



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Ana Isabel Jorge Reis

**ESTUDO DA ENCAPSULAÇÃO LAYER-BY-LAYER DE  
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 2021



Ana Isabel Jorge Reis

# ESTUDO DA ENCAPSULAÇÃO LAYER-BY-LAYER DE BACTÉRIAS LÁCTEAS PROBIÓTICAS

Dissertação de Mestrado na área científica de Engenharia Química submetida ao  
Departamento de Engenharia Química de 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 apoio do programa FCT: através do financiamento plurianual POCI-01-0145-FEDER-006910 do Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta (CIEPQPF) e Comissão Europeia: através do financiamento do projeto PREMIUM (MSCA-RISE-2017), ao abrigo do acordo de subvenção n.º 777657

Coimbra 2021

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



*“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem.  
Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”*

**Walter S. Landor**



## **Agradecimentos**

---

Em primeiro lugar quero de agradecer aos meus orientadores, Doutora Patrícia Coimbra, Doutora Patrícia Alves e Doutor Pedro Nuno Simões, por todo o apoio, pela disponibilidade e por toda a paciência que tiveram ao longo destes meses. Agradeço também aos meus companheiros de laboratório pela ajuda inicial partilhada.

Agradeço o apoio financeiro por parte do programa FCT, através do financiamento do Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta (CIEPQPF) e pela Comissão Europeia, através do financiamento do projeto internacional PREMIUM – Preservation of microorganisms by understanding the protective mechanisms of oligosaccharides.

Quero expressar a minha imensa gratidão a toda a minha família. Em especial, aos meus pais, Vitor Reis e Isabel Reis, por todo o apoio incondicional e todo o amor. Foram e são o meu maior pilar especialmente nesta grande etapa da minha vida, obrigado por tudo! Agradeço ao meu irmão, Alexandre Reis, por todo o carinho, compreensão e pelas sábias palavras sempre na altura certa. À minha tia-avó, Hermínia Santos, por todo o amor e dedicação, é a avó do coração. Aos meus tios, Henrique Reis e Fernanda Reis, e à minha prima Briana Reis, apesar de estarem longe, conseguem estar sempre presentes nas minhas conquistas.

Ao meu namorado, José Francisco Silva, quero agradecer todo o apoio e todos os momentos vividos nesta nossa grande jornada.

Agradeço a todos os amigos que conheci e me acompanharam nesta vida académica, na cidade dos Doutores, Coimbra. À minha grande companheira de todas as horas, Beatriz Jardim, por nunca me deixar desistir. Fomos o apoio uma da outra neste capítulo tão importante das nossas vidas, obrigada pelas noitadas de estudo intensivo e diversão.

À Samantha Dias pelas suas visitas animadas, nos momentos de estudo e pelos nossos passeios por Coimbra e arredores, com a nossa mascote, Beatriz.

Ao Carlos Carvalho, pela sua amizade e por incentivar-me sempre a escrever a dissertação, mesmo quando a criatividade teimava em aparecer.

Por último, um agradecimento especial à minha parceira de quatro patas, a Kira, que tanto me ensinou nestes últimos anos.

A todos, muito obrigado!





## Resumo

---

O objetivo deste trabalho consistiu em desenvolver um sistema para encapsular bactérias de ácido láctico, em particular a estirpe *Lactobacillus plantarum* WCFS1, com a adição de um componente com propriedades prebióticas, um fruto-oligossacarídeos (FOS). Pretende-se que este sistema permita a proteção dos probióticos, durante o processo de produção (nomeadamente o processo de liofilização), armazenamento, e ainda, contra as condições ácidas do estômago, proporcionando uma libertação controlada destes no intestino, a pH básico.

O método adotado para a encapsulação das bactérias probióticas foi o método de deposição *Layer-by-Layer* (LbL), que é promovido pela atração eletrostática entre o substrato (superfície das bactérias), carregado negativa ou positivamente, e polieletrólitos de cargas opostas. Foram estudados dois revestimentos, cada um com duas camadas: um formado por polímeros naturais, o quitosano (CHI), com carga positiva, e o alginato de sódio (ALG), com carga negativa, e outro formado também por CHI e um copolímero sintético, o poli(ácido acrílico)-Pluronic®-poli(ácido acrílico) (PPP), de carácter aniónico. As bactérias não encapsuladas e encapsuladas foram caracterizadas através da medida do potencial- $\zeta$ , determinação da viabilidade bacteriana antes e após os processos de encapsulação, liofilização, armazenamento e exposição aos meios gastrointestinais simulados, e registo das curvas de crescimento antes e depois da encapsulação e liofilização.

De um modo geral, quando comparadas as bactérias antes e depois de encapsuladas, pode concluir-se que a encapsulação com duas camadas, obteve resultados de menor perda de viabilidade, sugerindo ser um sistema mais promissor na proteção dos probióticos. O complexo biopolímero natural-copolímero sintético (CHI-PPP) revelou melhores resultados em relação ao complexo de biopolímeros naturais (CHI-ALG), nomeadamente, na resistência às condições gastrointestinais simuladas e no menor tempo de latência de crescimento bacteriano. No entanto, as bactérias não encapsuladas apresentaram valores de viabilidade superiores às bactérias encapsuladas, o que pode ser explicado pelo facto desta estirpe bacteriana ser bastante resistente. Por último, ao longo do armazenamento, o efeito do FOS não demonstrou melhoria da perda de viabilidade.

Em resumo, os resultados para esta estirpe em particular, permitem concluir que o processo de encapsulação parece não ser o mais adequado, contudo, a aplicação deste método é bastante promissora para a proteção de estirpes bacterianas mais sensíveis.

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



## Abstract

---

The aim of this work was the development of an intelligent system to encapsulate lactic acid bacteria, in particular the strain *Lactobacillus plantarum* WCFS1, with the addition of a food component with prebiotic properties, such as fructooligosaccharides (FOS). This system allows the probiotics to be protected during the production process (namely in the lyophilization), storage, and against the stomach acidic conditions, providing a controlled release of the probiotics in the intestine, at basic pH.

The method adopted for the encapsulation of probiotic bacteria was the Layer-by-Layer (LbL) deposition method, which is promoted by the electrostatic attraction between the substrate (surface of the bacteria), negatively or positively charged, and polyelectrolytes of opposite charges. Two coatings were studied, each with two layers: one formed by natural polymers, chitosan (CHI), with positive charge, and sodium alginate (ALG), with negative charge, and another formed also by CHI and a synthetic copolymer, Poly(acrylic acid)-Pluronic®-Poly(acrylic acid) (PPP), of anionic character. The unencapsulated and encapsulated bacteria were characterized by measuring the potential- $\zeta$ , determining bacterial viability before and after encapsulation, freeze-drying, storage, and exposure to simulated gastrointestinal media, and recording growth curves before and after encapsulation and freeze-drying.

Overall, when comparing the bacteria before and after encapsulation, it can be concluded that encapsulation with two layers, obtained results of less loss of viability, suggesting it is a more promising system in the protection of probiotics. The natural biopolymer-synthetic biopolymer complex (CHI-PPP) showed better results compared to the natural biopolymer complex (CHI-ALG), namely in resistance to simulated gastrointestinal conditions and shorter latency time of bacterial growth. However, the non-encapsulated bacteria showed higher viability values than the encapsulated bacteria, which can be explained by the fact that this bacterial strain is quite resistant. Finally, throughout storage, the effect of FOS did not improve the viability loss.

In summary, the results for this strain, allow us to conclude that the encapsulation process seems not to be the most appropriate, however, the application of this method is very promising for the protection of more sensitive bacterial strains.

**Keywords:** probiotics, prebiotics, encapsulation, polyelectrolytes, Layer-by-Layer, fructooligosaccharides (FOS).



# Índice

---

<b>Capítulo I – Introdução</b> .....	1
1. Enquadramento.....	1
1.1. Motivação.....	1
1.2. Objetivos.....	3
2. Conceitos Fundamentais.....	5
2.1. Probióticos.....	5
2.1.1. Bactérias Probióticas.....	5
2.1.2. Bactérias de Ácido Lático (BAL).....	7
2.1.2.1. Género <i>Lactobacillus</i> .....	8
2.1.2.1.1. Espécie <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	9
2.2. Prebióticos.....	9
2.2.1. Fruto-oligossacarídeos (FOS).....	10
2.3. Processo de Encapsulação de Probióticos.....	13
2.3.1. Técnica de deposição <i>Layer-by-Layer</i> (LbL).....	14
2.3.2. Materiais de Encapsulação para a técnica LbL.....	16
3. Estado da Arte.....	23
3.1. Processo de Encapsulação das Bactérias Probióticas por LbL.....	23
3.2. Preservação das Bactérias Probióticas a partir de FOS.....	27
<b>Capítulo II – Procedimento Experimental</b> .....	31
1. Materiais.....	31
2. Equipamentos.....	31
3. Métodos.....	32
3.1. Preparação do meio de cultura com e sem agar.....	32
3.2. Preparação das soluções.....	32
3.2.1. Solução de NaCl.....	33
3.2.2. Solução de FOS.....	33
3.2.3. Soluções Poliméricas.....	33

3.2.4. Preparação das soluções de meios simulados.....	34
3.3. Esterilização .....	34
3.4. Reativação e cultura das bactérias .....	34
3.5. Encapsulação por LbL .....	35
3.6. Liofilização .....	38
3.7. Exposição aos meios gastrointestinais simulados.....	38
3.8. Caracterização .....	41
3.8.1. Potencial Zeta (Potencial- $\zeta$ ) .....	41
3.8.2. Viabilidade Bacteriana .....	42
3.8.3. Crescimento Bacteriano .....	42
<b>Capítulo III – Resultados e Discussão .....</b>	<b>45</b>
1. Avaliação do Potencial Zeta- $\zeta$ .....	45
2. Avaliação da Viabilidade Bacteriana .....	49
2.1. Viabilidade após Encapsulação e após Liofilização .....	49
2.2. Viabilidade após Armazenamento a longo prazo .....	52
2.3. Viabilidade após exposição aos meios gastrointestinais simulados.....	54
3. Avaliação do Crescimento Bacteriano .....	57
<b>Capítulo IV – Apreciações Finais .....</b>	<b>61</b>
1. Conclusões .....	61
2. Trabalhos Futuros .....	62
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>63</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>71</b>
Anexo A – Potencial- $\zeta$ .....	71
Anexo B – Viabilidade.....	74
Anexo C – Crescimento Bacteriano.....	83

## Índice de Figuras

---

<b>Figura 1.</b> Estrutura química dos FOS de cadeia curta: (a) 1-kestose, (b) nistose e (c) 1F- $\beta$ -frutofuranosilnistose. ....	12
<b>Figura 2.</b> Esquema do processo de encapsulação por deposição <i>Layer-by-Layer</i> (LbL) [adaptado de Jonas et al., 2018].....	16
<b>Figura 3.</b> Estrutura química do quitosano protonado. ....	18
<b>Figura 4.</b> Estrutura química dos monómeros: ácido- $\beta$ -D-manurónico (M) (esquerda) e ácido $\alpha$ -L-gulurónico (G) (direita). ....	18
<b>Figura 5.</b> Estrutura química do alginato de sódio.....	19
<b>Figura 6.</b> Estrutura química do poli(ácido acrílico).....	20
<b>Figura 7.</b> Estrutura química do Pluronic®. ....	20
<b>Figura 8.</b> Estrutura química do copolímero PAA-PLU-PAA ou PPP (x: número de unidades de óxido de etileno (OE), y: número de unidades de O-CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> , z: número de unidades de óxido de propileno (PO) e n, m: número de unidades de ácido acrílico) [adaptado de Quintana et al., 2017].....	21
<b>Figura 9.</b> Potencial- $\zeta$ da bactéria <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (CIDCA 333) após a adição de diferentes números de camadas de CHI e PPP [Retirado de Quintana et al., 2017 e reproduzida com a autorização da editora Elsevier].....	24
<b>Figura 10.</b> Curvas de crescimento da bactéria <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CIDCA 333 cultivadas em MRS. Quadrados: bactérias não revestidas, círculos: bactérias revestidas com uma camada de CHI, triângulos para cima: bactérias revestidas com uma camada de CHI e uma de PPP, triângulos para baixo: bactérias revestidas com duas camadas de CHI e uma de PPP, diamantes: bactérias revestidas com duas camadas de CHI e duas de PPP [Retirado de Quintana et al., 2017 e reproduzida com a autorização da editora Elsevier]. ....	24
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática do processo de encapsulação das bactérias <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1, pelo método LbL. ....	36
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática da técnica <i>Layer-by-Layer</i> (LbL), aplicada neste projeto (cor verde: bactéria em estudo, LP), cor azul: primeira camada de revestimento CHI, cor amarela: segunda camada de revestimento de ALG e cor vermelha: segunda camada de revestimento de PPP).....	37
<b>Figura 13.</b> Representação esquemática da exposição aos meios de controlo (PBS), gástrico (FGS) e intestinal (FIS) simulados. ....	40

<b>Figura 14.</b> Resultados do potencial- $\zeta$ relativos ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1, sem FOS (a); e na presença de FOS (b). Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média $\pm$ desvio padrão, n=3). .....	46
<b>Figura 15.</b> Resultados do potencial- $\zeta$ relativos ao Ensaio 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1, sem FOS (a); e na presença de FOS (b). Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média $\pm$ desvio padrão, n=3). .....	46
<b>Figura 16.</b> Resultados do potencial- $\zeta$ relativos ao Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1, sem FOS (a); e na presença de FOS (b). Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média $\pm$ desvio padrão, n=3). .....	47
<b>Figura 17.</b> Viabilidade bacteriana antes e após o processo de encapsulação e liofilização relativa ao Ensaio 3 (a), Ensaio 4 (b) e Ensaio 5 (c): <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS. As barras pretas indicam a viabilidade antes da liofilização e as barras cinzentas correspondem à viabilidade após liofilização (média $\pm$ desvio padrão, n=3). .....	50
<b>Figura 18.</b> Perda de viabilidade bacteriana após liofilização relativa ao Ensaio 3 (a), Ensaio 4 (b) e Ensaio 5 (c): <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS. As barras pretas indicam a ausência de FOS e as barras cinzentas indicam a presença de FOS. Perda de viabilidade: $N_{dl}/N_{al}$ – número de células viáveis depois da liofilização/ número de células viáveis antes da liofilização. ....	51
<b>Figura 19.</b> Viabilidade bacteriana relativa ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1 a 5 meses (média $\pm$ desvio padrão, n=3). .....	53
<b>Figura 20.</b> Percentagem de perda de viabilidade relativa ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1 a 5 meses (média $\pm$ desvio padrão, n=3). Perda de viabilidade: número de bactérias no tempo t/número de bactérias no tempo 0. ....	53
<b>Figura 21.</b> Viabilidade bacteriana antes da liofilização e após exposição ao meio de controlo (PBS) e aos meios gástrico (FGS) e intestinal (FIS) simulados, relativa ao Ensaio EMS2 de encapsulação: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1, antes da liofilização, durante 2 h e 30 min de exposição, em série (média $\pm$ desvio padrão, n=3). .....	55
<b>Figura 22.</b> Viabilidade bacteriana após liofilização e após exposição ao meio de controlo (PBS) e aos meios gástrico (FGS) e intestinal (FIS) simulados, relativa aos Ensaio EMS3 (a) e EMS4 (b) de encapsulação: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1, após liofilização durante 2 h e 30 min de exposição, em série (média $\pm$ desvio padrão, n=3). .....	56
<b>Figura 23.</b> Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 3: <i>L. plantarum</i> WCFS1 antes da encapsulação (LP-FOS), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI-	



FOS), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG-FOS) e PPP (LP-CHI-PPP-FOS) com presença de FOS, ou seja, antes da liofilização. ....	58
<b>Figura A.24.</b> Resultados do potencial- $\zeta$ relativos ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1, sem FOS (a); e na presença de FOS (b). Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média $\pm$ desvio padrão, n=3).....	71
<b>Figura B.25.</b> Viabilidade bacteriana antes e após o processo de encapsulação e liofilização relativa ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS. As barras pretas indicam a viabilidade antes da liofilização e as barras cinzentas correspondem à viabilidade após a liofilização (média $\pm$ desvio padrão, n=3). ....	74
<b>Figura B.26.</b> Perda de viabilidade bacteriana após a liofilização relativa ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS. As barras pretas indicam a ausência de FOS e as barras cinzentas indicam a presença de FOS.....	75
<b>Figura B.27.</b> Viabilidade bacteriana antes e após o processo de encapsulação e liofilização relativa ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS. As barras pretas indicam a viabilidade antes da liofilização e as barras cinzentas correspondem à viabilidade após a liofilização (média $\pm$ desvio padrão, n=3). ....	75
<b>Figura B.28.</b> Viabilidade bacteriana relativa ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2, 3 e 7 semanas (média $\pm$ desvio padrão, n=3).....	77
<b>Figura B.29.</b> Viabilidade bacteriana relativa ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2 e 6 semanas (média $\pm$ desvio padrão, n=3).....	78
<b>Figura B.30.</b> Percentagem de perda de viabilidade relativa ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2, 3 e 7 semanas meses (média $\pm$ desvio padrão, n=3). Perda de viabilidade: número de bactérias no tempo t/número de bactérias no tempo 0.....	79
<b>Figura B.31.</b> Percentagem de perda de viabilidade relativa ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2 e 6 semanas meses (média $\pm$ desvio padrão, n=3). Perda de viabilidade: número de bactérias no tempo t/número de bactérias no tempo 0.....	80
<b>Figura B.32.</b> Viabilidade bacteriana antes da liofilização e após exposição ao meio de controlo (PBS) e aos meios gástrico (FGS) e intestinal (FIS) simulados, relativa ao Ensaio EMS1 de encapsulação: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1, antes da liofilização, durante 2 h de exposição em paralelo (média $\pm$ desvio padrão, n=3). ....	81

<b>Figura C.33.</b> Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 3: <i>L. plantarum</i> WCFS1 antes da encapsulação (LP), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG) e PPP (LP-CHI-PPP) sem presença de FOS, ou seja, antes da liofilização. ....	83
<b>Figura C.34.</b> Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 3: <i>L. plantarum</i> WCFS1 antes da encapsulação (LP), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG) e PPP (LP-CHI-PPP) sem presença de FOS, após liofilização. ....	84
<b>Figura C.35.</b> Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 3: <i>L. plantarum</i> WCFS1 antes da encapsulação (LP-FOS), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI-FOS), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG-FOS) e PPP (LP-CHI-PPP-FOS) com presença de FOS, após liofilização.....	84
<b>Figura C.36.</b> Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 4: <i>L. plantarum</i> WCFS1 antes da encapsulação (LP), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG) e PPP (LP-CHI-PPP) sem presença de FOS, ou seja, antes da liofilização. ....	85
<b>Figura C.37.</b> Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 4: <i>L. plantarum</i> WCFS1 antes da encapsulação (LP-FOS), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI-FOS), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG-FOS) e PPP (LP-CHI-PPP-FOS) sem presença de FOS, ou seja, antes da liofilização. ....	86
<b>Figura C.38.</b> Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 4: <i>L. plantarum</i> WCFS1 antes da encapsulação (LP), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG) e PPP (LP-CHI-PPP) sem presença de FOS, após liofilização. ....	87
<b>Figura C.39.</b> Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 4: <i>L. plantarum</i> WCFS1 antes da encapsulação (LP-FOS), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI-FOS), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG-FOS) e PPP (LP-CHI-PPP-FOS) com presença de FOS, após liofilização.....	88
<b>Figura C.40.</b> Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 5: <i>L. plantarum</i> WCFS1 antes da encapsulação (LP), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG) e PPP (LP-CHI-PPP) sem presença de FOS, ou seja, antes da liofilização. ....	89
<b>Figura C.41.</b> Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 5: <i>L. plantarum</i> WCFS1 antes da encapsulação (LP-FOS), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI-	

FOS), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG-FOS) e PPP (LP-CHI-PPP-FOS) sem presença de FOS, ou seja, antes da liofilização.....90

**Figura C.42.** Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 5: *L. plantarum* WCFS1 antes da encapsulação (LP), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG) e PPP (LP-CHI-PPP) sem presença de FOS, após liofilização.....91

**Figura C.43.** Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 5: *L. plantarum* WCFS1 antes da encapsulação (LP-FOS), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI-FOS), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG-FOS) e PPP (LP-CHI-PPP-FOS) com presença de FOS, após liofilização. ....92



## Índice de Tabelas

---

<b>Tabela 1.</b> Resumo das condições dos Ensaios EMS1, EMS2, EMS3 e EMS4 expostos aos meios gastrointestinais simulados. EMS: Exposição ao Meio Simulado.....	54
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros da cinética de crescimento bacteriano relativos ao Ensaio 3: <i>L. plantarum</i> WCFS1 sem e com a presença de FOS, após encapsulação, ou seja, antes da liofilização. ....	59
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros da cinética de crescimento bacteriano relativos ao Ensaio 3: <i>L. plantarum</i> WCFS1 sem e com a presença de FOS, após liofilização. ....	59
<b>Tabela A.4.</b> Valores do potencial- $\zeta$ relativos ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média $\pm$ desvio padrão, n=3). ....	71
<b>Tabela A.5.</b> Valores do potencial- $\zeta$ relativos ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 na presença de FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média $\pm$ desvio padrão, n=3). ....	71
<b>Tabela A.6.</b> Valores do potencial- $\zeta$ relativos ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média $\pm$ desvio padrão, n=3). ....	72
<b>Tabela A.7.</b> Valores do potencial- $\zeta$ relativos ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 na presença de FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média $\pm$ desvio padrão, n=3). ....	72
<b>Tabela A.8.</b> Valores do potencial- $\zeta$ relativos ao Ensaio 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média $\pm$ desvio padrão, n=3). ....	72
<b>Tabela A.9.</b> Valores do potencial- $\zeta$ relativos ao Ensaio 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 na presença de FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média $\pm$ desvio padrão, n=3). ....	72
<b>Tabela A.10.</b> Valores do potencial- $\zeta$ relativos ao Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 sem FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média $\pm$ desvio padrão, n=3). ....	72
<b>Tabela A.11.</b> Valores do potencial- $\zeta$ relativos ao Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 na presença de FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média $\pm$ desvio padrão, n=3). ....	73

<b>Tabela B.12.</b> Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após encapsulação e liofilização (média $\pm$ desvio padrão, n=3).....	74
<b>Tabela B.13.</b> Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após encapsulação e liofilização (média $\pm$ desvio padrão, n=3).....	75
<b>Tabela B.14.</b> Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após encapsulação e liofilização (média $\pm$ desvio padrão, n=3).....	76
<b>Tabela B.15.</b> Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 4: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após encapsulação e liofilização (média $\pm$ desvio padrão, n=3).....	76
<b>Tabela B.16.</b> Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 5: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após encapsulação e após liofilização (média $\pm$ desvio padrão, n=3).....	76
<b>Tabela B.17.</b> Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2, 3 e 7 semanas (média $\pm$ desvio padrão, n=3). .....	77
<b>Tabela B.18.</b> Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2 e 6 semanas (média $\pm$ desvio padrão, n=3). .....	78
<b>Tabela B.19.</b> Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1 a 5 meses (média $\pm$ desvio padrão, n=3).....	79
<b>Tabela B.20.</b> Percentagem de perda de viabilidade relativa ao Ensaio 1: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2, 3 e 7 semanas (média $\pm$ desvio padrão, n=3). .....	80
<b>Tabela B.21.</b> Percentagem de perda de viabilidade relativa ao Ensaio 2: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2 e 6 semanas (média $\pm$ desvio padrão, n=3). .....	81
<b>Tabela B.22.</b> Percentagem de perda de viabilidade relativa ao Ensaio 3: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1 a 5 meses (média $\pm$ desvio padrão, n=3).....	81

<b>Tabela B.23.</b> Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio EMS1 de encapsulação: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1, antes da liofilização, durante 2 h de exposição aos meios simulados em paralelo (média ± desvio padrão, n=3). .....	82
<b>Tabela B.24.</b> Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio EMS2 de encapsulação: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1, antes da liofilização, durante 2 h e 30 min de exposição, em série (média ± desvio padrão, n=3). .....	82
<b>Tabela B.25.</b> Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio EMS3 de encapsulação: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1, após liofilização, durante 2 h e 30 min de exposição, em série (média ± desvio padrão, n=3). .....	82
<b>Tabela B.26.</b> Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio EMS4 de encapsulação: <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1, após liofilização, durante 2 h e 30 min de exposição, em série (média ± desvio padrão, n=3). .....	82
<b>Tabela C.27.</b> Parâmetros da cinética de crescimento bacteriano relativos ao Ensaio 4: <i>L. plantarum</i> WCFS1 sem e com a presença de FOS após encapsulação, ou seja, antes da liofilização. ....	86
<b>Tabela C.28.</b> Parâmetros da cinética de crescimento bacteriano relativos ao Ensaio 4: <i>L. plantarum</i> WCFS1 sem e com a presença de FOS, após liofilização. ....	88
<b>Tabela C.29.</b> Parâmetros da cinética de crescimento bacteriano relativos ao Ensaio 5: <i>L. plantarum</i> WCFS1 sem e com a presença de FOS, após encapsulação, ou seja, antes liofilização. ....	90
<b>Tabela C.30.</b> Parâmetros da cinética de crescimento bacteriano relativos ao Ensaio 5: <i>L. plantarum</i> WCFS1 sem e com a presença de FOS, após liofilização. ....	92





## Siglas

---

ALG	Alginato de sódio
ATP	Adenosina trifosfato
BAL	Bactérias de ácido láctico
CFU	Unidade Formadora de colónias
CHI	Quitosano
D.O.	Densidade ótica
D.O. <sub>f</sub>	Densidade ótica final
D.O. <sub>i</sub>	Densidade ótica inicial
DWPI	Proteína isolada de soro de leite desnatado
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGS	Fluido gástrico simulado
FIS	Fluido intestinal simulado
FOS	Fruto-oligossacarídeos
GOS	Galato-oligossacarídeos
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HCl	Ácido clorídrico
ISAPP	<i>International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics</i>
k	Taxa de crescimento microbiano (h <sup>-1</sup> )
LbL	<i>Layer-by-Layer</i>
LP	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1
MC	Metilcelulose
MRS	Man, Rogosa & Sharoe <i>broth</i>
M <sub>w</sub>	Peso molecular
NaCl	Cloreto de sódio
N <sub>ai</sub>	Número de células viáveis antes da liofilização
NaOH	Hidróxido de sódio
N <sub>di</sub>	Número de células viáveis depois da liofilização

PAA	Poli(ácido acrílico)
PAA-PLU-PAA	Copolímero Poli(ácido acrílico)-Pluronic®-Poli(ácido acrílico)
PBS	Solução tampão de Fosfato salino/meio de controle
PEO	Poli(óxido de etileno)
PLU	Pluronic®
PPO	Poli(óxido de propileno)
PPP	Poli(ácido acrílico)-Pluronic®-Poli(ácido acrílico)
QPS	<i>Qualified Presumption of Safety</i>
SP	Fitato de sódio
sβG	β-glucano sulfatado
T	Temperatura (°C)
t	Tempo (h)
t <sub>0</sub>	Ponto de inflexão sigmóide (h)
T <sub>g</sub>	Temperatura de transição vítrea
t <sub>lag</sub>	Tempo de atraso ( <i>lag time</i> ) (h)
T <sub>m</sub>	Temperatura de transição de fase (°C)
WHO	<i>World Health Organization</i>
WPI	Proteína isolada de soro de leite
Y	Absorbância (nm)
Y <sub>f</sub>	Absorbância final (nm)
Y <sub>i</sub>	Absorbância inicial (nm)
ΔN	Variação percentual do número de bactérias (%)
ζ	Potencial Zeta (mV)

# Capítulo I – Introdução

## 1. Enquadramento

### 1.1. Motivação

Atualmente, tem existido um aumento na procura de alimentos nos quais são incorporadas espécies probióticas, convertendo-os em alimentos funcionais. Este crescimento, deve-se aos inúmeros benefícios destes microrganismos para a saúde humana.

Os probióticos são um conjunto de microrganismos que estão presentes naturalmente em alimentos fermentados, como é o caso dos iogurtes, leite e, queijos, em suplementos alimentares e produtos medicinais. Os microrganismos mais comumente usados pelas indústrias alimentar e farmacêutica, para a produção de alimentos funcionais e produtos probióticos são, as bactérias de ácido láctico. A introdução de espécies probióticas na alimentação humana, contribui para o tratamento de diversos distúrbios intestinais, nomeadamente, na absorção de sais e na síntese de vitaminas. Para além disso, têm impacto no sistema imunológico, inibindo o crescimento de microrganismos patogénicos (M. J. Martín et al., 2015).

Para serem eficazes, estas bactérias devem resistir às severas condições do trato gastrointestinal e atingir o local pretendido, o intestino, em quantidades suficientes para sustentar a sua colonização. Contudo, isto não se verifica devido às condições adversas que enfrentam ao longo do seu percurso, mais especificamente, devido ao baixo pH do estômago, aos sais biliares e às atividades enzimáticas (Quintana et al., 2017). De igual forma, e antes do seu consumo, estes microrganismos passam por várias situações de *stress* que podem afetar a sua viabilidade final, tais como os processos de desidratação durante a produção e o processo de armazenamento.

De forma a colmatar o efeito que estas condições exercem sobre as bactérias, a microencapsulação representa uma das soluções mais promissoras para preservar a viabilidade probiótica. Este método consiste no envolvimento das bactérias probióticas num determinado material (resultando em partículas com diâmetros a variar entre a escala nanométrica e milimétrica), que atua como barreira protetora. Desta forma, as bactérias encontram-se protegidas dos vários ambientes nocivos, assegurando-se, assim, a minimização de perda de viabilidade, durante o processamento, armazenamento, e consumo dos probióticos

encapsulados (Calinoiu et al., 2019). Este processo tem, ainda, a vantagem de evitar que estes microrganismos se multipliquem nos alimentos onde estão inseridos.

Deste modo, a seleção apropriada dos materiais de revestimento e da técnica de microencapsulação é fundamental para que as bactérias cheguem incólumes ao local pretendido onde exercerão a sua função.

Ao selecionar os biomateriais para o processo de encapsulação, é essencial a certificação de alguns fatores, como as suas propriedades físicas e químicas, toxicidade, biodegradabilidade, disponibilidade, qualidade alimentar e processos de fabricação e esterilização (J. Chen et al., 2017). Apesar da frequente utilização de materiais como alguns polissacarídeos, lípidos e proteínas, atualmente o interesse nos biopolímeros, nomeadamente no quitosano, alginato, amido e pectina, tem sido crescente, devido à sua capacidade de proteção quando expostos às condições adversas mencionadas anteriormente (Calinoiu et al., 2019). De forma a melhorar a eficiência do revestimento, têm sido levadas a cabo várias pesquisas, onde se combinam dois ou mais biopolímeros diferentes, como por exemplo, alginato-quitosano e alginato-pectina (Aguilar et al., 2015; Anselmo et al., 2016).

As técnicas de encapsulação mais aplicadas, tanto a nível laboratorial como industrial, são o *spray-drying*, a emulsão e a extrusão. Na microencapsulação, baseada em revestimento de probióticos, o método camada por camada (*Layer-by-Layer*, LbL), é um dos mais eficientes. É um procedimento simples, que consiste na adsorção alternada de polieletrólitos de cargas opostas em superfícies, neste caso, na superfície das bactérias probióticas carregadas negativamente, formando finas camadas de filmes funcionais. As propriedades desses filmes, como a espessura, permeabilidade, morfologia e resistência, podem ser ajustadas com precisão, manipulando parâmetros como o pH e a força iónica das soluções de polieletrólitos (Priya et al., 2011; Quintana et al., 2017).

Para além dos materiais e das técnicas de revestimento, a eficiência dos probióticos pode ainda ser melhorada com a adição de prebióticos. Estes são compostos não digeríveis e, no momento em que chegam ao intestino humano, fornecem a energia necessária para que as bactérias probióticas atinjam uma taxa de colonização significativa, sendo, por isso, considerados um substrato de crescimento (Romano et al., 2018). Desta forma, melhoram a estabilidade das bactérias, exibindo um efeito protetor durante os processos de liofilização e armazenamento, acrescentando valor aos produtos alimentares. Os mais utilizados são os fruto-oligossacarídeos (FOS).

Perante as condições adversas do trato gastrointestinal e as condições de produção e armazenamento, é necessário criar estratégias para aumentar a viabilidade das bactérias até

chegarem ao seu destino final. Esta necessidade gerou a motivação para este projeto, desenvolvendo um sistema de encapsulação de probióticos, constituído por um complexo de biopolímeros naturais, por outro complexo de biopolímeros natural-copolímero sintético e ainda, pela incorporação de um prebiótico. Assim, teremos dois sistemas que permitem a entrega controlada das bactérias e a proteção das mesmas a longo prazo, podendo comparar qual será o melhor.

## 1.2. Objetivos

A estratégia desenvolvida neste trabalho tem o propósito de aumentar a viabilidade e estabilidade de bactérias probióticas, mais especificamente, as bactérias de ácido láctico, mediante um processo de encapsulamento.

Assim sendo, a técnica *Layer-by-Layer*, foi a escolhida para o processo de encapsulação das bactérias lácticas da estirpe *Lactobacillus plantarum* WCFS1. No processo, as bactérias foram revestidas com duas camadas de polieletrólitos diferentes. A primeira camada de revestimento manteve-se sempre a mesma, usando um polímero natural, de carga positiva, o quitosano. Já na segunda camada, testaram-se dois polímeros com carga negativa: um polímero natural, o alginato, e um copolímero sintético, o poli(ácido acrílico)-Pluronic®-poli(ácido acrílico). A confirmação/monotorização do encapsulamento será realizada mediante a medição do potencial zeta das bactérias no fim da deposição de cada camada de polieletrólitos.

Para testar o efeito protetor dos revestimentos, a viabilidade das bactérias encapsuladas e não encapsuladas (controlo), com e sem a adição de um agente protetor (um fruto-oligossacarídeo, FOS) será determinada antes e depois do processo de liofilização. Com o mesmo objetivo, far-se-á a monotorização da viabilidade das bactérias ao longo de 5 meses de armazenamento e, de igual forma a viabilidade dos probióticos, encapsulados e não encapsulados, quando expostos aos meios simulados, gástrico e intestinal.



## 2. Conceitos Fundamentais

### 2.1. Probióticos

Existe um complexo ecossistema de microrganismos que colonizam o trato gastrointestinal humano. As bactérias intestinais fazem parte desses microrganismos, exercendo diversas funções muito importantes para a manutenção da saúde humana (Markowiak & Ślizewska, 2017).

A palavra probiótico deriva do grego “*probios*” que significa “para a vida”. No começo, um probiótico era caracterizado como um microrganismo capaz de estimular o crescimento de outros microrganismos (Florou-Paneri et al., 2012). Porém, esta definição foi alterada ao longo do tempo, devido a evidências científicas comprovadas, sobre os efeitos benéficos que estes microrganismos apresentam. Atualmente, a *Food and Agriculture Organization* (FAO) e a *World Health Organization* (WHO), definem os probióticos como “microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002; Hill et al., 2014). As funcionalidades dos probióticos dependem da estirpe a ser usada, bem como da dose e dos componentes utilizados para produzir um determinado produto probiótico. A dose recomendada encontra-se na gama de valores entre  $10^6$  e  $10^7$  CFU/g (Calinoiu et al., 2019).

Presentemente, os probióticos são considerados um recurso alternativo aos antibióticos, no tratamento de infecções intestinais, em consequência da crescente propagação da resistência aos antibióticos e à necessidade de redução de custos associados a tratamentos (Florou-Paneri et al., 2012). São incorporados em alimentos, fermentados ou não fermentados, tornando-os alimentos funcionais. Os alimentos funcionais são definidos por alimentos modificados que permitem um benefício à saúde humana, incluindo prevenção e tratamento de doenças. Para que estes efeitos sejam alcançados, os probióticos devem ser metabolicamente estáveis e ativos no produto, sobrevivendo ao trato gastrointestinal até atingir o cólon, onde serão colonizados (M. J. Martín et al., 2015).

#### 2.1.1. Bactérias Probióticas

O termo “probiótico” inclui uma enorme variedade de microrganismos, as bactérias produtoras de ácido láctico (BAL), bactérias não produtoras de ácido láctico e algumas leveduras (Chavarri et al., 2012). As mais utilizadas em alimentos funcionais são as bactérias produtoras de ácido láctico, pois apresentam maior potencial de manutenção e equilíbrio da

microflora intestinal saudável. Estas são responsáveis por neutralizar a atividade de bactérias patogênicas, aumentar a absorção de vitaminas e minerais, estimular o crescimento de ácidos orgânicos e aminoácidos, aumentar a eficiência do sistema imunológico e reduzir os níveis séricos de colesterol. Apresentam também, propriedades antimutagênicas e anticancerígenas, reduzindo a incidência de certas doenças (Markowiak & Ślizewska, 2017). As mais estudadas pertencem ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (M. J. Martín et al., 2015).

Embora haja fundamentos científicos sobre a eficácia e benefícios dos probióticos, é necessário estabelecer, antes destas serem incorporadas nos alimentos, quais as estirpes mais adequadas e qual a dosagem mais eficaz para um determinado efeito. Portanto, existem vários requisitos de segurança, funcionais e tecnológicos, relacionados com a produção e processamento, que as estirpes probióticas devem cumprir (M. J. Martín et al., 2015).

Quanto à segurança de uma estirpe bacteriana, é fundamental saber a origem (preferencialmente de origem humana), estabelecer as suas propriedades intrínsecas, avaliar a farmacocinética (estudo do percurso que as bactérias fazem no organismo, desde que são ingeridas até, que sejam excretadas) e a farmacodinâmica (estudo da interação das bactérias com o local alvo, onde exercem o seu mecanismo de ação), tendo assim uma identificação diagnóstica precisa. Para além disto, é essencial obter dados sobre: a ausência de associações a doenças infecciosas, distúrbios gastrointestinais e efeitos adversos; a resistência da estirpe bacteriana na passagem pelo trato gastrointestinal e a antibióticos; e as suas propriedades de colonização. Permitindo, assim, compreender melhor os efeitos associados ao consumo de probióticos (Markowiak & Ślizewska, 2017).

De maneira que a estirpe escolhida atue benéficamente, os critérios de funcionalidade têm de ser cumpridos. Estes critérios são: a resistência ao baixo pH do estômago, aos sais biliares e enzimas presentes no intestino, a adesão e capacidade de colonização nos locais específicos a uma taxa de sobrevivência adequada, a atividade antagônica contra os microrganismos patogênicos e a produção de compostos benéficos para a saúde do hospedeiro (Markowiak & Ślizewska, 2017; Saarela et al., 2000).

As características tecnológicas estão associadas à viabilidade durante o processo de produção e à estabilidade durante o armazenamento e distribuição de uma determinada estirpe probiótica ou de produtos acabados. Devem ainda ter-se em consideração propriedades sensoriais destas, bem como a capacidade de resistência a bacteriófagos (Markowiak & Ślizewska, 2017).

Os probióticos estão dependentes dos regulamentos impostos pela indústria alimentar e autoridades ligadas à saúde. Na Europa, a *European Food Safety Authority*, EFSA, introduziu



o termo *Qualified Presumption of Safety*, QPS, que envolve alguns critérios adicionais de avaliação da segurança de estirpes bacterianas, incluindo o histórico do seu uso seguro, da ausência de riscos e da resistência a antibióticos. Nos Estados Unidos da América, a *Food and Drug Administration*, FDA, regulamentou que as estirpes probióticas para serem consideradas seguras, têm de obter a designação de *Generally Recognized as Safe*, GRAS (R. Martín & Langella, 2019).

### 2.1.2. Bactérias de Ácido Lático (BAL)

As bactérias de ácido láctico (BAL) são de grande importância para a indústria alimentar e biotecnológica, sendo bastante utilizadas na produção e preservação de produtos alimentares e em suplementos diatéuticos (Daniel et al., 2011). Podem ser encontradas em meios ricos em hidratos de carbono, como em alimentos fermentados consumidos diariamente, leite, iogurtes, queijos, vegetais, carnes, pão e bebidas alcoólicas e, também estão presentes nas superfícies mucosas humanas e animais. Nestas superfícies mucosas, encontra-se uma enorme variedade de espécies bacterianas de estirpes distintas, que constituem a microbiota intestinal (Florou-Paneri et al., 2012; Saeed, A & Salam, A, 2013).

As BAL são definidas como bactérias Gram-positivas, catalase e oxidase negativa, não esporuladas com morfologia esférica e bastonete (cilindro arredondado). Apresentam cadeia respiratória e são bactérias que não usam o oxigénio para crescerem, mas são tolerantes à sua presença, portanto são consideradas anaeróbias aerotolerantes (Daniel et al., 2011; Florou-Paneri et al., 2012; Todorov & de Melo Franco, 2010).

O principal metabolismo das bactérias de ácido láctico é a degradação de diferentes hidratos de carbono, produzindo principalmente ácido láctico e energia, através do processo de fermentação. Com base nas vias de fermentação, as BAL podem ser divididas em dois grupos fisiológicos, as homofermentativas e as heterofermentativas. As homofermentativas metabolizam uma molécula de hidratos de carbono, como a glicose, em duas moléculas de ácido láctico e duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP), o que significa que o ácido láctico é o principal produto deste processo. Ao passo que, as heterofermentativas metabolizam uma molécula de glicose em apenas uma molécula de ácido láctico, uma de etanol, uma de dióxido de carbono e uma de ATP, o que se traduz num processo que não só obtém ácido láctico como produto final, mas também outros produtos adicionais (Saeed, A & Salam, A, 2013).

Apesar de existirem muitos géneros de bactérias que produzem ácido láctico como produto de fermentação, as BAL mais utilizadas pertencem ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* e

ordem *Lactobacillales*, incluindo os seguintes gêneros: *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus* e *Weissella*, segundo a classificação taxonômica mais atual (Florou-Paneri et al., 2012; Quinto et al., 2014). A classificação das BAL em diferentes gêneros tem em conta a configuração do ácido láctico produzido, o modo de fermentação, a sua morfologia, o crescimento em diferentes temperaturas, a capacidade de multiplicação em concentrações salinas e a tolerância a condições ácidas e básicas dos meios (Sauer et al., 2017). Por isso, é necessário considerar que diferentes espécies de bactérias, apresentam diferentes características ótimas de crescimento.

Tanto a temperatura como o pH têm uma grande influência no crescimento destes microrganismos. São conhecidas por mesófilas as BAL que crescem a temperaturas entre os 10 °C e 40 °C, com uma temperatura ideal de crescimento que ronda os 37 °C. As termófilas apresentam uma gama de temperaturas de 40 °C a 50 °C, e a sua temperatura ótima é aproximadamente, 42 °C. Em relação ao pH, estes valores variam, geralmente, entre 6,0 e 7,0 (Yang et al., 2018).

### **2.1.2.1. Gênero *Lactobacillus***

Atualmente, a adição de culturas *starter* de bactérias de ácido láctico são aplicadas em vários tipos de alimentos e bebidas, de forma a melhorar as características nutricionais e tecnológicas do produto. Uma cultura *starter* é definida como uma preparação microbiana que se adiciona a uma determinada matéria-prima, de modo a produzir um alimento fermentado, com um grau de controle sobre o processo de fermentação e padronização do produto final. Estas culturas apresentam pelo menos uma propriedade funcional, que contribui para a melhoria do processo de fermentação, aumentando a segurança e a qualidade do produto final, e ainda, confere benefícios à saúde humana. As principais BAL, consideradas bactérias probióticas comerciais, são do género *Lactobacillus* e, apresentam mais de 100 espécies reconhecidas, como é o caso das *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, entre outras (Florou-Paneri et al., 2012).

Refira-se que o grande investimento por parte das indústrias alimentares atualmente centra-se em entender melhor as características metabólicas destas bactérias, de modo a maximizar a viabilidade durante o processamento e armazenamento dos produtos finais (Siragusa et al., 2014; Todorov & de Melo Franco, 2010).

### 2.1.2.1.1. Espécie *Lactobacillus plantarum*

A espécie *Lactobacillus plantarum* é uma bactéria produtora de ácido láctico com um enorme potencial para aplicações industriais no setor alimentar. É uma bactéria que faz parte da microbiota intestinal e está presente numa vasta gama de alimentos como, laticínios, carnes, frutas, vegetais, entre outros. Estirpes probióticas selecionadas da espécie *L. plantarum* são usadas como culturas *starter*, em vários processos fermentativos, para desenvolver alimentos funcionais.

Esta espécie é caracterizada como Gram-positiva, anaeróbia, e tamanho de aproximadamente  $0,9-1,2 \times 1,0-8,0 \mu\text{m}$ . São definidas como heterofermentativas facultativas produtoras de ácido láctico, no entanto, não produzem apenas ácido láctico, como também ácido acético, etanol e ácido fórmico (Todorov & de Melo Franco, 2010). Exibem maior tolerância a ambientes ácidos, são altamente resistentes aos processos de desidratação e apresentam propriedades antifúngicas e antioxidantes (Muhammad et al., 2017).

As várias estirpes da *L. plantarum* podem ser utilizadas para o tratamento de vários distúrbios intestinais, como a síndrome do intestino irritável, que tem como sintomas gastrointestinais, a diarreia, a obstipação, a dor e a distensão abdominal. Vários estudos apontam também para efeitos benéficos na redução do colesterol e da pressão arterial, bem como atividade anticancerígena (Fijan, 2014; Florou-Paneri et al., 2012).

## 2.2. Prebióticos

A fim de melhorar o bem-estar e a saúde humana, a introdução de prebióticos na alimentação é bastante vantajosa, uma vez que melhoraram ou preservam o equilíbrio da microbiota intestinal. Estes podem ser encontrados em vegetais, frutas, produtos fermentados, produtos farmacêuticos e em alimentos funcionais (Hutkins et al., 2016).

A definição de prebiótico inicialmente proposta por Gibson e Roberfroid, em 1995, foi “ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e/ ou a atividade de uma ou de um número limitado de bactérias já residentes no colón”. Com o passar dos anos, outras definições foram propostas por não haver consenso pelas várias entidades científicas e industriais. A mais recente definição foi então dada pela *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) como “um substrato que é utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros que confere um benefício à saúde” (Gibson et al., 2017).

A descoberta dos prebióticos desencadeou um elevado interesse científico e industrial, o que resultou na comercialização de vários produtos alimentares e suplementos que combinam prebióticos com probióticos. Os principais objetivos desta combinação entre prebiótico e probiótico são, proteger as bactérias de ácido láctico dos processos de produção e armazenamento a longo prazo e aumentar a taxa de sobrevivência destas no trato gastrointestinal (Markowiak & Ślizewska, 2017).

A maioria dos prebióticos são hidratos de carbono. A sua estrutura determina os seus efeitos fisiológicos e os tipos de microrganismos que os podem utilizar como fonte de carbono e energia. São classificados como dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Os mais indicados como prebióticos são os oligossacarídeos e polissacarídeos (incluindo fibras dietéticas), contudo, nem todos os hidratos de carbono dietéticos são prebióticos. Por este razão, é bastante importante ter em conta os critérios de seleção de um prebiótico. Tendo por base os critérios de seleção, entende-se como prebiótico um composto que apresente características como, resistência ao pH ácido do estômago, à hidrólise enzimática e à absorção gastrointestinal, ou seja, a todo o processo digestivo. Deve ser seletivamente fermentado por bactérias intestinais potencialmente benéficas e conseguir estimular seletivamente o crescimento e/ ou a atividade das bactérias presentes no cólon associadas ao bem-estar do hospedeiro. Deve ainda proporcionar estabilidade no processo de produção e armazenamento dos produtos alimentares (Davani-Davari et al., 2019; Markowiak & Ślizewska, 2017; Roberfroid, 2018).

A produção de alimentos funcionais tem vindo a crescer devido à incorporação destes componentes alimentares. Os mais utilizados experimental e industrialmente são os fruto-oligossacarídeos (FOS) e os galato-oligossacarídeos (GOS) que apresentam funções protetoras e acrescentam valor nutricional e sanitário aos alimentos (Davani-Davari et al., 2019). Para além disto, apresentam propriedades não digeríveis ou parcialmente digeríveis, não são absorvidos no intestino, são mal fermentados por potenciais agentes patogénicos presentes no intestino e, por último, são bem fermentados pelas bactérias de ácido láctico, que são benéficas para o equilíbrio da microflora intestinal (Markowiak & Ślizewska, 2017).

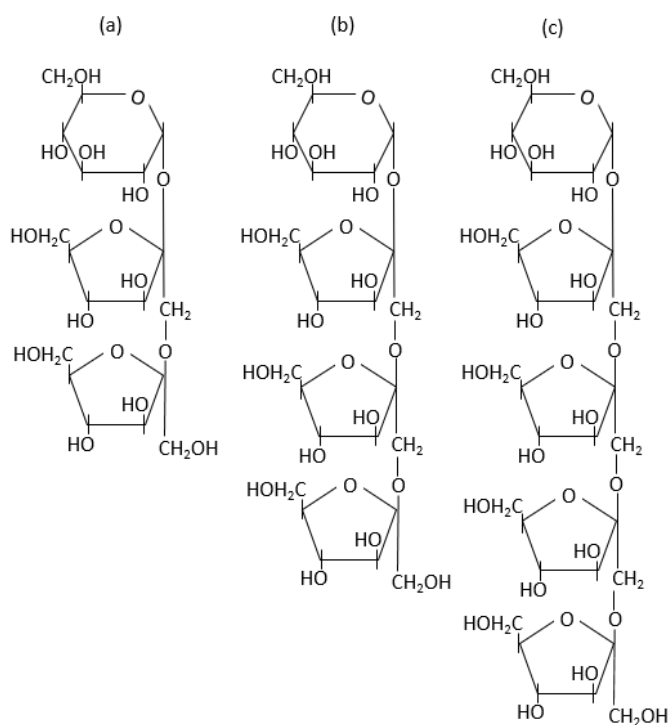
Assim sendo, é necessário ter em conta a estrutura molecular destes agentes protetores, bem como, os seus critérios de seleção, as suas propriedades e os seus efeitos.

### **2.2.1. Fruto-oligossacarídeos (FOS)**

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são provenientes de produtos de origem vegetal e encontram-se em concentrações variáveis em muitos alimentos. Constituem uma das

principais classes dos oligossacarídeos e a sua estrutura é composta por cadeias lineares, de unidades de frutose ligadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(2-1) a unidades de glucose nas extremidades não redutoras (G. Chen et al., 2016; Romano et al., 2016). A presença destas ligações conferem a estes compostos propriedades físico-químicas e fisiológicas únicas, tornando-os resistente à hidrólise provocada pelas enzimas digestivas do trato gastrointestinal. Estas substâncias são bastante usadas como ingredientes alimentares prebiótico (G. Chen et al., 2016).

O comprimento da cadeia dos FOS é um critério bastante importante, visto que, determina quais as bactérias probióticas que os poderão fermentar no intestino humano (Davani-Davari et al., 2019). Podem ser obtidos de duas formas distintas, resultando em produtos finais ligeiramente diferentes. O primeiro método recorre à hidrólise enzimática da inulina, produzindo a oligofrutoses, FOS constituídos por cadeias lineares de frutossil, com ou sem unidades de glucose nas extremidades, com um grau de polimerização que varia entre 1 e 7 unidades de frutossil. O segundo processo envolve a reação enzimática de transfrutossilização da sacarose utilizando as enzimas  $\beta$ -frutofuranosidase (EC 3.2.1.26) ou  $\beta$ -D frutossiltransferase (EC 2.4.1.9) como biocatalisadores, para produzir FOS de cadeia curta. Estes apresentam cadeias lineares ou ramificadas de frutossil com uma única unidade terminal de glucose e, o grau de polimerização varia entre 1 e 5 unidades de frutossil (Passos & Park, 2003; Romano et al., 2016; Singh et al., 2017). Os FOS de cadeia curta podem ser compostos por uma fração de glucose seguida de frações de frutose ligadas por  $\beta$ -(2-1), são denominados por, 1-kestose (uma glucose e duas frutose), nistose (uma glucose e três frutose), e frutofuranosilnistose (uma glucose e quatro frutose), como demonstrado na Figura 1 (Singh et al., 2017).



**Figura 1.** Estrutura química dos FOS de cadeia curta: (a) 1-kestose, (b) nistose e (c) 1F-β-fructofuranosilnistose.

Os FOS de cadeia curta são a fonte de carbono e energia preferencial dos probióticos. Uma vez que estes não são digeridos pelo trato gastrointestinal humano e, ao atingirem o cólon, estimulam de forma benéfica o crescimento de bactérias específicas. Assim, preenchem todos os critérios de seleção de um prebiótico.

Os FOS, quando comparados à sacarose, enquanto prebióticos, oferecem vantagens nutricionais e apresentam propriedades mais atrativas. São solúveis em água e altamente higroscópicos e a sua capacidade de retenção de água é superior à da sacarose. A sua doçura é de 0,4 a 0,6 vezes a da sacarose, consoante a sua estrutura química e o tamanho das cadeias poliméricas (P. Kumar & Dubey, 2019; Singh et al., 2017). A viscosidade de uma solução de FOS é maior do que a de uma solução de sacarose com a mesma concentração, devido ao elevado peso molecular do FOS. São ainda considerados altamente estáveis, a temperaturas de refrigeração, e a valores de pH entre 4 e 7, comparativamente à sacarose, não havendo alterações das suas propriedades, até um período de armazenamento de um ano (P. Kumar & Dubey, 2019; Sabater-Molina et al., 2009).

No que diz respeito aos benefícios associados à fermentação do FOS no intestino, podem destacar-se a diminuição dos níveis de triglicerídeos, fosfolípidios e colesterol no sangue, bem

como, a redução da pressão arterial e a melhor absorção de minerais, como o cálcio e o magnésio (P. Kumar & Dubey, 2019; Singh et al., 2017).

Outras características destes compostos, com grande relevância para as indústrias produtoras de probióticos, é o seu efeito protetor/ estabilizador das bactérias de ácido láctico durante os processos de liofilização e armazenamento a longo prazo. A interação dos FOS com os grupos de fosfato diminui a temperatura de transição de fase ( $T_m$ ) da bicamada fosfolipídica das paredes celulares das bactérias. Por conseguinte, as membranas desidratadas na presença de FOS permanecem na fase líquido-cristalina como se estivessem hidratadas, substituindo parcialmente as moléculas de água, através da formação de ligações de hidrogénio. Este mecanismo suporta o efeito protetor dos FOS nas bactérias de ácido láctico (Romano et al., 2014, 2016).

### **2.3. Processo de Encapsulação de Probióticos**

A produção de alimentos e suplementos enriquecidos com probióticos tem vindo a crescer nas últimas décadas. Porém, a conservação da viabilidade das culturas probióticas durante o seu processamento, armazenamento, distribuição e consumo constituem ainda um grande desafio para a indústria produtora de probióticos e a indústria alimentar (Rodrigues et al., 2020).

De um modo geral, os probióticos, para produzirem efeitos benéficos na saúde, devem ser metabolicamente estáveis e ativos no produto e sobreviver às severas condições gástricas e atingir o intestino em quantidades suficientes, para sustentar a sua colonização nas superfícies mucosas. Porém, existem diversos fatores que afetam a viabilidade das culturas bacterianas livres, nomeadamente, condições de processamento (temperatura, oxidação, cisalhamento), condições de dessecação para produtos alimentares secos, condições de armazenamento (humidade, oxigénio, temperatura, produção de peróxido de hidrogénio) e degradação no trato gastrointestinal (baixo pH, concentração de sais biliares e enzimas presentes no intestino) (Chavarri et al., 2012; M. J. Martín et al., 2015). Para colmatar estes efeitos, diferentes abordagens foram propostas, incluindo a seleção de estirpes bacterianas resistentes aos ácidos e sais biliares presentes no trato gastrointestinal, a quantidade de células probióticas necessária para exibir os seus efeitos positivos, o uso de recipientes impermeáveis ao oxigénio durante o armazenamento, a incorporação de micronutrientes, como por exemplo, o FOS, que estimula o crescimento dos probióticos, e a microencapsulação (Misra et al., 2021). Esta última abordagem tem ganho destaque nos últimos anos.

A encapsulação é um processo físico-químico ou mecânico, que envolve o aprisionamento de substâncias ativas num material com diferentes propriedades e funcionalidades. A substância encapsulada é denominada por fase de núcleo, agente ativo ou interno, enquanto o material usado para a encapsulação é chamado de membrana de revestimento, cápsula, material transportador, fase externa ou matriz. O processo de encapsulação pode ser classificado em dois tipos, consoante o tamanho dos grânulos produzidos: macroencapsulação (milímetros a centímetros) e microencapsulação (1-1000 µm) (Kavitake et al., 2018).

A encapsulação de microrganismos, nomeadamente de probióticos, reduz ou inibe a lesão ou perdas celulares durante o processo de produção/processamento (congelamento, desidratação, temperatura), durante o armazenamento e durante o consumo (passagem pelo trato intestinal superior até atingirem o cólon). Para além disto, também impede que estes se multipliquem nos alimentos e oferecem proteção contra bacteriófagos (M. J. Martín et al., 2015).

Assim, a microencapsulação é considerada a tecnologia mais eficiente para a preservação de bactérias probióticas. Para o encapsulamento de probióticos, o material encapsulante deve ser de grau alimentício, biodegradável, não tóxico, facilmente disponível, e deve, ainda, ser capaz de formar uma barreira efetiva de proteção. Deve ainda oferecer resistência à solubilização em meios aquosos, nomeadamente em condições de pH ácido, e simultaneamente permitir uma libertação das células no colón (Burgain et al., 2011; Kavitake et al., 2018; Rodrigues et al., 2020).

Atualmente, várias técnicas de microencapsulação são amplamente utilizadas para produzir partículas probióticas, tanto a nível laboratorial, como industrial. Contudo, é fundamental selecionar a técnica que seja menos agressiva, garantindo viabilidade suficiente das células encapsuladas e, ter em consideração a estabilidade mecânica compatível com a finalidade da aplicação. As técnicas mais utilizadas são: extrusão, emulsão, secagem por pulverização (*spray-drying*), e a técnica de deposição camada por camada (*Layer-by-Layer*) (Calinoiu et al., 2019; Rodrigues et al., 2020).

### **2.3.1. Técnica de deposição *Layer-by-Layer* (LbL)**

Um dos métodos de encapsulação mais simples e eficiente é a técnica de deposição *Layer-by-Layer* (LbL) que foi proposta pela primeira vez, por Iler em 1966, ao descrever a deposição de multicamadas em superfícies sólidas por adsorção sequencial de partículas coloidais carregadas positivamente e negativamente. Mais tarde, em 1991, Decher relatou o uso de polieletrólitos de cargas opostas que foram sucessivamente depositados em camadas sobre um substrato, através de interações eletrostáticas (Borges & Mano, 2014; De Villiers et al., 2014).

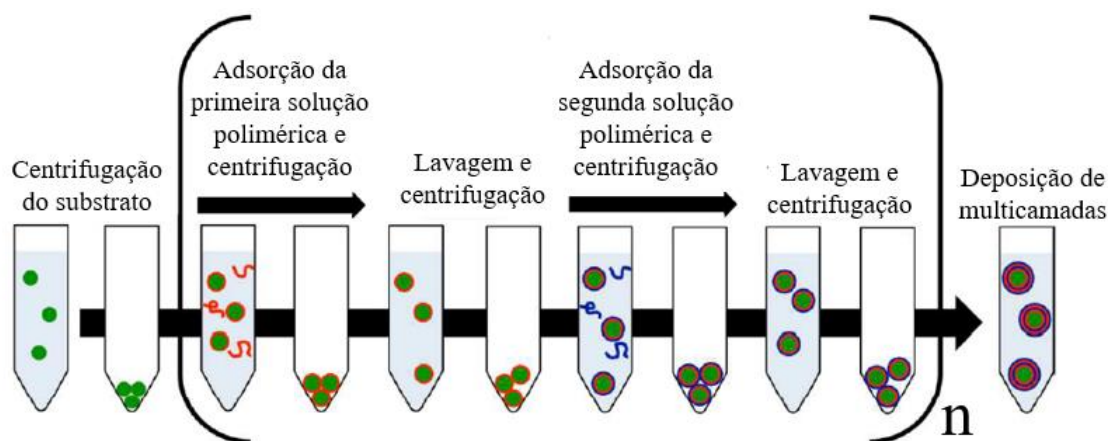


al., 2011). Depois desta descoberta, inúmeras investigações foram realizadas, com várias estruturas particuladas de substratos, diversos materiais de revestimento e envolvendo diferentes tipos de interações, electrostáticas e não electrostáticas (Ariga et al., 2014).

Embora tenha sido descoberta há mais de duas décadas, a técnica LbL é bastante atrativa uma vez que é um método simples e barato, pois não necessita de equipamentos sofisticados, nem depende de reações químicas complicadas para depositar as multicamadas. Simultaneamente permite um grande controlo sobre as propriedades do revestimento final, como espessura, estrutura e propriedades de superfície (Yucel Falco et al., 2017). Além de que, este método é aplicado a diversos tipos de substrato vivo e não vivo, de várias formas e tamanhos (Borges & Mano, 2014; Yucel Falco et al., 2017).

Por definição, o método LbL consiste na deposição alternada de polieletrólitos de cargas opostas, na superfície de um substrato carregado positivamente ou negativamente, através do processo de adsorção, envolvendo interações electrostáticas ou não electrostáticas (pontes de hidrogénio, ligações covalentes, interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals) (Borges & Mano, 2014; Quintana et al., 2017)

Geralmente, o processo de deposição LbL é promovido pela atração electrostática entre o substrato carregado negativamente ou positivamente e polieletrólitos de cargas opostas. Primeiramente, o substrato carregado é imerso numa solução polimérica de carga oposta, para adsorver a primeira camada. É importante referir que, os polieletrólitos exibem uma alta densidade de carga superficial e são utilizados em excesso na adsorção ao substrato. Este excesso de carga fornece o mecanismo de reversão da polaridade de carga superficial, facilitando uma superfície favorável para a adsorção de uma nova camada. Seguem-se os processos de lavagem e centrifugação, através dos quais, o excesso de material não adsorvido é removido, evitando a contaminação da próxima solução polimérica e permite ainda, a sua estabilização. Os ciclos de deposição são repetidos, de forma a obter o número de camadas pretendidas, como se encontra representado na Figura 2 (De Villiers et al., 2011; Jonas et al., 2018; Richardson et al., 2016).



**Figura 2.** Esquema do processo de encapsulação por deposição *Layer-by-Layer* (LbL) [adaptado de Jonas et al., 2018].

O procedimento LbL ocorre inteiramente em soluções aquosas, em condições moderadas, não necessita de solventes orgânicos e nocivos, nem de altas temperaturas ou valores extremos de pH. Estas características são deveras importantes, especialmente quando os materiais manipulados são biomoléculas, como ácidos nucleicos, polipeptídeos, polissacarídeos, proteínas, enzimas ou bactérias, visto que, estes podem perder a sua atividade biológica, quando expostas a ambientes agressivos (Borges & Mano, 2014).

Neste método, as propriedades finais do revestimento, podem ser controladas alterando alguns parâmetros experimentais, como a concentração de polieletrólitos, a densidade de carga superficial, a concentração de sal, o valor de pH, a força iónica, a temperatura, o tempo de adsorção e a quantidade de camadas depositadas (Borges & Mano, 2014; Yucel Falco et al., 2017).

Em comparação com outros métodos de revestimento mais convencionais, a técnica LbL apresenta imensas vantagens, incluindo, a simplicidade do processo e equipamentos, a sua adaptação para revestir a maioria das superfícies, a disponibilidade de partículas naturais e sintéticas, a aplicação flexível a substratos com formas e tamanhos irregulares, a formação de camadas estabilizadoras e por último, o elevado controlo sobre a composição e espessura do revestimento (De Villiers et al., 2011). Portanto, este método de microencapsulação é um método promissor para encapsular bactérias probióticas sensíveis (Quintana et al., 2017).

### 2.3.2. Materiais de Encapsulação para a técnica LbL

Os materiais que revestem os microrganismos devem apresentar qualidade alimentar e possuir propriedades físicas e químicas adequadas para conferir proteção aos mesmos. Na

técnica LbL os materiais mais utilizados são os polissacarídeos com caráter aniônico e catiónico, devido à sua disponibilidade, baixo custo e biocompatibilidade (Calinoiu et al., 2019).

Neste projeto os polissacarídeos usados são quitosano e o alginato de sódio. Adicionalmente, investigou-se a utilização de um copolímero poli(ácido acrílico)-Pluronic®-poli(ácido acrílico).

### - Quitosano

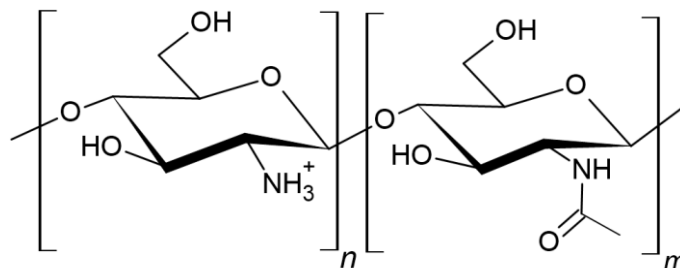
O quitosano é um polímero natural, o segundo polímero mais abundante na natureza (Islam et al., 2017). É amplamente aplicado em vários processos industriais como na área alimentar, biomédica, farmacêutica, cosmética, entre outros. Apresenta uma versatilidade de propriedades biológicas, químicas e físicas, tais como, processamento bastante fácil e barato, biodegradabilidade, biocompatibilidade, disponibilidade, não toxicidade, atividade antimicrobiana e boas propriedades de adsorção (Islam et al., 2017; Qiao et al., 2021). Este biopolímero é um polissacarídeo linear de natureza catiónica obtido industrialmente através da desacetilação alcalina da molécula de quitina, extraída dos exoesqueletos de crustáceos, insetos e das paredes celulares de fungos. Possui na sua estrutura unidades de repetição de  $\beta$ -(1-4)-Linked-D-Glucosamina e N-acetil-D-Glucosamina distribuídas aleatoriamente, como se pode observar na Figura 3 (Sánchez-Machado et al., 2018).

As propriedades funcionais do quitosano, como o grau de desacetilação, e o peso molecular dependem da matéria-prima e dos métodos de produção. O grau de desacetilação é uma das propriedades mais importantes, visto que determina a densidade de carga e a sua solubilidade (Qiao et al., 2021). Em geral, este polissacarídeo é insolúvel em água, em soluções alcalinas e em solventes orgânicos, mas é solúvel em soluções ácidas diluídas abaixo do valor do seu pKa, aproximadamente 6,3 (Sánchez-Machado et al., 2018). Quanto maior a percentagem de desacetilação, valores entre 56 e 99 %, maior será a solubilidade do biopolímero em condições aquosas ácidas (Calinoiu et al., 2019; Islam et al., 2017).

A sua propriedade policatiônica é atribuída à protonação dos grupos amina nas cadeias do polímero em meios ácidos, resultando na quebra de ligações de hidrogénio pela repulsão eletrostática entre cargas positivas, conferindo ao polímero interações com superfícies carregadas negativamente e com polímeros aniônicos (Qiao et al., 2021).

O quitosano é um dos materiais de revestimento para o processo de encapsulação por LbL mais utilizados pois é, de entre os polissacarídeos facilmente disponíveis, o único com caráter iónico positivo. Embora por si só este apresente algum caráter antimicrobiano (Jonas et al.,

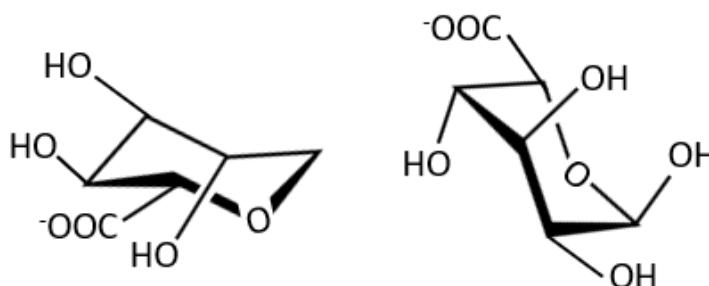
2018), em combinação com outros biopolímeros carregados negativamente, estes podem assegurar a sobrevivência das bactérias probióticas, desde o seu armazenamento até à passagem pelo trato gastrointestinal (Calinoiu et al., 2019).



**Figura 3.** Estrutura química do quitosano protonado.

### - Alginato de sódio

O alginato é um polímero aniónico, extraído da parede celular das algas marinhas e da cápsula celular de algumas bactérias. É um polímero linear, constituído por dois monómeros, os ácidos  $\beta$ -D-manurónico (M) e  $\alpha$ -L-gulurónico (G), ligados entre si por ligações glicosídicas  $\beta$  entre os carbonos 1 e 4 (Figura 4). A sua estrutura é composta por três tipos de blocos: blocos M homopoliméricos M-M, blocos G homopoliméricos G-G e blocos MG heteropoliméricos alternados M-G (Chavarri et al., 2012). A proporção de M e G, bem como o comprimento de cada bloco e a disposição sequencial das cadeias poliméricas variam dependendo da fonte natural do polímero, o que influencia as suas propriedades funcionais (Lee & Mooney, 2012).

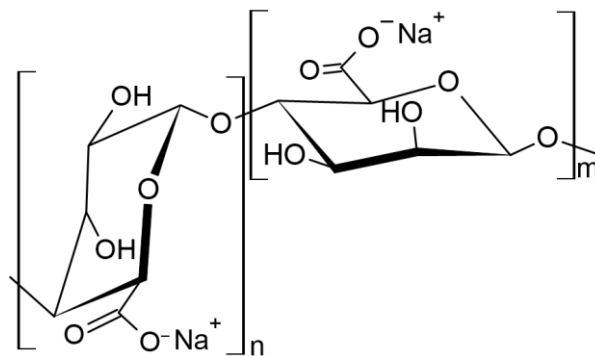


**Figura 4.** Estrutura química dos monómeros: ácido- $\beta$ -D-manurónico (M) (esquerda) e ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) (direita).

O alginato de sódio (Figura 5) é extraído a partir de algas ou bactérias passa pelo tratamento com soluções alcalinas aquosas. O extrato é filtrado e o cloreto de sódio é adicionado para precipitar o alginato. Após os processos de purificação e conversão, o pó de alginato de sódio é produzido (Lee & Mooney, 2012).

Este biopolímero é frequentemente utilizado para muitas aplicações em várias áreas da indústria alimentar, médica e farmacêutica, especialmente na libertação controlada de bactérias probióticas pelo processo de encapsulação. Esta frequente utilização deve-se ao facto de este ser biocompatível, gelificante, estabilizante, não apresentar toxicidade e, também, o seu processamento ser fácil e relativamente barato, envolvendo baixas temperaturas (Lee & Mooney, 2012; Priya et al., 2011). É também facilmente libertado no intestino, facilitando a atuação dos probióticos no local alvo.

Porém, exibe algumas limitações, como a incapacidade de suportar baixo pH pois, quando exposto a meios ácidos, como no trato gastrointestinal, com pH inferior ao valor da sua constante de dissociação ácida, pKa (entre 3,0 e 3,5), os seus grupos carboxílicos ficam protonados, formando ligações de hidrogénio, o que o leva à sua precipitação, aumentando a perda de estabilidade mecânica da cápsula de alginato e, diminuindo a capacidade protetora nos probióticos (Lee & Mooney, 2012; Li et al., 2009). Outra desvantagem é a elevada porosidade do alginato quando aplicado como um revestimento, fazendo com que os probióticos fiquem mais expostos aos vários tipos de *stress*. Para mitigar este efeito, existem novas estratégias de modificação da sua estrutura ao adicionando outros compostos poliméricos (Chavarri et al., 2012). A escolha recai sobre os compostos poliméricos catiónicos, como é o caso do quitosano, para formar fortes interações eletrostáticas com alginato de sódio.

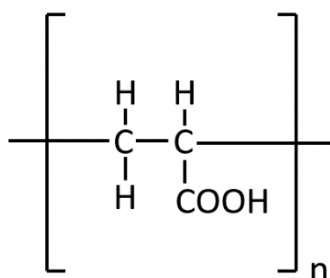


**Figura 5.** Estrutura química do alginato de sódio.

### - Copolímero Poli(ácido acrílico)-Pluronic®-Poli(ácido acrílico)

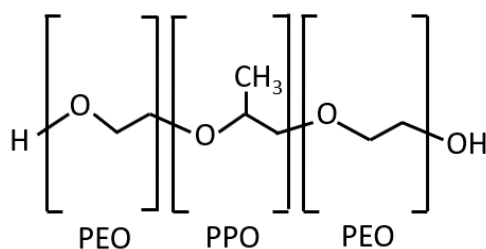
O copolímero em bloco de poli(ácido acrílico) e Pluronic® é de origem sintética e foi produzido com o objetivo de melhorar a eficiência na libertação controlada de fármacos ao introduzir uma função responsiva ao pH (Choo et al., 2011).

O poli(ácido acrílico) (PAA), Figura 5, é um polímero sintético, constituído por monómeros de ácido acrílico e é amplamente utilizado em áreas como a farmacêutica e a cosmética, devido à sua biocompatibilidade e sensibilidade ao pH (Quintana et al., 2017). Este polieletrólito aniónico é composto por grupos carboxílicos e é conhecido por inchar e dissolver-se a pH elevado devido à desprotonação dos ácidos carboxílicos (pKa 4,95), e precipita a pH baixo (Choo et al., 2011). Assim, tem-se uma resposta ativa na passagem pelo meio ácido do estômago e o meio básico do intestino (Guzmán et al., 2011).



**Figura 6.** Estrutura química do poli(ácido acrílico).

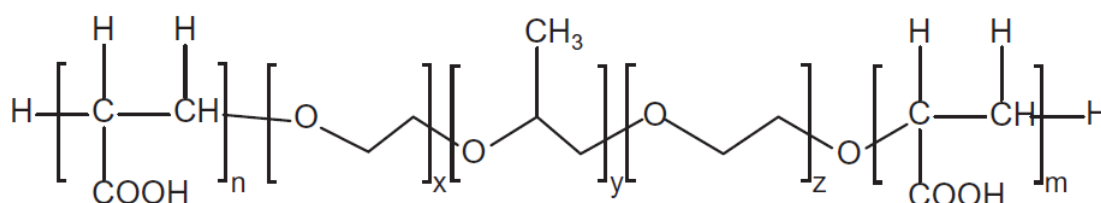
O Pluronic® (PLU) é um copolímero tribloco, composto por poli(óxido de etileno) (PEO) e por poli(óxido de propileno) (PPO), dispostos numa estrutura básica (PEO-b-PPO-b-PEO), disponível comercialmente, numa grande variedade de estruturas e pesos moleculares, que determinam as suas propriedades hidrofílicas e lipofílicas (Barreiro-Iglesias et al., 2005; Quintana et al., 2017). Este copolímero sintético, apresentado na Figura 6, é caracterizado como anfifílico visto que, o óxido de etileno apresenta propriedades hidrofílicas, enquanto o óxido de propileno apresenta propriedades hidrofóbicas (Choo et al., 2011). É conhecido por ser não tóxico e pela sua excelente biocompatibilidade devido à elevada fração de cadeias de poli(óxido de etileno), tornando-o altamente solúvel em água. Por esta razão é reconhecido como excipiente farmacêutico polivalente e um ótimo candidato para sistemas de libertação controlada, capaz de aumentar a solubilidade aquosa e a estabilidade dos fármacos e probióticos (Barreiro-Iglesias et al., 2005).



**Figura 7.** Estrutura química do Pluronic®.

Existem algumas limitações, como é o caso da baixa eficiência de aprisionamento do fármaco, para combater essa desvantagem o Pluronic® tem de ser combinado com outro polímero, como por exemplo o poli(ácido acrílico) (Barreiro-Iglesias et al., 2005).

Foi então explorada a potencial utilidade de copolímeros compostos por surfactantes, PLU, conjugados através de ligações covalentes com PAA, utilizando os grupos OH terminais reativos da cadeia polimérica do Pluronic® para iniciar uma polimerização radicalar viva por emulsão, traduzindo-se no crescimento das cadeias de poli(ácido acrílico) (Quintana et al., 2017). O copolímero em bloco (PAA-PLU-PAA ou PPP), Figura 7, apresenta excelentes características ao nível da libertação prolongada, preferencialmente num ambiente de pH neutro a alcalino, e propriedades adesivas, devido à presença do PAA, e melhora a capacidade de solubilização, graças às propriedades hidrofóbicas do PLU (Barreiro-Iglesias et al., 2005; Choo et al., 2011).



**Figura 8.** Estrutura química do copolímero PAA-PLU-PAA ou PPP (x: número de unidades de óxido de etileno (OE), y: número de unidades de O-CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>, z: número de unidades de óxido de propileno (PO) e n, m: número de unidades de ácido acrílico) [adaptado de Quintana et al., 2017].

Estas características fazem deste polímero, PPP, um composto promissor para o revestimento, na técnica LbL, de bactérias probióticas preservando a integridade bacteriana durante a passagem pelo trato gastrointestinal.





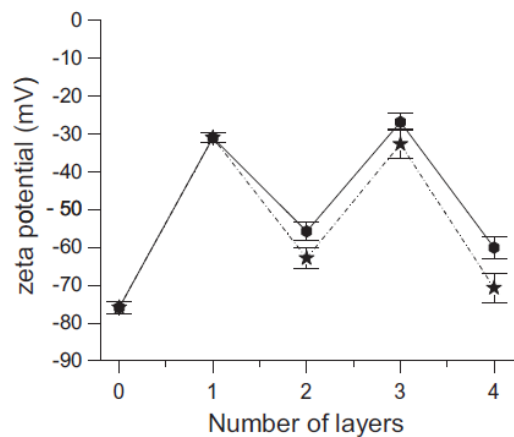
### 3. Estado da Arte

Nesta seção será apresentada a pesquisa bibliográfica realizada com base em investigações recentes, sobre técnicas que permitem diminuir a perda de viabilidade e estabilidade bacteriana durante o processo de encapsulação de bactérias probióticas, condições de armazenamento a longo prazo e condições gastrointestinais simuladas. Os dois métodos de preservação apresentados são a técnica de encapsulação *Layer-by-layer* (LbL) e a adição de um agente protetor, FOS.

#### 3.1. Processo de Encapsulação das Bactérias Probióticas por LbL

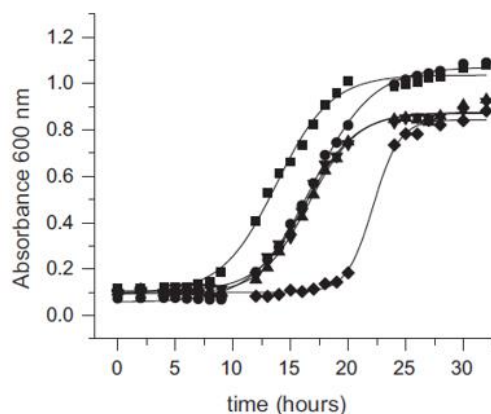
Quintana et al. (2017) avaliaram o processo de encapsulação, pela técnica LbL, das bactérias probióticas, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (CIDCA 333) através da deposição alternada dos polieletrólitos: o quitosano (CHI), usado como polímero catiónico; e o copolímero de poli(ácido acrílico) (PAA)-g-Pluronic® (PLU) (PAA-PLU-PAA ou PPP), utilizado como polieletrólito aniônico. Os microrganismos foram encapsulados usando diferentes números de camadas. A avaliação foi feita tendo em conta a contagem em placas, antes e após o revestimento, após a liofilização e após a exposição a condições gástricas e intestinais simuladas.

Os resultados da evolução das cargas superficiais após a adição das camadas de polímeros às bactérias carregadas negativamente, demonstraram valores alternados mais e menos negativos do potencial- $\zeta$ , apresentando um padrão característico em zig-zag, como se pode observar pela Figura 8. Assim, comprovou-se que a deposição das camadas dos polieletrólitos na superfície da bactéria foi realizada com sucesso.



**Figura 9.** Potencial- $\zeta$  da bactéria *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (CIDCA 333) após a adição de diferentes números de camadas de CHI e PPP [Retirado de Quintana et al., 2017 e reproduzida com a autorização da editora Elsevier].

Para avaliar o efeito do revestimento no crescimento bacteriano, recorre-se ao estudo da cinética de crescimento para as bactérias encapsuladas e não encapsuladas. Os investigadores observaram que a adição de camadas aumentou o atraso no crescimento das bactérias, Figura 9. Este atraso é definido como o tempo necessário para os microrganismos se adaptarem ao meio. Em relação às bactérias encapsuladas após a adição da primeira camada de CHI, o atraso de crescimento aumentou 2,8 h. Após a adição da segunda e terceira camada, o tempo de atraso manteve-se constante, 12,0 h, já na adição da quarta camada, o tempo de atraso aumentou para 19,5 h.



**Figura 10.** Curvas de crescimento da bactéria *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 cultivadas em MRS. Quadrados: bactérias não revestidas, círculos: bactérias revestidas com uma camada de CHI, triângulos para cima: bactérias revestidas com uma camada de CHI e uma de PPP, triângulos para baixo: bactérias revestidas com duas camadas de CHI e uma de PPP, diamantes: bactérias revestidas com duas camadas de CHI e duas de PPP [Retirado de Quintana et al., 2017 e reproduzida com a autorização da editora Elsevier].

Em relação à viabilidade, adicionou-se 20 % m/v de sacarose, para proteger as bactérias dos danos causados pela liofilização e, constatou-se que as bactérias encapsuladas antes e após a liofilização não sofreram danos significativos. Enquanto as bactérias encapsuladas com 4 camadas, apresentaram valores reduzidos de viabilidade. Contudo, podem afirmar que o método LbL foi bem-sucedido. Quanto à exposição dos microrganismos liofilizados e revestidos com duas, três e quatro camadas, aos meios gástricos e intestinais simulados, não sofreram perdas de viabilidade significativas, em comparação com as bactérias revestidas correspondentes antes da exposição a estes meios. Os resultados obtidos demonstraram o elevado potencial da combinação, CHI-PPP, como sistema de libertação controlada de bactérias de ácido láctico, em produtos alimentares.

Yucel Falco et al. (2017) investigaram a encapsulação das bactérias probióticas *Lactobacillus acidophilus* através do método de deposição de polieletrólitos por LbL. Os materiais de revestimento utilizados foram, o policatión quitosano (CHI) e o polianião  $\beta$ -glucano sulfatado ( $\beta$ SG). A bactéria escolhida, foi revestida até oito camadas alternadas de CHI e  $\beta$ SG. A deposição alternada dos polieletrólitos foi comprovada, através dos valores do potencial- $\zeta$  que indicam um padrão em zig-zag.

Para demonstrar a capacidade das células se dividirem e formarem novas células, examinaram a viabilidade da *L.acidophilus* encapsuladas em comparação com as bactérias não encapsuladas. Após a adição de duas camadas de revestimento, existe apenas uma redução de 1 log CFU/mL (de  $8,4 \pm 0,1$  para  $7,2 \pm 0,4$  log CFU/mL) em relação à viabilidade das células não revestidas. Porém, o número de células viáveis decresce à medida que, o número de camadas aumenta. Com a adição de quatro camadas, a viabilidade diminuiu para  $6,4 \pm 0,4$  log CFU/mL e mantém-se perto deste valor com a adição de seis e oito camadas. Esta redução pode ser explicada pelo facto de haver agregação celular durante o processo de encapsulação. A agregação foi observada pelos investigadores, após três camadas. Para além disto, as células podem necessitar de um tempo mais longo de crescimento e divisão celular, dentro de um revestimento mais espesso, em relação às células não revestidas ou revestidas com apenas uma ou duas camadas de polieletrólitos.

A estabilidade destes revestimentos também foi testada em fluidos gástricos e intestinais simulados. Os resultados indicaram que as camadas de polímeros são resistentes ao fluido gástrico simulado e são parcialmente degradados no fluido intestinal simulado (Yucel Falco et al., 2017).

Anselmo et al. (2016) realizaram o processo de encapsulação das bactérias probióticas da estirpe *Bacillus coagulans* através da técnica LbL. As camadas alternadas do biopolímero

catiônico quitosano (CHI) e do biopolímero aniônico alginato (ALG) foram sequencialmente depositadas por interações eletrostáticas até três bicamadas ((CHI/ALG)<sub>3</sub>). A deposição sequencial foi confirmada com sucesso através das medições do potencial- $\zeta$ , apresentando o característico padrão em zig-zag.

Para demonstrarem a capacidade de crescimento e proliferação dos probióticos encapsulados, estudaram o efeito do número de camadas nas bactérias *Bacillus coagulans* não encapsuladas e encapsuladas com 1, 2 e 3 bicamadas de (CHI/ALG). Em cada caso, os probióticos mantiveram a sua capacidade de crescer e proliferar. À medida que o número de camadas aumenta, o atraso no crescimento também aumenta. As três bicamadas de (CHI/ALG) exibiram tempos de atraso relativamente elevados, 10 h, em comparação às restantes. A viabilidade dos probióticos não encapsulados mostrou uma redução de mais de 1 log CFU/mL, em comparação com (CHI/ALG)<sub>2</sub> (duas bicamadas), após o armazenamento durante uma semana. Porém, Anselmo et al. (2016) constataram que a técnica LbL pode levar à agregação das bactérias probióticas. Isto foi verificado após a adição da última camada de ALG em (CHI/ALG)<sub>2</sub>. Também foi avaliada a viabilidade das bactérias encapsuladas nos fluidos gástrico e intestinal simulados. Demonstrou-se que as bactérias encapsuladas com duas bicamadas de quitosano e alginato apresentam taxas de sobrevivência significativamente maiores do que as bactérias não encapsuladas e encapsuladas com uma e três bicamadas.

Wang et al. (2019) avaliaram a taxa de sobrevivência e estabilidade no trato gastrointestinal simulado, bem como no armazenamento a longo prazo das bactérias probióticas *Lactobacillus pentosus* encapsuladas pelo método LbL. Os materiais de revestimento, utilizados para encapsular as bactérias, foram o quitosano (CHI) e o fitato de sódio (SP). Através das interações eletrostáticas, a deposição alternada das camadas comprovou-se tendo em conta, os valores negativos e positivos do potencial- $\zeta$ .

A taxa de sobrevivência no trato gastrointestinal foi testada para as bactérias não encapsuladas e encapsuladas até quatro camadas ((CHI/SP)<sub>1</sub> e (CHI/SP)<sub>2</sub>). O número de células viáveis após 120 min em meio gástrico simulado, nas bactérias não encapsuladas, foi completamente nulo, enquanto o número de células viáveis nas bactérias revestidas com (CHI/SP)<sub>1</sub> e (CHI/SP)<sub>2</sub> foi de 2,10 log CFU/mL e 4,20 log CFU/mL, respetivamente. Para o meio intestinal simulado, após 180 min de incubação, o número de bactérias viáveis sem encapsulação foi de 2,01 log CFU/mL. Para as bactérias revestidas com (CHI/SP)<sub>1</sub> o valor foi de 3,38 log CFU/mL e com (CHI/SP)<sub>2</sub> conseguiram atingir valores de 6,23 log CFU/mL. Assim sendo, os resultados mostram que a encapsulação com duas camadas de quitosano e

fitato de sódio ((CHI/SP)<sub>2</sub>) revelaram vantagens de sobrevivência significativas contra os meios gastrointestinais simulados, em comparação com as restantes.

O efeito do processo de encapsulação dos probióticos no armazenamento a longo prazo, também foi estudado. A *Lactobacillus pentosus* sem encapsulamento e com encapsulamento foi armazenada por vários períodos de tempo para simular o armazenamento de produtos comerciais. Após 30 dias de armazenamento, os probióticos não encapsulados apresentaram valores significativamente mais baixos do que os probióticos encapsulados com (CHI/SP)<sub>2</sub>. Os resultados indicam que após o processo LbL, a viabilidade das bactérias *Lactobacillus pentosus*, durante o armazenamento foi melhorada.

Em resumo, estes estudos demonstram que o método LbL é bastante promissor na medida em que, aumenta a viabilidade dos probióticos durante a sua produção, armazenamento e exposição aos meios gastrointestinais simulados. Conclui-se que a viabilidade das bactérias encapsuladas, é maior em relação às não encapsuladas.

### 3.2. Preservação das Bactérias Probióticas a partir de FOS

Savedboworn et al. (2019) estudaram a capacidade protetora da proteína de arroz em combinação com vários prebióticos para proteger o probiótico *Lactobacillus plantarum* TISTR2075 após o processo de liofilização, armazenamento a longo prazo e na exposição dos meios gástricos e intestinais simulados. Esta comparação foi realizada com a adição de vários agentes protetores: proteína de arroz, fruto-oligossacarídeo (FOS), goma arábica, inulina, polidextrose e xilitol. A melhor combinação foi 10 % (w/v) de proteína de arroz + 5 % (w/v) de fruto-oligossacarídeo (FOS), visto que apresentou menor perda de viabilidade após o processo de liofilização, melhor estabilidade de armazenamento a longo prazo e aumentou a funcionalidade probiótica durante a exposição a condições gástricas e intestinais simuladas.

Romano et al. (2014) investigaram o efeito estabilizador do fruto-oligossacarídeo (FOS) em filmes de metilcelulose (MC) tanto pela viabilidade bacteriana como pelas propriedades físico-químicas dos filmes em duas estirpes de *Lactobacilli*, a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 e a *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. Várias concentrações de FOS foram testadas para as duas etapas de formulação dos filmes. Estas etapas são potencialmente prejudiciais para as bactérias devido ao efeito osmótico da solução, que formará o filme sobre as bactérias, e o efeito da desidratação provocado pela secagem num forno de ar forçado. Verificou-se um aumento da viabilidade por parte da bactéria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333 com a adição de 3% (w/v) de FOS

nos filmes de MC. Nenhuma melhoria foi observada para maiores concentrações de FOS. A bactéria *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 demonstrou maior resistência intrínseca aos processos de desidratação, visto que não foi registada perda de viabilidade na ausência de FOS, nem a adição de 5% (w/v) de FOS aumentou significativamente a sua viabilidade. Os resultados obtidos suportam a utilização de filmes de MC contendo FOS como uma boa estratégia para imobilizar algumas bactérias de ácido láctico.

Kalita et al. (2018) avaliaram o efeito do processo de *spray-drying*, as condições gástricas e intestinais simuladas e o armazenamento a longo prazo no probiótico *Lactobacillus plantarum* MTCC2621 com proporções variadas de maltodextrina, FOS e pectina. A partir da viabilidade bacteriana, conseguiram demonstrar que as bactérias encasuladas com 10% (w/v) de maltodextrina e adição de 5% (w/v) de FOS atingiram maior rendimento e capacidade de sobrevivência aos meios simulados. As bactérias revestidas sem adição de FOS apresentaram um aumento significativo de perda da viabilidade celular. Os dados apresentados demonstraram que esta combinação apresenta uma elevada capacidade protetora contra os danos provocados pelo processo de *spray-drying* e contra o ambiente gástrico e, ainda aumentam o crescimento da *Lactobacillus plantarum* MTCC2621 no intestino.

Rajam & Anandharamakrishnan, (2015) estudaram o efeito simbiótico entre o prebiótico FOS e o probiótico *Lactobacillus plantarum* MTCC5422. Devido à baixa temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do FOS, este em combinação com a bactéria produz um material pegajoso durante o processo de microencapsulação por *spray-drying* e não um pó. Deste modo, propuseram uma combinação de proteína isolada de soro de leite (WPI) e proteína isolada de soro de leite desnatado (DWPI) para encapsular as bactérias com a adição de FOS, avaliando assim o tamanho de partículas, a morfologia das microcápsulas, a eficiência de encapsulação, a estabilidade e viabilidade das bactérias durante o armazenamento e em condições gástricas e intestinais simuladas. A microencapsulação da *Lactobacillus plantarum* MTCC5422 foi realizada com FOS unicamente, FOS-WPI e FOS-DWPI, em diferentes proporções. A combinação de FOS com WPI ou DWPI reduziu a viscosidade e agregação das partículas. As microcápsulas de FOS-DWPI de proporção 1:1 obtiveram maior eficiência de encapsulação e a proporção de 1:1,15 alcançaram melhor estabilidade de armazenamento e proteção em condições gástricas e intestinais simuladas do que os outros encapsulados. Assim, a microencapsulação com FOS e DWPI como material de revestimento foi considerado mais eficaz.

Resumindo, estes e outros estudos revelaram que a adição aos probióticos de FOS, por si só, ou em combinação com outros prebióticos, minimiza a perda de viabilidade destes

microrganismos quando sujeitos a processos de desidratação (liofilização, *spray-drying*, secagem em estufa), em condições de armazenamento, e quando são expostos a condições idênticas às encontradas no trato gastrointestinal.





## Capítulo II – Procedimento Experimental

Nesta secção são descritos todos os materiais e equipamentos utilizados para a realização dos ensaios e respetivas simulações gastrointestinais, bem como, os métodos de caracterização associados a estes.

### 1. Materiais

Os materiais utilizados para a realização deste trabalho são os seguintes: Ácido Acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (VWR Chemicals, MA, USA, 100 %), Ácido Clorídrico (HCl) (VWR Chemicals, MA, USA, 37 %), Cloreto de Sódio (NaCl) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 99 %), Hidróxido de Sódio (NaOH) (VWR Chemicals, MA, USA), Quitosano (Acros Organics, NJ, USA, Mw: 100 000 – 300 000 g/mol, grau de desacetilação  $\geq 75$  %), Alginato de Sódio (Alfa Aesar), Copolímero poli(ácido acrílico)-Pluronic®- poli(ácido acrílico) (PPP) (Sintetizado na Universidade de Coimbra, Portugal Mw: 11,671 kDa, (Quintana et al., 2017)), Fruto-Oligossacarídeo (FOS) (Sintetizado e cedido por: CIDCA-CONICET (*Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas*), La Plata, Argentina (dp:3-5), MRS broth (*Lactobacillus* Man Rogosa & Sharoe (Himedia)), Agar powder (Labkem), *Lactobacillus Plantarum* (WCFS1 - 83114) (LP) (CIDCA-CONICET microbiological collection, La Plata, Argentina), Pepsina Suína (P7125, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Cloreto de Potássio (KCl) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 99 %), Fosfato Monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (E. Merck, Darmstadt, 99 %), Cloreto de Cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (Acros Organics, NJ, USA, 96 %), Solução Tampão de Fosfato Salino (PBS em pastilhas) (PanReac ApplicChem, Barcelona, Spain), Pancreatina (P1625, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Sais Biliares (P48305, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e Bicarbonato de Sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Globo, A Colmeia do Minho, Aldeia de Paio Pires, Portugal).

### 2. Equipamentos

Os equipamentos usados no desenvolvimento deste projeto incluem:

- Balança (*Radwag*);
- Medidor de pH (*Ezdo PL-700PC*);
- Autoclave (*Trade Raypa*);

- Câmaras de Fluxo Laminar (*Faster two 30 e HR 1200-IIA2*);
- Vortéx (*Thermolyne 37600 Mixer*);
- Incubadoras (*Thermoshake, THO500/1 e SI50 Stuart*);
- Centrífuga (*Hermle LaborTechnik Z366*);
- Liofilizador (*Telstar LyoQuest*);
- Estufa (*Memmert modell 600*);
- Leitor de Microplacas (*Synergy HTX multi-mode microplate reader da BioTek*);
- Zetasizer Nano ZS (*Malvern Instruments*).

### 3. Métodos

A parte experimental deste trabalho divide-se em cinco fases: i) preparação e esterilização dos meios de cultura, das soluções poliméricas e de todo o material a utilizar; ii) método de encapsulação por LbL das bactérias *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com os polímeros; iii) caracterização das bactéria não encapsuladas e encapsuladas; iv) preparação e esterilização dos meios simulados, gástrico e intestinal; v) caracterização da exposição das bactérias não encapsuladas e encapsuladas aos meios simulados.

#### 3.1. Preparação do meio de cultura com e sem agar

Foram preparados cerca de 500 mL de meio de cultura MRS (55 g/L) para os seguintes fins: 25 mL para a reativação das bactérias, 200 mL para a incubação das bactérias e 5 mL para a espectrofotometria de densidade ótica (D.O). O sobranço foi armazenado para as experiências seguintes.

De forma a avaliar a viabilidade bacteriana, adicionou-se agar (15 g/L) a cerca de 500 mL de meio MRS (55 g/L). Esta solução foi distribuída, após a esterilização, por placas de *Petri*, aproximadamente 25 mL por placa, sempre em condições assépticas e com a solução ainda quente. Depois de solidificar, as placas foram armazenadas a frio a  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$ .

#### 3.2. Preparação das soluções

Foram preparadas todas as soluções necessárias para a encapsulação das bactérias, a simulação dos meios gastrointestinais e respetivas caracterizações.

### 3.2.1. Solução de NaCl

Adicionou-se 8,76 g de NaCl a 1 L de água destilada de modo a obter uma solução salina com uma concentração de 0,15 M. No final, ajustou-se o pH para sensivelmente 6 recorrendo a soluções de NaOH e HCl, com concentrações de 5,0 M e 1,0 M, respetivamente. Esta solução foi utilizada nos processos de lavagem realizados em cada etapa do método de encapsulação. Foi ainda utilizada durante a caracterização, nomeadamente, nas diluições para a preparação do estudo da viabilidade celular.

### 3.2.2. Solução de FOS

A solução de fruto-oligossacarídeos (FOS) foi preparada com concentração de 2 % (m/v), em água destilada. O FOS utilizado estava armazenado a -20 °C.

### 3.2.3. Soluções Poliméricas

Todas as soluções poliméricas foram preparadas com concentração de 1 mg/mL (0,1 % (m/v)). As soluções de quitosano (CHI), de alginato de sódio (ALG) e do copolímero poli(ácido acrílico)-Pluronic®-poli(ácido acrílico) (PPP) foram preparadas dissolvendo cada polímero em água destilada. À solução de CHI foi adicionado 1 % (v/v) de ácido acético para tornar possível a sua dissolução total. Já para a preparação da solução de PPP foi necessário ajustar o pH da solução para 12, para atingir a dissolução total do copolímero. Depois de dissolvidos os polímeros, adicionou-se às soluções NaCl na quantidade necessária, para obter uma concentração de 0,15 M. Por fim, o pH de todas as soluções foi ajustado para o valor de 6 recorrendo a soluções de NaOH e HCl, com concentrações de 5,0 M e 1,0 M, respetivamente. Este valor de pH tem por objetivo favorecer a interação electrostática entre os polieletrólitos. Verifica-se que os grupos amina do polímero, CHI, estão protonados ( $\text{NH}_3^+$ ), uma vez que a sua constante de dissociação ácida ( $\text{pK}_a$ ) apresenta um valor de aproximadamente 6,5, ao passo que, para os polianiões ALG e PPP os seus grupos carboxílicos estão desprotonados ( $\text{COO}^-$ ), ou seja, totalmente ionizados, devido aos seus valores de  $\text{pK}_a$  à volta de, 3,5 e 4,5, respetivamente. Desta forma, existem cargas positivas e negativas para que haja uma deposição alternada dos polieletrólitos.

### 3.2.4. Preparação das soluções de meios simulados

Nesta etapa da experiência pretendeu-se observar o comportamento das bactérias liofilizadas e não liofilizadas, com e sem revestimento, quando expostas aos fluidos gástricos e intestinais simulados.

Para a preparação desses meios, utilizou-se como referência para as quantidades utilizadas, o artigo (Quintana et al., 2017). Para o meio de controlo e para o processo de lavagem utilizou-se uma solução tampão de fosfato salino, PBS, esterilizada (pH=7,4). O fluido gástrico simulado, FGS, foi preparado com a adição de 3200 unidades/ mL de pepsina suína, 7,2 mM de cloreto de cálcio, 98 mM de cloreto de sódio, 13,6 mM de cloreto de potássio e 0,82 mM de fosfato monopotássico a 100 mL de água destilada. Já o fluido intestinal simulado, FIS, foi preparado adicionando 0,1 % (w/v) de pancreatina, 0,15 % (w/v) de sais biliares de bovino, 22 mM de cloreto de sódio e 7,6 mM de bicarbonato de sódio, a 100 mL de água destilada, tal como o anterior. O pH do meio gástrico foi ajustado para o valor de 2,5 e o pH do meio intestinal para o valor de 8, com soluções de NaOH e HCl, com concentrações de 5,0 M e 1,0 M, respetivamente. A adição das enzimas, pepsina suína, pancreatina e sais biliares de bovino só foram adicionadas às suas respetivas soluções na véspera dos ensaios. Após esta adição, os dois meios, FGS e FIS, foram esterilizados por filtração através de um filtro de seringa de *nylon* hidrofílico, com diâmetro de 25 mm e com poros de 0,45 µm. Estas soluções foram guardadas a frio 5 °C ± 3.

### 3.3. Esterilização

Todos os materiais e soluções usadas, exceto os meios simulados, foram primeiramente esterilizados na autoclave, a 121 °C durante 15 min. Para prevenir quaisquer tipos de contaminações, as manipulações de todas as fases em cada processo foram realizadas sob condições assépticas na câmara de fluxo laminar.

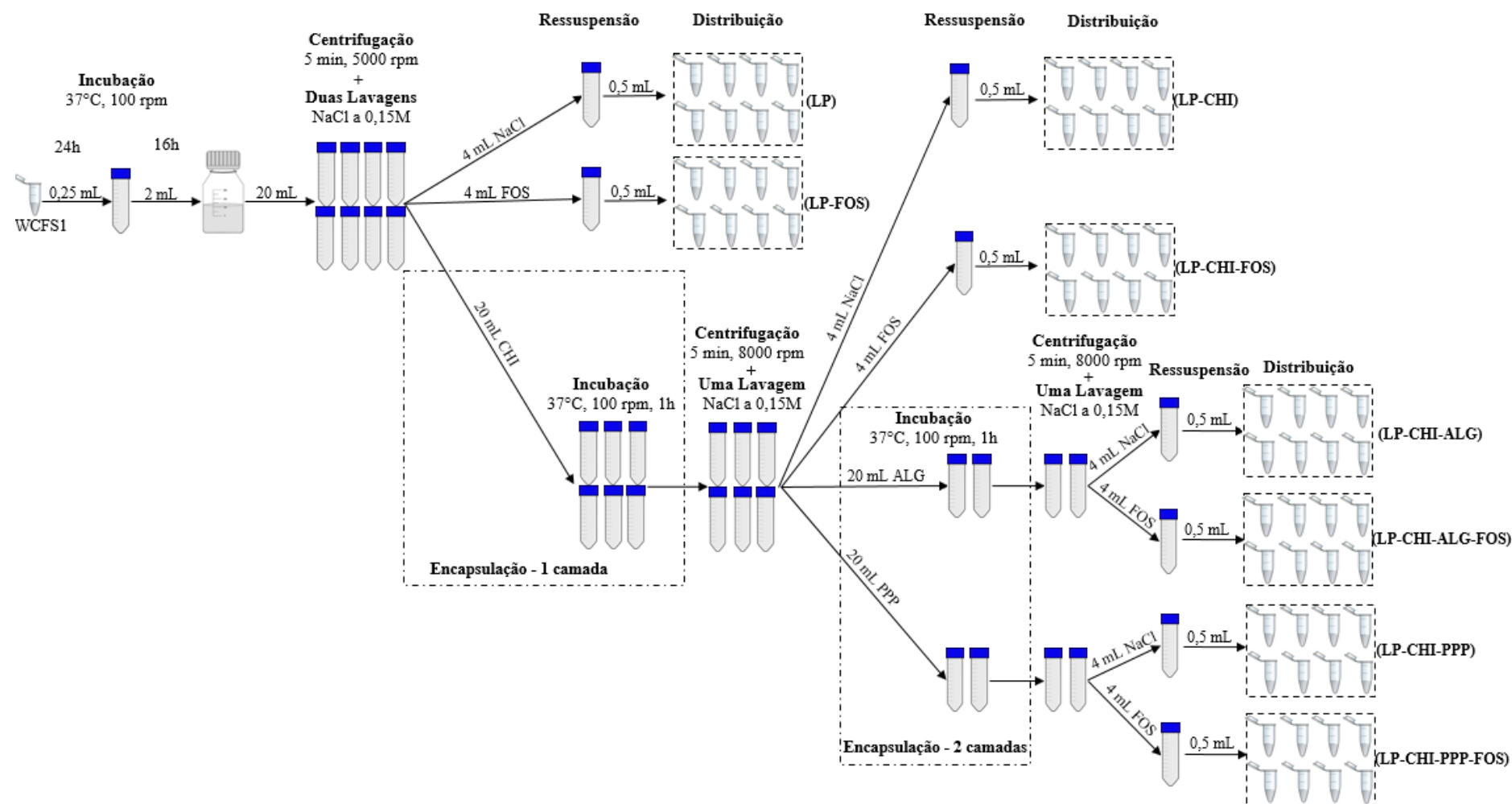
### 3.4. Reativação e cultura das bactérias

Primeiramente, procedeu-se a uma multiplicação prévia das bactérias, *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (LP), que se encontravam preservadas a -20 °C numa solução de glicerina a 30 % (v/v). Esta pré-cultura, designada de *starter*, foi obtida incubando 0,25 mL de suspensão de bactérias preservadas em 25 mL de meio MRS, tendo-se procedido à incubação, em condições aeróbias, a 37 °C, e com uma agitação orbital de 100 rpm durante 24 h. Após

este período de tempo, foi retirado 2 mL desta pré-cultura e incubado em 200 mL de meio MRS fresco, procedendo-se à sua incubação sob as mesmas condições mencionadas anteriormente, durante aproximadamente 16 h, até as bactérias atingirem a fase estacionária de crescimento.

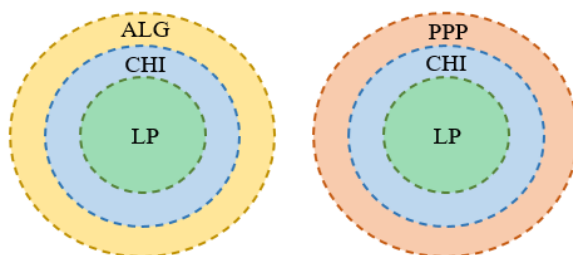
### 3.5. Encapsulação por LbL

Para os ensaios de LbL, cujo procedimento se encontra esquematizado na Figura 10, a cultura obtida na secção anterior foi distribuída por 8 tubos de *falcon*, em 20 mL por cada tubo, procedendo-se de seguida à sua centrifugação durante 5 min a 5000 rpm, de forma a isolar a biomassa. Removeu-se o sobrenadante e passou-se ao processo de lavagem dos *pellets* de biomassa, isto é, à remoção de resíduos do meio de cultura. Este processo passa pela ressuspensão dos *pellets* de bactérias, numa solução salina de 20 mL, com o auxílio de um vórtex. Seguidamente, estas soluções são centrifugadas, nas condições já mencionadas. Este processo é repetido mais uma vez para garantir uma lavagem adequada. No final, retirou-se o sobrenadante e reservaram-se 6 tubos de *falcon* para o processo de encapsulação das bactérias. A biomassa nos restantes 2 dos tubos de *falcon* foi ressuspensa em 4 mL de solução salina e em 4 mL de solução de FOS. Para cada tubo, a suspensão resultante foi redistribuída por tubos de *ependorfs*, 0,5 mL por tubo. Estas bactérias não encapsuladas, utilizadas como controlos, são designadas neste trabalho como LP e LP-FOS, respetivamente, como se pode observar na Figura 10. Um tubo de *ependorf* de cada condição foi guardado a frio  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$ , para testes futuros de caracterização. Os restantes foram congelados, a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para a realização do processo seguinte, a liofilização.



**Figura 11.** Representação esquemática do processo de encapsulação das bactérias *Lactobacillus plantarum* WCFS1, pelo método LbL.

A encapsulação foi efetuada pelo método LbL, onde as bactérias, *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (LP), foram encapsuladas com duas camadas de polímeros, Figura 11. A primeira camada foi de CHI, visto que, este polieletrólito apresenta carga superficial positiva, enquanto a LP apresenta carga superficial negativa. Resultando assim, em interações electroestáticas bastante fortes. Na segunda camada foram testados dois polímeros diferentes com cargas superficiais negativas, um de origem natural, o ALG, e o outro de origem sintética, o PPP.



**Figura 12.** Representação esquemática da técnica *Layer-by-Layer* (LbL), aplicada neste projeto (cor verde: bactéria em estudo, LP), cor azul: primeira camada de revestimento CHI, cor amarela: segunda camada de revestimento de ALG e cor vermelha: segunda camada de revestimento de PPP).

A encapsulação começa com os 6 tubos de *falcon* que contêm os *pellets* de bactérias, decorrentes da fase anterior, onde passaram pelo processo de lavagem. Para a formação da primeira camada, foram adicionados 20 mL de solução de CHI a cada um dos 6 tubos de *falcon*, as bactérias foram ressuspensas com o auxílio do vórtex, e as suspensões incubadas a 37 °C sob agitação de 100 rpm durante 1 h. Após este período de tempo, removeu-se o sobrenadante de CHI por centrifugação a 5000 rpm durante 5 min. Os *pellets* que se encontram nestes tubos passaram pelo processo de lavagem uma única vez com solução de NaCl. A adição de solução salina de lavagem foi realizada aos poucos e com a ajuda do vórtex, para que não houvesse agregação por parte das células. Destes 6 tubos de *falcon* reservaram-se 4 para a adição da segunda camada. Aos restantes dois tubos adicionaram-se 4 mL de solução salina (LP-CHI) num e 4 mL de solução de FOS (LP-CHI-FOS) noutro. A suspensão destes dois tubos foi dividida em 8 tubos de *ependorfs* para cada condição e foram reservados nas mesmas condições dos anteriores (Figura 10).

A formação da segunda camada, utilizando os 4 tubos de *falcon* anteriormente reservados, começou pela adição, gradual, de 20 mL de solução de ALG em 2 tubos de *falcon* e 20 mL de solução de PPP nos 2 tubos restantes. As condições de incubação e de lavagem foram as mesmas da primeira camada, já as da centrifugação foram distintas, 8000 rpm durante 5 min, pois com estas condições obteve-se uma melhor separação dos *pellets* de bactérias e do

sobrenadante. A ressuspensão de 4 mL de solução salina e de 4 mL de solução de FOS foi feita tanto para os tubos de ALG (LP-CHI-ALG) e (LP-CHI-ALG-FOS), como para os de PPP (LP-CHI-PPP) e (LP-CHI-PPP-FOS). Foram então distribuídos pelos *ependorfs* e armazenados nas condições já referidas.

### 3.6. Liofilização

A liofilização é uma técnica comumente utilizada para preservar as bactérias de ácido láctico, BAL, pois estas são sensíveis a processos que utilizem temperaturas muito elevadas, como por exemplo, a técnica de secagem por *spray-drying*. A liofilização minimiza as perdas de viabilidade e funcionalidade e garante a estabilidade das bactérias nos alimentos, durante um armazenamento a longo prazo. Ao passo que o armazenamento a curto prazo, congelamento a -20 °C, induz a formação de cristais de gelo causando alterações irreversíveis nas células (Meng et al., 2008).

Este processo de liofilização inclui 3 fases, o congelamento da suspensão de bactérias, a desidratação primária e secundária. A desidratação primária, utiliza vácuo, para remove o gelo por sublimação, baixando a pressão de vapor e, evitando a transição para a fase líquida. A desidratação secundária remove os resquícios de água não congelada por dessorção (Fonseca et al., 2014).

Para obter uma boa estabilidade das bactérias de ácido láctico liofilizadas, teve-se em conta vários fatores, como as condições operacionais de liofilização e as condições de armazenamento. Para tal, no projeto desenvolvido, congelaram-se as amostras numa câmara de liofilização, a uma temperatura de aproximadamente -80 °C, na câmara de refrigeração de um liofilizador, *Telstar LyoQuest*, tendo-se de seguida procedido à sua liofilização no mesmo equipamento, a uma pressão de cerca de 0,10 milibar, durante 24 h. As amostras foram armazenadas em sílica gel dentro de um saco, a frio 5 °C ± 3.

### 3.7. Exposição aos meios gastrointestinais simulados

Procede-se à exposição das bactérias, antes e após a encapsulação e liofilização, aos meios gastrointestinais simulados, tendo como objetivo simular o sistema digestivo humano.

Primeiramente, realizou-se um ensaio onde se utilizou um processo em paralelo. Começa-se por centrifugar 18 tubos de *ependorf*, ou seja, 6 tubos de cada condição sem liofilização (LP, LP-CHI-ALG e LP-CHI-PPP), durante 5 min a 5000 rpm. De seguida, foi retirado o



sobrenadante, até ficarem nos tubos apenas os *pellets* de bactérias. Dividiram-se os 18 tubos em grupos de 6, contendo 2 tubos de cada condição. A um grupo adicionou-se 1 mL de solução de PBS, a outro foi adicionado 1 mL de solução FGS e ao último grupo de 6 tubos adicionou-se 1 mL de solução FIS.

Todos os tubos de *ependorf* foram ressuspensos com a ajuda do vórtex e foram a incubar durante 2 h, a 37 °C e sob agitação de 100 rpm. Após esse período, os 18 tubos foram a centrifugar sob as mesmas condições, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 0,5 mL de solução tampão de fosfato salina a cada tubo. Reservaram-se a frio 5 °C ± 3, para posterior avaliação da sua viabilidade.

O processo em série, esquematizado na Figura 12, começou da mesma maneira que o paralelo, centrifugou-se os 18 tubos de *ependorf*, 6 tubos de cada condição sem liofilização. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se 1 mL de solução de PBS a 6 *ependorfs*, 2 tubos de cada condição. A diferença residiu na adição de 1 mL de solução de FGS a 12 tubos de *ependorf*, 4 tubos de cada condição, ressuspenderam-se todos os tubos no vórtex e foram a incubar durante 2 h e 30 min, a 37 °C e sob agitação de 100 rpm. Ao fim deste período de incubação, os 18 *ependorfs* foram novamente a centrifugar sob as condições referidas anteriormente, deixando os *pellets* de bactérias nos *ependorfs*. Dos 12 tubos de *ependorf* que foram a incubar com FGS, escolheram-se 6, 2 tubos de cada condição, aos quais se acrescentou 1 mL de solução FIS, e foram novamente a incubar nas mesmas condições que os anteriores. Aos 6 tubos de *ependorf* que continham o meio de controlo, solução de PBS, e os restantes 6 tubos de *ependorf* que tinham o meio FGS (já centrifugados) foi adicionado 0,5 mL de solução PBS e foram reservados a frio 5 °C ± 3. No final da última incubação com o meio FIS, os *ependorfs* foram centrifugados nas mesmas condições e adicionou-se 0,5 mL de solução PBS a estes, ressuspenderam-se e juntaram-se aos restantes que se encontravam no frigorífico para posteriores testes de viabilidade.

Para os ensaios com amostras liofilizadas, estas foram previamente hidratadas com 0,5 mL de água destilada e o processo de exposição aos meios simulados foi realizado em série como descrito anteriormente.

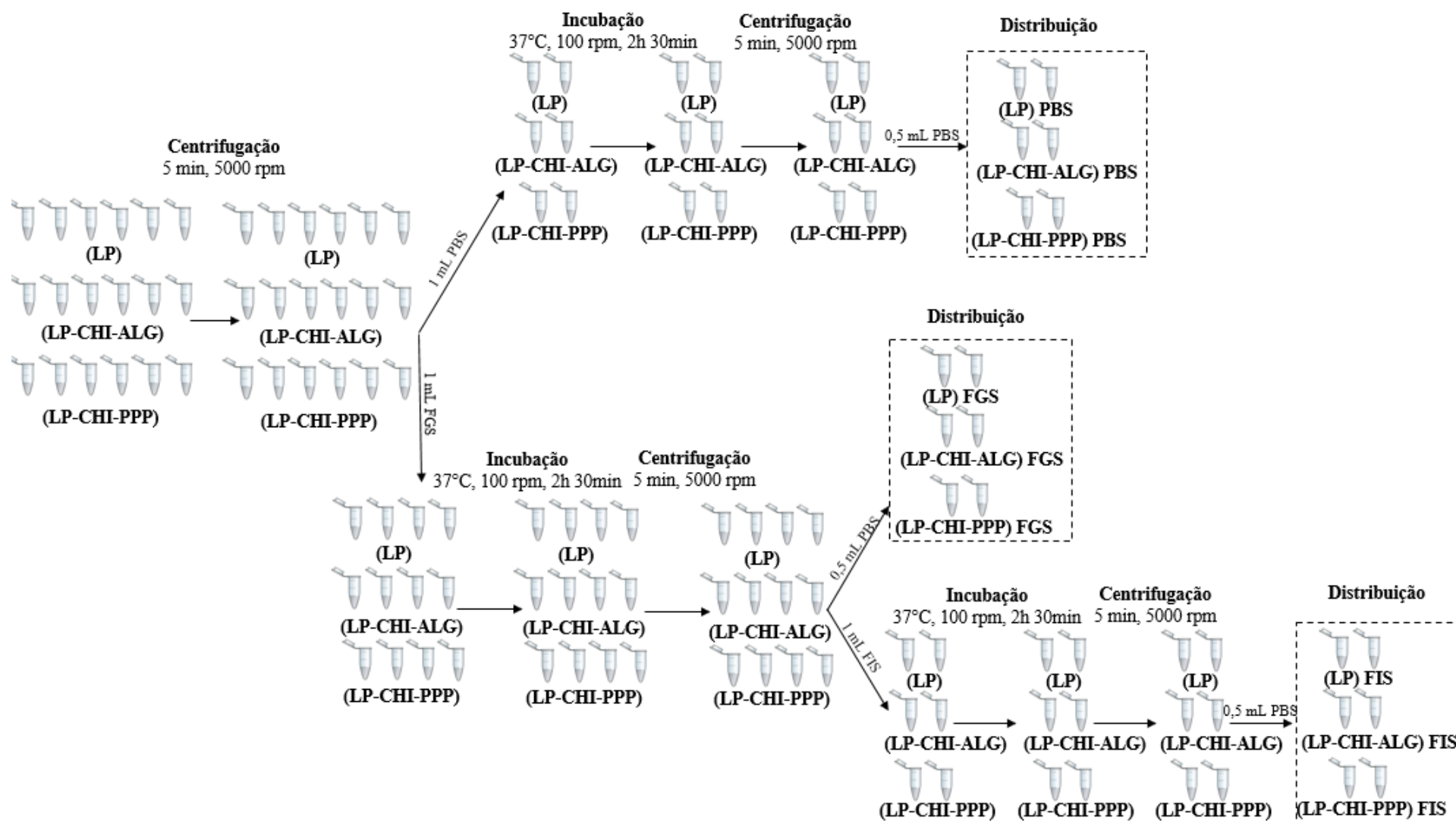


Figura 13. Representação esquemática da exposição aos meios de controlo (PBS), gástrico (FGS) e intestinal (FIS) simulados.

### 3.8. Caracterização

Os procedimentos utilizados para caracterizar as bactérias encapsuladas, antes e após liofilização, foram a determinação do potencial zeta, o cálculo da viabilidade bacteriana e a determinação da curva de crescimento.

#### 3.8.1. Potencial Zeta (Potencial- $\zeta$ )

O potencial- $\zeta$  é uma medida analítica padrão para caracterizar a superfície das nanopartículas (A. Kumar & Dixit, 2017). Depende de vários parâmetros como a temperatura, pH, condutividade e solvente. Os valores do potencial- $\zeta$  são utilizados para inferir propriedades/características das nanopartículas como a sua estabilidade, interações proteicas, bem como, avaliar a eficácia de processos como as modificações da superfície das nanopartículas ou o encapsulamento pelo método LbL (Smith et al., 2017).

As nanopartículas apresentam um potencial de superfície que atrai uma camada de íões de carga oposta relativamente à sua carga superficial, a camada de íões denomina-se de camada de *Stern* (Smith et al., 2017; Cano-Sarmiento et al., 2018). O potencial neste ponto é referido como potencial de *Stern* e é reduzido em magnitude em comparação ao potencial de superfície da nanopartícula. Para além da camada de *Stern*, existe uma segunda camada difusa de íões dispersos. Estas duas camadas de íões associados são referidas como dupla camada elétrica. O limite dessa camada é conhecido como plano de cisalhamento, onde a nanopartícula e os íões movem-se como uma única entidade (Smith et al., 2017). O potencial eletrostático que se desenvolve no limite entre o fluido circulante e a dupla camada de íões, que está associada à superfície da nanopartícula, é designado de potencial- $\zeta$  (Smith et al., 2017; Biriukov et al., 2020). A sua determinação é feita através da conversão da mobilidade eletroforética quando aplicado um campo elétrico (Biriukov et al., 2020). Após a aplicação de uma certa voltagem, observa-se a migração das nanopartículas em direção ao eletrodo com a carga oposta, esta velocidade de deslocamento da partícula será proporcional à magnitude do potencial- $\zeta$  (Selvamani, 2018). Pelo método M3 PALS mede-se a velocidade da partícula em função da voltagem aplicada (Malvern Panalytical, 2020). Um laser passa através da célula e, à medida que as partículas se movem, a intensidade da luz dispersa flutua a uma frequência proporcional à velocidade da partícula. A velocidade da partícula em múltiplas tensões é medida, e estes dados são utilizados para calcular o potencial- $\zeta$  (Selvamani, 2018).

Para aferir a deposição das camadas de revestimento das bactérias, foi medida a carga superficial das bactérias encapsuladas e não encapsuladas, com e sem FOS, após a adição de cada camada de revestimento. O equipamento usado foi o *zetasizer* Nano ZS (Malvern Instruments 2016). As amostras com o volume de 0,1 mL cada, foram diluídas em 1 mL de água destilada e inseridas na célula de medição DTS 1070, sendo que as medições foram duplicadas e o número de leituras foi de 5. Os resultados estão apresentados em termos de média  $\pm$  desvio padrão de 5 leituras.

### 3.8.2. Viabilidade Bacteriana

Partindo dos tubos de *ependorf* que continham as suspensões de células encapsuladas e não encapsuladas, antes e depois da liofilização, para cada condição, foi realizada a contagem de células viáveis através do método de placas. As suspensões de células foram diluídas sucessivamente em 0,9 mL de uma solução salina usando um volume de 0,1 mL de suspensão. As diluições foram otimizadas de condição para condição, ou seja, para as bactérias não encapsuladas, antes e depois da liofilização, as diluições foram até  $10^{-7}$ , para as bactérias encapsuladas antes da liofilização, até  $10^{-6}$ , e para as bactérias encapsuladas depois da liofilização, até  $10^{-4}$ . Cada caixa de *Petri*, contendo MRS e agar, foi dividida em 4 secções, correspondentes às diluições pretendidas. Nestas foram colocadas 3 gotas, com 10  $\mu$ L, devidamente separadas, em cada quarto de placa. Esta incubação foi feita assepticamente numa câmara de fluxo laminar. Estas foram incubadas aerobiamente numa estufa a 37 °C, temperatura ótima de crescimento, durante 48 h.

A contagem das células viáveis foi então realizada através das colónias formadas, assumindo-se que cada colónia é originada a partir de uma única célula viável. A viabilidade das bactérias foi calculada, antes e após o processo de encapsulação e liofilização, bem como, para vários tempos de armazenamento, para simular o armazenamento a longo prazo. Por último foi ainda calculada a viabilidade após a exposição aos meios gastrointestinais simulados. Estes resultados foram expressos pelos valores da média das diferentes diluições  $\pm$  desvio padrão em escala log (CFU/mL).

### 3.8.3. Crescimento Bacteriano

O crescimento das culturas microbianas estudadas foi medido pela análise da espectrofotometria de densidade ótica (D.O.) ao longo do tempo. Este é um método rápido, e

simples, que acompanha o crescimento bacteriano, embora seja um método indireto, pois não permite a diferenciação das células viáveis das não viáveis, visto que, faz uma avaliação do número total de células presentes na amostra. A determinação da densidade ótica ou absorvância corresponde à quantidade de luz que atravessa a suspensão bacteriana.

O crescimento das bactérias encapsuladas está dependente do revestimento, sendo que este deve possuir uma permeabilidade que permita o transporte de nutrientes. Idealmente, a curva de D.O. das bactérias encapsuladas devia aproximar-se à curva de D.O. das bactérias não encapsuladas. O acompanhamento das curvas de crescimento auxiliará na identificação de qual o sistema de proteção e manutenção da atividade metabólica que mais se adequa às bactérias.

A determinação das curvas de crescimento após cada etapa de encapsulação e liofilização, foi realizada em microplacas com 96 poços, onde foi adicionado a cada poço 90 µL do meio MRS e 10 µL de suspensão de bactérias de cada condição. Cada ensaio foi efetuado com três réplicas. De seguida, ajustaram-se os parâmetros da cinética de crescimento, no leitor de microplacas, *Synergy HTX multi-mode microplate reader da BioTek*, para uma absorvância de 600 nm, uma temperatura ótima de crescimento de 37 °C e durante 48 h, os valores foram retirados de hora em hora.

O efeito do revestimento no crescimento bacteriano foi avaliado pela análise comparativa das cinéticas de crescimento, ajustando um modelo de função aos dados de crescimento medidos, que corresponde à equação (2.1):

$$Y(t) = \frac{Y_f}{1 - e^{-k(t-t_0)}} + Y_i \quad (2.1)$$

onde,  $t$  é o tempo em horas,  $Y(t)$  é a absorvância a 600 nm num certo período de tempo,  $Y_i$  e  $Y_f$ , correspondem aos valores de absorvância a 600 nm no tempo inicial,  $t \rightarrow 0$ , e no tempo final,  $t \rightarrow \infty$  (uma vez atingida a fase estacionária de crescimento), respetivamente. O valor de  $t_0$  é o tempo correspondente ao ponto de inflexão sigmóide, e  $k$  o parâmetro da taxa de crescimento. O tempo de atraso ( $t_{lag}$ ) foi calculado através da interseção da reta tangente à curva em  $t = t_0$ , com o eixo  $Y = Y_i$ . A taxa de crescimento durante a fase exponencial foi calculada através do módulo da inclinação da reta tangente. Os resultados correspondentes aos valores de  $Y(t)$  foram normalizados de maneira a restringir uma gama de variação ao intervalo ( $0 \leq Y(t) \leq 1$ ), para obter uma comparação direta de todos os resultados. A

variação percentual do número de bactérias entre amostras ( $\Delta N(\%)$ ), pode ser calculada a partir da equação (2.2):

$$\Delta N(\%) = \left( \frac{D.O.f}{D.O.i} - 1 \right) * 100 \quad (2.2)$$

em que,  $D.O.i$  e  $D.O.f$  traduzem as densidades óticas inicial e final, respetivamente.

## Capítulo III – Resultados e Discussão

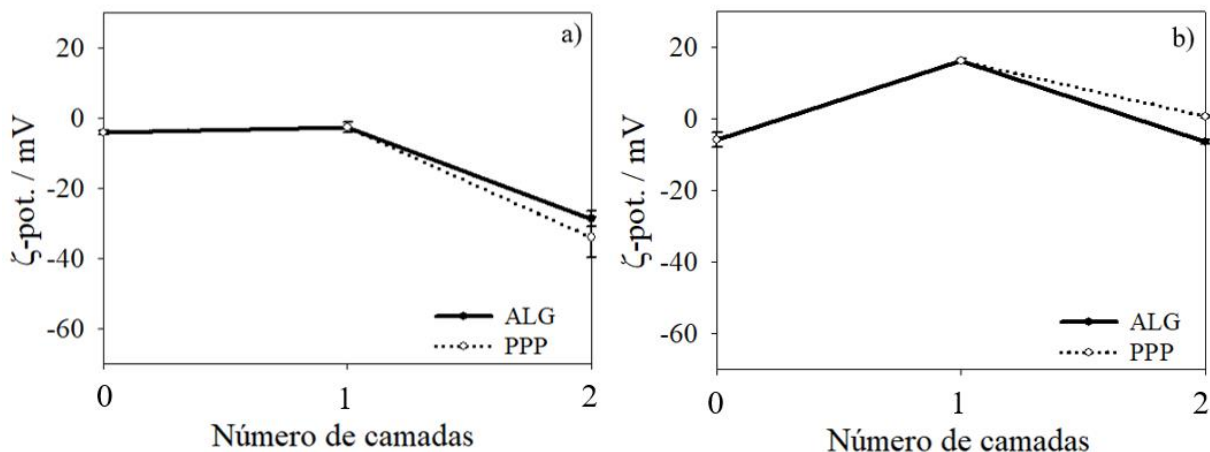
O presente capítulo inicia-se com a apresentação dos resultados relativos ao potencial- $\zeta$ , com o objetivo de confirmar a deposição das camadas de revestimento através da técnica LbL. Mais à frente são apresentados e analisados os dados relativos à viabilidade bacteriana antes e após o processo de encapsulação e liofilização, bem como os dados sobre o armazenamento a longo prazo. É ainda analisado o efeito da exposição das bactérias não encapsuladas e encapsuladas aos meios gastrointestinais simulados. Por fim, são apresentados os dados do crescimento bacteriano antes e após a adição das camadas de polieletrólitos. Estas análises são feitas tendo em conta as variáveis em estudo: a composição da segunda camada, composta por um polímero natural, ALG, ou por um copolímero sintético, PPP, e ainda, a ausência e presença de FOS durante o processo de liofilização.

Realizaram-se 5 ensaios de modo a aferir a reprodutibilidade dos resultados. Os primeiros ensaios, 1 e 2, encontram-se em anexo, visto que foram ensaios preliminares realizados com o objetivo de ajustar as condições de operação na técnica LbL, nomeadamente para ajustar os procedimentos de forma a minimizar o fenómeno de agregação das bactérias encapsuladas. Os ensaios seguintes, 3, 4 e 5, foram executados exatamente nas mesmas condições experimentais, diferindo apenas em alguns pormenores dos ensaios 1 e 2.

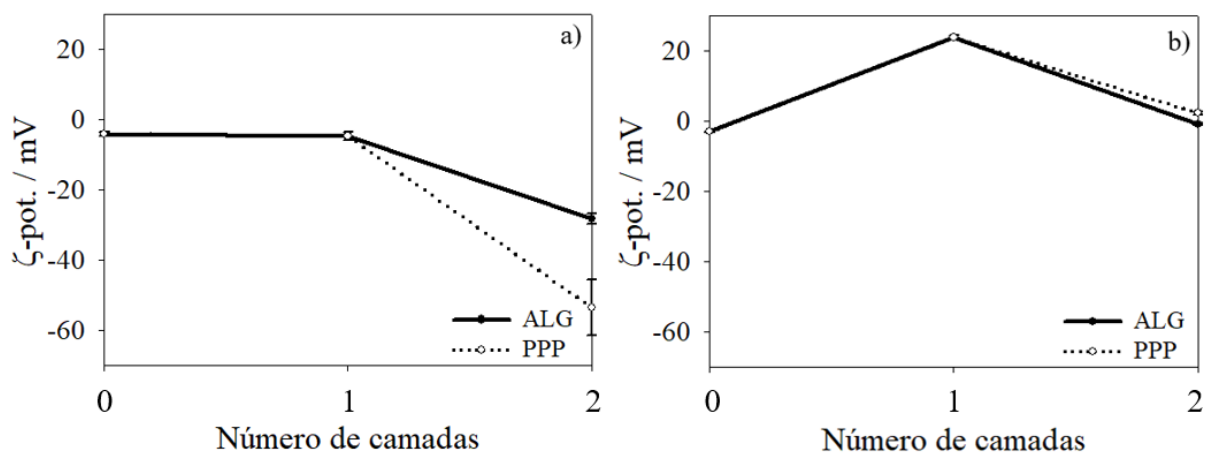
### 1. Avaliação do Potencial Zeta- $\zeta$

Para garantir a efetividade do método LbL, a avaliação das medições do potencial- $\zeta$  é bastante importante, visto que, permite acompanhar a alteração de carga superficial aquando da deposição alternada das camadas de revestimento. As bactérias que atuam como substrato para a adsorção das camadas de revestimento, *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (LP), apresentam carga superficial negativa, mas com valor absoluto próximo de zero. Desta forma, o quitosano foi o primeiro polieletrólito a ser adsorvido na superfície do substrato, uma vez que os seus grupos amina estão parcialmente protonados, a pH 6, valor de pH selecionado para a deposição, apresentando assim, carga superficial positiva. Esta combinação, LP-CHI, deveria resultar em valores de potencial- $\zeta$  menos negativos que o valor de referência, ou seja, o potencial- $\zeta$  das bactérias não revestidas. Já com a deposição da segunda camada, com o polímero alginato de sódio e o copolímero poli(ácido acrílico)-Pluronic®-poli(ácido acrílico), a conjugação LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP deve apresentar um potencial- $\zeta$  negativo, visto que os grupos carboxílicos destes dois polímeros aniônicos estão completamente

desprotonados a pH 6. Os resultados do potencial- $\zeta$  para os Ensaio 3, 4 e 5, com e sem a presença de FOS, estão apresentados graficamente nas Figuras 13 a 15. Os resultados representados em tabelas encontram-se em anexo (Anexo A).

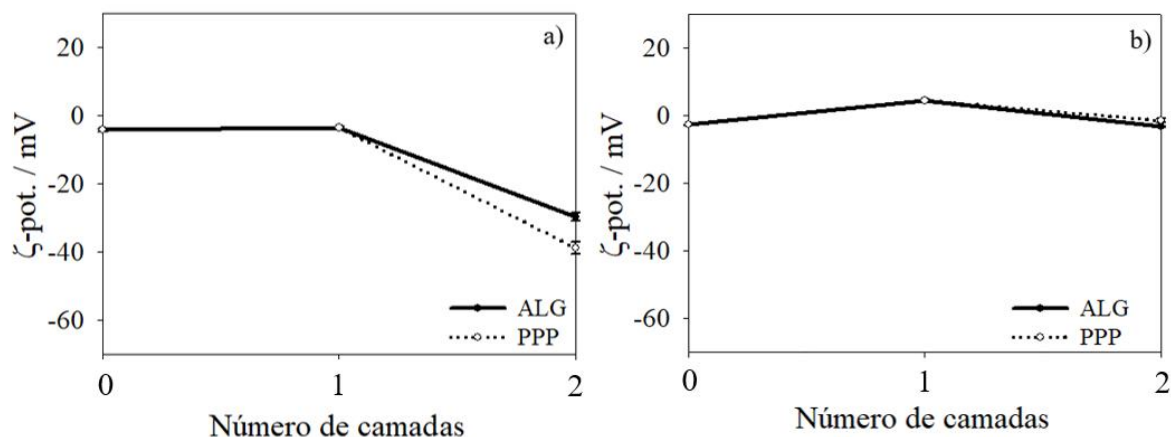


**Figura 14.** Resultados do potencial- $\zeta$  relativos ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* WCFS1, sem FOS (a); e na presença de FOS (b). Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).



**Figura 15.** Resultados do potencial- $\zeta$  relativos ao Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1, sem FOS (a); e na presença de FOS (b). Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).





**Figura 16.** Resultados do potencial- $\zeta$  relativos ao Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1, sem FOS (a); e na presença de FOS (b). Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

Os valores do potencial- $\zeta$  referentes à adsorção da primeira camada com CHI, nas bactérias sem a presença de FOS (a), não apresentaram alterações significativas na carga superficial (de  $-4,05 \pm 0,55$  para  $-2,60 \pm 1,49$  mV, de  $-4,04 \pm 0,65$  para  $-4,59 \pm 1,13$  mV e de  $-4,15 \pm 0,43$  para  $-3,46 \pm 0,22$  mV, Figura 13(a), Figura 14(a) e Figura 15(a), respetivamente), embora exista um ligeiro aumento dos valores do potencial- $\zeta$ . Resultados semelhantes foram relatados na literatura, sendo justificados pela proximidade do valor do pH da solução a que decorre o processo de encapsulação – pH 6 – e o pKa do CHI, que é aproximadamente 6,5. Deste modo, como os valores são bastante próximos, uma fração significativa dos grupos amina deste polímero encontra-se não protonada, levando a uma baixa densidade de cargas positivas nas cadeias do polímero (Jonas et al., 2018; Priya et al., 2011). Assim, o CHI terá cargas positivas suficientes para interagir com as cargas negativas da membrana da bactéria e ficar imobilizado, mas não suficientes para reverter a carga superficial das partículas LP-CHI.

Como consequência da incompleta compensação de cargas, após a adsorção de CHI, poderá haver uma forte agregação por parte das bactérias revestidas, durante o processo de centrifugação. Embora não seja sempre reconhecida, a agregação é um dos maiores problemas da técnica de LbL em células vivas (Jonas et al., 2018).

Com a adsorção da segunda camada, tanto de ALG como de PPP (sem adição de FOS (a)) os valores do potencial- $\zeta$  tornam-se significativamente mais negativos (de  $-2,60 \pm 1,49$  para  $-28,63 \pm 2,21$  mV e  $-2,60 \pm 1,49$  para  $-33,94 \pm 5,72$  mV), dados relativos ao Ensaio 3 (Figura 13(a)), ALG como segunda camada e PPP como segunda camada, respetivamente), refletindo a grande densidade de carga negativa exibida por estes polímeros a pH 6, visto que, a este

valor de pH a totalidade dos grupos carboxílicos (em ambos os polímeros) estão desprotonados.

Por outro lado, quando as bactérias foram ressuspensas na solução de FOS (b), verificaram-se valores do potencial- $\zeta$  bastante mais positivos para as bactérias revestidas com a primeira camada de quitosano (LP-CHI) em relação aos ensaios sem a presença de FOS (a), observando-se um aumento significativo do potencial- $\zeta$  entre a bactéria (LP) e a bactéria revestida com a primeira camada (LP-CHI) (de  $-5,82 \pm 1,98$  para  $16,19 \pm 0,68$  mV, de  $-2,98 \pm 0,23$  para  $23,87 \pm 0,61$  mV, Figura 13(b) e Figura 14(b), respetivamente).

Estes resultados podem ser justificados pelo pH da solução de FOS utilizada. Tal como as outras soluções, aquando da sua preparação o pH da solução de FOS foi ajustado para 6, antes da esterilização. No entanto, e após a verificação destes resultados, resolveu medir-se novamente o pH da solução de FOS utilizado, tendo-se constatado que este apresentava um valor de 4,6 (ao contrário das soluções poliméricas, que conservaram valores de pH de aproximadamente 6). Esta constatação pode significar que o FOS pode ter sofrido algum tipo de degradação durante o processo de esterilização por autoclavagem, e esta questão será discutida mais à frente. Por agora, o facto da solução de FOS apresentar um pH ácido, quando as bactérias LP-CHI são ressuspensas nesta solução, os grupos amina nas cadeias do quitosano não envolvidos em interações eletrostáticas com a superfície das bactérias, que estavam desprotonados, passam a estar protonados, aumentando assim a densidade de carga positiva à superfície. Por outro lado, ao ressuspender as bactérias revestidas com a segunda camada, ALG ou PPP, na solução de FOS a pH 4,6, podem ocorrer duas situações que contribuem para os valores do potencial- $\zeta$  menos negativos ou positivos observados (Figura 13(b), Figura 14(b) e Figura 15(b)) em relação aos valores do potencial- $\zeta$  sem adição de FOS.

Primeiramente, a pH baixo, uma fração dos grupos carboxílicos de ambos os polieletrólitos pode passar a estar protonada, uma vez que os valores das suas constantes de dissociação ácidas (pKa do ALG varia entre 3,0 e 3,5 e do PPP é aproximadamente 4,95) estão mais perto do valor do pH da solução (Lee & Mooney, 2012; Choo et al., 2011). Adicionalmente, os grupos carboxílicos que se mantêm desprotonados podem envolver-se em interações eletrostáticas com os grupos amina do CHI, que, entretanto, passaram a estar protonados, diminuindo também desta forma o número de grupos carboxílicos desprotonados livres e conseqüentemente contribuem para o aumento do potencial- $\zeta$ .

Porém, na maior parte dos casos, os resultados apresentam alternância das cargas superficiais, o que se traduz num padrão em zig-zag, característico da técnica LbL, permitindo concluir que a deposição decorreu como o pretendido.

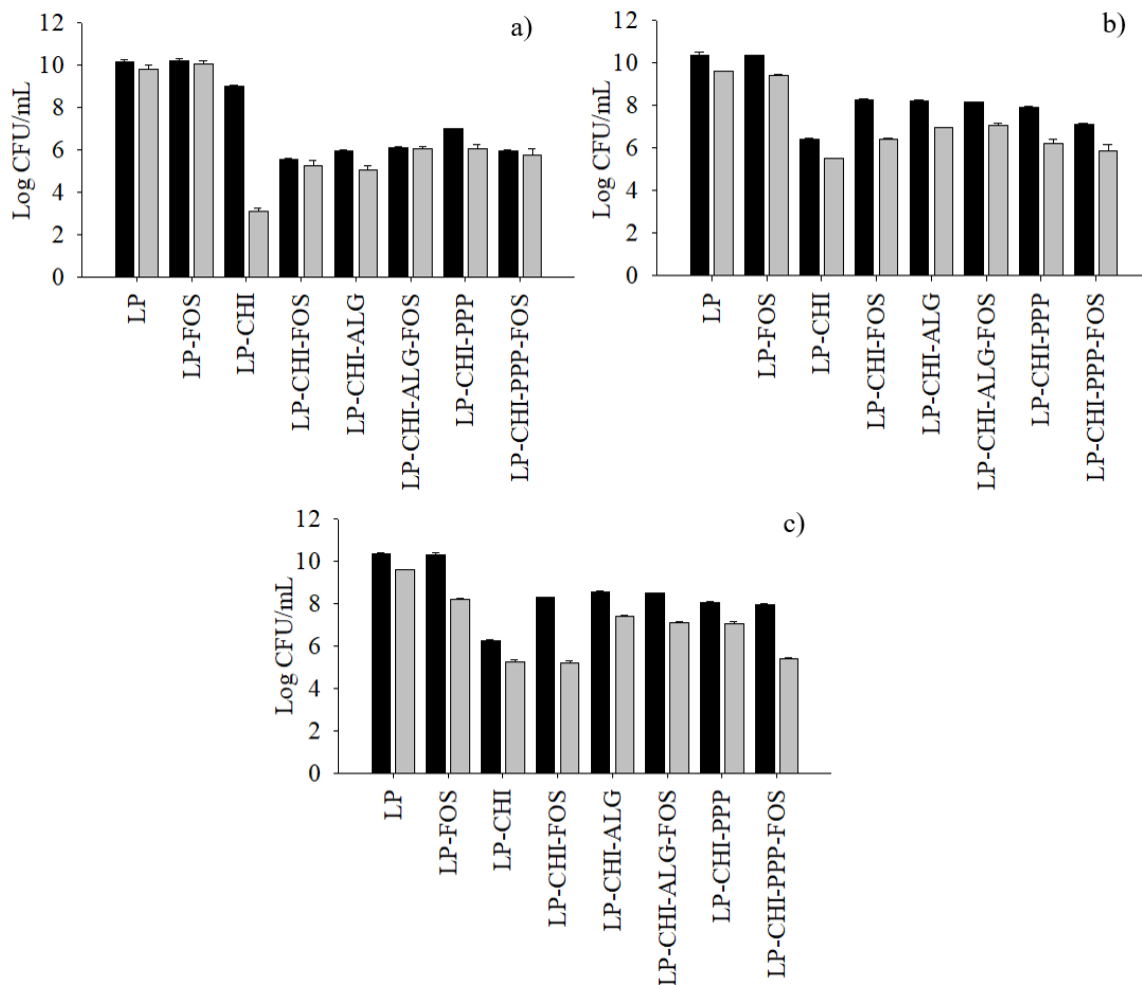
## **2. Avaliação da Viabilidade Bacteriana**

De modo a testar a eficácia da encapsulação na proteção das bactérias, procedeu-se à determinação da viabilidade celular pelo método das placas, após a liofilização (secção 2.1), ao longo do tempo de armazenamento (secção 2.2) e após a exposição aos meios gastrointestinais simulados (secção 2.3). Este método avalia, a capacidade de crescimento e proliferação das bactérias probióticas encapsuladas e não encapsuladas, determinando o número de células viáveis por unidade de volume.

Idealmente, para tirar as devidas conclusões com mais significado estatístico, durante o processo de incubação em placas de agar, das bactérias encapsuladas e não encapsuladas, devem ser garantidas as mesmas condições. Todos os dados representados em tabelas e os ensaios preliminares, 1 e 2 encontram-se em anexo (Anexo B).

### **2.1. Viabilidade após Encapsulação e após Liofilização**

Nas Figuras 16 e 17 estão representados os dados relativos à viabilidade antes e após o processo de liofilização, para as células encapsuladas e não encapsuladas, na presença ou não de FOS. Para ajudar a interpretar os resultados em termos quantitativos, os resultados da Figura 16 são representados de uma forma alternativa na Figura 17, onde a viabilidade celular de cada condição (depois da liofilização) se encontra normalizada pela respetiva viabilidade antes da liofilização. Como já se referiu, foram realizados 3 ensaios, tendo como objetivo, assegurar a consistência dos resultados apresentados.



**Figura 17.** Viabilidade bacteriana antes e após o processo de encapsulação e liofilização relativa ao Ensaio 3 (a), Ensaio 4 (b) e Ensaio 5 (c): *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS. As barras pretas indicam a viabilidade antes da liofilização e as barras cinzentas correspondem à viabilidade após liofilização (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

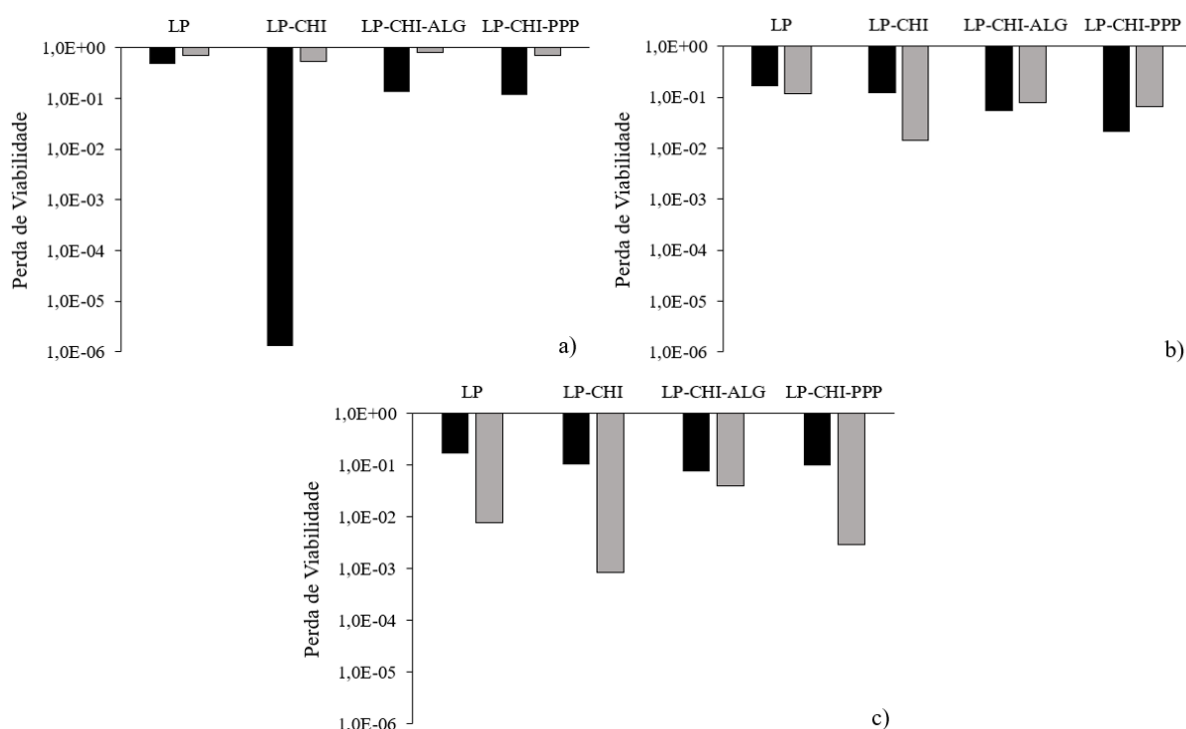
Os resultados apresentados na Figura 16, indicam que a viabilidade bacteriana decresceu após a adição de uma e duas camadas de revestimento em relação às bactérias não encapsuladas (primeiras quatro colunas). Esta redução no número de células viáveis poderá ser justificada, em parte, pela perda de biomassa durante os processos de lavagem e centrifugação inerentes ao processo de encapsulação, e pela agregação celular durante a adsorção das camadas de revestimento, o que dificulta o crescimento e proliferação das bactérias durante o seu crescimento nas placas (Jonas et al., 2018; Yucel Falco et al., 2017).

Na generalidade, as bactérias encapsuladas com duas camadas apresentam uma menor perda de viabilidade depois de liofilizadas em relação às encapsuladas apenas com uma camada de revestimento. Isto pode ser explicado pelo facto de o polícatião CHI, adsorvido como primeira camada, apresentar, atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de um

amplo espectro de bactérias (Fouda et al., 2009). Desta forma, as forças eletrostáticas entre os grupos amina protonados e a superfície negativa das bactérias conferem uma interação desestruturante na membrana celular destas (Jonas et al., 2018). Ao adicionar a segunda camada do polianião ALG ou PPP, os grupos amina protonados do CHI vão interagir com os grupos carboxílicos desprotonados, referentes à segunda camada, conferindo um equilíbrio entre cargas, e consequentemente, uma maior estabilidade, proteção e menor perda de viabilidade nas bactérias. A utilização de um biopolímero natural, ALG, ou de um biopolímero sintético, PPP, como segunda camada parece não influenciar os resultados de viabilidade, podendo concluir-se que é indiferente a utilização de um ou de outro.

Finalmente, comparando a viabilidade das células encapsuladas com as não encapsuladas, antes e após liofilização, verifica-se, de uma forma geral, que a diminuição das células não encapsuladas é idêntica ou mesmo menor que a das células encapsuladas. Isto pode ser explicado pelo facto das bactérias da estirpe *Lactobacillus plantarum* WCFS1 serem bastante resistentes aos processos de desidratação (Muhammad et al., 2017).

O efeito do FOS na preservação das bactérias encapsuladas e não encapsuladas, após liofilização, pode ser observado na Figura 17, para o Ensaio 3 (a), Ensaio 4 (b) e Ensaio 5 (c).

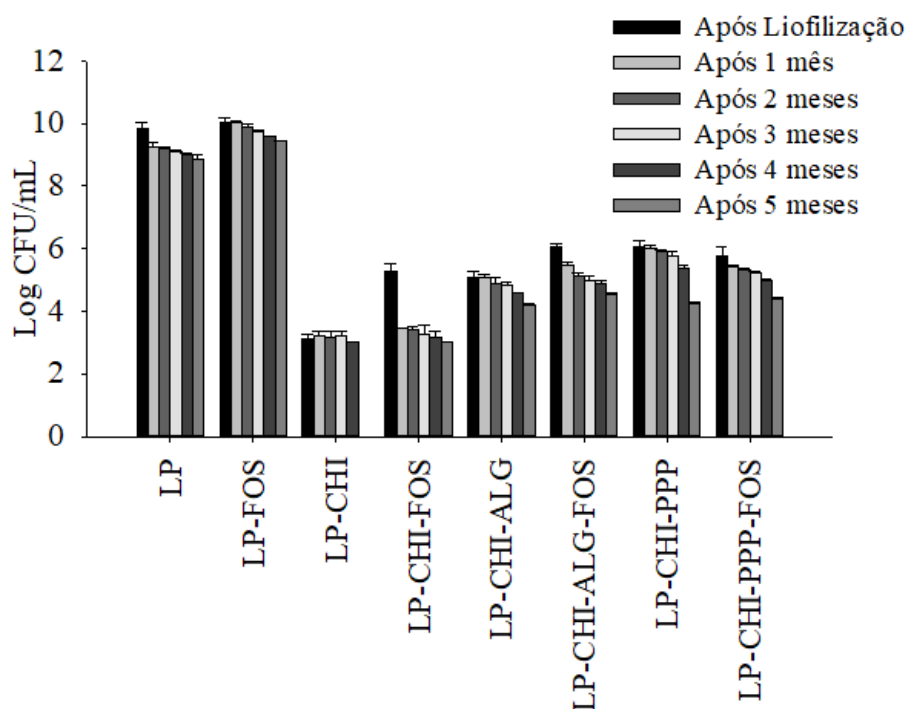


**Figura 18.** Perda de viabilidade bacteriana após liofilização relativa ao Ensaio 3 (a), Ensaio 4 (b) e Ensaio 5 (c): *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS. As barras pretas indicam a ausência de FOS e as barras cinzentas indicam a presença de FOS. Perda de viabilidade:  $N_{dl}/N_{al}$  – número de células viáveis depois da liofilização/ número de células viáveis antes da liofilização.

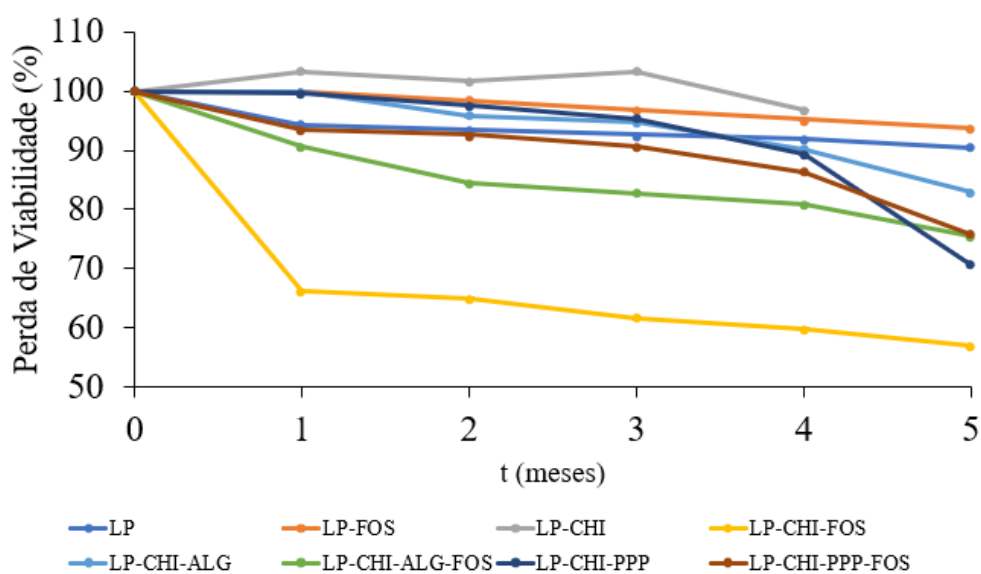
Os resultados obtidos mostram que, para as bactérias encapsuladas com duas camadas, após liofilização, a perda de viabilidade foi maior para as bactérias sem FOS, nos Ensaio 3 e 4, Figura 17(a) e Figura 17(b), respectivamente. As bactérias revestidas com duas camadas de polieletrólitos, revelam uma maior tendência de proteção da viabilidade celular no processo de desidratação, em relação às encapsuladas com apenas uma camada. No entanto, os resultados do Ensaio 5 (Figura 17(c)) mostram o contrário, a perda de viabilidade foi maior nas bactérias com FOS. Esta variação poderá ser provocada pelas condições de liofilização, mais precisamente na última etapa (desidratação secundária), onde se remove os resquícios de água não congelada por dessorção. Para contrariar este efeito, a temperatura desta etapa deverá ser controlada, de maneira que a temperatura em todos os andares na câmara de liofilização seja a mesma. A realização de mais ensaios para confirmar os resultados obtidos, também é necessária.

### **2.2. Viabilidade após Armazenamento a longo prazo**

A Figura 18 mostra os resultados de viabilidade, após liofilização, das bactérias encapsuladas e não encapsuladas, com e sem FOS, ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C. De forma a tornar mais clara a visualização dos resultados, apresenta-se ainda na Figura 19, a percentagem de perda de viabilidade ao longo do tempo.



**Figura 19.** Viabilidade bacteriana relativa ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1 a 5 meses (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).



**Figura 20.** Percentagem de perda de viabilidade relativa ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1 a 5 meses (média  $\pm$  desvio padrão, n=3). Perda de viabilidade: número de bactérias no tempo t/número de bactérias no tempo 0.

A percentagem de perda de viabilidade após 5 meses das bactérias não encapsuladas, sem e com a presença de FOS, foi cerca de 10% (LP) e 6% (LP-FOS), enquanto nas bactérias

encapsuladas com uma camada de CHI, foi de aproximadamente, 43 % (LP-CHI-FOS). Nas bactérias LP-CHI, sem a presença de FOS não foi possível determinar a perda de viabilidade para a quinto mês, mas a perda de viabilidade ao quarto mês era de 4 %. Já nas bactérias encapsuladas com duas camadas de revestimento, ALG ou PPP, foi cerca de 17 % (LP-CHI-ALG), 30 % (LP-CHI-PPP), 24 % (LP-CHI-ALG-FOS) e 24 % (LP-CHI-PPP-FOS).

Assim, pode concluir-se que, ao contrário do que era esperado, as bactérias não encapsuladas, com e sem FOS, apresentam menor perda de viabilidade do que as bactérias encapsuladas. Assim, o encapsulamento LbL apresenta ter um efeito negativo da preservação da viabilidade das bactérias ao longo do tempo de armazenamento, sobretudo quando o encapsulamento consiste apenas numa camada de CHI. Verifica-se também, que a presença de FOS não altera significativamente os valores de viabilidade ao longo do tempo. De qualquer forma, em todas as condições, as bactérias mantêm uma viabilidade superior a 50% após 5 meses de armazenamento, o que demonstra a grande robustez desta estirpe.

### 2.3. Viabilidade após exposição aos meios gastrointestinais simulados

A avaliação da viabilidade nas bactérias probióticas, não encapsuladas e encapsuladas com duas camadas de revestimento, antes e após liofilização, foi realizada com base na exposição ao fluido gástrico simulado (FGS) e ao fluido intestinal simulado (FIS), como uma aproximação às condições do estômago e do intestino, respetivamente. A escolha das bactérias encapsuladas com duas camadas de revestimento foi baseada nos resultados de viabilidade anteriores, devido a estas apresentarem valores bastante mais promissores, em relação às bactérias encapsuladas com apenas uma camada de revestimento.

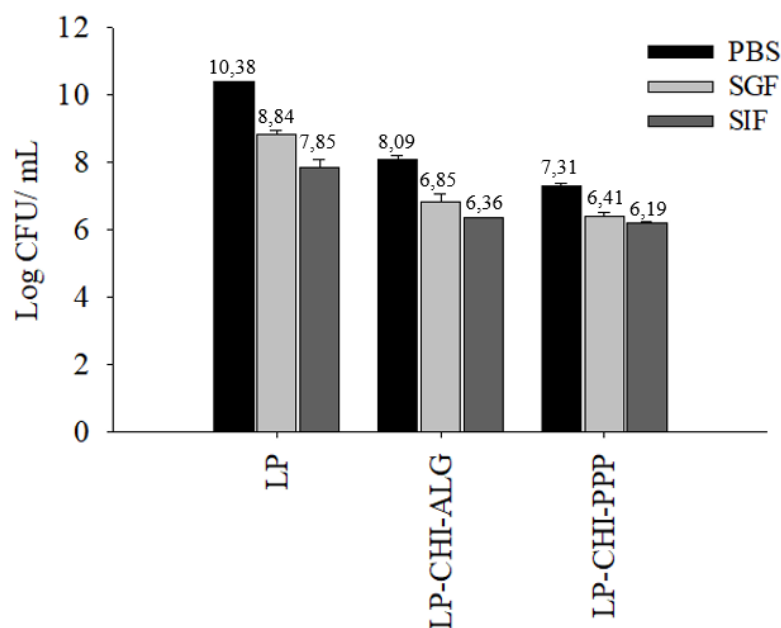
Foram realizados 4 ensaios de meios simulados, de modo a assegurar a consistência dos dados apresentados cujas condições são resumidas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resumo das condições dos Ensaios EMS1, EMS2, EMS3 e EMS4 expostos aos meios gastrointestinais simulados. EMS: Exposição ao Meio Simulado.

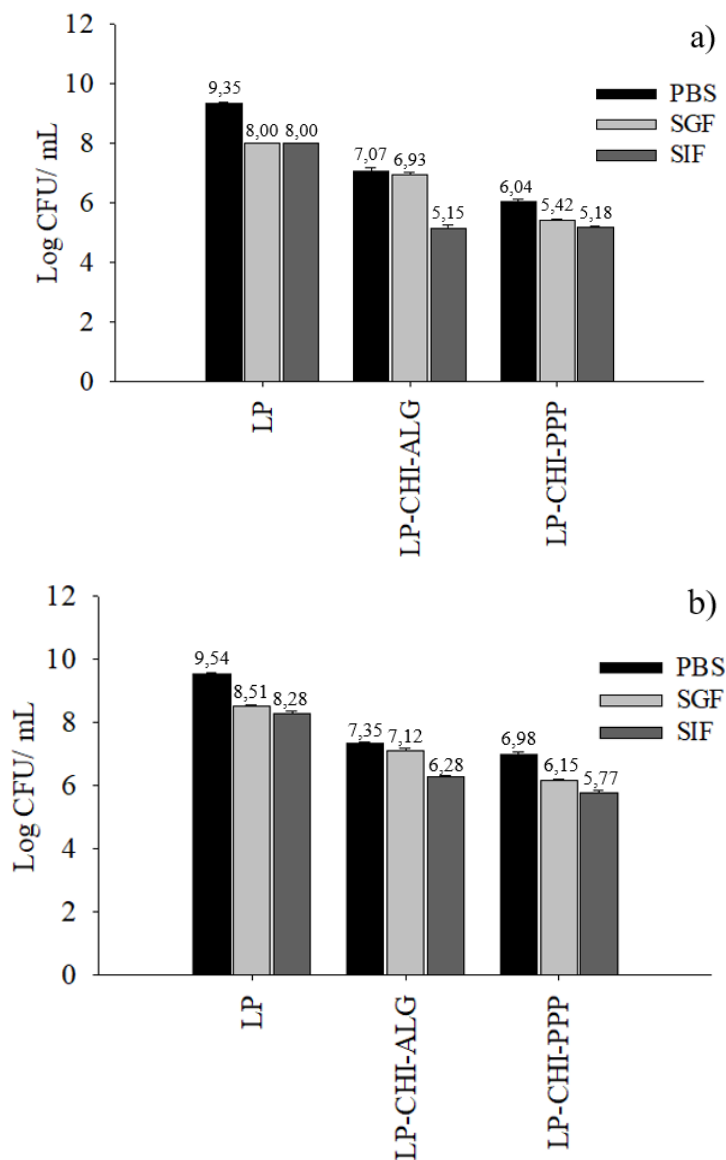
Ensaio	Antes da Liofilização	Após Liofilização	Tempo de Exposição
<b>EMS1</b>	Processo em paralelo	-	2 h
<b>EMS2</b>	Processo em série	-	2 h 30 min
<b>EMS3</b>	-	Processo em série	2 h 30 min
<b>EMS4</b>	-	Processo em série	2 h 30 min



Nas Figuras 20 e 21 apresentam-se os resultados obtidos para a exposição. No Anexo B, Figura B.32 e Tabela B.23, encontram-se os dados relativos à viabilidade bacteriana do Ensaio EMS1, antes da liofilização e após 2 h de exposição aos meios gastrointestinais simulados, processo realizado em paralelo, de modo a ajustar alguns parâmetros para os ensaios seguintes.



**Figura 21.** Viabilidade bacteriana antes da liofilização e após exposição ao meio de controlo (PBS) e aos meios gástrico (FGS) e intestinal (FIS) simulados, relativa ao Ensaio EMS2 de encapsulação: *Lactobacillus plantarum* WCFS1, antes da liofilização, durante 2 h e 30 min de exposição, em série (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).



**Figura 22.** Viabilidade bacteriana após liofilização e após exposição ao meio de controlo (PBS) e aos meios gástrico (FGS) e intestinal (FIS) simulados, relativa aos Ensaio EMS3 (a) e EMS4 (b) de encapsulação: *Lactobacillus plantarum* WCFS1, após liofilização durante 2 h e 30 min de exposição, em série (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

Os valores apresentados na Figura 20 demonstram que, de um modo geral, as bactérias não encapsuladas e encapsuladas, antes da liofilização, apresentam uma redução de mais de 1 Log CFU/mL de perda de viabilidade do meio de controlo para o meio gástrico, valor superior ao registado pelas bactérias não encapsuladas e encapsuladas após liofilização, Figura 21(a) e Figura 21(b). Apesar do processo de liofilização ter por objetivo preservar as bactérias durante o processo de armazenamento a longo prazo, é possível verificar que o mesmo acontece durante a exposição aos fluidos gastrointestinais, apresentando uma menor perda de

viabilidade em comparação às bactérias não liofilizadas, como se pode verificar pela análise das Figuras 20 e 21. As bactérias não encapsuladas, antes da liofilização, apresentam também uma redução de aproximadamente 1 Log CFU/mL de perda de viabilidade do meio gástrico para o meio intestinal, em relação às bactérias encapsuladas, como se pode verificar pela Figura 20. Em relação às bactérias encapsuladas com a segunda camada de PPP, estas obtiveram uma menor perda de viabilidade em comparação com as bactérias revestidas com a segunda camada de ALG.

Pela análise da Figura 21(a) e Figura 21(b), observa-se que as bactérias não encapsuladas após liofilização, apresentam sempre uma redução de mais de 1 Log CFU/mL, ao passo que, as bactérias encapsuladas apresentam valores inferiores a 1 Log CFU/mL do meio de controle para o meio gástrico. As bactérias revestidas com segunda camada de PPP também apresentam melhores resultados de viabilidade em relação às bactérias com ALG como segunda camada do meio gástrico para o meio intestinal.

Conclui-se assim, que as bactérias não encapsuladas sofreram uma maior redução de perda de viabilidade em comparação com as bactérias encapsuladas e, em geral, as bactérias encapsuladas com segunda camada de PPP, em comparação com as revestidas com segunda camada de ALG, conseguiram resistir melhor às condições gastrointestinais simuladas.

Todos os valores obtidos podem ser observados nas Tabelas B.24 a B.26, presentes no Anexo B.

### **3. Avaliação do Crescimento Bacteriano**

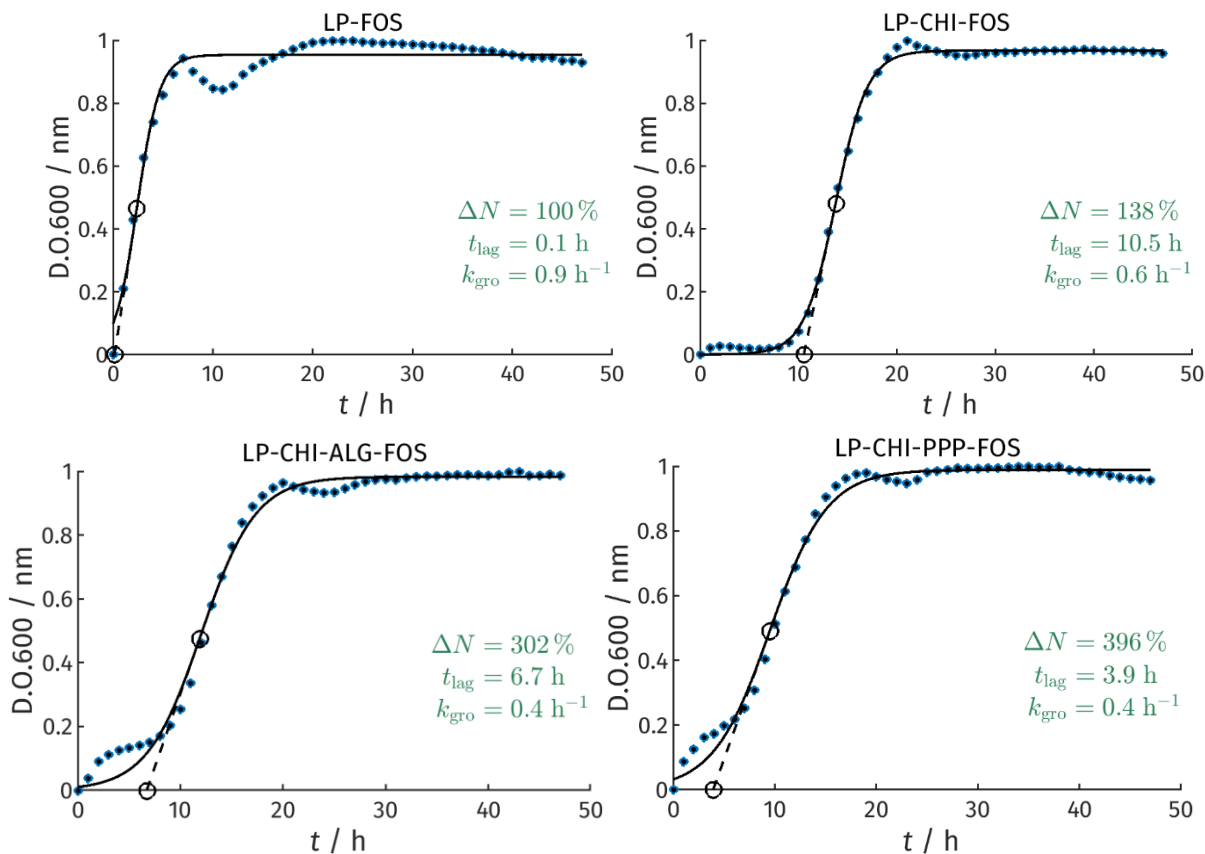
Para analisar o efeito da deposição das várias camadas de revestimento no crescimento bacteriano, as bactérias não liofilizadas e liofilizadas, foram incubadas em MRS a 37 °C e o seu crescimento seguido por espectrofotometria de densidade ótica (D.O.), durante 48 h.

Como já foi referido anteriormente, os Ensaio 1 e 2 foram realizados de modo a ajustar as condições de operação na técnica LbL e por isso, não são apresentados em Anexo, em termos gerais, verificam-se as mesmas tendências observadas nos restantes ensaios.

Na Figura 22, representam-se as curvas de crescimento obtidas para o Ensaio 3, com presença de FOS, antes da liofilização. Estas curvas de crescimento servem, de uma forma geral, como forma representativa para a interpretação dos dados obtidos, visto que, todos os ensaios foram realizados sob as mesmas condições. Os restantes gráficos que dizem respeito ao Ensaio 3, encontram-se presentes no Anexo C na Figura C.33 (sem a presença de FOS e antes da liofilização), Figura C.34 (sem a presença de FOS e após liofilização) e Figura C35

(com a presença de FOS e após liofilização), bem como os Ensaios 4 e 5, realizados com o objetivo de aferir a consistência dos resultados. Todos os gráficos caracterizam o padrão de crescimento das bactérias (Quintana et al., 2017).

Nas Tabelas 2 e 3 estão resumidos os valores dos parâmetros cinéticos associados ao Ensaio 3. No Anexo C estão representadas as Tabelas C.27 a C.30 referentes aos Ensaios 4 e 5.



**Figura 23.** Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 3: *L. plantarum* WCFS1 antes da encapsulação (LP-FOS), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI-FOS), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG-FOS) e PPP (LP-CHI-PPP-FOS) com presença de FOS, ou seja, antes da liofilização.

**Tabela 2.** Parâmetros da cinética de crescimento bacteriano relativos ao Ensaio 3: *L. plantarum* WCFS1 sem e com a presença de FOS, após encapsulação, ou seja, antes da liofilização.

<i>L. plantarum</i> WCFS1 antes da liofilização	$t_{lag}$ (h)	k (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	ΔN (%)
<b>LP</b>	0,00	1,10	0,9199	114
<b>LP-FOS</b>	0,01	0,89	0,9517	100
<b>LP-CHI</b>	16,60	0,45	0,9932	270
<b>LP-CHI-FOS</b>	10,50	0,62	0,9988	138
<b>LP-CHI-ALG</b>	8,50	0,55	0,9981	194
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	6,70	0,38	0,9920	302
<b>LP-CHI-PPP</b>	4,20	0,45	0,9964	287
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	3,90	0,36	0,9926	396

**Tabela 3.** Parâmetros da cinética de crescimento bacteriano relativos ao Ensaio 3: *L. plantarum* WCFS1 sem e com a presença de FOS, após liofilização.

<i>L. plantarum</i> WCFS1 após liofilização	$t_{lag}$ (h)	k (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	ΔN (%)
<b>LP</b>	0,50	0,66	0,9681	96
<b>LP-FOS</b>	0,00	0,49	0,9707	80
<b>LP-CHI</b>	21,30	0,45	0,9858	241
<b>LP-CHI-FOS</b>	20,60	0,51	0,9974	307
<b>LP-CHI-ALG</b>	4,80	0,24	0,9767	444
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	8,40	0,33	0,9817	240
<b>LP-CHI-PPP</b>	6,40	0,39	0,9925	344
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	2,40	0,24	0,9669	448

Ao observar os gráficos presentes na Figura 22 e as Tabelas 2 e 3, é possível verificar que, para as bactérias encapsuladas, existe, nos tempos iniciais, um intervalo de tempo sem crescimento celular (ou com um crescimento não exponencial), ao contrário do que se verifica para as bactérias não encapsuladas. Este atraso, designado como o tempo de latência ou *lag time*, é definido como o tempo necessário para que os microrganismos se adaptem ao meio. Como o material encapsulante protege as bactérias do meio exterior, oferecendo uma barreira à difusão de nutrientes presentes no meio de cultura, é expectável que o tempo de latência seja significativo para as bactérias encapsuladas, e que este aumente com o aumento do número de camadas (Anselmo et al., 2016; Quintana et al., 2017). Isto verifica-se com as bactérias encapsuladas relativamente às não encapsuladas. No entanto, as bactérias encapsuladas com apenas uma camada de CHI (LP-CHI-FOS), apresentam um tempo de atraso superior ao das bactérias encapsuladas com duas camadas (LP-CHI-ALG-FOS e LP-CHI-PPP-FOS). Isto pode dever-se às propriedades citotóxicas do CHI, que inibem o crescimento bacteriano (Jonas et al., 2018). A adsorção de uma segunda camada polianiónica, contribui para uma diminuição do tempo de adaptação das bactérias ao meio, proporcionando uma maior

interação entre os grupos amina protonados do CHI com os grupos carboxílicos desprotonados, referentes ao ALG ou ao PPP. Resultados semelhantes foram relatados por Jonas et al. (2018). Pode ainda observar-se pela Figura 22 e pelas Tabelas 2 e 3, que a escolha do biopolímero para segunda camada de revestimento, pode influenciar o tempo de adaptação ao meio por partes das bactérias. O PPP revelou ser uma melhor opção, em relação ao ALG, visto apresentar um menor atraso no crescimento bacteriano.

Em todos os casos, verifica-se, que as bactérias não encapsuladas apresentaram menores variações percentuais do número de bactérias,  $\Delta N$ , em relação às encapsuladas. Estes resultados indicam que o processo de encapsulação foi bem-sucedido, sugerindo que as bactérias apresentam uma atividade metabólica normal, pois, apesar do atraso verificado no crescimento bacteriano, estas exibem uma variação percentual de bactérias superior às não encapsuladas.

De um modo geral, os valores apresentados nas tabelas acima referidas, traduzem tempos de atraso mais elevados nas bactérias liofilizadas em comparação com as bactérias após encapsulação. O maior aumento detectado é o das bactérias com apenas uma camada de revestimento. Em relação à variação percentual do número de bactérias,  $\Delta N$ , é visível um decréscimo desta variação nas bactérias não encapsuladas após liofilização, em relação às não encapsuladas antes da liofilização. Quanto às restantes bactérias encapsuladas, não é possível fazer uma análise completa visto haver uma variabilidade nos dados. O mesmo se pode dizer dos valores obtidos da taxa de crescimento,  $k$ .

## Capítulo IV – Apreciações Finais

### 1. Conclusões

Este projeto teve como principal objetivo desenvolver um sistema de encapsulação de probióticos, constituídos por biopolímeros naturais, por um copolímero sintético e ainda pela incorporação de um componente com características prebióticas, como é o caso do FOS, com o objetivo final de obter um sistema com a capacidade de preservar a viabilidade das bactérias probióticas ao longo do seu processamento, armazenamento a longo prazo e passagem pelo trato gastrointestinal superior. O processo de encapsulação, através da técnica *Layer-by-Layer*, permitiu a deposição alternada de polieletrólitos na estirpe de bactérias *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Este processo, foi avaliado e caracterizado por diferentes métodos, nomeadamente, a determinação do potencial- $\zeta$ , viabilidade bacteriana e curvas de crescimento.

As bactérias não encapsuladas exibiram valores de viabilidade superiores ou idênticos às bactérias encapsuladas após liofilização, longos períodos de tempo armazenadas, e exposição aos meios gastrointestinais simulados, o que demonstra a resistência desta estirpe a condições adversas.

Quando comparadas as bactérias encapsuladas, pode concluir-se que a encapsulação com apenas uma camada, não apresenta resultados satisfatórios. No entanto, obtiveram-se melhores resultados com duas camadas de revestimento, sugerindo que este possa ser um sistema promissor de proteção de bactérias probióticas. Comparando, em particular, os biopolímeros utilizados como segunda camada, pode concluir-se que o sistema de encapsulação com o complexo biopolímero natural-copolímero sintético (LP-CHI-PPP) se destacou em relação ao complexo de biopolímeros naturais (LP-CHI-ALG). Não foi possível retirar conclusões no que diz respeito ao efeito do FOS, após o processo de liofilização, pois os resultados obtidos não foram consistentes.

Em suma, para esta estirpe em particular, a encapsulação parece não ser necessária, porém, a utilização deste processo para outras espécies ou estirpes mais sensíveis poderá ser um sistema de proteção bastante promissor.

## 2. Trabalhos Futuros

De forma a complementar este estudo, deveriam ser realizados os seguintes estudos e otimizações:

1. Esterilizar a solução de FOS por filtração, em vez de autoclavagem, de forma a garantir a não degradação química dos FOS;
2. Otimizar e controlar mais estreitamente os parâmetros do processo de liofilização, de modo a assegurar que este seja exatamente igual para todos os ensaios;
3. Realizar este estudo com estirpes bacterianas mais sensíveis, para provar o efeito protetor deste tipo de encapsulação;
4. Visualizar as camadas depositadas através de microscopia eletrónica de varrimento, para demonstrar a deposição alternada dos polieletrólitos;
5. Substituir o CHI por outro polieletrólito, de modo a garantir o crescimento bacteriano.



## Referências Bibliográficas

- Aguilar, K. C., Tello, F., Bierhalz, A. C. K., Garnica Romo, M. G., Martínez Flores, H. E., & Grosso, C. R. F. (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>
- 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. W., & Hill, J. P. (2014). Layer-by-layer nanoarchitectonics: Invention, innovation, and evolution. *Chemistry Letters*, *43*(1), 36–68. <https://doi.org/10.1246/cl.130987>
- Barreiro-Iglesias, R., Bromberg, L., Temchenko, M., Hatton, T. A., Alvarez-Lorenzo, C., & Concheiro, A. (2005). Pluronic-g-poly(acrylic acid) copolymers as novel excipients for site specific, sustained release tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *26*(5), 374–385. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.07.014>
- Biriukov, D., Fibich, P., & Předota, M. (2020). Zeta Potential Determination from Molecular Simulations. *Journal of Physical Chemistry C*, *124*(5), 3159–3170.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b11371>
- Borges, J., & Mano, J. F. (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>
- Calinoiu, L. F., Ștefanescu, B. E., Pop, I. D., Muntean, L., & Vodnar, D. C. (2019). Chitosan coating applications in probiotic microencapsulation. *Coatings*, *9*(3), 1–21.  
<https://doi.org/10.3390/COATINGS9030194>
- Cano-Sarmiento, C., Téllez-Medina, D. I., Viveros-Contreras, R., Cornejo-Mazón, M., Figueroa-Hernández, C. Y., García-Armenta, E., Alamilla-Beltrán, L., García, H. S., &

- Gutiérrez-López, G. F. (2018). Zeta Potential of Food Matrices. *Food Engineering Reviews*, 10(3), 113–138. <https://doi.org/10.1007/s12393-018-9176-z>
- Chavarri, M., Maranon, I., & Carmen, M. (2012). Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. *Probiotics*. <https://doi.org/10.5772/50046>
- Chen, G., Li, C., & Chen, K. (2016). Fructooligosaccharides: A Review on Their Mechanisms of Action and Effects. *Studies in Natural Products Chemistry*, 48, 209–229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63602-7.00006-0>
- Chen, J., Wang, Q., Liu, C. M., & Gong, J. (2017). Issues deserve attention in encapsulating probiotics: Critical review of existing literature. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1228–1238. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.977991>
- Choo, E. S. G., Yu, B., & Xue, J. (2011). Synthesis of poly(acrylic acid) (PAA) modified Pluronic P123 copolymers for pH-stimulated release of Doxorubicin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 358(2), 462–470. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.03.047>
- 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>
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., Berenjian, A., & Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, 8(3), 1–27. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>
- De Villiers, M. M., Otto, D. P., Strydom, S. J., & Lvov, Y. M. (2011). Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(9), 701–715. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.05.011>
- FAO/WHO. (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. 1–11.
- 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., Adams, G., Fahy, G. M., & Wowk, B. (2014). *Chapter 24 - Freeze-Drying of*

- Lactic Acid Bacteria (Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols)*. 1257, 477–488.  
<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5>
- Fouda, M. M. G., Wittke, R., Knittel, D., & Schollmeyer, E. (2009). Use of chitosan/polyamine biopolymers based cotton as a model system to prepare antimicrobial wound dressing. *International Journal of Diabetes Mellitus*, 1(1), 61–64.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijdm.2009.05.005>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., 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 and Hepatology*, 14(8), 491–502.  
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- 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>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514.  
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hutkins, R. W., Krumbeck, J. A., Bindels, L. B., Cani, P. D., Fahey, G., Goh, Y. J., Hamaker, B., Martens, E. C., Mills, D. A., Rastal, R. A., Vaughan, E., & Sanders, M. E. (2016). Prebiotics: Why definitions matter. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.09.001>
- Islam, S., Bhuiyan, M. A. R., & Islam, M. N. (2017). Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *Journal of Polymers and the Environment*, 25(3), 854–866. <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0865-5>
- 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>
- Kalita, D., Saikia, S., Gautam, G., Mukhopadhyay, R., & Mahanta, C. L. (2018). Characteristics of synbiotic spray dried powder of litchi juice with *Lactobacillus plantarum* and different carrier materials. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.092>
- Kavitake, D., Kandasamy, S., Devi, P. B., & Shetty, P. H. (2018). Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods – A review. *Food Bioscience*, 21(November 2017), 34–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.11.003>
- 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, P., & Dubey, K. K. (2019). Current Perspectives and Future Strategies for Fructooligosaccharides Production Through Membrane Bioreactor. In *Applied Microbiology and Bioengineering*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815407-6.00010-1>
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 37(1), 106–126.  
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- Li, X. Y., Chen, X. G., Cha, D. S., Park, H. J., & Liu, C. S. (2009). Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginategelatin and its properties. *Journal of Microencapsulation*, 26(4), 315–324. <https://doi.org/10.1080/02652040802328685>
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 15–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>
- Martín, R., & Langella, P. (2019). Emerging health concepts in the probiotics field: Streamlining the definitions. *Frontiers in Microbiology*, 10.

- <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01047>
- Meng, X. C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Daly, C., & Ross, R. P. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, *106*(4 SPEC. ISS.), 1406–1416. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.076>
- Misra, S., Pandey, P., & Mishra, H. N. (2021). Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *109*(January), 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.039>
- Muhammad, Z., Ramzan, R., Huo, G. C., Tian, H., & Bian, X. (2017). Integration of polysaccharide-thermoprotectant formulations for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*, appraisal of survivability and physico-biochemical properties during storage of spray dried powders. *Food Hydrocolloids*, *66*, 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.040>
- 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>
- 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>
- Qiao, C., Ma, X., Wang, X., & Liu, L. (2021). Structure and properties of chitosan films: Effect of the type of solvent acid. *Lwt*, *135*(July 2020), 109984. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109984>
- 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>
- Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., & Girbés, T. (2014). Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, *05*(18), 1765–1775. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.518190>

- 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>
- 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>
- Roberfroid, M. (2018). Prebiotics : The Concept Revisited 1 , 2. *The Journal of Nutrition Effects of Probiotics and Prebiotics Prebiotics*, February.
- Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., & Sato, H. H. (2020). Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review. *Food Research International*, *137*(April). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>
- 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*(December), 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>
- 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. *Journal of Physiology & Biochemistry*, *65*(3), 315–328. <https://xpv.uab.cat/article/,DanaInfo=.aljpnDxvyqwqp3Mq32,SSL+10.1007%2FBF0318>

0584

- Saeed, A. H., & Salam, A. I. (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 2013, 73–87. [http://file.scirp.org/Html/10-2700895\\_40133](http://file.scirp.org/Html/10-2700895_40133)
- Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., Correa-Murrieta, M. A., Sánchez-Duarte, R. G., Cruz-Flores, P., & la Mora-López, G. S. (2018). Chitosan. In *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00064-3>
- Sauer, M., Russmayer, H., Grabherr, R., Peterbauer, C. K., & Marx, H. (2017). The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. *Trends in Biotechnology*, 35(8), 756–769. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.05.002>
- Savedboworn, W., Teawsomboonkit, K., Surichay, S., Riansa-ngawong, W., Rittisak, S., Charoen, R., & Phattayakorn, K. (2019). Impact of protectants on the storage stability of freeze-dried probiotic *Lactobacillus plantarum*. *Food Science and Biotechnology*, 28(3), 795–805. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0523-x>
- 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>
- Singh, S. P., Jadaun, J. S., Narnoliya, L. K., & Pandey, A. (2017). Prebiotic Oligosaccharides: Special Focus on Fructooligosaccharides, Its Biosynthesis and Bioactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(2), 613–635. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2605-2>
- Siragusa, S., De Angelis, M., Calasso, M., Campanella, D., Minervini, F., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2014). Fermentation and proteome profiles of *Lactobacillus plantarum* strains during growth under food-like conditions. *Journal of Proteomics*, 96, 366–380. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.11.003>
- Smith, M. C., Crist, R. M., Clogston, J. D., & McNeil, S. E. (2017). Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(24), 5779–5787. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0527-z>
- Todorov, S. D., & de Melo Franco, B. D. G. (2010). *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the species and application in food production. *Food Reviews*

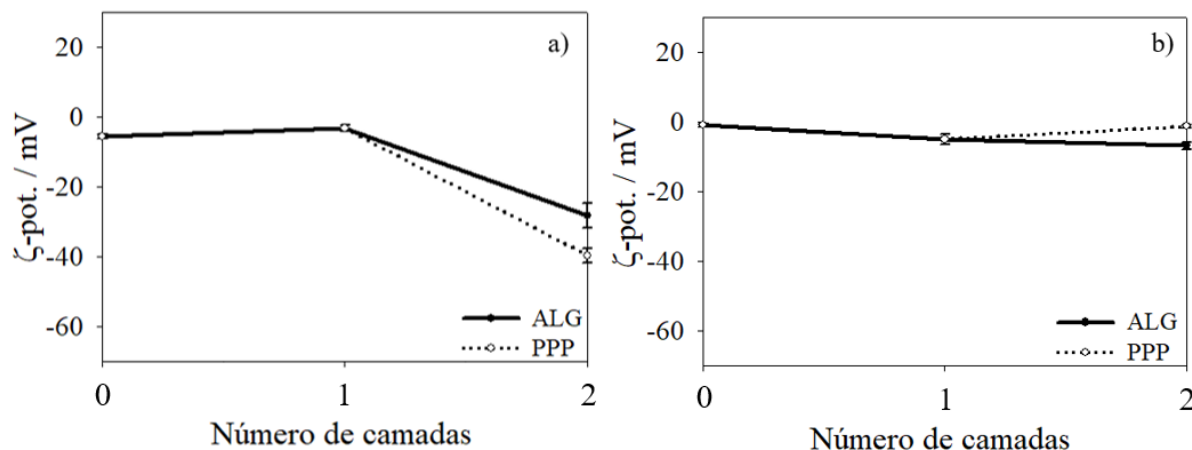
*International*, 26(3), 205–229. <https://doi.org/10.1080/87559129.2010.484113>

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>

Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>

Yucel Falco, C., Sotres, J., Rascón, A., Risbo, J., & Cárdenas, M. (2017). Design of a potentially prebiotic and responsive encapsulation material for probiotic bacteria based on chitosan and sulfated  $\beta$ -glucan. *Journal of Colloid and Interface Science*, 487, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.10.019>



Anexo A – Potencial- $\zeta$ 

**Figura A.24.** Resultados do potencial- $\zeta$  relativos ao Ensaio 2: *Lactobacillus plantarum* WCFS1, sem FOS (a); e na presença de FOS (b). Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

**Tabela A.4.** Valores do potencial- $\zeta$  relativos ao Ensaio 2: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

	0	1	2
<b>CHI</b>	$-5,62 \pm 0,57$	$-3,15 \pm 0,93$	NaN
<b>ALG</b>	$-5,62 \pm 0,57$	$-3,15 \pm 0,93$	$-28,10 \pm 3,58$
<b>PPP</b>	$-5,62 \pm 0,57$	$-3,15 \pm 0,93$	$-39,58 \pm 2,09$

**Tabela A.5.** Valores do potencial- $\zeta$  relativos ao Ensaio 2: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 na presença de FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

	0	1	2
<b>CHI</b>	$-0,92 \pm 0,33$	$-4,87 \pm 1,42$	NaN
<b>ALG</b>	$-0,92 \pm 0,33$	$-4,87 \pm 1,42$	$-6,83 \pm 0,90$
<b>PPP</b>	$-0,92 \pm 0,33$	$-4,87 \pm 1,42$	$-1,23 \pm 0,46$

**Tabela A.6.** Valores do potencial- $\zeta$  relativos ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

	0	1	2
<b>CHI</b>	-4,05 $\pm$ 0,55	-2,60 $\pm$ 1,49	NaN
<b>ALG</b>	-4,05 $\pm$ 0,55	-2,60 $\pm$ 1,49	-28,63 $\pm$ 2,21
<b>PPP</b>	-4,05 $\pm$ 0,55	-2,60 $\pm$ 1,49	-33,94 $\pm$ 5,72

**Tabela A.7.** Valores do potencial- $\zeta$  relativos ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 na presença de FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

	0	1	2
<b>CHI</b>	-5,82 $\pm$ 1,98	16,19 $\pm$ 0,68	NaN
<b>ALG</b>	-5,82 $\pm$ 1,98	16,19 $\pm$ 0,68	-6,37 $\pm$ 0,65
<b>PPP</b>	-5,82 $\pm$ 1,98	16,19 $\pm$ 0,68	0,72 $\pm$ 0,38

**Tabela A.8.** Valores do potencial- $\zeta$  relativos ao Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

	0	1	2
<b>CHI</b>	-4,04 $\pm$ 0,65	-4,59 $\pm$ 1,13	NaN
<b>ALG</b>	-4,04 $\pm$ 0,65	-4,59 $\pm$ 1,13	-28,14 $\pm$ 1,52
<b>PPP</b>	-4,04 $\pm$ 0,65	-4,59 $\pm$ 1,13	-53,49 $\pm$ 7,97

**Tabela A.9.** Valores do potencial- $\zeta$  relativos ao Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 na presença de FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

	0	1	2
<b>CHI</b>	-2,98 $\pm$ 0,23	23,87 $\pm$ 0,61	NaN
<b>ALG</b>	-2,98 $\pm$ 0,23	23,87 $\pm$ 0,61	-0,80 $\pm$ 0,21
<b>PPP</b>	-2,98 $\pm$ 0,23	23,87 $\pm$ 0,61	2,31 $\pm$ 0,33

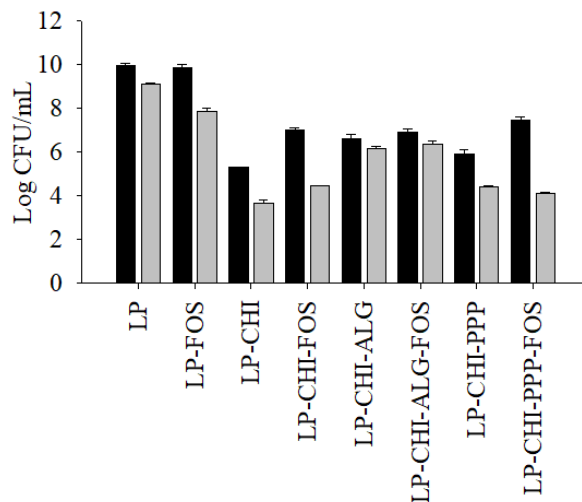
**Tabela A.10.** Valores do potencial- $\zeta$  relativos ao Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 sem FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

	0	1	2
<b>CHI</b>	-4,15 $\pm$ 0,43	-3,46 $\pm$ 0,22	NaN
<b>ALG</b>	-4,15 $\pm$ 0,43	-3,46 $\pm$ 0,22	-29,59 $\pm$ 1,24
<b>PPP</b>	-4,15 $\pm$ 0,43	-3,46 $\pm$ 0,22	-38,79 $\pm$ 1,77

**Tabela A.11.** Valores do potencial- $\zeta$  relativos ao Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 na presença de FOS. Número de camadas: 0 – LP; 1 – LP-CHI; 2 – LP-CHI-ALG ou LP-CHI-PPP (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

	0	1	2
<b>CHI</b>	-2,61 $\pm$ 0,14	4,52 $\pm$ 0,15	NaN
<b>ALG</b>	-2,61 $\pm$ 0,14	4,52 $\pm$ 0,15	-3,24 $\pm$ 0,15
<b>PPP</b>	-2,61 $\pm$ 0,14	4,52 $\pm$ 0,15	-1,39 $\pm$ 0,62

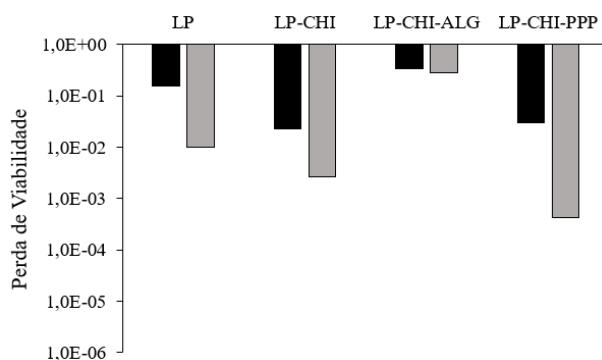
## Anexo B – Viabilidade



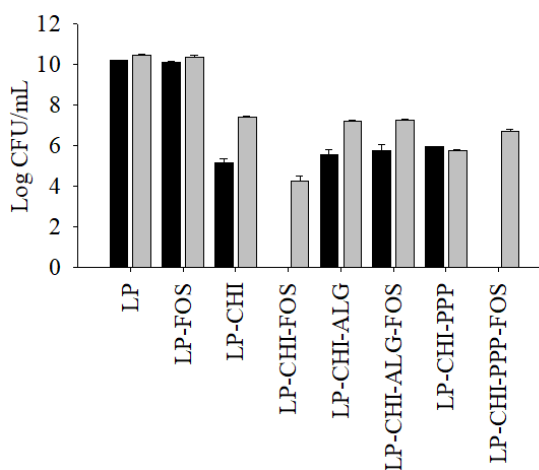
**Figura B.25.** Viabilidade bacteriana antes e após o processo de encapsulação e liofilização relativa ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS. As barras pretas indicam a viabilidade antes da liofilização e as barras cinzentas correspondem à viabilidade após a liofilização (média ± desvio padrão, n=3).

**Tabela B.12.** Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após encapsulação e liofilização (média ± desvio padrão, n=3).

	Log CFU/mL	
	Após Encapsulação	Após Liofilização
<b>LP</b>	9,93 ± 0,10	9,12 ± 0,04
<b>LP-FOS</b>	9,87 ± 0,15	7,87 ± 0,15
<b>LP-CHI</b>	5,30 ± 0,00	3,65 ± 0,16
<b>LP-CHI-FOS</b>	7,01 ± 0,09	4,44 ± 0,02
<b>LP-CHI-ALG</b>	6,60 ± 0,21	6,16 ± 0,09
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	6,91 ± 0,13	6,35 ± 0,18
<b>LP-CHI-PPP</b>	5,93 ± 0,20	4,43 ± 0,03
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	7,45 ± 0,13	4,09 ± 0,08



**Figura B.26.** Perda de viabilidade bacteriana após a liofilização relativa ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS. As barras pretas indicam a ausência de FOS e as barras cinzentas indicam a presença de FOS.



**Figura B.27.** Viabilidade bacteriana antes e após o processo de encapsulação e liofilização relativa ao Ensaio 2: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS. As barras pretas indicam a viabilidade antes da liofilização e as barras cinzentas correspondem à viabilidade após a liofilização (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

**Tabela B.13.** Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 2: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após encapsulação e liofilização (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

	Log CFU/mL	
	Após Encapsulação	Após Liofilização
LP	10,19 $\pm$ 0,03	10,45 $\pm$ 0,03
LP-FOS	10,11 $\pm$ 0,03	10,34 $\pm$ 0,10
LP-CHI	5,15 $\pm$ 0,21	7,40 $\pm$ 0,06
LP-CHI-FOS	0,00 $\pm$ 0,00	4,26 $\pm$ 0,24
LP-CHI-ALG	5,57 $\pm$ 0,23	7,21 $\pm$ 0,06
LP-CHI-ALG-FOS	5,78 $\pm$ 0,30	7,25 $\pm$ 0,07
LP-CHI-PPP	5,78 $\pm$ 0,03	5,74 $\pm$ 0,06
LP-CHI-PPP-FOS	0,00 $\pm$ 0,00	6,72 $\pm$ 0,10

**Tabela B.14.** Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após encapsulação e liofilização (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

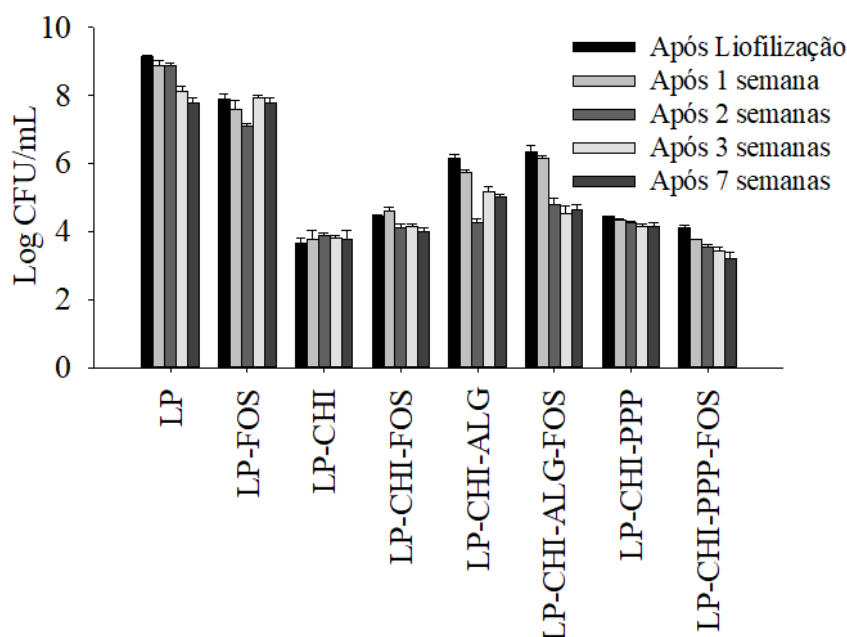
	Log CFU/mL	
	Após Encapsulação	Após Liofilização
<b>LP</b>	10,16 $\pm$ 0,12	9,82 $\pm$ 0,20
<b>LP-FOS</b>	10,22 $\pm$ 0,09	10,05 $\pm$ 0,13
<b>LP-CHI</b>	9,00 $\pm$ 0,04	3,10 $\pm$ 0,17
<b>LP-CHI-FOS</b>	5,56 $\pm$ 0,07	5,26 $\pm$ 0,24
<b>LP-CHI-ALG</b>	5,97 $\pm$ 0,03	5,08 $\pm$ 0,20
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	6,13 $\pm$ 0,04	6,04 $\pm$ 0,12
<b>LP-CHI-PPP</b>	7,00 $\pm$ 0,00	6,04 $\pm$ 0,23
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	5,97 $\pm$ 0,03	5,77 $\pm$ 0,27

**Tabela B.15.** Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 4: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após encapsulação e liofilização (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

	Log CFU/mL	
	Após Encapsulação	Após Liofilização
<b>LP</b>	10,35 $\pm$ 0,13	9,59 $\pm$ 0,02
<b>LP-FOS</b>	10,33 $\pm$ 0,01	9,40 $\pm$ 0,04
<b>LP-CHI</b>	6,39 $\pm$ 0,06	5,49 $\pm$ 0,04
<b>LP-CHI-FOS</b>	8,27 $\pm$ 0,04	6,42 $\pm$ 0,06
<b>LP-CHI-ALG</b>	8,19 $\pm$ 0,07	6,94 $\pm$ 0,03
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	8,16 $\pm$ 0,02	7,04 $\pm$ 0,13
<b>LP-CHI-PPP</b>	7,90 $\pm$ 0,05	6,19 $\pm$ 0,23
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	7,12 $\pm$ 0,05	5,88 $\pm$ 0,27

**Tabela B.16.** Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 5: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após encapsulação e após liofilização (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

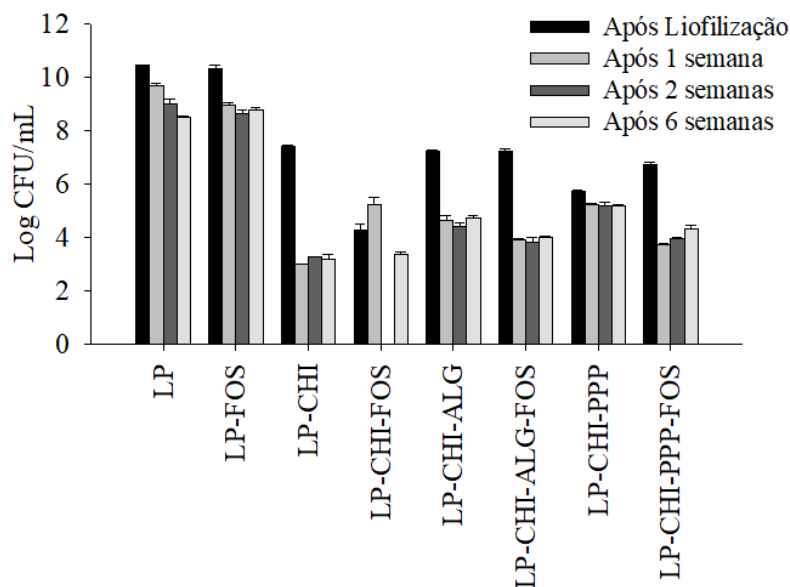
	Log CFU/mL	
	Após Encapsulação	Após Liofilização
<b>LP</b>	10,36 $\pm$ 0,02	9,58 $\pm$ 0,01
<b>LP-FOS</b>	10,31 $\pm$ 0,06	8,21 $\pm$ 0,03
<b>LP-CHI</b>	6,24 $\pm$ 0,09	5,27 $\pm$ 0,08
<b>LP-CHI-FOS</b>	8,29 $\pm$ 0,03	5,22 $\pm$ 0,09
<b>LP-CHI-ALG</b>	8,55 $\pm$ 0,04	7,43 $\pm$ 0,03
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	8,48 $\pm$ 0,02	7,09 $\pm$ 0,05
<b>LP-CHI-PPP</b>	8,08 $\pm$ 0,04	7,08 $\pm$ 0,07
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	7,95 $\pm$ 0,05	5,43 $\pm$ 0,03



**Figura B.28.** Viabilidade bacteriana relativa ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2, 3 e 7 semanas (média ± desvio padrão, n=3).

**Tabela B.17.** Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2, 3 e 7 semanas (média ± desvio padrão, n=3).

	Log CFU/mL				
	Após Liofilização	Após 1 semana	Após 2 semanas	Após 3 semanas	Após 7 semanas
<b>LP</b>	9,12 ± 0,04	8,87 ± 0,15	8,88 ± 0,06	8,09 ± 0,17	7,76 ± 0,15
<b>LP-FOS</b>	7,87 ± 0,15	7,59 ± 0,26	7,08 ± 0,07	7,92 ± 0,08	7,78 ± 0,15
<b>LP-CHI</b>	3,65 ± 0,16	3,78 ± 0,25	3,88 ± 0,06	3,81 ± 0,05	3,77 ± 0,27
<b>LP-CHI-FOS</b>	4,44 ± 0,02	4,59 ± 0,11	4,11 ± 0,09	4,15 ± 0,05	3,97 ± 0,12
<b>LP-CHI-ALG</b>	6,16 ± 0,09	5,72 ± 0,10	4,21 ± 0,14	5,15 ± 0,16	5,00 ± 0,08
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	6,35 ± 0,18	6,14 ± 0,06	4,77 ± 0,21	4,53 ± 0,21	4,62 ± 0,15
<b>LP-CHI-PPP</b>	4,43 ± 0,03	4,33 ± 0,03	4,25 ± 0,05	4,14 ± 0,08	4,15 ± 0,11
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	4,09 ± 0,08	3,78 ± 0,00	3,54 ± 0,09	3,42 ± 0,10	3,20 ± 0,17



**Figura B.29.** Viabilidade bacteriana relativa ao Ensaio 2: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2 e 6 semanas (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

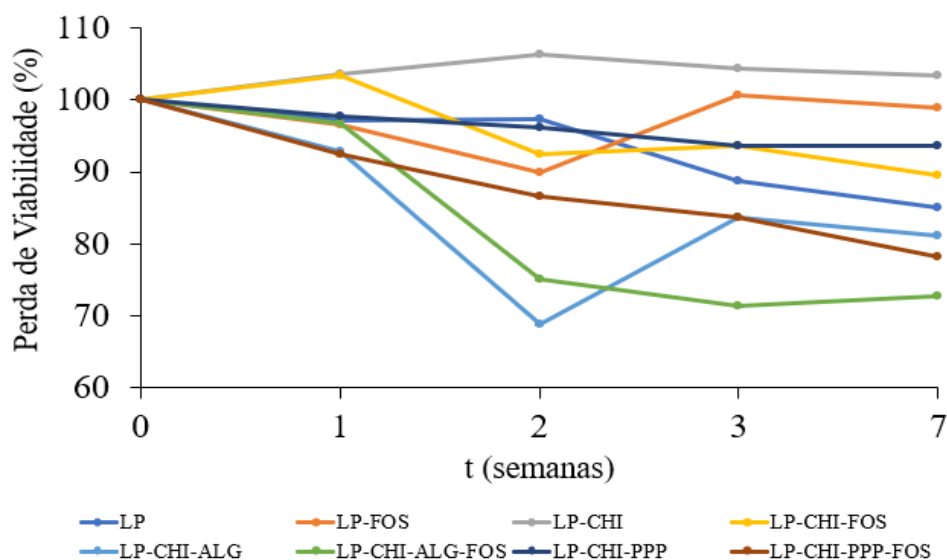
**Tabela B.18.** Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 2: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2 e 6 semanas (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

	Log CFU/mL			
	Após Liofilização	Após 1 semana	Após 2 semanas	Após 6 semanas
<b>LP</b>	10,45 $\pm$ 0,03	9,69 $\pm$ 0,09	9,02 $\pm$ 0,18	8,51 $\pm$ 0,05
<b>LP-FOS</b>	10,34 $\pm$ 0,10	8,97 $\pm$ 0,07	8,62 $\pm$ 0,15	8,80 $\pm$ 0,08
<b>LP-CHI</b>	7,40 $\pm$ 0,06	3,00 $\pm$ 0,00	3,30 $\pm$ 0,00	3,20 $\pm$ 0,17
<b>LP-CHI-FOS</b>	4,26 $\pm$ 0,24	5,26 $\pm$ 0,24	0,00 $\pm$ 0,00	3,36 $\pm$ 0,10
<b>LP-CHI-ALG</b>	7,21 $\pm$ 0,06	4,65 $\pm$ 0,16	4,41 $\pm$ 0,14	4,75 $\pm$ 0,08
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	7,25 $\pm$ 0,07	3,90 $\pm$ 0,05	3,85 $\pm$ 0,15	4,01 $\pm$ 0,06
<b>LP-CHI-PPP</b>	5,74 $\pm$ 0,06	5,25 $\pm$ 0,01	5,18 $\pm$ 0,13	5,20 $\pm$ 0,05
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	6,72 $\pm$ 0,10	3,75 $\pm$ 0,05	3,98 $\pm$ 0,03	4,32 $\pm$ 0,14



**Tabela B.19.** Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1 a 5 meses (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

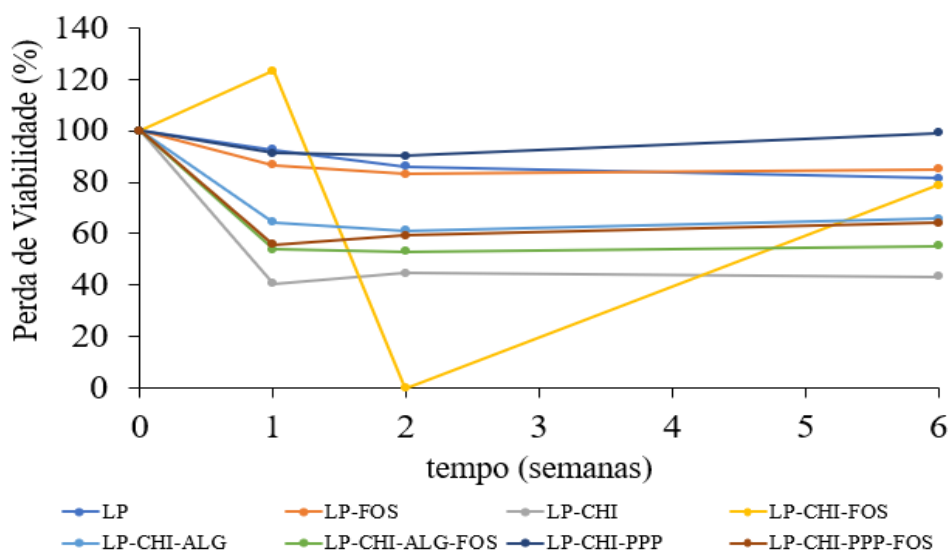
	Log CFU/mL					
	Após Liofilização	Após 1 mês	Após 2 meses	Após 3 meses	Após 4 meses	Após 5 meses
<b>LP</b>	9,82 $\pm$ 0,20	9,25 $\pm$ 0,13	9,18 $\pm$ 0,07	9,09 $\pm$ 0,05	9,01 $\pm$ 0,02	8,87 $\pm$ 0,11
<b>LP-FOS</b>	10,05 $\pm$ 0,13	10,04 $\pm$ 0,07	9,90 $\pm$ 0,10	9,73 $\pm$ 0,05	9,57 $\pm$ 0,02	9,42 $\pm$ 0,02
<b>LP-CHI</b>	3,10 $\pm$ 0,17	3,20 $\pm$ 0,17	3,15 $\pm$ 0,21	3,20 $\pm$ 0,17	3,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
<b>LP-CHI-FOS</b>	5,26 $\pm$ 0,24	3,48 $\pm$ 0,00	3,42 $\pm$ 0,10	3,24 $\pm$ 0,34	3,15 $\pm$ 0,21	3,00 $\pm$ 0,00
<b>LP-CHI-ALG</b>	5,08 $\pm$ 0,20	5,07 $\pm$ 0,10	4,86 $\pm$ 0,22	4,81 $\pm$ 0,13	4,57 $\pm$ 0,01	4,21 $\pm$ 0,04
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	6,04 $\pm$ 0,12	5,47 $\pm$ 0,07	5,10 $\pm$ 0,11	5,00 $\pm$ 0,14	4,89 $\pm$ 0,11	4,56 $\pm$ 0,02
<b>LP-CHI-PPP</b>	6,04 $\pm$ 0,23	6,02 $\pm$ 0,11	5,90 $\pm$ 0,05	5,75 $\pm$ 0,18	5,39 $\pm$ 0,06	4,26 $\pm$ 0,04
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	5,77 $\pm$ 0,27	5,40 $\pm$ 0,08	3,35 $\pm$ 0,05	5,23 $\pm$ 0,05	4,98 $\pm$ 0,07	4,38 $\pm$ 0,04



**Figura B.30.** Percentagem de perda de viabilidade relativa ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2, 3 e 7 semanas meses (média  $\pm$  desvio padrão, n=3). Perda de viabilidade: número de bactérias no tempo t/número de bactérias no tempo 0.

**Tabela B.20.** Percentagem de perda de viabilidade relativa ao Ensaio 1: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2, 3 e 7 semanas (média ± desvio padrão, n=3).

	Perda de Viabilidade (%)				
	Após Liofilização	Após 1 semana	Após 2 semanas	Após 3 semanas	Após 7 semanas
<b>LP</b>	100,00 ± 0,04	97,13 ± 0,15	97,34 ± 0,06	88,70 ± 0,17	85,06 ± 0,15
<b>LP-FOS</b>	100,00 ± 0,15	96,53 ± 0,26	89,95 ± 0,07	100,64 ± 0,08	98,96 ± 0,15
<b>LP-CHI</b>	100,00 ± 0,16	103,47 ± 0,25	106,30 ± 0,06	104,39 ± 0,05	103,36 ± 0,27
<b>LP-CHI-FOS</b>	100,00 ± 0,02	103,40 ± 0,11	92,48 ± 0,09	93,54 ± 0,05	89,49 ± 0,12
<b>LP-CHI-ALG</b>	100,00 ± 0,09	92,85 ± 0,10	68,84 ± 0,14	83,67 ± 0,16	81,09 ± 0,08
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	100,00 ± 0,18	96,80 ± 0,06	75,12 ± 0,21	71,45 ± 0,21	72,79 ± 0,15
<b>LP-CHI-PPP</b>	100,00 ± 0,03	97,80 ± 0,03	96,11 ± 0,05	93,58 ± 0,08	93,72 ± 0,11
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	100,00 ± 0,08	92,45 ± 0,00	86,61 ± 0,09	83,65 ± 0,10	78,32 ± 0,17



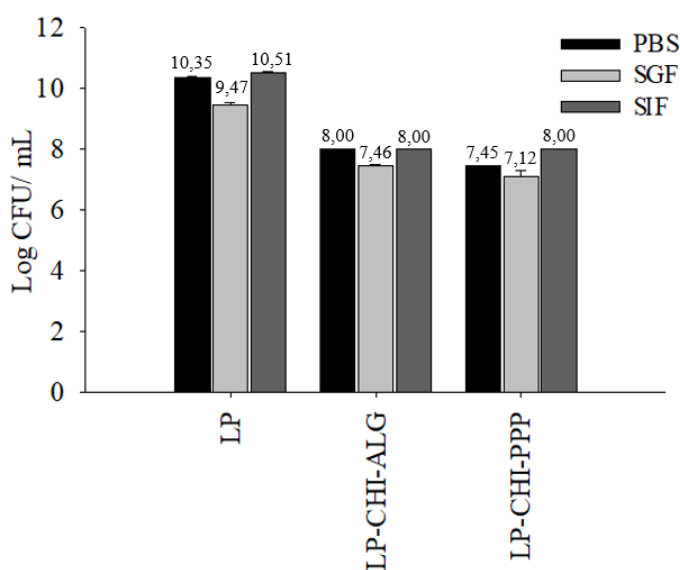
**Figura B.31.** Percentagem de perda de viabilidade relativa ao Ensaio 2: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2 e 6 semanas meses (média ± desvio padrão, n=3). Perda de viabilidade: número de bactérias no tempo t/número de bactérias no tempo 0.

**Tabela B.21.** Percentagem de perda de viabilidade relativa ao Ensaio 2: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1, 2 e 6 semanas (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

	Log CFU/mL			
	Após Liofilização	Após 1 semana	Após 2 semanas	Após 6 semanas
<b>LP</b>	100,00 $\pm$ 0,03	92,79 $\pm$ 0,09	86,31 $\pm$ 0,18	81,48 $\pm$ 0,05
<b>LP-FOS</b>	100,00 $\pm$ 0,10	86,70 $\pm$ 0,07	83,35 $\pm$ 0,15	85,06 $\pm$ 0,08
<b>LP-CHI</b>	100,00 $\pm$ 0,06	40,57 $\pm$ 0,00	44,64 $\pm$ 0,00	43,28 $\pm$ 0,17
<b>LP-CHI-FOS</b>	100,00 $\pm$ 0,24	123,48 $\pm$ 0,24	0,00 $\pm$ 0,00	78,88 $\pm$ 0,10
<b>LP-CHI-ALG</b>	100,00 $\pm$ 0,06	64,51 $\pm$ 0,16	61,19 $\pm$ 0,14	65,84 $\pm$ 0,08
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	100,00 $\pm$ 0,07	53,80 $\pm$ 0,05	53,07 $\pm$ 0,15	55,32 $\pm$ 0,06
<b>LP-CHI-PPP</b>	100,00 $\pm$ 0,06	91,43 $\pm$ 0,01	90,31 $\pm$ 0,13	99,15 $\pm$ 0,05
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	100,00 $\pm$ 0,10	55,83 $\pm$ 0,05	59,30 $\pm$ 0,03	64,29 $\pm$ 0,14

**Tabela B.22.** Percentagem de perda de viabilidade relativa ao Ensaio 3: *Lactobacillus plantarum* WCFS1 com e sem presença de FOS, após liofilização e após armazenamento de 1 a 5 meses (média  $\pm$  desvio padrão, n=3).

	Log CFU/mL					
	Após Liofilização	Após 1 mês	Após 2 meses	Após 3 meses	Após 4 meses	Após 5 meses
<b>LP</b>	100,00 $\pm$ 0,20	94,24 $\pm$ 0,13	93,54 $\pm$ 0,07	92,60 $\pm$ 0,05	91,83 $\pm$ 0,02	90,41 $\pm$ 0,11
<b>LP-FOS</b>	100,00 $\pm$ 0,13	99,84 $\pm$ 0,07	98,42 $\pm$ 0,10	96,73 $\pm$ 0,05	95,16 $\pm$ 0,02	93,69 $\pm$ 0,02
<b>LP-CHI</b>	100,00 $\pm$ 0,17	103,24 $\pm$ 0,17	101,62 $\pm$ 0,21	103,24 $\pm$ 0,17	96,76 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
<b>LP-CHI-FOS</b>	100,00 $\pm$ 0,24	66,11 $\pm$ 0,00	65,00 $\pm$ 0,10	61,58 $\pm$ 0,34	59,90 $\pm$ 0,21	57,04 $\pm$ 0,00
<b>LP-CHI-ALG</b>	100,00 $\pm$ 0,20	99,93 $\pm$ 0,10	95,83 $\pm$ 0,22	94,79 $\pm$ 0,13	90,09 $\pm$ 0,01	82,99 $\pm$ 0,04
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	100,00 $\pm$ 0,12	90,56 $\pm$ 0,07	84,46 $\pm$ 0,11	82,75 $\pm$ 0,14	80,98 $\pm$ 0,11	75,52 $\pm$ 0,02
<b>LP-CHI-PPP</b>	100,00 $\pm$ 0,23	99,61 $\pm$ 0,11	97,65 $\pm$ 0,05	95,18 $\pm$ 0,18	89,28 $\pm$ 0,06	70,53 $\pm$ 0,04
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	100,00 $\pm$ 0,27	93,51 $\pm$ 0,08	92,61 $\pm$ 0,05	90,55 $\pm$ 0,05	86,27 $\pm$ 0,07	75,84 $\pm$ 0,04



**Figura B.32.** Viabilidade bacteriana antes da liofilização e após exposição ao meio de controlo (PBS) e aos meios gástrico (FGS) e intestinal (FIS) simulados, relativa ao Ensaio EMS1 de encapsulação:

*Lactobacillus plantarum* WCFS1, antes da liofilização, durante 2 h de exposição em paralelo (média ± desvio padrão, n=3).

**Tabela B.23.** Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio EMS1 de encapsulação:

*Lactobacillus plantarum* WCFS1, antes da liofilização, durante 2 h de exposição aos meios simulados em paralelo (média ± desvio padrão, n=3).

	Log CFU/mL		
	PBS	FGS	FIS
<b>LP</b>	10,35 ± 0,05	9,47 ± 0,05	10,51 ± 0,04
<b>LP-CHI-ALG</b>	8,00 ± 0,00	7,46 ± 0,05	8,00 ± 0,00
<b>LP-CHI-PPP</b>	7,45 ± 0,02	7,12 ± 0,17	8,00 ± 0,00

**Tabela B.24.** Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio EMS2 de encapsulação:

*Lactobacillus plantarum* WCFS1, antes da liofilização, durante 2 h e 30 min de exposição, em série (média ± desvio padrão, n=3).

	Log CFU/mL		
	PBS	FGS	FIS
<b>LP</b>	10,38 ± 0,04	8,84 ± 0,12	7,85 ± 0,21
<b>LP-CHI-ALG</b>	8,09 ± 0,12	6,85 ± 0,20	6,36 ± 0,02
<b>LP-CHI-PPP</b>	7,31 ± 0,08	6,41 ± 0,08	6,19 ± 0,05

**Tabela B.25.** Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio EMS3 de encapsulação:

*Lactobacillus plantarum* WCFS1, após liofilização, durante 2 h e 30 min de exposição, em série (média ± desvio padrão, n=3).

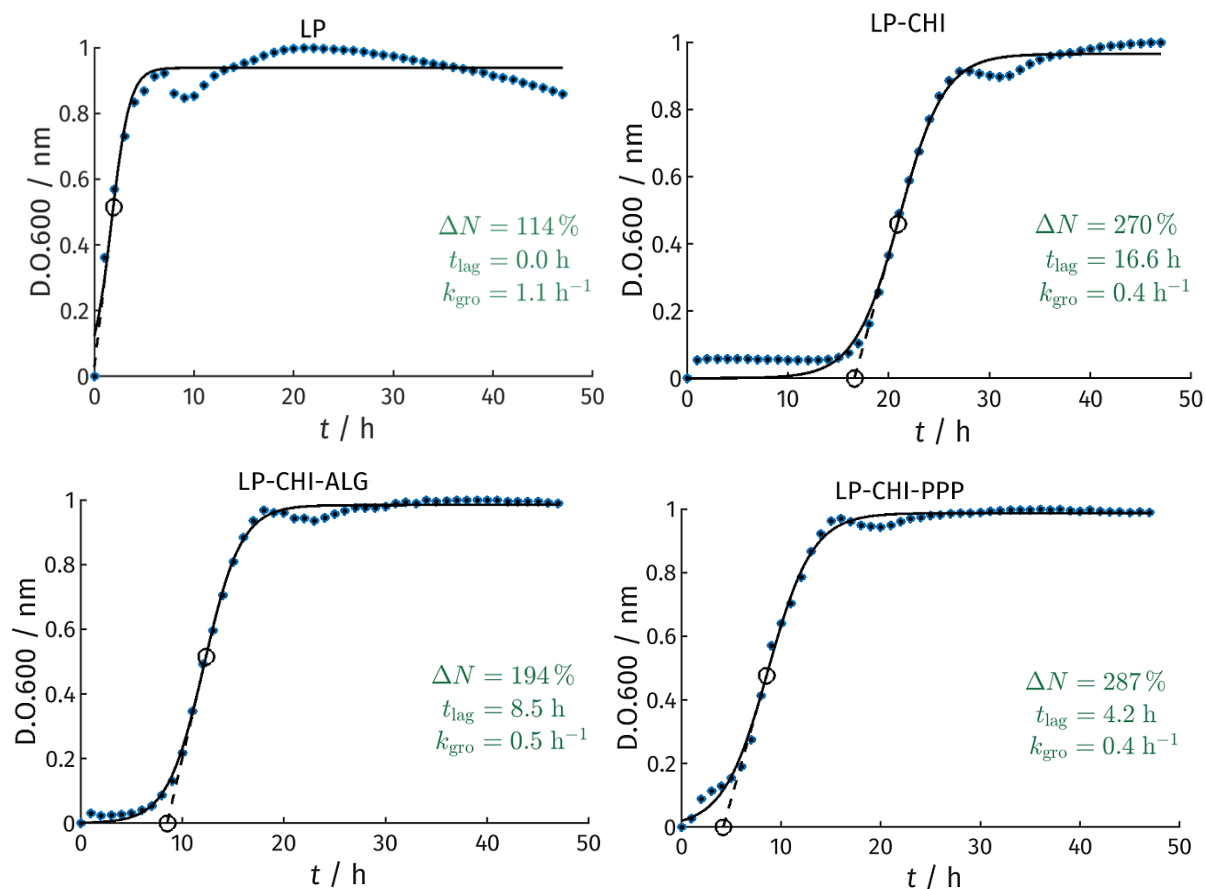
	Log CFU/mL		
	PBS	FGS	FIS
<b>LP</b>	9,35 ± 0,04	8,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00
<b>LP-CHI-ALG</b>	7,07 ± 0,11	6,93 ± 0,08	5,15 ± 0,09
<b>LP-CHI-PPP</b>	6,04 ± 0,07	5,42 ± 0,05	5,18 ± 0,04

**Tabela B.26.** Valores de viabilidade bacteriana relativos ao Ensaio EMS4 de encapsulação:

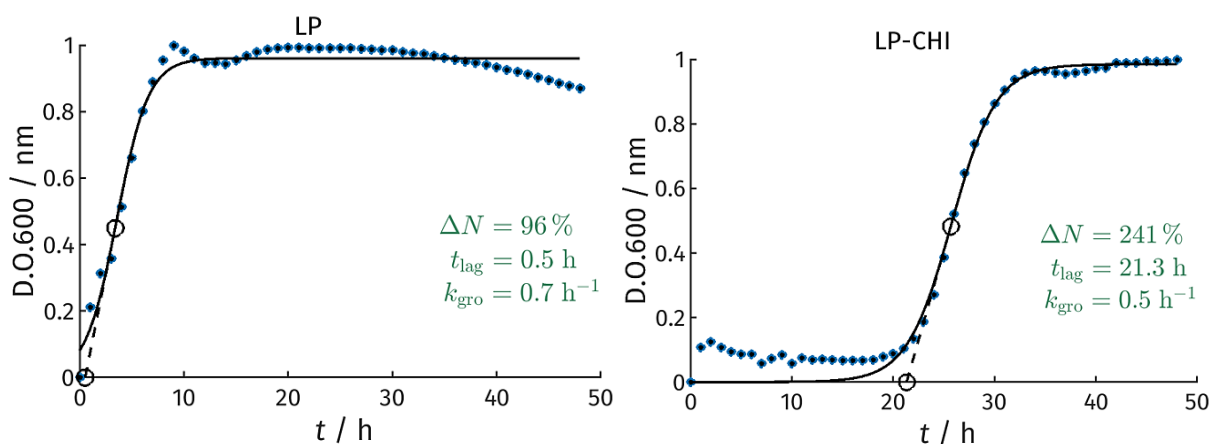
*Lactobacillus plantarum* WCFS1, após liofilização, durante 2 h e 30 min de exposição, em série (média ± desvio padrão, n=3).

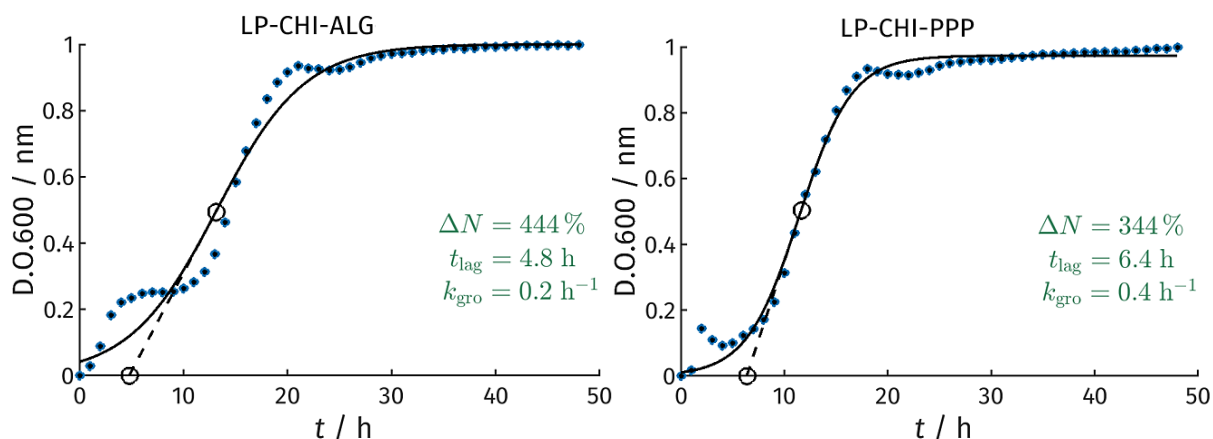
	Log CFU/mL		
	PBS	FGS	FIS
<b>LP</b>	9,54 ± 0,03	8,51 ± 0,02	8,28 ± 0,06
<b>LP-CHI-ALG</b>	7,35 ± 0,03	7,12 ± 0,05	6,28 ± 0,04
<b>LP-CHI-PPP</b>	6,98 ± 0,10	6,15 ± 0,06	5,77 ± 0,09

## Anexo C – Crescimento Bacteriano

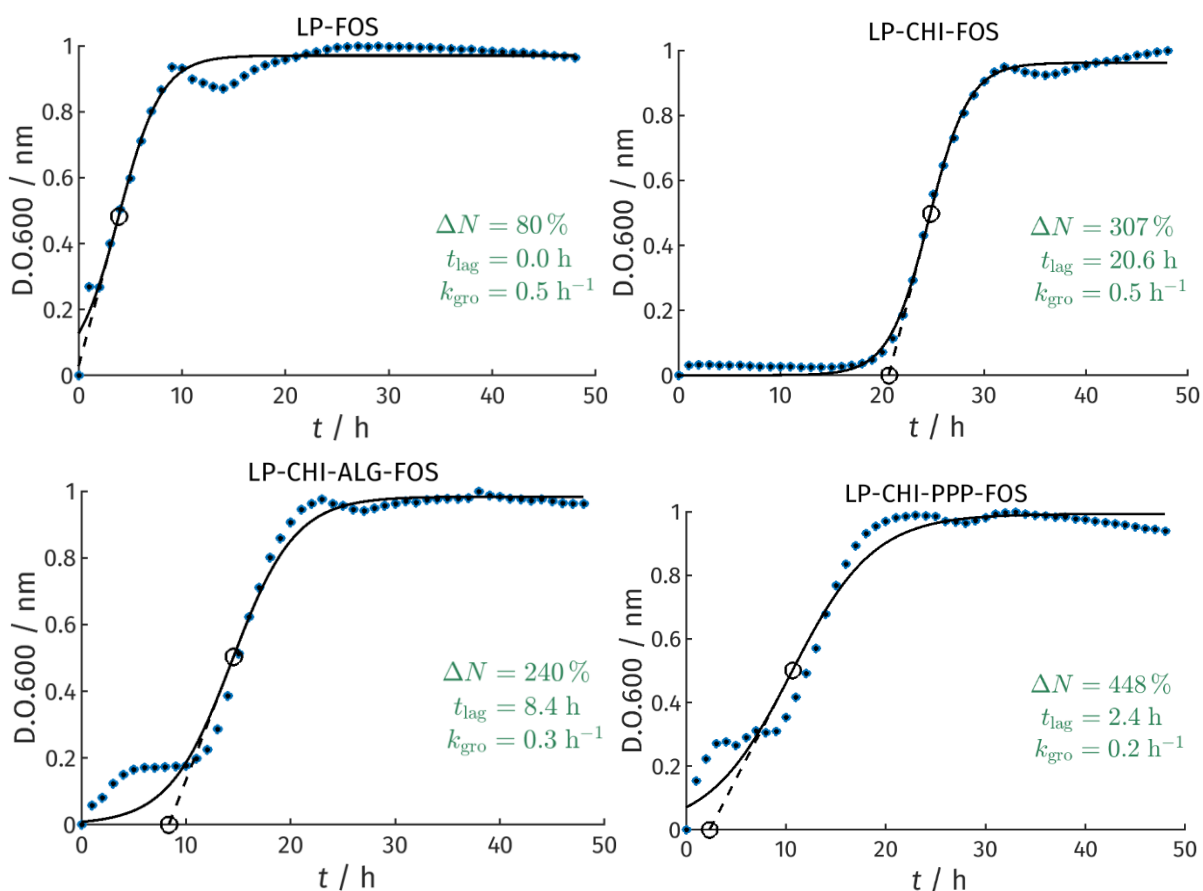


**Figura C.33.** Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 3: *L. plantarum* WCFS1 antes da encapsulação (LP), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG) e PPP (LP-CHI-PPP) sem presença de FOS, ou seja, antes da liofilização.

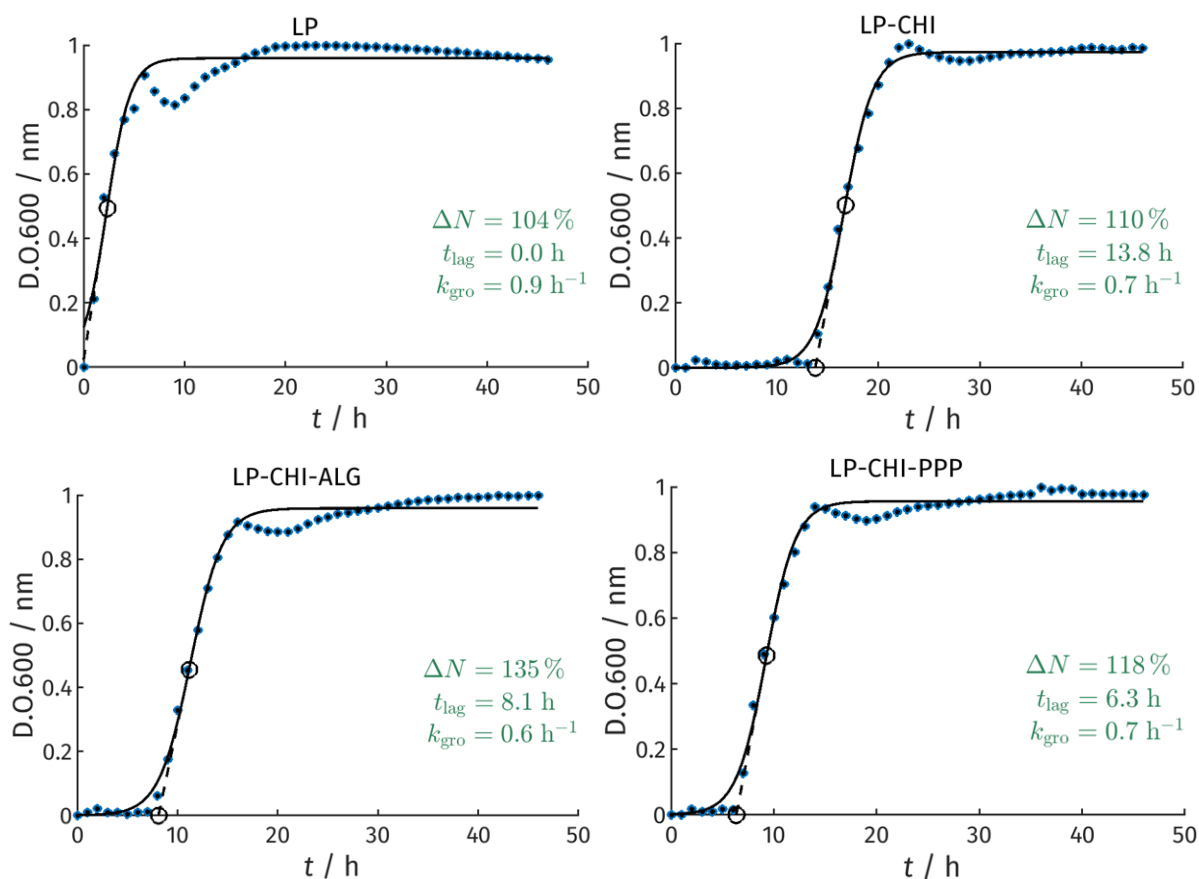




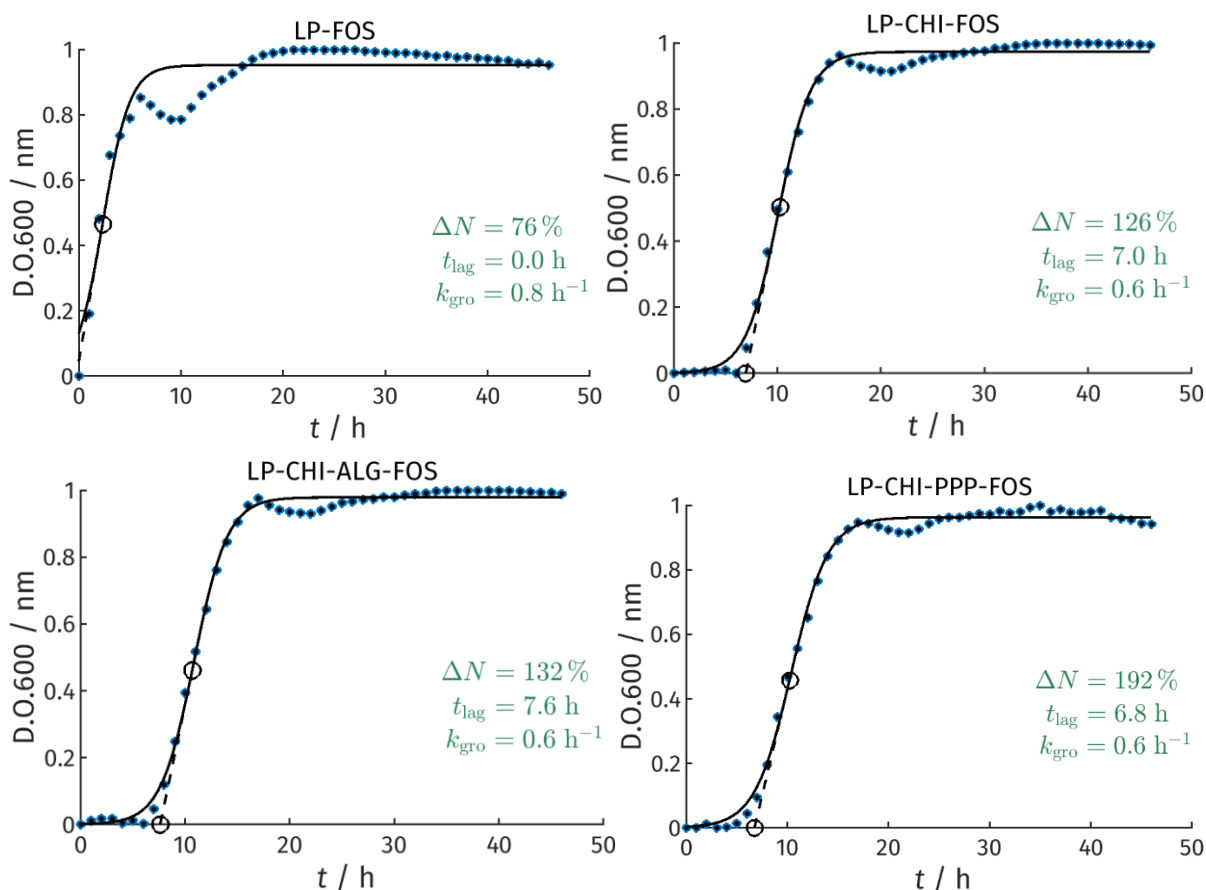
**Figura C.34.** Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 3: *L. plantarum* WCFS1 antes da encapsulação (LP), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG) e PPP (LP-CHI-PPP) sem presença de FOS, após liofilização.



**Figura C.35.** Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 3: *L. plantarum* WCFS1 antes da encapsulação (LP-FOS), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI-FOS), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG-FOS) e PPP (LP-CHI-PPP-FOS) com presença de FOS, após liofilização.



**Figura C.36.** Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 4: *L. plantarum* WCFS1 antes da encapsulação (LP), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG) e PPP (LP-CHI-PPP) sem presença de FOS, ou seja, antes da liofilização.

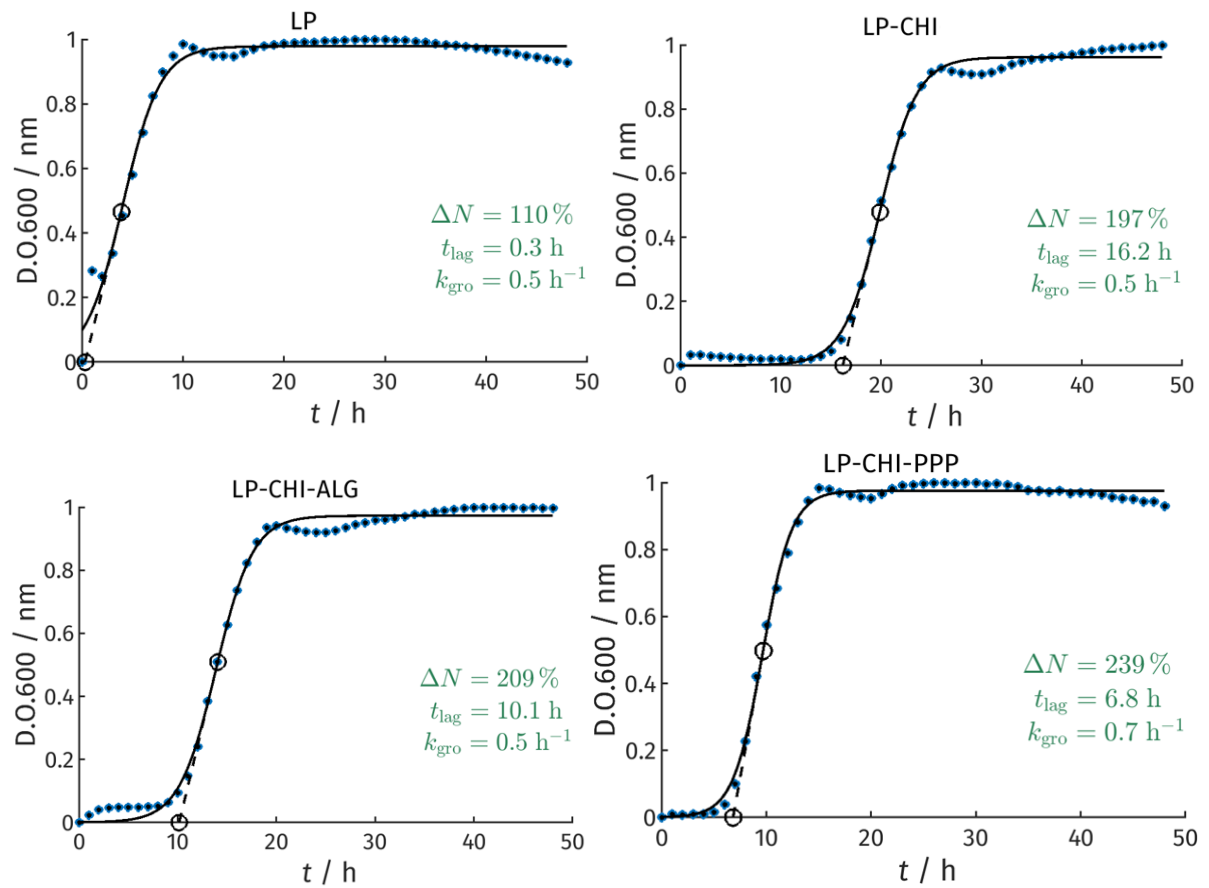


**Figura C.37.** Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 4: *L. plantarum* WCFS1 antes da encapsulação (LP-FOS), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI-FOS), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG-FOS) e PPP (LP-CHI-PPP-FOS) sem presença de FOS, ou seja, antes da liofilização.

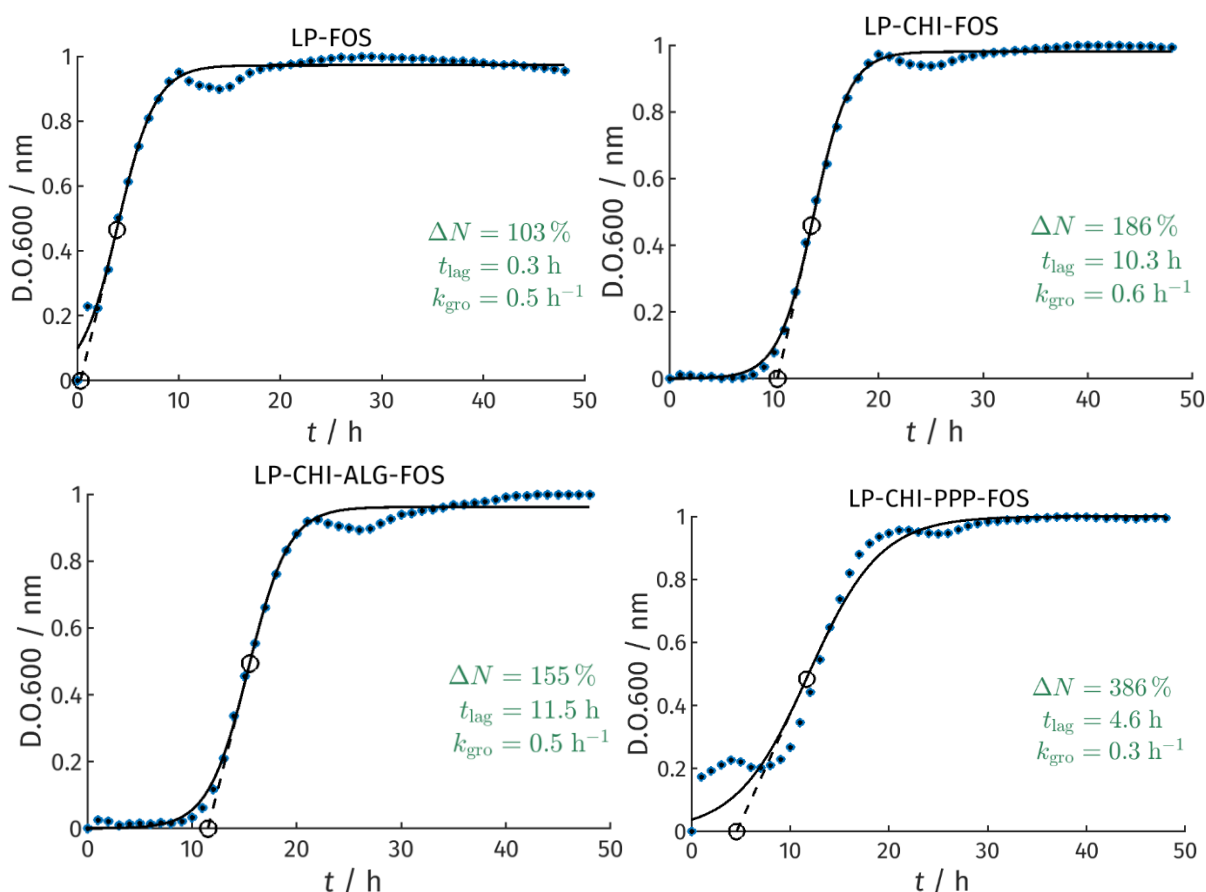
**Tabela C.27.** Parâmetros da cinética de crescimento bacteriano relativos ao Ensaio 4: *L. plantarum* WCFS1 sem e com a presença de FOS após encapsulação, ou seja, antes da liofilização.

<i>L. plantarum</i> WCFS1 antes liofilização	$t_{lag}$ (h)	k ( $\text{h}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>	$\Delta N$ (%)
<b>LP</b>	0,00	0,85	0,9267	104
<b>LP-FOS</b>	0,00	0,77	0,8995	76
<b>LP-CHI</b>	13,80	0,70	0,9981	110
<b>LP-CHI-FOS</b>	7,00	0,64	0,9948	126
<b>LP-CHI-ALG</b>	8,10	0,63	0,9928	135
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	7,60	0,63	0,9969	132
<b>LP-CHI-PPP</b>	6,30	0,69	0,9928	118
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	6,80	0,56	0,9964	192





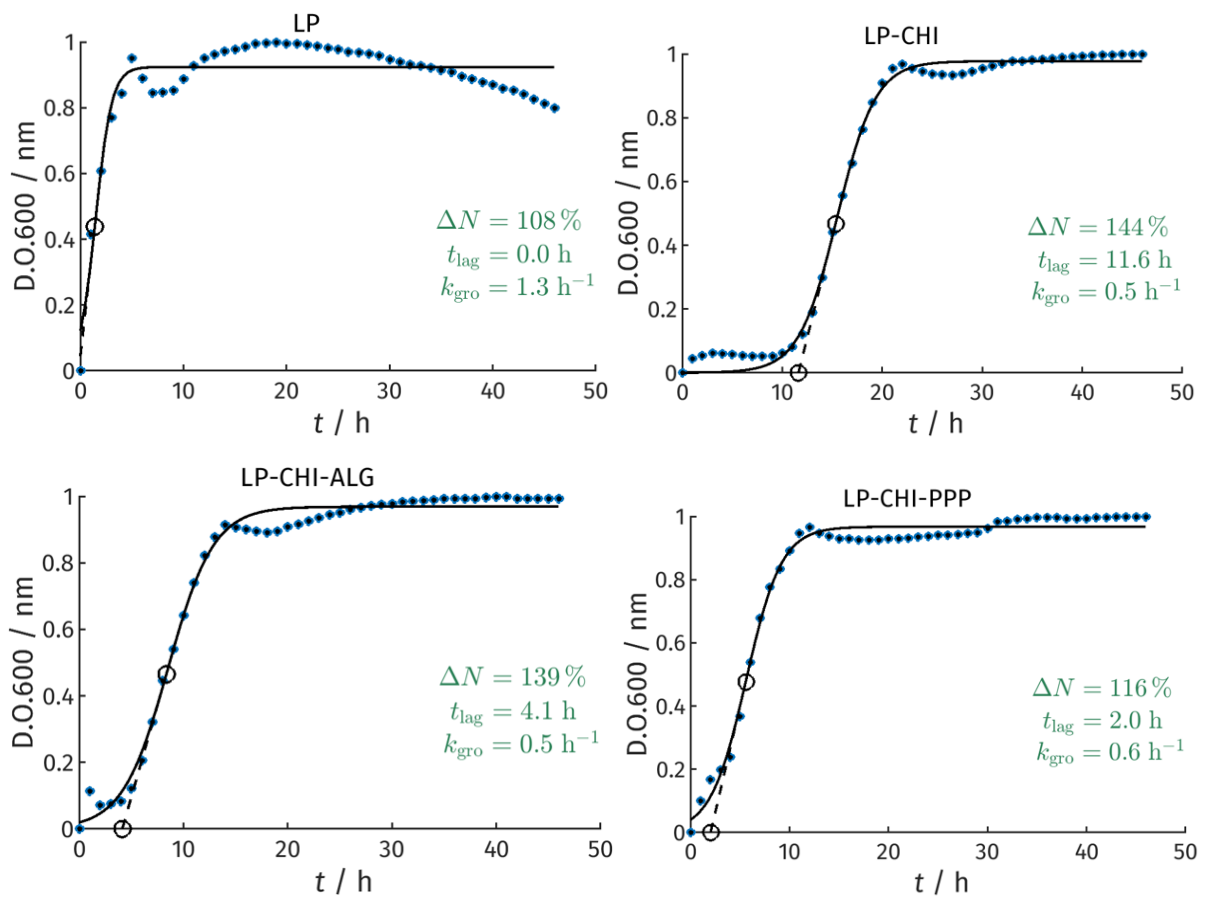
**Figura C.38.** Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 4: *L. plantarum* WCFS1 antes da encapsulação (LP), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG) e PPP (LP-CHI-PPP) sem presença de FOS, após liofilização.



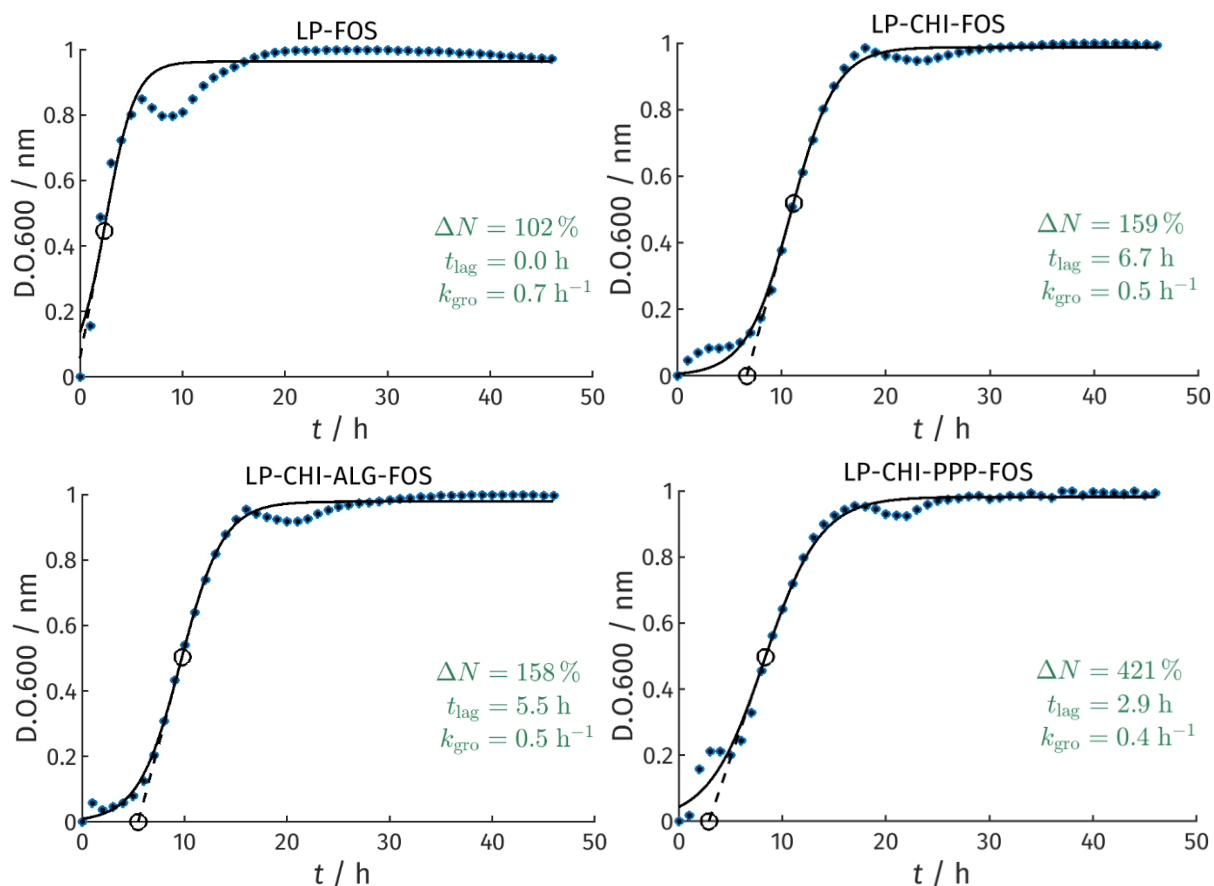
**Figura C.39.** Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 4: *L. plantarum* WCFS1 antes da encapsulação (LP-FOS), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI-FOS), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG-FOS) e PPP (LP-CHI-PPP-FOS) com presença de FOS, após liofilização.

**Tabela C.28.** Parâmetros da cinética de crescimento bacteriano relativos ao Ensaio 4: *L. plantarum* WCFS1 sem e com a presença de FOS, após liofilização.

<i>L. plantarum</i> WCFS1 após liofilização	$t_{lag}$ (h)	$k$ ( $h^{-1}$ )	$R^2$	$\Delta N$ (%)
<b>LP</b>	0,30	0,54	0,9804	110
<b>LP-FOS</b>	0,30	0,54	0,9834	103
<b>LP-CHI</b>	16,20	0,54	0,9971	197
<b>LP-CHI-FOS</b>	10,30	0,59	0,9982	186
<b>LP-CHI-ALG</b>	10,10	0,54	0,9958	209
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	11,50	0,52	0,9956	155
<b>LP-CHI-PPP</b>	6,80	0,72	0,9969	239
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	4,60	0,28	0,9745	386



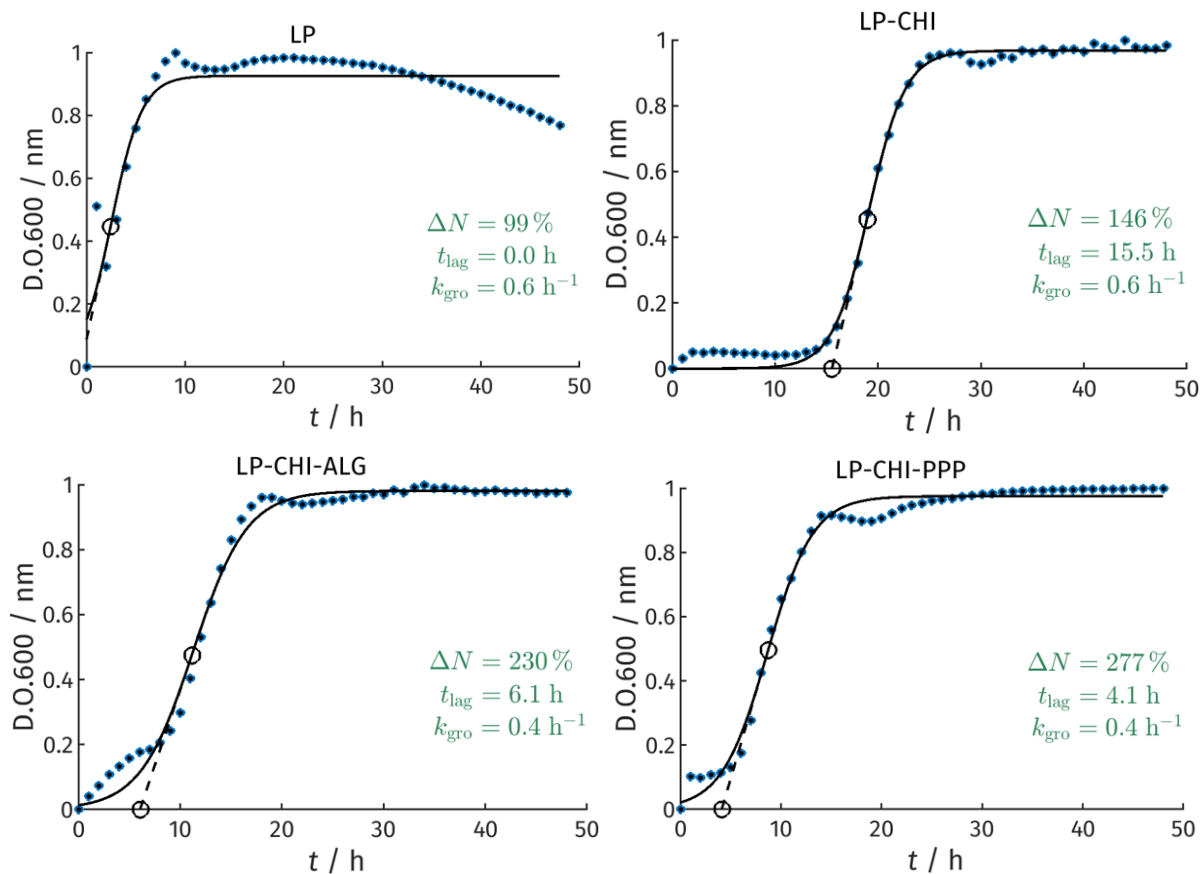
**Figura C.40.** Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 5: *L. plantarum* WCFS1 antes da encapsulação (LP), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG) e PPP (LP-CHI-PPP) sem presença de FOS, ou seja, antes da liofilização.



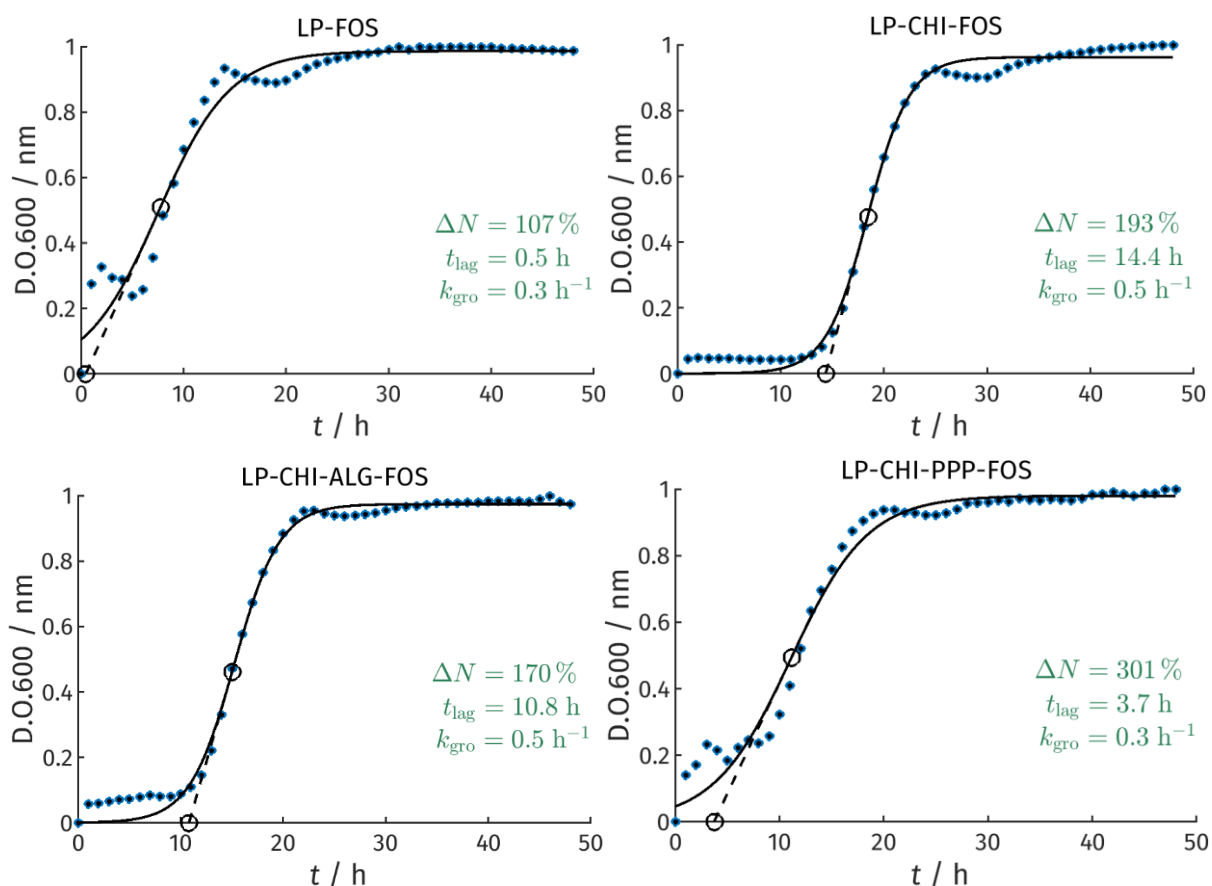
**Figura C.41.** Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 5: *L. plantarum* WCFS1 antes da encapsulação (LP-FOS), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI-FOS), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG-FOS) e PPP (LP-CHI-PPP-FOS) sem presença de FOS, ou seja, antes da liofilização.

**Tabela C.29.** Parâmetros da cinética de crescimento bacteriano relativos ao Ensaio 5: *L. plantarum* WCFS1 sem e com a presença de FOS, após encapsulação, ou seja, antes liofilização.

<i>L. plantarum</i> WCFS1 antes liofilização	$t_{lag}$ (h)	$k$ (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	$\Delta N$ (%)
<b>LP</b>	0,00	1,28	0,8708	108
<b>LP-FOS</b>	0,00	0,71	0,9117	102
<b>LP-CHI</b>	11,60	0,52	0,9956	144
<b>LP-CHI-FOS</b>	6,70	0,47	0,9963	159
<b>LP-CHI-ALG</b>	4,10	0,46	0,9909	139
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	5,50	0,48	0,9959	158
<b>LP-CHI-PPP</b>	2,00	0,56	0,9886	116
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	2,90	0,37	0,9916	421



**Figura C.42.** Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 5: *L. plantarum* WCFS1 antes da encapsulação (LP), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG) e PPP (LP-CHI-PPP) sem presença de FOS, após liofilização.



**Figura C.43.** Curvas de crescimento bacteriano relativas ao Ensaio 5: *L. plantarum* WCFS1 antes da encapsulação (LP-FOS), após encapsulação da primeira camada de CHI (LP-CHI-FOS), após encapsulação da segunda camada de ALG (LP-CHI-ALG-FOS) e PPP (LP-CHI-PPP-FOS) com presença de FOS, após liofilização.

**Tabela C.30.** Parâmetros da cinética de crescimento bacteriano relativos ao Ensaio 5: *L. plantarum* WCFS1 sem e com a presença de FOS, após liofilização.

<i>L. plantarum</i> WCFS1 antes liofilização	$t_{lag}$ (h)	$k$ ( $h^{-1}$ )	$R^2$	$\Delta N$ (%)
<b>LP</b>	0,00	0,65	0,8418	99
<b>LP-FOS</b>	0,00	0,28	0,9623	107
<b>LP-CHI</b>	15,50	0,56	0,9965	146
<b>LP-CHI-FOS</b>	14,40	0,49	0,9948	193
<b>LP-CHI-ALG</b>	6,10	0,38	0,9912	230
<b>LP-CHI-ALG-FOS</b>	10,80	0,46	0,9946	170
<b>LP-CHI-PPP</b>	4,10	0,44	0,9908	277
<b>LP-CHI-PPP-FOS</b>	3,70	0,27	0,9807	301