionais para dar significado estatístico aos resultados e conclusões deles derivadas;
- Utilização de fluidos simulados para estudar a resistência do encapsulamento no processo digestivo.

- Adams, M. (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68(2–3), 171–178. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00198-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00198-9)
- Adams, M., & Nicolaidis, L. (1997). Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, 8(5–6), 227–239. [https://doi.org/10.1016/s0956-7135\(97\)00016-9](https://doi.org/10.1016/s0956-7135(97)00016-9)
- Aguilar, K., Tello, F., Bierhalz, A., Garnica Romo, M., Martínez Flores, H., & Grosso, C. (2015). Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. *Journal of Food Engineering*, 154, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.12.020>
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M., Ares, I., & Martínez, M. (2016). Prebiotics: Safety and Toxicity Considerations. *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*, 757–775. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00054-1>
- Anal, A., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18(5), 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004>
- Anselmo, A. C., McHugh, K. J., Webster, J., Langer, R., & Jaklenec, A. (2016). Layer-by-Layer Encapsulation of Probiotics for Delivery to the Microbiome. *Advanced Materials*, 28(43), 9486–9490. <https://doi.org/10.1002/adma.201603270>
- Ariga, K., Yamauchi, Y., Rydzek, G., Ji, Q., Yonamine, Y., Kevin, C., & Hill, J. (2014). Layer-by-layer nanoarchitectonics: Invention, innovation, and evolution. *Chemistry Letters*, 43(1), 36–68. <https://doi.org/10.1246/cl.130987>
- Ashford, M., Fell, J., Attwood, D., Sharma, H., & Woodhead, P. (1994). Studies on pectin formulations for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 30(3), 225–232. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)90028-0](https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)90028-0)
- Baricault, L., Denariáz, G., Hourí, J., Bouley, C., Sapin, C., & Trugnan, G. (1995). Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation. *Carcinogenesis*, 16(2), 245–252.

Bibliografia

- Bepeyeva, A., de Barros, J., Albadran, H., Kakimov, A. K., Kakimova, Z., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. (2017). Encapsulation of *Lactobacillus casei* into Calcium Pectinate-Chitosan Beads for Enteric Delivery. *Journal of Food Science*, 82(12), 2954–2959. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13974>
- Borges, J., & Mano, J. (2014). Molecular interactions driving the layer-by-layer assembly of multilayers. *Chemical Reviews*, 114(18), 8883–8942. <https://doi.org/10.1021/cr400531v>
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 467–483. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>
- Cabrera, J., Cambier, P., & van Cutsem, P. (2011). Drug encapsulation in pectin hydrogel beads- a systematic study of simulated digestion media. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(SUPPL. 5), 292–299.
- Chavarri, M., Maranon, I., & Carmen, M. (2012). Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. *Probiotics*, 501–540. <https://doi.org/10.5772/50046>
- Chen, G., Yao, S. J., Guan, Y. X., & Lin, D. Q. (2005). Preparation and characterization of NaCS-CMC/PDMDAAC capsules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45(3–4), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.08.002>
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D. (2013). Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan-alginate for the improved survival and targeted delivery of probiotic bacteria after oral administration. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(1), 52–60. <https://doi.org/10.1039/c2tb00126h>
- Coppola, M. M., & Turnes, C. G. (2004). Probióticos e resposta imune Probiotics and immune response. *Ciência Rural*, 34(4), 1297–1303.
- Corona-Hernandez, R. I., Álvarez-Parrilla, E., Lizardi-Mendoza, J., Islas-Rubio, A. R., de la Rosa, L. A., & Wall-Medrano, A. (2013). Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(6), 614–628. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12030>
- Dafe, A., Etemadi, H., Dilmaghani, A., & Mahdavinia, G. R. (2017). Investigation of pectin/starch hydrogel as a carrier for oral delivery of probiotic bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 536–543. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.060>

- Dafe, A., Etemadi, H., Zarredar, H., & Mahdavinia, G. R. (2017). Development of novel carboxymethyl cellulose/k-carrageenan blends as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, *97*, 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.016>
- Daniel, C., Roussel, Y., Kleerebezem, M., & Pot, B. (2011). Recombinant lactic acid bacteria as mucosal biotherapeutic agents. *Trends in Biotechnology*, *29*(10), 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.002>
- Dias, K. B., Silva, D. P., Ferreira, L. A., Fidelis, R. R., Costa, J. da L., Silva, A. L. L., & Scheidt, G. N. (2013). Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, *4*(3), 184–191.
- Dierendonck, M., De Koker, S., De Rycke, R., & De Geest, B. G. (2014). Just spray it-LbL assembly enters a new age. *Soft Matter*, *10*(6), 804–807. <https://doi.org/10.1039/c3sm52202d>
- Donath, E., Sukhorukov, G., Caruso, F., Davis, S., & Möhwald, H. (1998). Novel Hollow Polymer Shells by Colloid-Templated Assembly of Polyelectrolytes. *Angewandte Chemie International Edition*, *37*(16), 2201–2205.
- Donohue, D., & Salminen, S. (1996). Study of probiotic bacteria. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, *5*, 25–28.
- Emregül, E., Sungur, S., & Akbulut, U. (1996). Effect of chromium salts on invertase immobilization onto carboxymethylcellulose-gelatine carrier system. *Biomaterials*, *17*(14), 1423–1427. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)87285-1](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)87285-1)
- Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *11*(5), 4745–4767. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504745>
- Florou-Paneri, P., Christaki, E., & Bonos, E. (2012). Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. *Intech*, 589–614. <https://doi.org/10.5772/47766>
- Fonseca, F., Béal, C., & Corrieu, G. (2000). Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research*, *67*(1), 83–90. <https://doi.org/10.1017/S002202999900401X>
- Food and Agriculture Organization, & W. H. O. (2006). Probiotics in food: health and

Bibliografía

- nutritional properties and guidelines for evaluation. In *FAO*.
- George, M., & Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *Journal of Controlled Release*, *114*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.017>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *14*(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Groboillot, A. F., Champagne, C. P., Darling, G. D., Poncelet, D., & Neufeld, R. J. (1993). Membrane Formation by Interfacial Cross-Linking of Chitosan for Microencapsulation of *Lactococcus Lactis*. *Biotechnology and Bioengineering*, *42*, 1157–1163.
- Guzmán, E., Cavallo, J. A., Chuliá-Jordán, R., Gómez, C., Strumia, M. C., Ortega, F., & Rubio, R. G. (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), 6836–6845. <https://doi.org/10.1021/la200522r>
- Guzmán, E., Chuliá-Jordán, R., Ortega, F., & Rubio, R. G. (2011). Influence of the percentage of acetylation on the assembly of LbL multilayers of poly(acrylic acid) and chitosan. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *13*(40), 18200–18207. <https://doi.org/10.1039/c1cp21609k>
- Hejazi, R., & Amiji, M. (2003). Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release*, *89*(2), 151–165. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00126-3)
- Hirayama, K., & Rafter, J. (2000). The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection*, *2*(6), 681–686. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00357-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00357-9)
- Johansson, M. L., Molin, G., Jeppsson, B., Nobaek, S., Ahrne, S., & Bengmark, S. (1993). Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: In vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(1), 15–20. <https://doi.org/10.1128/aem.59.1.15-20.1993>
- Jonas, A. M., Glinel, K., Behrens, A., Anselmo, A. C., Langer, R. S., & Jaklenec, A. (2018). Controlling the Growth of *Staphylococcus epidermidis* by Layer-By-Layer Encapsulation. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *10*(19), 16250–16259.

<https://doi.org/10.1021/acsami.8b01988>

- Kaihara, S., Suzuki, Y., & Fujimoto, K. (2011). In situ synthesis of polysaccharide nanoparticles via polyion complex of carboxymethyl cellulose and chitosan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *85*(2), 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.03.008>
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, *3*, 39–48.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition*, *2013*, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>
- Kim, S. K., & Venkatesan, J. (2013). Chitin and Chitosan Derivatives: Advances in Drug Discovery and Developments. In *CRC Press, Taylor & Francis Group*. <https://doi.org/10.1201/b15636>
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. C. (2006). Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *LWT - Food Science and Technology*, *39*(2), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.12.006>
- Kumar, A., & Dixit, C. K. (2017). Methods for characterization of nanoparticles. *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*, 44–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1>
- Kumar, M., Kumar, A., Nagpal, R., Mohania, D., Behare, P., Verma, V., Kumar, P., Poddar, D., Aggarwal, P. K., Henry, C. J. K., Jain, S., & Yadav, H. (2010). Cancer-preventing attributes of probiotics: An update. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *61*(5), 473–496. <https://doi.org/10.3109/09637480903455971>
- Lahtinen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., & von Wright, A. (2011). Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects, 4th Ed. In *CRC Press, Taylor & Francis Group*. <https://doi.org/10.3920/bm2012.x003>
- Larsen, N., Cahú, T. B., Isay Saad, S. M., Blennow, A., & Jespersen, L. (2018). The effect of pectins on survival of probiotic *Lactobacillus* spp. in gastrointestinal juices is related to their structure and physical properties. *Food Microbiology*, *74*, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.015>

Bibliografia

- Lehtto, El., & Salminen, S. (1997). Adhesion of Two Lactobacillus, One Lactococcus and One Propionibacterium Strain to Cultured Human Intestinal Caco-2 Cell Line. *Bioscience Microflora*, 16(1), 13–17.
- Liu, D. Z., Chen, W. P., Lee, C. P., Wu, S. L., Wang, Y. C., & Chung, T. W. (2004). Effects of alginate coated on PLGA microspheres for delivery tetracycline hydrochloride to periodontal pockets. *Journal of Microencapsulation*, 21(6), 643–652. <https://doi.org/10.1080/02652040400000512>
- Malvern Panalytical. (2020). *Zetasizer Nano ZS para tamanho, potencial zeta, mobilidade de proteínas e microrreologia*. <https://www.malvernpanalytical.com/br/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs>
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2018). The role of probiotics , prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*, 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>
- Menezes, M., Silva, T., Etchepare, M., Fonseca, B., Sonza, V., Codevilla, C., Barin, J., Silva, C., & Menezes, C. (2019). Improvement of the viability of probiotics (Lactobacillus acidophilus) by multilayer encapsulation. *Ciencia Rural*, 49(9), 1–10. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20181020>
- Moreira, M. M., Guido, L. F., Cruz, J. M., & Barros, A. A. (2010). Determination of galacturonic acid content in pectin from fruit juices by liquid chromatographydiode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Central European Journal of Chemistry*, 8(6), 1236–1243. <https://doi.org/10.2478/s11532-010-0101-4>
- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., & Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5(1), 1–18.
- Mozzi, F., Raya, R. R., & Vignolo, G. M. (2010). *Biotechnology of lactic acid bacteria*. Wiley-Blackwell.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., & Takano, T. (1995). Antihypertensive Effect of Sour Milk and Peptides Isolated from It That are Inhibitors to Angiotensin I-Converting Enzyme. *Journal of Dairy Science*, 78(6), 1253–1257. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76745-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76745-5)
- Nannen, N. L., & Hutkins, R. W. (1991). Intracellular pH Effects in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 74(3), 741–746. <https://doi.org/10.3168/jds.S0022->

0302(91)78219-2

- Narvhus, J. A., & Axelsson, L. (2003). LACTIC ACID BACTERIA. *Encyclopedia Of Food Sciences And Nutrition*, 3465–3472. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/00673-8>
- Nussinovitch, A. (1997). Hydrocolloid Applications. In *Springer US*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6385-3>
- Opanasopit, P., Apirakaramwong, A., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., & Ruktanonchai, U. (2008). Development and characterization of pectinate micro/nanoparticles for gene delivery. *AAPS PharmSciTech*, 9(1), 67–74. <https://doi.org/10.1208/s12249-007-9007-7>
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>
- Passos, L. M. L., & Park, Y. K. (2003). Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. *Ciência Rural*, 33(2), 385–390. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782003000200034>
- Petti, C. A., & She, R. C. (2015). Procedures for the Storage of Microorganisms*. In J. J, P. M, C. K, F. G, L. M, R. S, & W. D (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition* (pp. 161–168). ASM Press, Washington, DC. <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch11>
- Prabaharan, M., & Mano, J. F. (2005). Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*, 12(1), 41–57. <https://doi.org/10.1080/10717540590889781>
- 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), 11838–11845. <https://doi.org/10.1021/jf203378s>
- Quintana, G., Simões, M. G., Hugo, A., Alves, P., Ferreira, P., Gerbino, E., Simões, P. N., & Gómez-Zavaglia, A. (2017). Layer-by-layer encapsulation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* using block-copolymers of poly(acrylic acid) and pluronic for safe release in gastro-intestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 35, 408–417. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.007>
- Raafat, D., & Sahl, H. G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential - A critical literature

Bibliografia

- survey. *Microbial Biotechnology*, 2(2 SPEC. ISS.), 186–201.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x>
- Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). Spray freeze drying method for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Food Engineering*, 166, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.05.029>
- Reddy, G. V., Friend, B. A., Shahani, K. M., & Farmer, R. E. (1983). Antitumor Activity of Yogurt Components1. *Journal of Food Protection*, 46(1), 8–11.
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-46.1.8>
- Reddy, G. V., Shahani, K. M., & Banerjee, M. R. (1973). Inhibitory effect of yogurt on ehrlich ascites tumor-cell proliferation. *Journal of the National Cancer Institute*, 50(3), 815–817.
<https://doi.org/10.1093/jnci/50.3.815>
- Rehman, A., Ahmad, T., Aadil, R. M., Spotti, M. J., Bakry, A. M., Khan, I. M., Zhao, L., Riaz, T., & Tong, Q. (2019). Pectin polymers as wall materials for the nano-encapsulation of bioactive compounds. *Trends in Food Science and Technology*, 90, 35–46.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.015>
- Riaz, Q. U. A., & Masud, T. (2013). Recent Trends and Applications of Encapsulating Materials for Probiotic Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(3), 231–244.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2010.524953>
- Richardson, J. J., Cui, J., Björnmalm, M., Braunger, J. A., Ejima, H., & Caruso, F. (2016). Innovation in Layer-by-Layer Assembly. *Chemical Reviews*, 116(23), 14828–14867.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00627>
- Rolfe, R. D. (2000). The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health. *The Journal Of Nutrition*, 130(2), 396–402.
- Romano, N., Schebor, C., Mobili, P., & Gómez-Zavaglia, A. (2016). Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Research International*, 90, 251–258.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.003>
- Romano, N., Sciammaro, L., Mobili, P., Puppo, M. C., & Gomez-Zavaglia, A. (2018). Flour from mature *Prosopis nigra* pods as suitable substrate for the synthesis of prebiotic fructo-oligosaccharides and stabilization of dehydrated *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Research International*, 121(October), 561–567.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.016>
- Romano, N., Tavera-Quiroz, M. J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*, *64*, 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.018>
- Romano, N., Tymczyszyn, E., Mobili, P., & Gomez-Zavaglia, A. (2015). Prebiotics as Protectants of Lactic Acid Bacteria (chapter 10). In R. R. Watson & V. R. Preedy (Eds.), *Bioactive foods in promoting health: Probiotics, prebiotics and symbiotics. Part 1: Prebiotics in health promotion* (2nd ed., pp. 155–164). The Netherlands: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00010-1>
- Roy, J. C., Ferri, A., Giraud, S., Jinping, G., & Salaün, F. (2018). Chitosan–carboxymethylcellulose-based polyelectrolyte complexation and microcapsule shell formulation. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms19092521>
- Saad, S. M. I. (2006). Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, *42*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1590/s1516-93322006000100002>
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, *84*(3), 197–215. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8)
- Sabater-Molina, M., Larque, E., Torrella, F., & Zamora, S. (2009). Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology & Biochemistry*, *65*(3), 315–328. <https://doi.org/10.1007/BF03180584>
- Sako, T., & Tanaka, R. (2011). Prebiotic | Types. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 354–364. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00426-x>
- Schwab, C., Vogel, R., & Ga, M. G. (2007). *Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of Lactobacillus reuteri TMWI . 106 during freeze-drying*. *55*, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.06.004>
- Selvamani, V. (2018). Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs. In *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814031-4.00015-5>

Bibliografia

- Shah, N.P. & Ravula, R. R. . (2000). Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55(3), 139–144.
- Shah, M. R., Imran, M., & Ullah, S. (2017). Nanosuspensions. In *Lipid-Based Nanocarriers for Drug Delivery and Diagnosis*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-52729-3.00005-6>
- Sharma, I., & Ahmad, P. (2014). Catalase: A Versatile Antioxidant in Plants. In *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling* (Issue 1983). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00004-6>
- Shu, G., Hu, M., Qin, T., Chen, H., & Qi, M. (2012). Effect of fructo-oligosaccharide, isomalto-oligosaccharide, inulin and xylo-oligosaccharide on survival of B. BIFIDUM during freeze-drying. *Advanced Materials Research*, 382, 454–457. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.382.454>
- Singh, P., Medronho, B., Alves, L., da Silva, G. J., Miguel, M. G., & Lindman, B. (2017). Development of carboxymethyl cellulose-chitosan hybrid micro- and macroparticles for encapsulation of probiotic bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 175, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.119>
- Sinha, V. R., Singla, A. K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., & Dhawan, S. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 274(1–2), 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.12.026>
- Sridevi, V., Sumathi, V., Guru Prasad, M., & Satish Kumar, M. (2014). Fructooligosaccharides - type prebiotic: a review. *Journal of Pharmacy Research*, 8(3), 321–330.
- Stephen, A., Phillips, G., & Williams, P. (2006). *Food Polysaccharides and Their Applications: Second Edition* (2nd ed.). CRC Press, Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1201/9781420015164.ch8>
- Sukhorukov, G. B., Volodkin, D. V., Günther, A. M., Petrov, A. I., Shenoy, D. B., & Möhwald, H. (2004). Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds. *Journal of Materials Chemistry*, 14(14), 2073–2081. <https://doi.org/10.1039/b402617a>
- Svaldo Lanero, T., Cavalleri, O., Krol, S., Rolandi, R., & Gliozzi, A. (2006). Mechanical properties of single living cells encapsulated in polyelectrolyte matrixes. *Journal of Biotechnology*, 124(4), 723–731. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.02.016>
- Sybesma, W., Hugenholtz, J., De Vos, W. M., & Smid, E. J. (2006). Safe use of genetically

- modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups, and industry. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(4), 1–25. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue4-fulltext-12>
- Tang, Z., Wang, Y., Podsiadlo, P., & Kotov, N. A. (2006). Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering. *Advanced Materials*, 18(24), 3203–3224. <https://doi.org/10.1002/adma.200600113>
- Thomas, M. Ben, Vaidyanathan, M., Radhakrishnan, K., & Raichur, A. M. (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, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.03.015>
- Trevisol, T. C., Fritz, A. R. M., de Souza, S. M. A. G. U., Bierhalz, A. C. K., & Valle, J. A. B. (2019). Alginate and carboxymethyl cellulose in monolayer and bilayer films as wound dressings: Effect of the polymer ratio. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(3), 1–9. <https://doi.org/10.1002/app.46941>
- Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C., & Salminen, S. J. (1999). The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26(2), 137–142. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(99\)00131-5](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(99)00131-5)
- Valdés, A., Burgos, N., Jiménez, A., & Garrigós, M. C. (2015). Natural pectin polysaccharides as edible coatings. *Coatings*, 5(4), 865–886. <https://doi.org/10.3390/coatings5040865>
- Wakabayashi, A., Kumagai, Y., Watari, E., Shimizu, M., Utsuyama, M., Hirokawa, K., & Takahashi, H. (2006). Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. *Immunology*, 119(2), 167–177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02418.x>
- Wang, M., Yang, J., Li, M., Wang, Y., Wu, H., Xiong, L., & Sun, Q. (2019). Enhanced viability of layer-by-layer encapsulated *Lactobacillus pentosus* using chitosan and sodium phytate. *Food Chemistry*, 285(October 2018), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.162>
- Wang, Y. (2009). Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International*, 42(1), 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.09.001>
- Yucel Falco, C., Sotres, J., Rascón, A., Risbo, J., & Cárdenas, M. (2017). Design of a potentially

Bibliografia

prebiotic and responsive encapsulation material for probiotic bacteria based on chitosan and sulfated β -glucan. *Journal of Colloid and Interface Science*, 487, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.10.019>

Zhu, K., Ye, T., Liu, J., Peng, Z., Xu, S., Lei, J., Deng, H., & Li, B. (2013). Nanogels fabricated by lysozyme and sodium carboxymethyl cellulose for 5-fluorouracil controlled release. *International Journal of Pharmaceutics*, 441(1–2), 721–727. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.10.022>

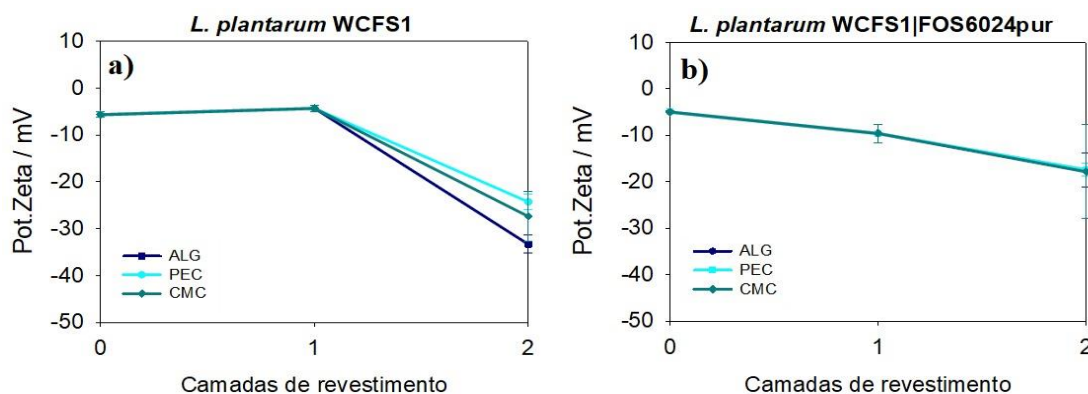
Anexo A – Potencial- ζ 

Figura A.1 - Resultados do potencial- ζ relativos ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1, sem FOS (a); e com FOS (b).

Tabela A.1 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem FOS.

Polímeros	Camadas		
	0	1	2
CHI			-
ALG			$-33,30 \pm 0,58$
PEC	$-5,67 \pm 0,58$	$-4,31 \pm 0,68$	$-24,28 \pm 1,65$
CMC			$-27,36 \pm 5,32$

Tabela A.2 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com FOS.

Polímeros	Camadas		
	0	1	2
CHI			-
ALG			$-17,42 \pm 3,63$
PEC	$-4,96 \pm 0,19$	$-9,57 \pm 1,99$	$-17,42 \pm 1,35$
CMC			$-17,82 \pm 10,14$

Tabela A.3 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 2: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *CFL1* sem FOS.

Polímeros	Camadas		
	0	1	2
CHI			-
ALG			$-13,76 \pm 8,49$
PEC	$-20,76 \pm 0,94$	$1,58 \pm 18,48$	$-18,36 \pm 2,61$
CMC			$-4,31 \pm 3,54$

Tabela A.4 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 2: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *CFL1* com FOS.

Polímeros	Camadas		
	0	1	2
CHI			-
ALG			$-4,11 \pm 3,84$
PEC	$-19,00 \pm 1,07$	$-1,85 \pm 2,58$	$-9,23 \pm 7,44$
CMC			$-12,50 \pm 8,26$

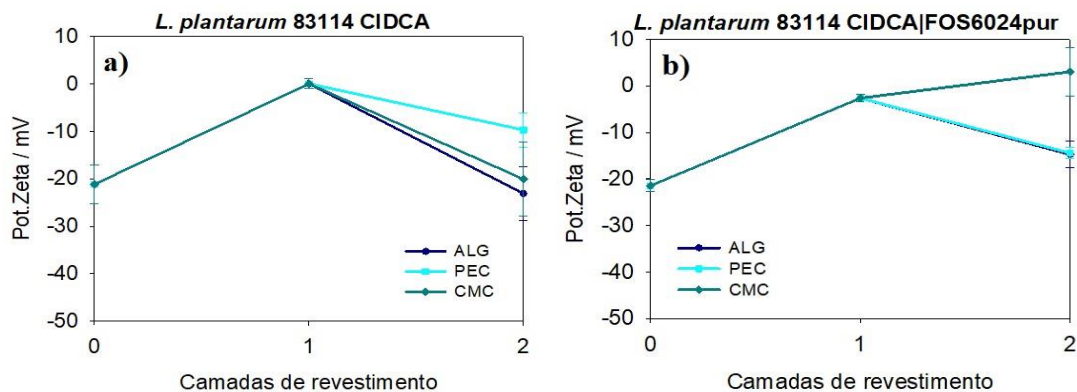


Figura A.2 - Resultados do potencial- ζ relativos ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, sem FOS (a); e com FOS (b).

Tabela A.5 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 sem FOS.

Polímeros	Camadas		
	0	1	2
CHI			-
ALG	-21,14 ± 4,17	0,03 ± 1,04	-23,10 ± 5,59
PEC			-9,70 ± 3,59
CMC			-20,06 ± 7,74

Tabela A.6 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 com FOS.

Polímeros	Camadas		
	0	1	2
CHI			-
ALG	-21,46 ± 1,26	-2,63 ± 0,73	-14,74 ± 2,83
PEC			-14,44 ± 1,12
CMC			3,05 ± 5,21

Tabela A.7 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem FOS.

Polímeros	Camadas		
	0	1	2
CHI			-
ALG	-4,89 ± 0,41	-1,47 ± 0,48	-36,72 ± 5,90
PEC			-24,02 ± 1,71
CMC			-42,72 ± 2,10

Tabela A.8 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com FOS.

Polímeros	Camadas		
	0	1	2
CHI			-
ALG	0,01 ± 0,17	20,24 ± 0,94	6,02 ± 0,65
PEC			10,07 ± 0,70
CMC			9,66 ± 2,88

Tabela A.9 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem FOS com alginato na primeira camada.

Polímeros	Camadas		
	0	1	2
ALG	-4,89 ± 0,41	-5,69 ± 0,27	-
CHI			-5,07 ± 0,94

Tabela A.10 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com FOS com alginato na primeira camada.

Polímeros	Camadas		
	0	1	2
ALG			-
CHI	0,01 ± 0,17	0,35 ± 0,08	42,18 ± 1,16

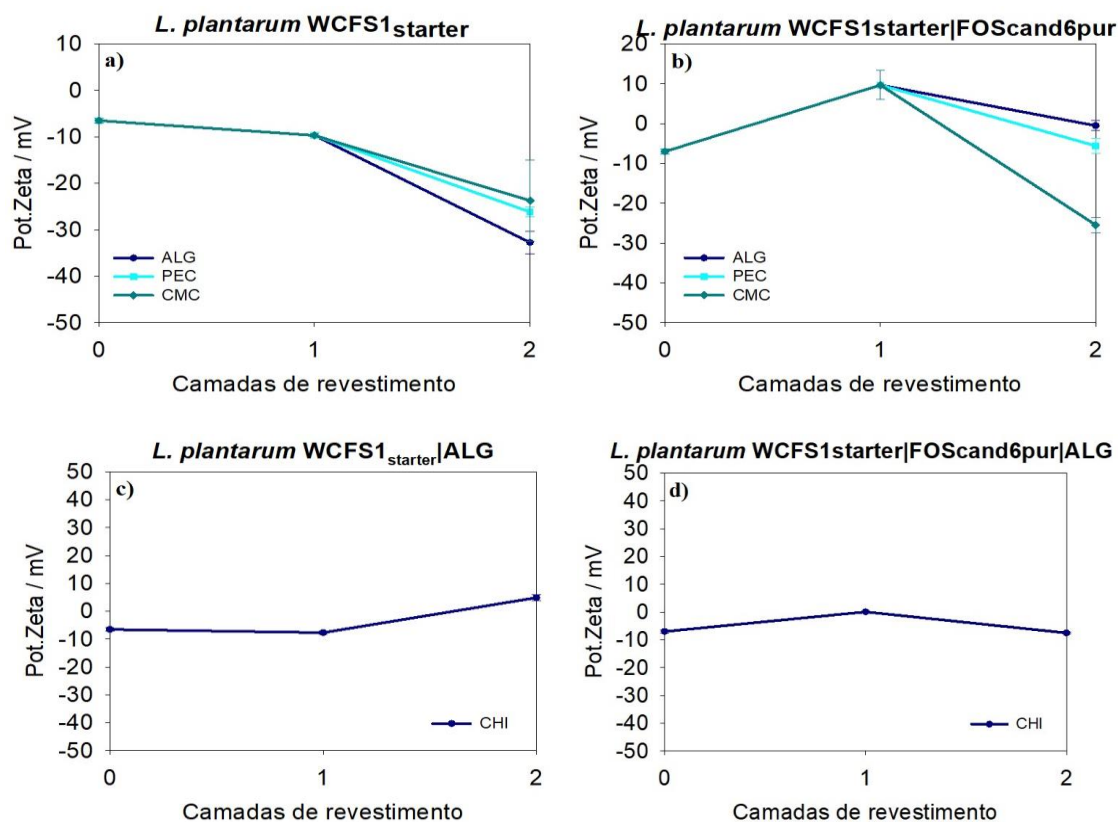


Figura A.3 - Resultados do potencial- ζ relativos ao Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com starter, com quitosano na primeira camada, sem FOS (a); e com FOS (b); e com alginato como primeira camada, sem FOS (c); e com FOS (d).

Tabela A.11 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem starter e sem FOS.

Polímeros	Camadas		
	0	1	2
CHI			-
ALG			-32,76 ± 2,37
PEC	-6,51 ± 0,50	-9,69 ± 0,66	-26,16 ± 1,06
CMC			-23,74 ± 8,80

Tabela A.12 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com starter e com FOS.

Polímeros	Camadas		
	0	1	2
CHI	-7,03 ± 0,66	9,66 ± 3,67	-
ALG			-0,54 ± 1,25
PEC			-5,62 ± 1,93
CMC			-25,48 ± 1,90

Anexos

Tabela A.13 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem starter e sem FOS com alginato na primeira camada.

Polímeros	Camadas		
	0	1	2
ALG			-
CHI	$-6,51 \pm 0,50$	$-7,67 \pm 0,49$	$4,87 \pm 0,99$

Tabela A.14 - Valores do potencial- ζ relativos ao Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com starter e com FOS com alginato na primeira camada.

Polímeros	Camadas		
	0	1	2
ALG			-
CHI	$-7,03 \pm 0,66$	$0,05 \pm 0,09$	$-7,55 \pm 0,29$

Anexo B – Viabilidade

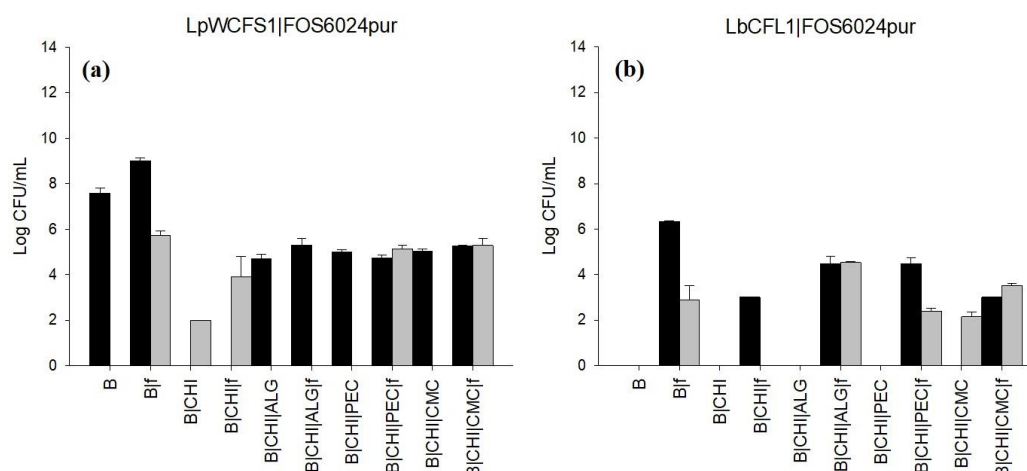


Figura B.1 - Viabilidade celular antes e após o processo de encapsulamento relativa ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado (a); Ensaio 2: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado (b).

Tabela B.1 - Valores de viabilidade relativos ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 após encapsulamento, após liofilização e após 15 dias de armazenamento.

<i>L. plantarum</i> WCFS1	Log CFU/mL		
	Após LbL	Após liofilização	Após 15 dias de armazenamento
B	7,60 ± 0,21	0,00 ± 0,00	2,99 ± 0,12
B f	9,02 ± 0,12	5,74 ± 0,20	0,00 ± 0,00
B CHI	0,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	3,80 ± 0,05
B CHI f	0,00 ± 0,00	3,90 ± 0,91	0,00 ± 0,00
B CHI ALG	4,71 ± 0,20	0,00 ± 0,00	2,15 ± 0,21
B CHI ALG f	5,30 ± 0,31	0,00 ± 0,00	4,43 ± 0,01
B CHI PEC	4,99 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
B CHI PEC f	4,74 ± 0,14	5,14 ± 0,15	4,22 ± 0,04
B CHI CMC	5,03 ± 0,10	0,00 ± 0,00	4,32 ± 0,17
B CHI CMC f	5,28 ± 0,03	5,29 ± 0,32	2,00 ± 0,00

Tabela B.2 - Valores de viabilidade relativos ao Ensaio 2: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 após encapsulamento e após liofilização.

<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Log CFU/mL	
	Após LbL	Após liofilização
B	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
B f	6,34 ± 0,02	2,87 ± 0,66
B CHI	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
B CHI f	3,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
B CHI ALG	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
B CHI ALG f	4,48 ± 0,32	4,53 ± 0,05
B CHI PEC	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
B CHI PEC f	4,48 ± 0,26	2,39 ± 0,12
B CHI CMC	0,00 ± 0,00	2,15 ± 0,21
B CHI CMC f	3,00 ± 0,00	3,58 ± 0,07

Tabela B.3 - Valores de viabilidade relativos ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 após encapsulamento e após liofilização.

<i>L. plantarum</i> CIDCA 83114	Log CFU/mL	
	Após LbL	Após liofilização
B	9,72 ± 0,05	4,18 ± 0,04
B f	9,90 ± 0,44	6,37 ± 0,06
B CHI	3,69 ± 0,30	3,13 ± 0,16
B CHI f	0,00 ± 0,00	3,17 ± 0,12
B CHI ALG	5,35 ± 0,49	3,72 ± 0,33
B CHI ALG f	6,53 ± 0,40	4,67 ± 0,40
B CHI PEC	3,60 ± 0,00	3,66 ± 0,04
B CHI PEC f	3,54 ± 0,09	3,48 ± 0,19
B CHI CMC	4,65 ± 0,24	3,42 ± 0,48
B CHI CMC f	6,00 ± 0,16	4,47 ± 0,49

Tabela B.4 - Valores de viabilidade relativos ao Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 após encapsulamento, após liofilização e após 15 dias de armazenamento.

<i>L. plantarum</i> WCFS1	Log CFU/mL		
	Após LbL	Após liofilização	Após 15 dias de armazenamento
B	10,28 ± 0,48	4,32 ± 0,46	5,06 ± 0,17
B f	10,22 ± 0,47	3,74 ± 0,18	2,00 ± 0,00
B CHI	5,65 ± 0,49	4,34 ± 0,59	3,00 ± 0,00
B CHI f	6,02 ± 0,12	6,57 ± 0,45	0,00 ± 0,00
B CHI ALG	7,28 ± 0,15	6,03 ± 0,61	0,00 ± 0,00
B CHI ALG f	7,10 ± 0,20	5,51 ± 1,22	0,00 ± 0,00
B CHI PEC	6,28 ± 1,02	5,14 ± 0,86	0,00 ± 0,00
B CHI PEC f	6,68 ± 0,56	5,96 ± 1,76	0,00 ± 0,00
B CHI CMC	6,03 ± 0,33	5,07 ± 0,78	0,00 ± 0,00
B CHI CMC f	5,94 ± 0,40	5,06 ± 0,71	0,00 ± 0,00
B ALG	6,44 ± 0,29	6,86 ± 0,36	3,73 ± 1,09
B ALG f	6,94 ± 0,50	5,48 ± 1,16	0,00 ± 0,00
B ALG CHI	6,63 ± 0,57	4,95 ± 0,75	4,00 ± 0,00
B ALG CHI f	7,07 ± 0,36	5,05 ± 0,84	0,00 ± 0,00

Tabela B.5 - Valores de viabilidade relativos ao Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 após encapsulamento, após liofilização e após 15 dias de armazenamento.

<i>L. plantarum</i> WCFS1	Log CFU/mL		
	Após LbL	Após liofilização	Após 15 dias de armazenamento
B	12,74 ± 0,21	7,76 ± 0,45	6,75 ± 0,36
B f	11,97 ± 0,27	7,40 ± 0,77	0,00 ± 0,00
B CHI	5,57 ± 0,89	5,49 ± 0,65	0,00 ± 0,00
B CHI f	8,48 ± 0,02	8,48 ± 0,02	6,57 ± 0,45
B CHI ALG	7,00 ± 0,02	6,52 ± 0,54	2,50 ± 0,71
B CHI ALG f	7,11 ± 0,04	6,59 ± 0,52	0,00 ± 0,00
B CHI PEC	7,46 ± 0,31	6,53 ± 0,53	0,00 ± 0,00
B CHI PEC f	8,55 ± 0,39	6,27 ± 0,90	0,00 ± 0,00
B CHI CMC	7,24 ± 0,01	6,49 ± 0,58	0,00 ± 0,00
B CHI CMC f	6,68 ± 0,42	5,94 ± 1,22	0,00 ± 0,00
B ALG	10,55 ± 0,46	7,54 ± 0,55	4,74 ± 0,32
B ALG f	10,57 ± 0,43	7,58 ± 0,55	3,00 ± 0,00
B ALG CHI	6,46 ± 0,67	6,62 ± 0,57	0,00 ± 0,00
B ALG CHI f	8,90 ± 0,48	6,39 ± 0,68	0,00 ± 0,00

Anexo C – Curvas de crescimento

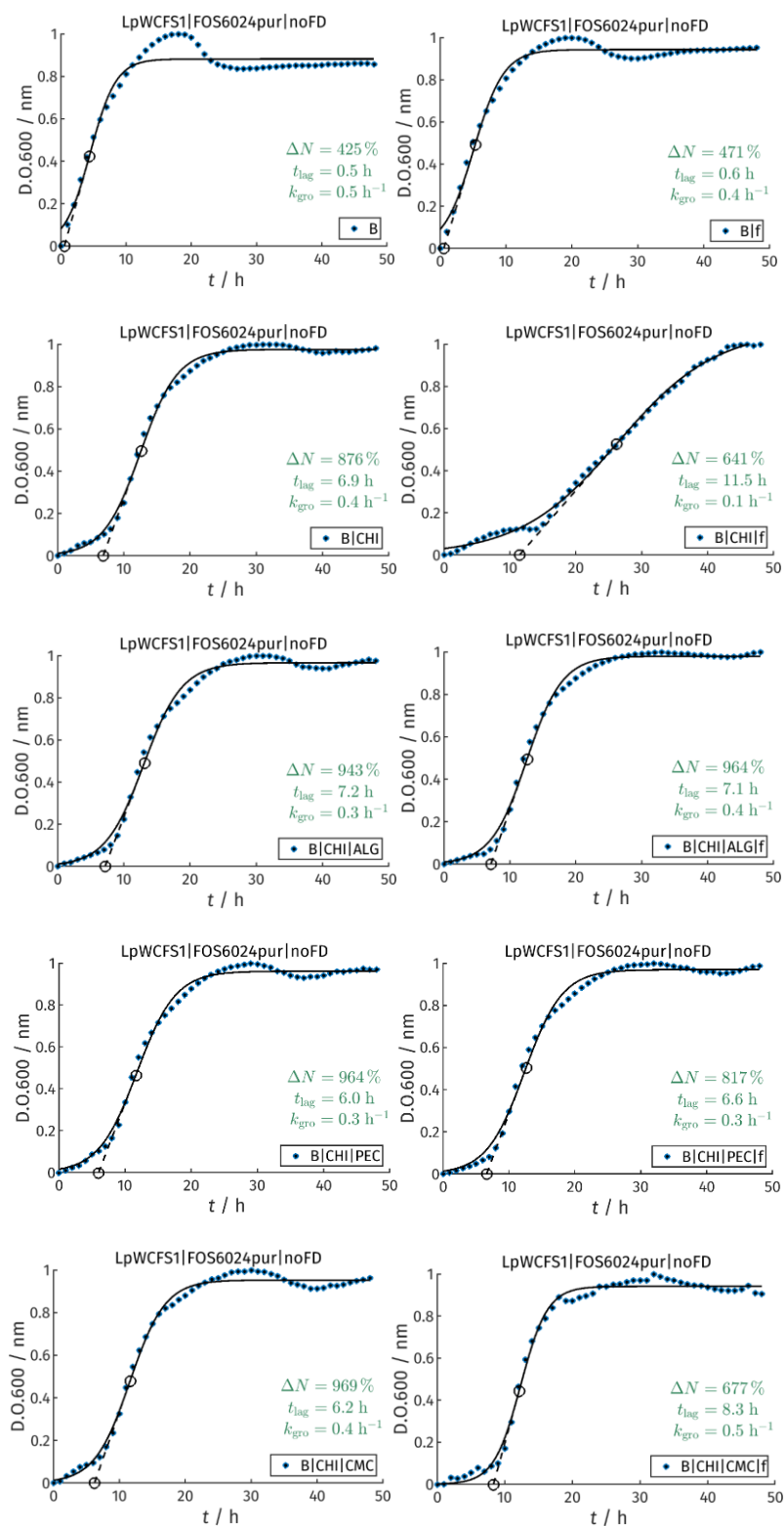
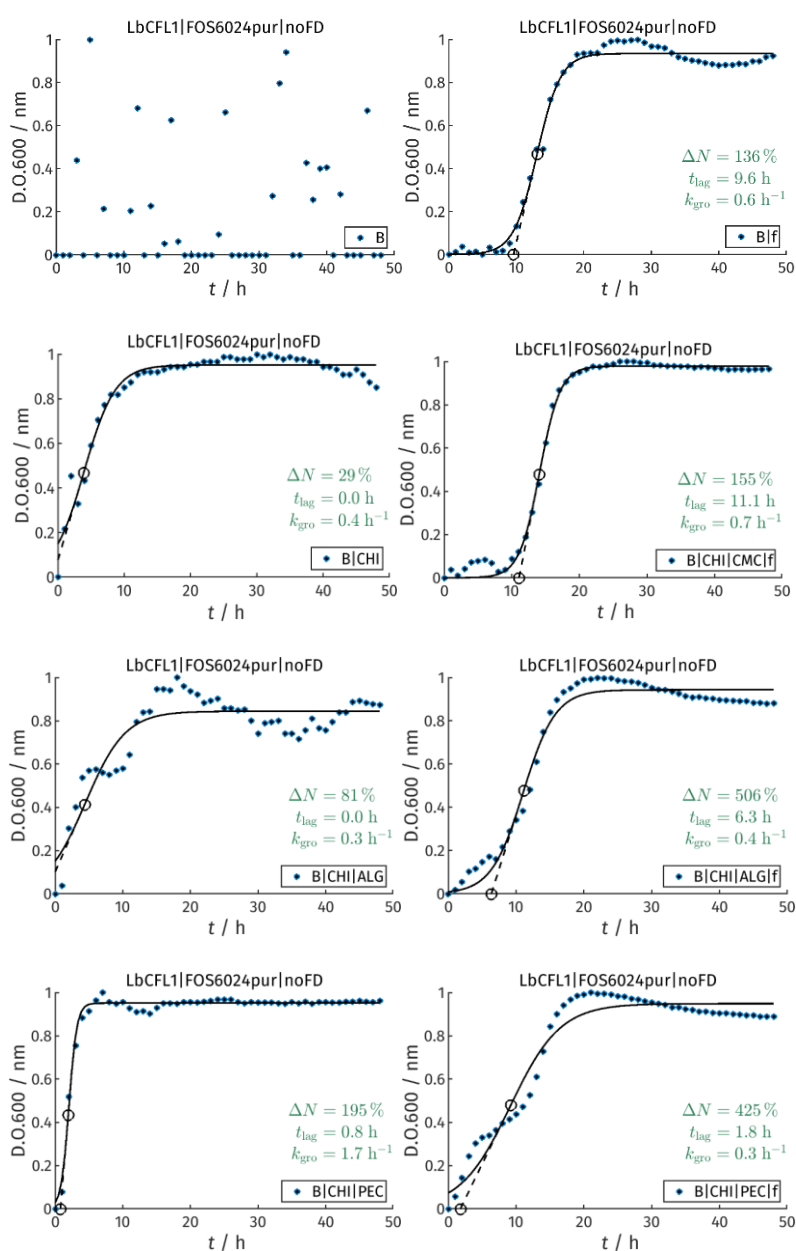


Figura C.1 - Curvas de crescimento antes e após o processo de encapsulamento relativas ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.

Tabela C.1 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano antes e após o processo de encapsulamento relativos ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.

<i>L. plantarum</i> WCFS1 após LbL	t_{lag} (h)	k (h^{-1})	R^2	ΔN (%)
B	0,5	0,51	0,9462	425
B f	0,6	0,44	0,9815	471
B CHI	6,9	0,36	0,9967	876
B CHI f	11,5	0,13	0,9975	641
B CHI ALG	7,2	0,34	0,9945	943
B CHI ALG f	7,1	0,37	0,9961	964
B CHI PEC	6,0	0,34	0,9950	964
B CHI PEC f	6,6	0,35	0,9944	817
B CHI CMC	6,2	0,37	0,9947	969
B CHI CMC f	8,3	0,50	0,9943	677



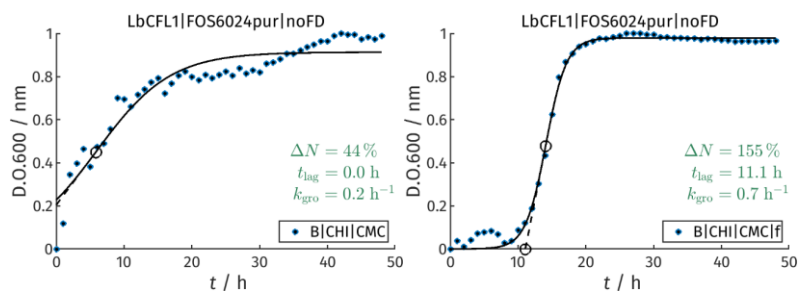
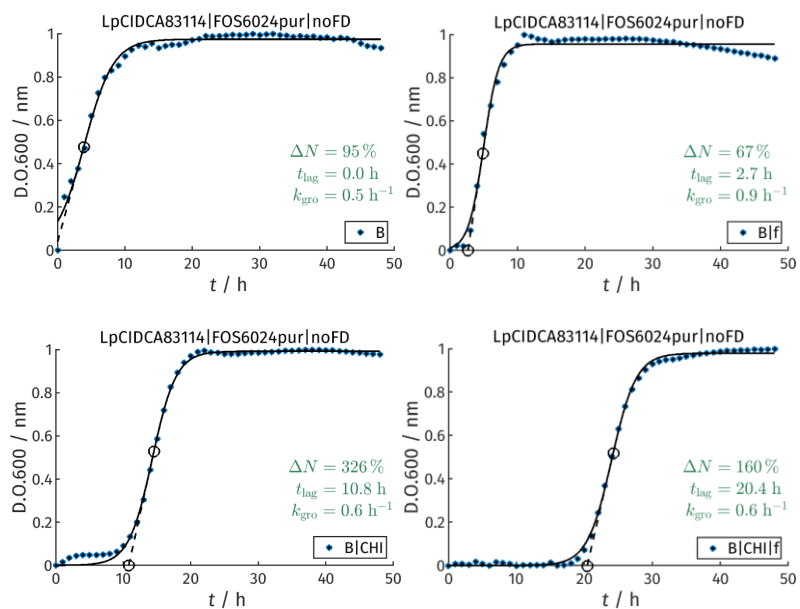


Figura C.2 - Curvas de crescimento antes e após o processo de encapsulamento relativas ao Ensaio 2: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.

Tabela C.2 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano antes e após o processo de encapsulamento relativos ao Ensaio 2: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.

<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CFL1 após LbL	t_{lag} (h)	k (h^{-1})	R^2	ΔN (%)
B	NaN	NaN	NaN	NaN
B f	9,6	0,58	0,9905	136
B CHI	0,0	0,43	0,9554	29
B CHI f	11,1	0,56	0,9691	318
B CHI ALG	0	0,34	0,8358	81
B CHI ALG f	6,3	0,42	0,9787	506
B CHI PEC	0,8	1,72	0,9873	195
B CHI PEC f	1,8	0,27	0,9518	425
B CHI CMC	0	0,18	0,9049	44
B CHI CMC f	11,1	0,66	0,9959	155



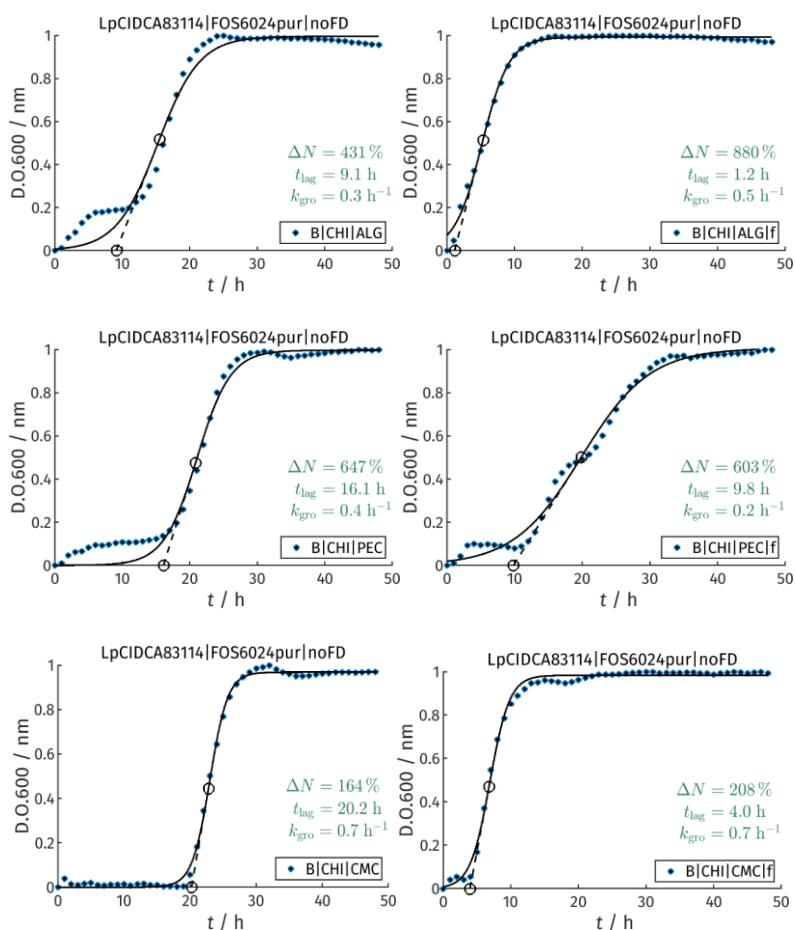
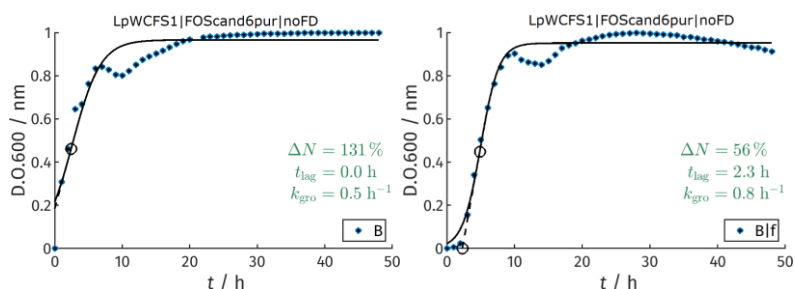
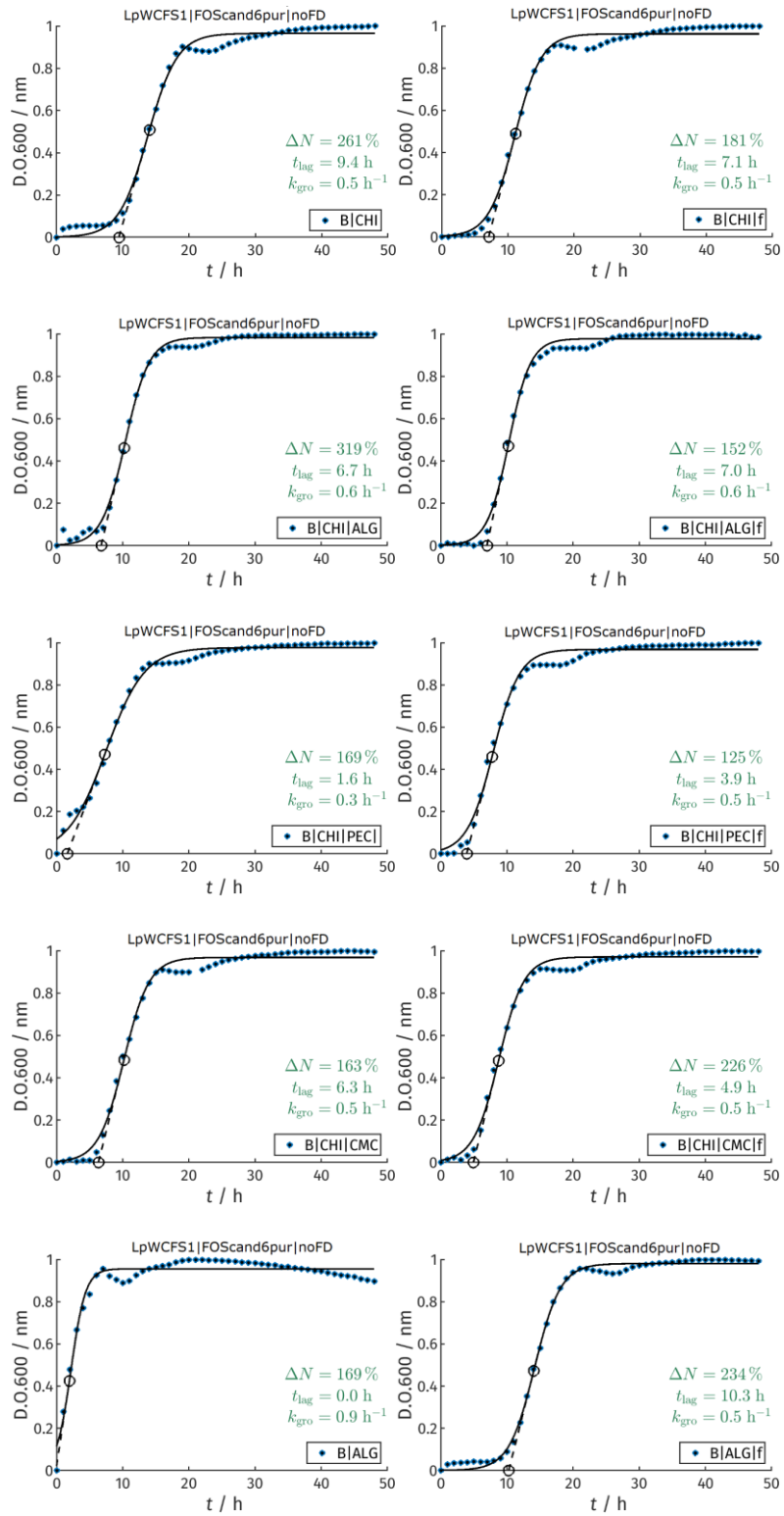


Figura C.3 - Curvas de crescimento antes e após o processo de encapsulamento relativas ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.

Tabela C.3 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano antes e após o processo de encapsulamento relativos ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.

<i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 após LbL	t_{lag} (h)	k (h^{-1})	R^2	ΔN (%)
B	0,0	0,47	0,9833	95
B f	2,7	0,89	0,9880	67
B CHI	10,8	0,57	0,9982	326
B CHI f	20,4	0,56	0,9991	160
B CHI ALG	9,1	0,32	0,9791	431
B CHI ALG f	1,2	0,50	0,9951	880
B CHI PEC	16,1	0,41	0,9872	647
B CHI PEC f	9,8	0,20	0,9923	603
B CHI CMC	20,2	0,74	0,9987	164
B CHI CMC f	4,0	0,69	0,9953	208





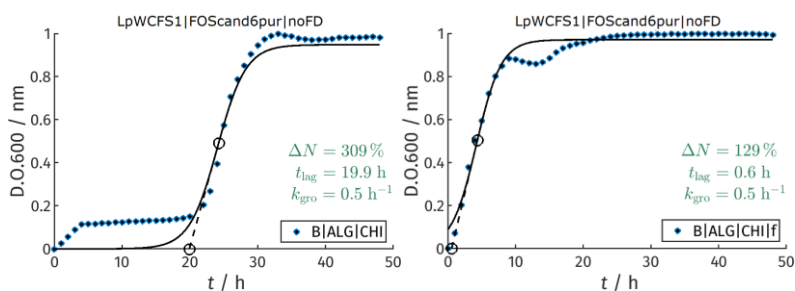
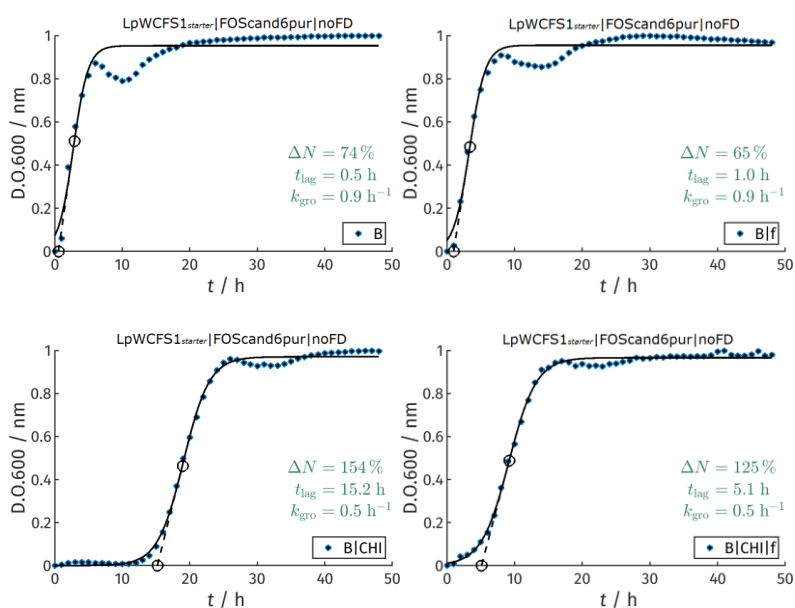


Figura C.4 - Curvas de crescimento antes e após o processo de encapsulamento relativas ao Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado.

Tabela C.4 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano antes e após o processo de encapsulamento relativos ao Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem starter, sem e com a presença FOS candidato 6 purificado.

<i>L. plantarum</i> WCFS1 após LbL	t_{lag} (h)	k (h^{-1})	R^2	ΔN (%)
B	0,0	0,48	0,9040	131
B f	2,3	0,75	0,9775	56
B CHI	9,4	0,46	0,9931	261
B CHI f	7,5	0,64	0,9935	151
B CHI ALG	6,7	0,55	0,9963	319
B CHI ALG f	7,0	0,61	0,9955	152
B CHI PEC	1,6	0,34	0,9920	169
B CHI PEC f	3,9	0,50	0,9900	125
B CHI CMC	6,3	0,52	0,9928	163
B CHI CMC f	4,9	0,53	0,9930	226
B ALG	0,0	0,91	0,9599	169
B ALG f	10,3	0,51	0,9975	234
B ALG CHI	19,9	0,57	0,9971	226
B ALG CHI f	0,6	0,55	0,9689	129



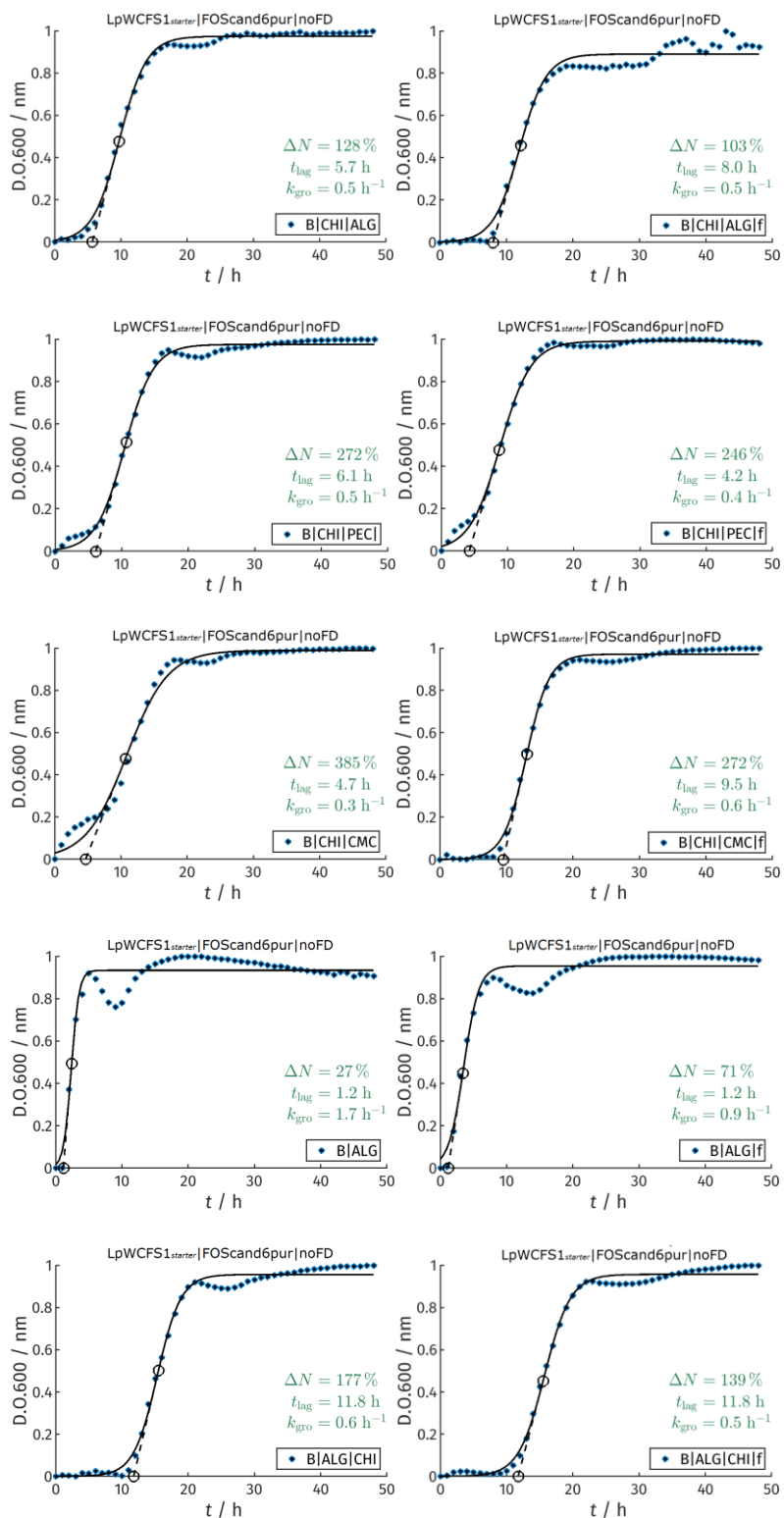
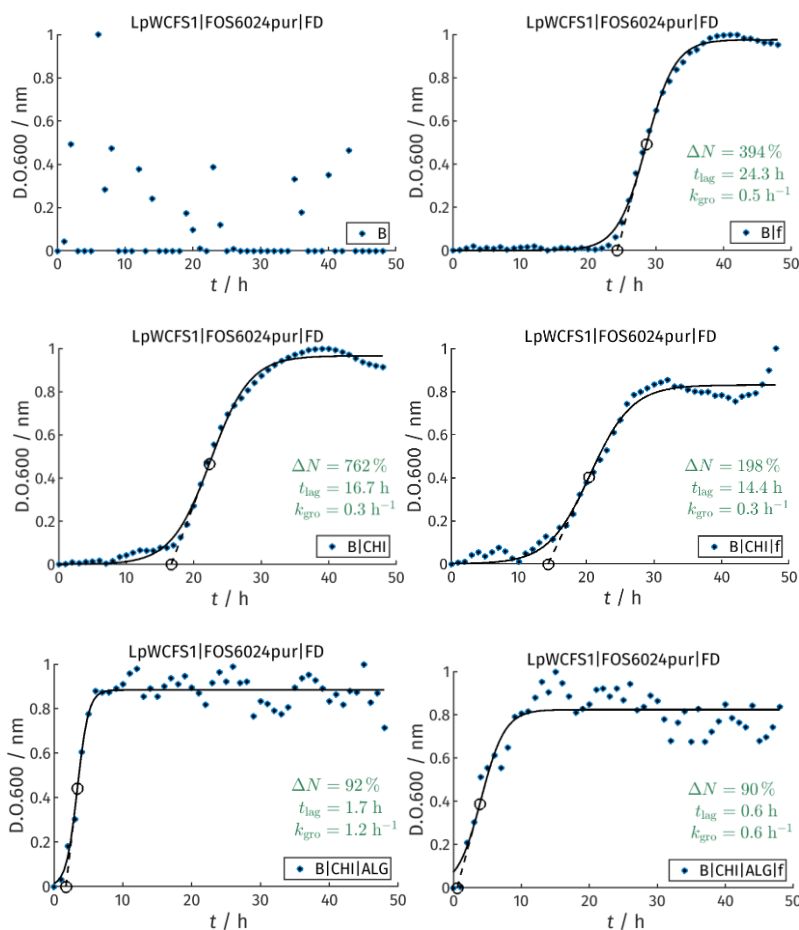


Figura C.524 - Curvas de crescimento antes e após o processo de encapsulamento relativas ao Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado.

Tabela C.5 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano antes e após o processo de encapsulamento relativos ao Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado.

<i>L. plantarum</i> WCFS1 após LbL	t_{lag} (h)	k (h^{-1})	R^2	ΔN (%)
B	0,5	0,91	0,9137	74
B f	1,0	0,86	0,9565	65
B CHI	15,2	0,52	0,9981	154
B CHI f	5,1	0,49	0,9972	125
B CHI ALG	5,7	0,49	0,9963	128
B CHI ALG f	8,0	0,50	0,9839	103
B CHI PEC	6,1	0,46	0,9953	272
B CHI PEC f	4,2	0,43	0,9973	246
B CHI CMC	4,7	0,32	0,9905	385
B CHI CMC f	9,5	0,58	0,9972	272
B ALG	1,2	1,73	0,9238	27
B ALG f	1,2	0,88	0,9442	71
B ALG CHI	11,8	0,56	0,9947	177
B ALG CHI f	11,8	0,51	0,9961	139



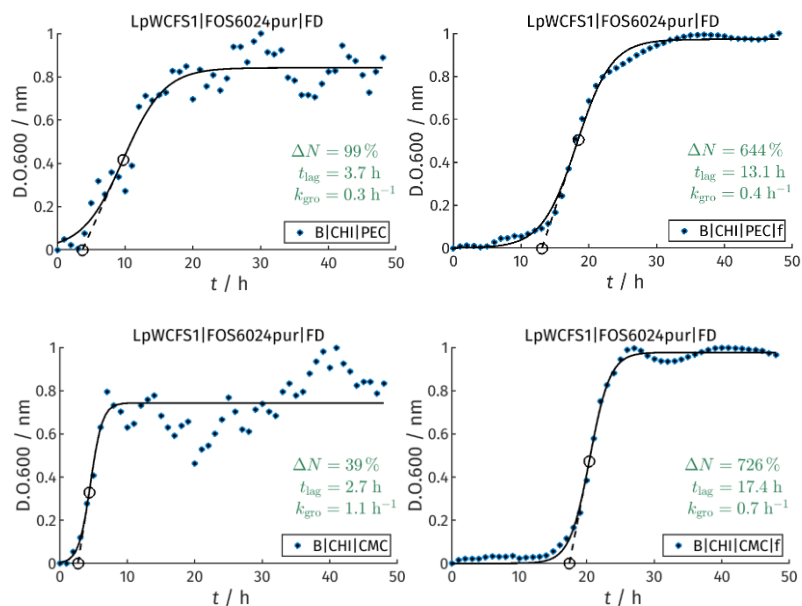
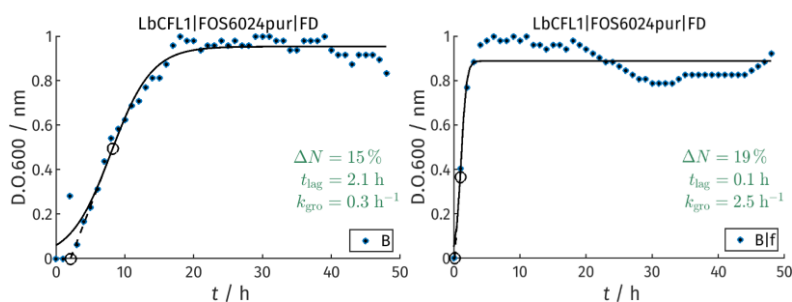


Figura C.6 - Curvas de crescimento após o processo de liofilização relativas ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.

Tabela C.6 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano após o processo de liofilização relativos ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.

<i>L. plantarum</i> WCFS1 após liofilização	t_{lag} (h)	k (h^{-1})	R^2	ΔN (%)
B	NaN	NaN	NaN	NaN
B f	24,3	0,47	0,9980	394
B CHI	16,7	0,34	0,9961	762
B CHI f	14,4	0,32	0,9851	198
B CHI ALG	1,7	1,24	0,9290	92
B CHI ALG f	0,6	0,57	0,8519	90
B CHI PEC	3,7	0,33	0,9263	99
B CHI PEC f	13,1	0,39	0,9962	644
B CHI CMC	2,7	1,14	0,7600	39
B CHI CMC f	17,4	0,67	0,9970	726



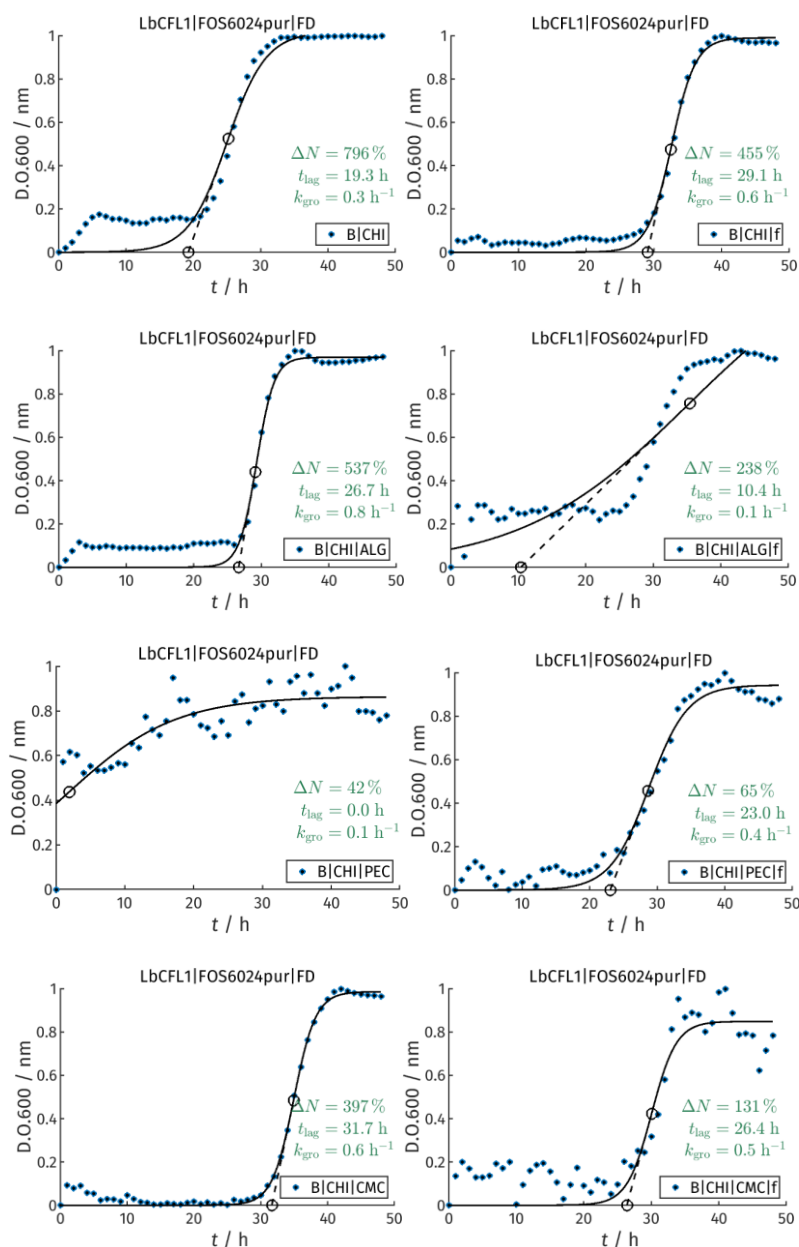


Figura 25 - Curvas de crescimento após o processo de liofilização relativas ao Ensaio 2: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.

Tabela C.7 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano após o processo de liofilização relativos ao Ensaio 2: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.

<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CFL1 após liofilização	t_{lag} (h)	k (h^{-1})	R^2	ΔN (%)
B	2,1	0,34	0,9707	15
B f	0,1	2,53	0,8091	19
B CHI	19,3	0,35	0,9586	796
B CHI f	29,1	0,57	0,9899	455
B CHI ALG	26,7	0,77	0,9711	537
B CHI ALG f	10,4	0,08	0,8841	238
B CHI PEC	0,0	0,13	0,6772	42
B CHI PEC f	23,0	0,35	0,9764	65
B CHI CMC	31,7	0,61	0,9947	397
B CHI CMC f	26,4	0,55	0,8720	131

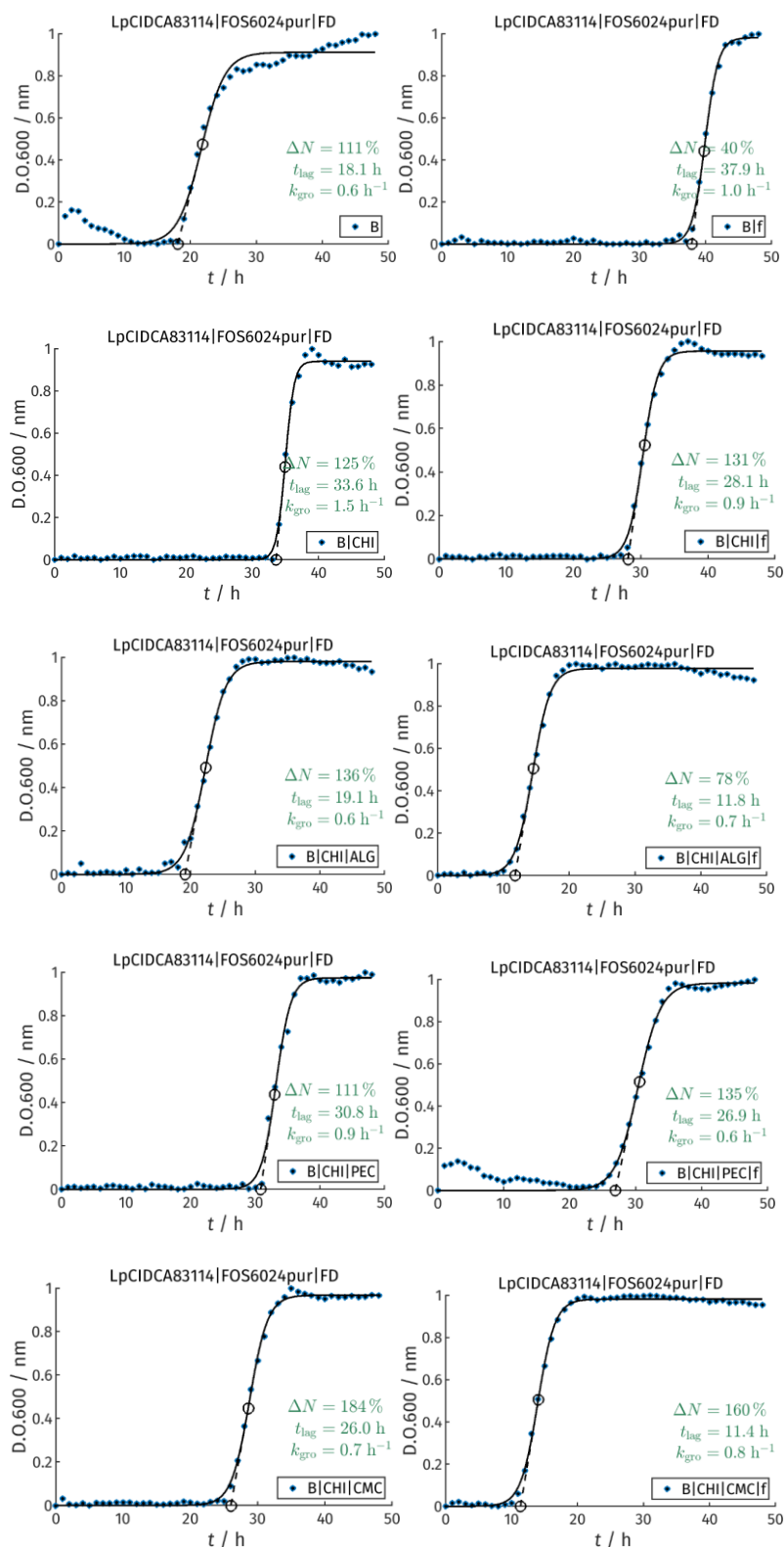
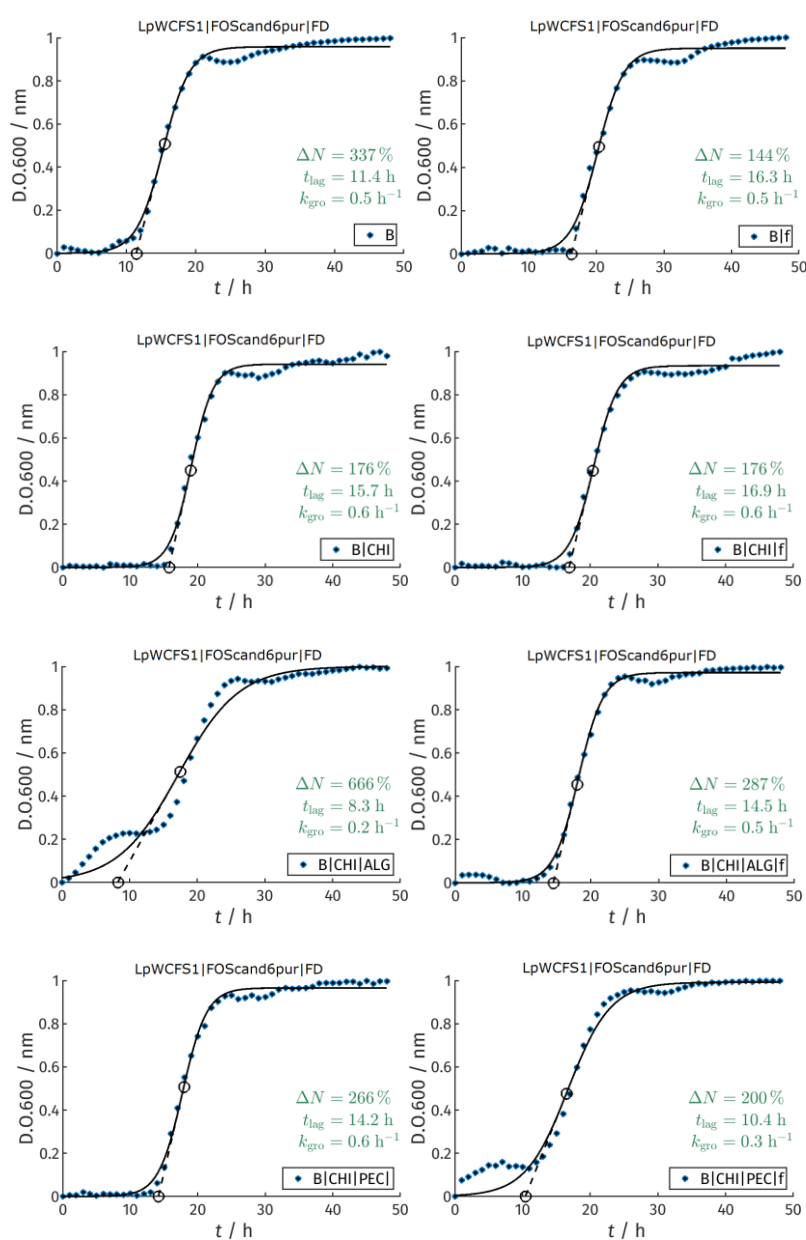


Figura 26 - Curvas de crescimento após o processo de liofilização relativas ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.

Tabela C.8 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano após o processo de liofilização relativos ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 sem starter, sem e com a presença de FOS 6024 purificado.

<i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 após liofilização	t_{lag} (h)	k (h^{-1})	R^2	ΔN (%)
B	18,1	0,56	0,9768	111
B f	37,9	1,02	0,9979	40
B CHI	33,6	1,51	0,9979	125
B CHI f	28,1	0,90	0,9982	131
B CHI ALG	19,1	0,64	0,9983	136
B CHI ALG f	11,8	0,75	0,9975	78
B CHI PEC	30,8	0,88	0,9963	111
B CHI PEC f	26,9	0,58	0,9849	135
B CHI CMC	26,0	0,74	0,9990	184
B CHI CMC f	11,4	0,77	0,9989	160



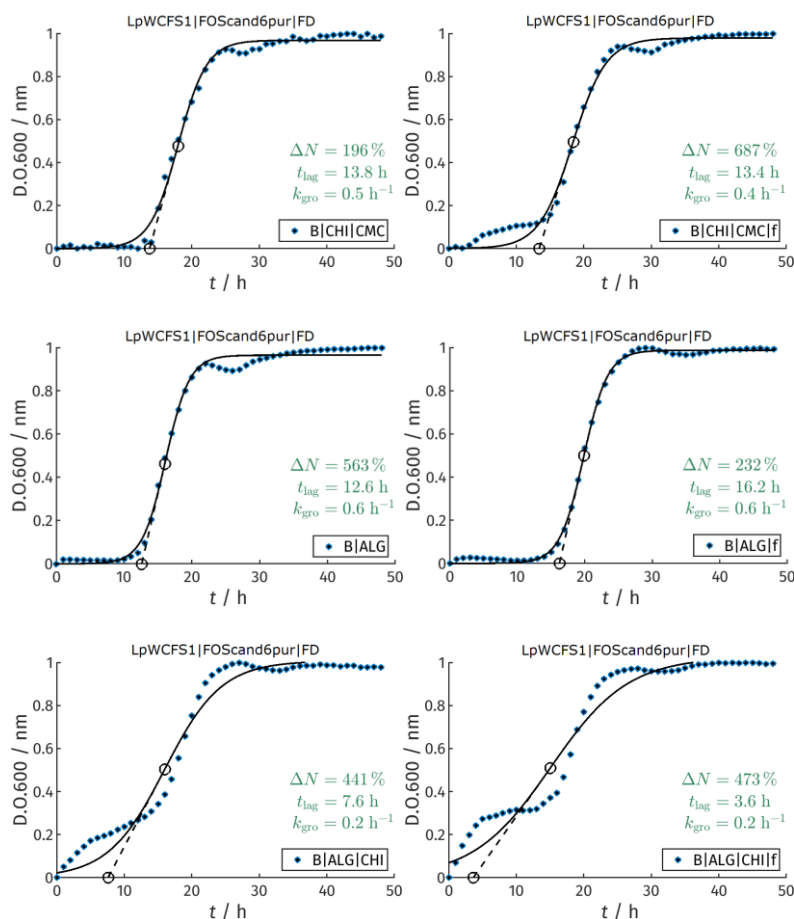
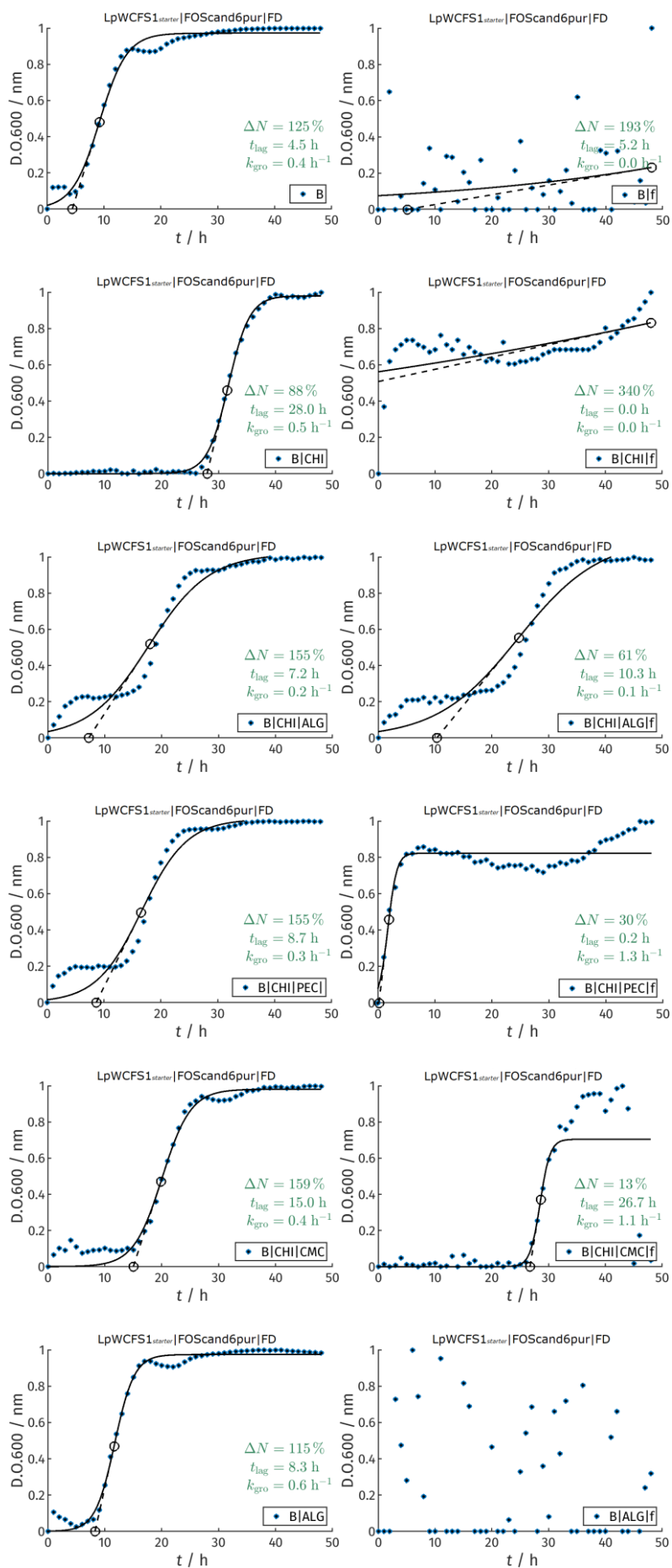


Figura C.9 - Curvas de crescimento após o processo de liofilização relativas ao Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado.

Tabela C.9 - Parâmetros da cinética de crescimento microbiano após o processo de liofilização relativos ao Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado.

<i>L. plantarum</i> WCFS1 após liofilização	t_{lag} (h)	k (h^{-1})	R^2	ΔN (%)
B	11,4	0,52	0,9950	337
B f	16,3	0,51	0,9938	144
B CHI	14,6	0,53	0,9963	282
B CHI f	16,9	0,56	0,9948	176
B CHI ALG	8,3	0,22	0,9752	666
B CHI ALG f	14,5	0,55	0,9975	287
B CHI PEC	14,2	0,56	0,9969	266
B CHI PEC f	10,4	0,32	0,9834	200
B CHI CMC	13,8	0,47	0,9956	196
B CHI CMC f	13,4	0,40	0,9925	687
B ALG	12,6	0,57	0,9925	563
B ALG f	16,2	0,56	0,9991	232
B ALG CHI	7,6	0,24	0,9753	441
B ALG CHI f	3,6	0,17	0,9584	473



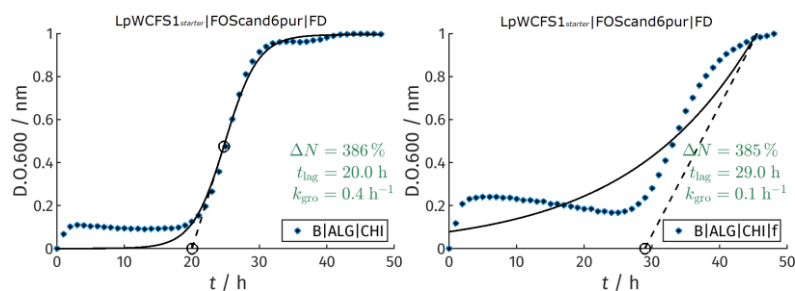


Figura C.10 - Curvas de crescimento após o processo de liofilização relativas ao Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado.

Tabela C.10 - Parâmetros da cinética de crescimento após o processo de liofilização relativos ao Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com starter, sem e com a presença de FOS candidato 6 purificado.

<i>L. plantarum</i> WCFS1 após liofilização	t_{lag} (h)	k (h ⁻¹)	R ²	ΔN (%)
B	4,5	0,42	0,9862	125
B f	5,2	0,02	0,0392	193
B CHI	28,0	0,54	0,9988	88
B CHI f	0,0	0,01	0,3190	340
B CHI ALG	7,2	0,19	0,9635	155
B CHI ALG f	10,3	0,14	0,9458	61
B CHI PEC	8,7	0,25	0,9665	155
B CHI PEC f	0,2	1,29	0,7999	30
B CHI CMC	15,0	0,40	0,9857	159
B CHI CMC f	26,7	1,14	0,7080	13
B ALG	8,3	0,58	0,9927	115
B ALG f	NaN	NaN	NaN	NaN
B ALG CHI	20,0	0,41	0,9811	386
B ALG CHI f	29,0	0,06	0,8840	385