

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

DAVI DOS SANTOS NASCIMENTO

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO SOBRE A
ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES NUTRACÊUTICAS COMPOSTAS POR
Limosilactobacillus fermentum 296, QUERCETINA E RESVERATROL

João Pessoa

2022

DAVI DOS SANTOS NASCIMENTO

**INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO SOBRE A
ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES NUTRACÊUTICAS COMPOSTAS POR
Limosilactobacillus fermentum 296, QUERCETINA E RESVERATROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Linha de Pesquisa: Segurança, Qualidade e Funcionalidade dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

João Pessoa

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N244i Nascimento, Davi dos Santos.

Influência das condições de armazenamento sobre a estabilidade de formulações nutraceuticas compostas por *Limosilactobacillus fermentum* 296, quercetina e resveratrol / Davi dos Santos Nascimento. - João Pessoa, PB, 2022.

86 f. : il.

Orientação: Evandro Leite de Souza.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Microbiota intestinal. 2. Probióticos. 3. Nutraceutico. 4. Compostos fenolicos. I. Souza, Evandro Leite de. II. Título.

UFPB/BC

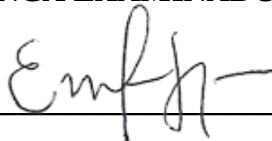
CDU 616-008.87:611.34(043)

DAVI DOS SANTOS NASCIMENTO

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO SOBRE A
ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES NUTRACÊUTICAS COMPOSTAS POR
Limosilactobacillus fermentum 296, QUERCETINA E RESVERATROL

Dissertação de mestrado defendida em 23/09/2022

BANCA EXAMINADORA



Prof. Evandro Leite de Souza

Presidente da Banca examinadora



Profª. Drª. Maria Elieidy Gomes de Oliveira

Examinadora interna titular

Dr. Yuri Manguiera do Nascimento

Examinador externo titular

Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves

Examinador interno suplente

Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

Examinador externo suplente

“Esse trabalho é dedicado às vozes em minha cabeça, que são minhas amigas mais surpreendentes. E aos meus pais, que moram conosco.”

Adaptado de “Gente Ansiosa”
(Frederik Backman)

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo àquele que é o princípio e o fim não apenas desta pesquisa, mas da minha vida. Aquele que foi meu sustento, força, conhecimento e habilidade. Obrigado, Deus, por conduzir mais essa etapa, por sempre trazer lições além das que espero, por ser a esperança nos tempos difíceis, e por me dar a honra que é poder te honrar com esse título. E agradeço a todos que Ele colocou ao longo dessa etapa acadêmica.

Aos meus pais, que sempre apoiaram e aplaudiram minha decisão de dar mais alguns passos pela vida acadêmica. Sempre foram meu alicerce e meu lugar para onde voltar quando me senti sozinho. Se eu deixei marcas positivas na vida de quem eu passei nesse mestrado, foi graças primeiramente a Deus, e depois a vocês, que são a base de quem eu sou hoje. Amo vocês. E ao meu avô João Batista (*in memoriam*), que foi exemplo de acolhimento e cuidado, tendo acompanhado quase toda minha caminhada acadêmica e se alegrado com ela. Todas as bênçãos, vô!

Ao professor Evandro Leite de Souza, que me deu uma grande oportunidade de crescimento pessoal e profissional abrindo as portas da pesquisa sob sua orientação. Minha imensa gratidão pelo seu zelo, preocupação e incentivo. Coragem!

À professora Maria Elieidy Gomes de Oliveira, minha mãezinha acadêmica, com quem tenho a alegria de compartilhar essa conquista. Obrigado por ter sido um lugar de paz, e por acreditar em mim muito mais do que eu mesmo às vezes acredito.

A Yuri Mangueira, por toda a paciência e dedicação ao me receber para desenvolver minha pesquisa numa área totalmente nova para mim. Obrigado pelo suporte, pelo ensinamento compartilhado, e por me emprestar Thalisson durante as análises, a quem também sou grato pela amizade e pela disposição de me auxiliar no que eu precisasse. Bem como ao professor Josean, agradeço por me abrir as portas do laboratório para que minha pesquisa prosseguisse.

Ao professor Fábio de Sousa e a José Venâncio Chaves por terem sido tão abertos a compartilhar conhecimento, e auxiliarem no desenvolvimento das análises. Sou grato pela oportunidade de ter trabalhado com vocês.

À Karoliny Brito Sampaio, que foi meu braço direito, esquerdo, minhas pernas e minha cabeça ao longo desses anos. Quem me ensinou a prática de bancada do início ao

fim, suportou todas as vezes que minha mente não avançava mais, ou que eu questionava qualquer coisa pequena, ou cometia erros tentando aprender. Você foi a melhor amizade que eu poderia ganhar desse programa para a minha vida.

Aos rostos amigos que estiveram ao meu lado durante o mestrado, Camila e Júlia, com quem compartilhei mais dias de luta do que dias de glória. Obrigado por tudo, e por me emprestarem Kaíque um pouco.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, cujos professores foram essenciais na minha formação acadêmica, na soma de conhecimento e no despertar do senso crítico. Agradeço a todos, e em especial à professora Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga (*in memoriam*), de quem tive a honra de ser aluno na graduação e no mestrado, e que “combateu o bom combate”, deixando um legado lindo e exemplar de profissional e de ser humano. Obrigado, professora.

Aos demais alunos e colaboradores do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Alimentos, Caroliny, Professora Estefânia, Gracy, Heloísa, Jaielson, Karina, Professora Kataryne, Professora Lúcia, Maiara, Professora Noádia, Sônia e Thais. Seja através de uma conversa, uma ajuda, um sorriso, vocês foram essenciais nesse acolhimento no laboratório, e sou extremamente grato por ter passado na vida de cada um.

Aos meus amigos de fora do programa, tanto os que estudaram comigo na graduação, os respectivos agregados, os que tenho comigo desde o colégio, e a minha família em Cristo, obrigado por terem suportado minhas lamúrias ao longo desses anos. “A felicidade só é real quando é compartilhada”. Essa conquista também é de vocês.

E por último, “quero agradecer a mim por todo esse trabalho. Quero agradecer a mim por nunca desistir. Quero agradecer a mim por sempre dar e tentar dar mais do que o que recebo. Quero agradecer a mim por simplesmente ser eu a todo momento”.

RESUMO

Existe uma íntima correlação entre as propriedades térmicas de nutracêuticos em pó, utilizados na prevenção e tratamento de doenças relacionadas à microbiota intestinal, e sua estabilidade e funcionalidades. A estabilidade de bactérias nessas formulações, por sua vez, depende da umidade relativa (UR) em que o pó é armazenado, o que interfere diretamente na sua atividade de água (a_w). O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da temperatura e da umidade relativa sobre a estabilidade térmica e microbiológica, e as potenciais funcionalidades de formulações nutracêuticas contendo *Limosilactobacillus fermentum* 296, quercetina (QUE) e resveratrol (RES) durante o armazenamento refrigerado e em temperatura ambiente. Inicialmente, foi avaliada a estabilidade microbiológica e térmica da formulação após o processo de umidificação, alcançado a partir da exposição por 15 dias a diferentes umidades relativas (11, 22 e 33% UR) e temperaturas de armazenamento (4 e 25 °C). Foram utilizadas técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) para avaliar mudanças estruturais, físicas e químicas da amostra. Não houve diferenças significativas nas temperaturas de redução de massa e de reações endotérmicas da formulação sob as 3 diferentes UR, indicando uma estabilidade do nutracêutico. A formulação sob umidificação a 11% UR em refrigeração mostrou uma maior contagem de células viáveis quando comparada às outras URs (22 e 33%) e à temperatura ambiente. Posteriormente, a formulação foi armazenada sob UR controlada de 11% e temperaturas refrigerada (4 °C) e ambiente (25 °C) durante 90 dias, sendo realizada a contagem de células viáveis, a avaliação do perfil fisiológico das células, a mensuração do conteúdo de QUE e RES, e a capacidade antioxidante formulação. O estado fisiológico das células de *L. fermentum* 296 foi semelhante após o período de umidificação de 15 dias nas 3 condições de UR, e no período de 90 dias de armazenamento sob UR de 11% também houve semelhança entre as duas temperaturas (refrigeração e ambiente). *L. fermentum* 296 apresentou maior contagem de células viáveis (>6 log UFC/g) até o dia 90 de armazenamento sob temperatura de refrigeração do que sob temperatura ambiente tanto na formulação contendo os compostos fenólicos, quanto na formulação controle. Durante o armazenamento sob temperatura de refrigeração e ambiente, não ocorreram perdas no conteúdo de QUE e RES e foi mantida a capacidade antioxidante da formulação. Os resultados mostraram que a maior funcionalidade potencial da formulação nutracêutica avaliada durante o armazenamento a longo prazo (90 dias) pode ser garantida sob 11% UR e temperatura de refrigeração. Este estudo contribuiu com informações que preenchem uma lacuna a respeito do processo de estabilização de nutracêuticos liofilizados com probióticos, quercetina e resveratrol após a umidificação sob diferentes UR e o controle das condições de armazenamento.

Palavras-chave: Probióticos; Compostos Fenólicos; Nutracêutico; Estabilidade; Funcionalidade.

ABSTRACT

There is a close correlation between the thermal properties of powdered nutraceuticals, used in the prevention and treatment of diseases related to the intestinal microbiota, and their stability and functionality. The stability of bacteria in these formulations, in turn, depends on the relative humidity (RH) in which the powder is stored, which directly interferes with its water activity (a_w). The aim of this work was to evaluate the effects of temperature and relative humidity on the thermal and microbiological stability, and the potential functionalities of nutraceutical formulations containing *Limosilactobacillus fermentum* 296, quercetin (QUE) and resveratrol (RES) during cold storage and at room temperature. Initially, the microbiological and thermal stability of the formulation was evaluated after the humidification process, achieved from exposure for 15 days to different relative humidities (11, 22 and 33% RH) and storage temperatures (4 and 25 °C). Differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TG) techniques were used to evaluate structural, physical and chemical changes in the sample. There were no significant differences in the mass reduction and endothermic reaction temperatures of the formulation under the 3 different RH, indicating a stability of the nutraceutical. The formulation under humidification at 11% RH in refrigeration showed a higher viable cell count when compared to the other RHs (22 and 33%) and at room temperature. Subsequently, the formulation was stored under a controlled RH of 11% and at refrigerated (4 °C) and ambient (25 °C) temperatures for 90 days, with viable cells being counted, the physiological profile of the cells evaluated, the measurement of QUE and RES content, and formulation antioxidant capacity. The physiological state of *L. fermentum* 296 cells was similar after a 15-day humidification period in the 3 RH conditions, and in the 90-day storage period at 11% RH there was also a similarity between the two temperatures (refrigeration and room temperature). *L. fermentum* 296 showed higher viable cell counts ($>6 \log \text{ CFU/g}$) up to day 90 of storage at refrigerated temperature than at room temperature both in the formulation containing the phenolic compounds and in the control formulation. During storage at refrigerated and ambient temperature, there were no losses in the content of QUE and RES and the antioxidant capacity of the formulation was maintained. The results showed that the highest potential functionality of the nutraceutical formulation evaluated during long-term storage (90 days) can be guaranteed under 11% RH and refrigeration temperature. This study contributed information that fills a gap regarding the stabilization process of lyophilized nutraceuticals with probiotics, quercetin and resveratrol after humidification under different RH and control of storage conditions.

Keywords: Probiotics; Phenolic Compounds; Nutraceutical; Stability; Functionality.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1.	Estrutura química da quercetina.	23
Figura 2.	Estruturas químicas do resveratrol.	24
Figura 3.	Mecanismo de ação da atividade antioxidante de bactérias do gênero <i>Lactobacillus</i> .	30
Figura 4.	Fluxograma dos procedimentos metodológicos.	33

FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1.	Representative DSC (A) and TG curves under air (B) and nitrogen (C) atmospheres of fructooligosaccharides (FOS), quercetin and resveratrol separately, as well as of LF and LRQF formulations under different humidity conditions (11% RH). LF: <i>Limosilactobacillus fermentum</i> 296 + FOS; LFQR: <i>L. fermentum</i> 296 + FOS + quercetin + resveratrol.	86
Figure 2.	Representative HPLC chromatograms of quercetin (A) and resveratrol (B) separately, as well as in LFQR under day 30 of refrigeration (C) and room temperature (D) storage. LFQR: <i>L. fermentum</i> 296 + FOS + quercetin + resveratrol.	87

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO DA DISSERTAÇÃO

- Quadro 1** Ensaios clínicos com a suplementação de diferentes doses de quercetina ou resveratrol com efeitos avaliados sobre a saúde. 25

TABELAS DO ARTIGO

- Table 1** Viable cell counts (log CFU/g) of *Limosilactobacillus fermentum* 296 in LF and LFQF before and after freeze-drying, after the 15-day-humidification period with controlled relative humidity (RH; 11, 22, and 33%), and during storage under refrigeration (RefT, 4 ± 0.5 °C) and room temperature (RoT, 25 ± 0.5 °C) at 11% RH. LF: *L. fermentum* 296 + FOS; LFQR: *L. fermentum* 296 + FOS + quercetin + resveratrol. 82
- Table 2.** Sizes (percent) of living cells (PI-cFDA+), injured (PI+cFDA+), and dead (PI+cFDA-) cells of *Limosilactobacillus fermentum* 296 in the nutraceutical formulation after the humidification period with controlled relative humidity (RH; 11, 22, and 33%), and during storage under refrigeration (RefT, 4 ± 0.5 °C) and room temperature (RoT, 25 ± 0.5 °C) at 11% RH. LF: *L. fermentum* 296 + FOS; LFQR: *L. fermentum* 296 + FOS + quercetin + resveratrol. 83
- Table 3** Contents (µg/mg) of quercetin and resveratrol in LFQR formulation, as measured by HPLC, during storage under refrigeration (RefT, 4 ± 0.5 °C) and room temperature (RoT, 25 ± 0.5 °C) at 11% relative humidity. LFQR: *L. fermentum* 296 + FOS + quercetin + resveratrol. 84
- Table 4** Antioxidant capacity of LFQR formulation, expressed as TEAC (mmol Trolox/µg), measured by absorption measurements with DPPH and ABTS assays, during storage under refrigeration (RefT, 4 ± 0.5 °C) and room temperature (RoT, 25 ± 0.5 °C) at 11% relative humidity. LFQR: *L. fermentum* 296 + FOS + quercetin + resveratrol. 85

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

a_a	Atividade de água
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico]
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ALT	Alanina aminotransferase
ARE	<i>Antioxidant response elemento</i>
AST	Aspartato aminotransferase
BAL	Bactéria ácido láctica
cFDA	Diacetato de carboxifluoresceína
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
FIM	<i>Foundation for Innovation in Medicine</i>
FOS	Frutooligossacarídeos
FSC	<i>Forward scatter</i>
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
GRAS	<i>Generally Regarded as Safe</i>
Keap1	<i>Kelch-like ECH-Associating protein</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
NF-κB	Fator nuclear kappa B
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2 related factor</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PBS	Tampão fosfato-salino
PI	Iodeto de propídio
QUE	Quercetina
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

RES	Resveratrol
SSC	<i>Side scatter</i>
STAT3	<i>Signal transducers and activators of transcription 3</i>
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente Trolox
TG	Termogravimetria
Tg	Temperatura de transição vítrea
TGI	Trato gastrointestinal
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidades formadoras de colônia
UR	Umidade relativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 FORMULAÇÕES NUTRACÊUTICAS	16
2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	20
2.2.1 Quercetina	21
2.2.2 Resveratrol	23
2.3 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS	27
2.4 INTERAÇÃO ENTRE COMPOSTOS FENÓLICOS E PROBIÓTICOS	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO E DESENHO EXPERIMENTAL.....	33
3.2 CEPA POTENCIALMENTE PROBIÓTICA E PREPARAÇÃO DO INÓCULO	33
3.3 PREPARAÇÃO DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES NUTRACÊUTICAS.....	34
3.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL E TERMOGRAVIMETRIA	35
3.5 CONTAGENS DE CÉLULAS VIÁVEIS	35
3.6 DETERMINAÇÃO DO ESTADO FISIOLÓGICO DAS CÉLULAS BACTERIANAS	36
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE QUE E RES NAS DIFERENTES FORMULAÇÕES	37
3.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	38
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
4. RESULTADOS	41
REFERÊNCIAS	42
APÊNDICES	53

1 INTRODUÇÃO

A caracterização físico-química de ingredientes sólidos de uma formulação nutracêutica é parte importante do processo de desenvolvimento do produto, pois suas propriedades podem impactar a estabilidade e as propriedades biológicas dos componentes bioativos presentes na formulação (DE ANDRADE *et al.*, 2020), havendo a correlação entre as propriedades térmicas de nutracêuticos em pó e as contagens de células viáveis nestes produtos (DANTAS *et al.*, 2021). A estabilidade das células de bactérias probióticas, por sua vez, depende principalmente da atividade de água (a_w) do produto e da umidade relativa em que o pó é armazenado, sendo que valores de a_w abaixo de 0,4 resultam geralmente em maior estabilidade na viabilidade das células durante o armazenamento prolongado (ROMANO *et al.*, 2018). Devido à exposição à água, umidade ou temperaturas variadas durante o processamento ou armazenamento, os compostos sólidos que contém hidroxilas podem resultar na formação de formas mais instáveis, amorfas, ou em uma mistura de formas cristalinas, sendo necessário que se avalie fatores como termoestabilidade, polimorfismos, incompatibilidades e degradação de produtos com matrizes sólidas (BORGHETTI *et al.*, 2012; JÚNIOR *et al.*, 2018).

Os nutracêuticos são importantes para a prevenção e tratamento de doenças relacionadas à microbiota intestinal (CHIU *et al.* 2020), uma vez que esta tem relação com funções fisiológicas, como absorção e metabolismo de nutrientes, regulação da imunidade, atividade antitumoral, atuação como barreira biológica, além da melhora de funções cognitivas e endócrinas (EASTWOOD *et al.*, 2021; GONG *et al.*, 2020), e quando desregulada, pode estar envolvida no surgimento de doenças crônicas não transmissíveis e outras condições indesejadas de saúde (OTEIZA *et al.*, 2018). Os principais componentes utilizados pela indústria são os probióticos, compostos fenólicos e fibras dietéticas (FENG *et al.* 2020).

O desafio de encapsular bactérias probióticas para formulação de nutracêuticos consiste na seleção de um grau adequado do material encapsulante e do processo apropriado que proporcione a manutenção da viabilidade das células bacterianas e longo tempo de armazenamento, especialmente se as células estiverem armazenadas sob temperatura e umidade ambientes (YING *et al.*, 2016). Dados da literatura revelam que a presença de compostos fenólicos aumenta a sobrevivência de probióticos em diferentes

matrizes alimentares, melhorando as características gerais de qualidade dos alimentos e potencializando os efeitos benéficos à saúde de ambos os componentes (SOUZA *et al.*, 2018). Dentre os compostos fenólicos, a quercetina (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) se destaca por ser um flavonóide que possui potencial de melhorar o balanço microecológico, com efeitos de aumento na adesão de espécies de *Lactobacillus*, e, consequente, otimização da colonização intestinal, além de modular os processos de encapsulação desses micro-organismos (CHÁVARRI *et al.*, 2010; VOLSTATOVA *et al.*, 2017). Por sua vez, o resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbeno) pertence ao grupo dos estilbenos, caracterizado como potente antioxidante. Ainda, possui a capacidade de estimular o crescimento de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. e melhorar os efeitos promotores de saúde de bactérias probióticas (ARCANJO *et al.*, 2019; MONTELLA *et al.*, 2013).

Em estudo anterior foi desenvolvida uma formulação nutracêutica composta por *Limosilactobacillus fermentum* 296, quercetina e resveratrol. A cepa *L. fermentum* 296 foi isolada de subprodutos do processamento de morango (GARCIA *et al.*, 2016) e testada em relação aos aspectos de segurança para o consumidor e funcionalidades fisiológicas *in vitro* e *in vivo*, com resultados que caracterizaram o seu potencial probiótico (ALBUQUERQUE *et al.* 2017; CAVALCANTE *et al.* 2019; FERREIRA *et al.*, 2022; FREIRE *et al.*, 2021a; FREIRE *et al.*, 2021b; OLIVEIRA *et al.* 2020). A formulação apresentou elevadas contagens de células viáveis da cepa probiótica durante exposição a condições simuladas do trato gastrointestinal e durante o armazenamento refrigerado prolongado (SAMPAIO, 2020).

Para estabelecer as condições de armazenamento que mantenham os aspectos relativos à funcionalidade da formulação composta por *L. fermentum* 296, quercetina e resveratrol, o presente estudo tem como objetivo avaliar a influência da umidade relativa no perfil fisiológico e na estabilidade térmica dessa formulação. Para isso, foram realizadas análises das condições fisiológicas e contagem de células viáveis de *L. fermentum* 296, calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria para mensurar a estabilidade térmica. Esse parâmetros também foram utilizados para avaliar a influência da temperatura de armazenamento da estabilidade da formulação, associados à quantificação de quercetina e resveratrol por cromatografia líquida de alta eficiência e a atividade antioxidante da formulação por redução dos radicais ABTS e DPPH para acompanhar a estabilidade dos compostos fenólicos presentes na formulação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FORMULAÇÕES NUTRACÊUTICAS

Os alimentos fornecem energia, gordura, proteínas, carboidratos e vitaminas para o corpo humano. No entanto, novos componentes bioativos presentes em alimentos têm sido alvo de pesquisas, como carotenóides, compostos fenólicos e glicosinolatos (NIJHAWAN, 2020), os quais têm sido explorados na composição de nutracêuticos. O termo “nutracêutico” foi usado pela primeira vez em 1989 pelo Dr. Stephen L. DeFelice, fundador e presidente da *Foundation for Innovation in Medicine* (FIM), sendo um híbrido das palavras “nutrição” e “farmacêutico”, e definido como “um alimento (ou parte de um alimento) que provê benefícios médicos ou à saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de uma doença” (GHAFFARI; ROSHANRAVAN, 2020).

Os compostos/componentes bioativos utilizados para a elaboração de nutracêuticos são derivados de várias plantas, vegetais e frutas, e podem exercer diversas funções no intestino, particularmente no cólon, incluindo redução de inflamação, inibição do desenvolvimento de câncer e promoção do crescimento de probióticos (FENG *et al.*, 2020). Estudos também têm mostrado os efeitos neuroprotetores de nutracêuticos por meio da regulação do metabolismo de energia, do estresse neuro-oxidativo e da neuroinflamação, bem como auxiliando na neurogênese (EASTWOOD; VENKATAKRISHNAN; WANG, 2020).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não reconhece o termo nutracêutico e sim alimentos com alegações de propriedade funcional e/ou de saúde. A alegação de propriedade funcional refere-se ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou o não nutriente desempenha no crescimento, desenvolvimento, manutenção e em outras funções normais do organismo humano. Já a alegação de propriedade de saúde afirma, sugere ou implica a existência de relação entre alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde (BRASIL, 1999).

Os suplementos de competência da ANVISA que veiculem essas alegações devem ser enquadrados e registrados na categoria de substâncias bioativas e probióticos isolados (Resolução nº 02, de 07 de janeiro de 2002) (BRASIL 1999, 2002). Também podem seguir a RDC 240/2018, que dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com

obrigatoriedade de registro sanitário; a RDC 241/2018, que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos; a RDC 243/2018, que dispõe sobre os requisitos para composição, qualidade, segurança e rotulagem dos suplementos alimentares e para atualização das listas de nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar destes produtos; e a IN 28/2018, que estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares.

Os nutracêuticos são comercializados na forma de pílulas, pós ou outras formas medicinais para fins específicos de saúde, sendo os suplementos para imunidade, suporte articular, nutrição esportiva, cuidados cardíacos, redutores de colesterol, fortalecimento de pele e cabelo, suplemento de colágeno e queima de gordura algumas das categorias mais vendidas no mercado em todo o mundo (TRIPATHI *et al.*, 2020).

Existem limitações na aplicação de compostos bioativos na indústria de alimentos e de nutracêuticos, como por exemplo a adição de compostos lipofílicos a matrizes aquosas, que podem comprometer tanto os aspectos sensoriais quanto a vida de prateleira do produto. Componentes com alto ponto de fusão também podem causar precipitação ou sabor desagradável na ingestão. Essa instabilidade química pode acarretar em degradação dos compostos durante o armazenamento. Estratégias, como o uso de nanocristais para compostos fenólicos, a exemplo do resveratrol, bem como o uso de nanopartículas, nanoencapsulação ou nanoemulsão têm sido exploradas para otimizar a estabilidade desses produtos no trato gastrointestinal (CHEN e HU, 2020).

Os principais obstáculos enfrentados para a estabilidade de probióticos em formulações nutracêuticas durante o armazenamento são as mudanças de pH, a presença de oxigênio, hidrogênio e peróxido, a umidade relativa e as altas temperaturas (YAO *et al.*, 2020). Assim, é necessária a implementação de métodos que permitam prever as condições de armazenamento de produtos desidratados de forma a preservar a viabilidade das células bacterianas. Isso pode ser feito por meio do controle dos valores de atividade de água e umidade dos produtos desidratados para permitir que as células das culturas probióticas mantenham suas funções estruturais e biológicas (RASCÓN *et al.*, 2018). No que diz respeito à viabilidade de culturas probióticas, a atividade de água é ainda mais importante que a umidade, pois se refere à água presente na matriz que não está ligada a

outras moléculas, estando disponível para o metabolismo dos microrganismos (VESTERLUND, SALMINEN, SALMINEN, 2012). Essa viabilidade pode ser observada por meio de métodos que avaliem o estado fisiológico das células, a exemplo da citometria de fluxo, pois muitas vezes sua atividade metabólica pode estar presente mesmo quando não há o aparecimento em cultivo em meio de cultura. Células nesse estado são chamadas de viáveis mas não cultiváveis, e entram nessa condição como uma resposta de proteção a um ambiente estressor. Esse estado fisiológico é reversível e ainda pode apresentar efeitos benéficos à saúde do hospedeiro após a suplementação (DAVIS, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2020).

A liofilização é uma técnica de secagem amplamente utilizada para preservar culturas probióticas na forma de pó desidratado, visto que aplica baixas temperaturas que tendem a ser menos danosas aos microrganismos. Quando empregada na elaboração de nutracêuticos gera produtos caracterizados pela baixa densidade, alta porosidade e boa retenção de aroma e sabor (PELLICER *et al.*, 2019; VELLY *et al.*, 2015). Nesse processo geralmente ocorre considerável redução do número de células bacterianas viáveis devido à redução da atividade de água, já que a perda de água ocasiona danos celulares. Assim, o uso de crioprotetores, como sacarose, glicerol ou proteínas, durante o método também é requerido para melhor proteção dessas células (OBRADOVIĆ *et al.*, 2022; TYMCZYSZYN *et al.*, 2011).

Os frutooligosacarídeos (FOS) surgem como agentes crioprotetores de culturas probióticas, cujo efeito sobre as cepas veiculadas se deve a dois fatores: i) a capacidade de repor moléculas de água durante a desidratação, mantendo as estruturas biológicas em condições hidratadas; e ii) a capacidade de formar matrizes vítreas (vitificação), interagindo com a membrana das bactérias e propiciando um estado de alta viscosidade e baixa mobilidade que impedem interações moleculares (ROMANO *et al.*, 2016; TYMCZYSZYN *et al.*, 2012).

Os FOS são compostos por um pequeno número de unidades de frutose ligadas por pontes (2→1)-β-glicosídicas, tendo uma única D-glicose terminal. Podem ser obtidos por síntese enzimática ou por hidrólise da inulina a partir de fontes naturais (MARTINS, 2019). O efeito protetor dos carboidratos em materiais desidratados se deve à sua habilidade de formar matrizes vítreas e suprimir a mudança de fase de cristalino para uma fase de gel (SIEMONS *et al.*, 2020).

Muitos carboidratos são usados para a encapsulação de probióticos por meio do processo de liofilização. No entanto, poucos estudos têm reportado o uso de FOS, provavelmente devido aos seus limites de aplicação por conta da sua baixa temperatura de transição vítrea (RAJAM; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015). A estabilização de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* com FOS foi avaliada por Romano *et al.* (2016), sendo relatado que o efeito do FOS na proteção das células bacterianas provavelmente se deu em decorrência da formação de estados vítreos.

A temperatura de transição vítrea (T_g) é a temperatura em que um polímero rígido deixa o estado endurecido, ou vítreo, para um estado mais flexível ou elástico (MICHEL; FERRIER, 2020). Assim, se a temperatura do meio aumenta e exceda a T_g , o material torna-se significativamente amolecido (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2020). Mudanças cumulativas na umidade relativa atmosférica em contato com o liofilizado acarretam em evolução da a_w do produto e consequente perda do estado amorfo, ideal para o sucesso do armazenamento, afetando a qualidade e estabilidade do material, especialmente quando se relaciona a culturas bacterianas (GONZÁLEZ *et al.*, 2020; ROMANO *et al.*, 2016). A adição de umidade em matrizes liofilizadas pode causar desequilíbrio e transformação do estado sólido em um estado mais plástico fluido quando a T_g é ultrapassada (SERNA-COCK; VARGAS-MUÑOZ; APONTE, 2015).

O estado físico da matriz do material encapsulado é crucial para a estabilidade das células bacterianas. Uma viscosidade extremamente alta dos produtos desidratados em estado amorfo pode reduzir a mobilidade molecular, minimizando reações químicas adversas. Para isso, a temperatura de armazenamento deve permanecer abaixo da T_g , e um dos fatores que influencia essa transição de estado é a atividade de água (DIANAWATI; MISHRA; SHAN, 2013). Dianawati *et al.* (2013) observaram por meio da análise de calorimetria exploratória diferencial que cepas de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis* microencapsuladas apresentaram maior T_g quando submetidas ao processo de secagem por liofilização quando comparada com a secagem por aspersão.

Para o controle da qualidade do produto armazenado, algumas técnicas são empregadas para verificar e validar as características de estabilidade microbiológica e estrutural dos componentes. A citometria de fluxo é um método empregado para avaliar mais de um parâmetro numa solução de células coradas com reagentes fluorescentes por meio da aplicação de lasers de luz (MCKINNON, 2018). A termogravimetria monitora ou

analisa perda ou agregação de massa à amostra em temperaturas variadas. Por sua vez, a calorimetria exploratória diferencial realiza a medida do fluxo de calor, sendo capaz de identificar mudanças de fase, sem que haja variações de massa, como mudanças estruturais, reações e transições sólido-sólido, cristalização, fusão, dentre outras (MITIĆ *et al.*, 2017).

A cromatografia líquida de alta eficiência pode ser utilizada para separação e identificação de compostos através da passagem da amostra por uma coluna contendo uma fase estacionária específica, que irá interagir de forma diferente com cada composto, seja hidrofílico ou hidrofóbico, permitindo um diferente tempo de passagem e, consequentemente, quantificação dos componentes de forma precisa. Durante o armazenamento, essa técnica pode ser empregada para avaliar a degradação de compostos fenólicos por meio da medida de mudanças no seu conteúdo nas amostras analisadas (ESTEKIA; SHAHSAVARIA; SIMAL-GANDARA, 2019; RUMIŃSKA *et al.*, 2021).

2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados pelas células de plantas, sendo um grande e estruturado grupo de componentes orgânicos com diferentes propriedades químicas, físicas e biológicas. São divididos em fenóis simples, como ácidos fenólicos e alcoóis fenólicos, e polifenóis, como flavonoides, lignanas, estilbenos e taninos. Uma característica comum é a presença do grupo hidroxil conectado diretamente ao anel aromático (KORZENIOWSKA; ŁĘSKA; WIECZOREK, 2020).

Os compostos fenólicos possuem de forma geral moderada solubilidade em água e peso molecular de 500 a 4000 Dalton. São reportados como tendo diversos efeitos biológicos, incluindo propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antiviral, além de desempenharem importante papel na prevenção de várias doenças, como câncer e doenças cardiovasculares. Do ponto de vista econômico, a *Grand View Research* anunciou que o mercado global de compostos fenólicos foi avaliado em USD \$1,28 milhões de dólares em 2018, e que houve um incremento de 7,2% nesse valor em 2019, o que se deve ao aumento da conscientização de saúde pelos consumidores e aumento da população geriátrica em certos segmentos geográficos (SIACOR *et al.*, 2020).

Comumente, os compostos fenólicos são usados como antioxidantes em alimentos a fim de aumentar a vida de prateleira. Além disso, já foram relatados efeitos antimicrobianos sobre *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *A. flavus* e *A. parasiticus* (LI *et al.*, 2020).

Poucos estudos têm avaliado a bioacessibilidade de compostos fenólicos, que é definida como a quantidade do constituinte que chega ao intestino pela liberação da matriz ingerida, estando disponível para atravessar a barreira intestinal. Sampaio *et al.* (2020) submeteram formulações nutracêuticas contendo cepas de *Limosilactobacillus fermentum* (139, 263 e 296), quercetina e/ou resveratrol à digestão gastrointestinal *in vitro* para estimar a bioacessibilidade destes compostos e observaram valores de bioacessibilidade potencial maior que 50% para o resveratrol e maiores que 29% para a quercetina, os quais foram similares aos reportados em outros estudos (CHEN *et al.*, 2018; QIU *et al.*, 2017).

O meio gastrointestinal, com suas variações de pH e enzimas, pode afetar as moléculas bioativas. Embora haja uma baixa absorção desses componentes no lúmen intestinal, a microbiota colônica fermenta os compostos fenólicos com a produção de metabólitos que, por sua vez, serão absorvidos. Assim, as propriedades biológicas dos compostos fenólicos dietéticos não dependem apenas da quantidade ingerida, mas da fração que é liberada pela matriz alimentar que virá a ser disponível para absorção (GARZÓN; VAN DE VELDE; DRAGO, 2020).

Fatores como a presença de iluminação incandescente, irradiação solar e ultravioleta, são responsáveis pela degradação da quercetina e pela conversão do trans-resveratrol na sua forma menos bioativa. Quercetina e resveratrol são facilmente oxidáveis e hidrolisáveis, revelando uma maior necessidade de haver um controle das condições de armazenamento para a manutenção da sua funcionalidade (LIU, *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2022; ZHU *et al.*, 2021).

2.2.1 Quercetina

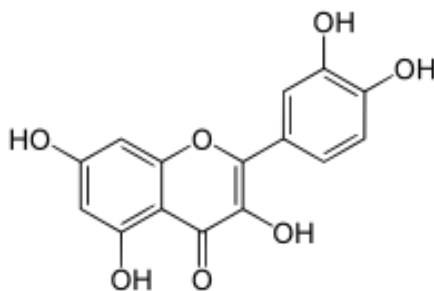
Os flavonoides são considerados uma classe de fitoquímicos polifenóis que inibem a inflamação em muitos modelos animais de doenças crônicas, além de reduzirem a inflamação intestinal (PEI; LIU; BOLLING, 2020). A quercetina é um tipo de flavonoide

dietético encontrado em várias frutas e vegetais, como cerejas, brócolis, cebola roxa e manga. É composta por dois anéis benzeno ligados a um anel pirona. Recentemente, suas atividades, como antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, antineoplásico, neuroprotetor e antialérgico, têm sido comprovadas (WANG *et al.*, 2020).

A biodisponibilidade da quercetina pode variar de 0 a 50%. Este composto permeia o epitélio intestinal de forma passiva, podendo ser metabolizada pelos enterócitos e hepatócitos, formando componentes glicuronidados, sulfatados ou metilados. Seus principais metabólitos são quercetina-3-glicuronídeo, 3'-metilquercetina-3-glicuronídeo e quercetina-3'-sulfato. A suplementação oral de quercetina em doses acima de 1 g por dia por três meses não resultou em efeitos adversos. Porém, a administração intravenosa de quercetina em doses de 10,5 mg/Kg em pacientes com câncer resultou em náuseas, sudorese, vômitos, rubor e dispneia, enquanto doses de 51,3 mg/Kg apresentaram toxicidade renal (BIANCATELLI *et al.*, 2020).

De acordo com a EFSA (2011), a quercetina pode ser utilizada com a proposta de benefícios de proteção do DNA, das proteínas e dos lipídios contra danos oxidativos, embora tenha sido relatado que benefícios à saúde cardiovascular, mental, hepática e renal precisariam ser mais bem explorados. Estudos mais recentes mostram que a suplementação de quercetina com doses de 120 a 190 mg por dia pode reduzir a pressão sanguínea sistólica (BRÜLL *et al.*, 2015), biomarcadores cardiovasculares, como colesterol total, colesterol não-HDL e apolipoproteína B (BURAK *et al.*, 2019), exercer efeitos anti-inflamatórios por redução de IL-1 β , IL-10 e TNF- α (CHEKALINA *et al.*, 2019) e aumentar função endotelial, reduzindo inflamação e contribuindo para efeitos cardioprotetores (DOWER *et al.*, 2015). Porém, o maior problema com o uso terapêutico da quercetina é sua baixa solubilidade em água, baixa bioacessibilidade e transformação bioquímica em condições fisiológicas (CHOUDHARY *et al.*, 2020; CAI *et al.*, 2013).

Figura 1. Estrutura química da quercetina.



Fonte: Imran *et al.* (2020).

2.2.2 Resveratrol

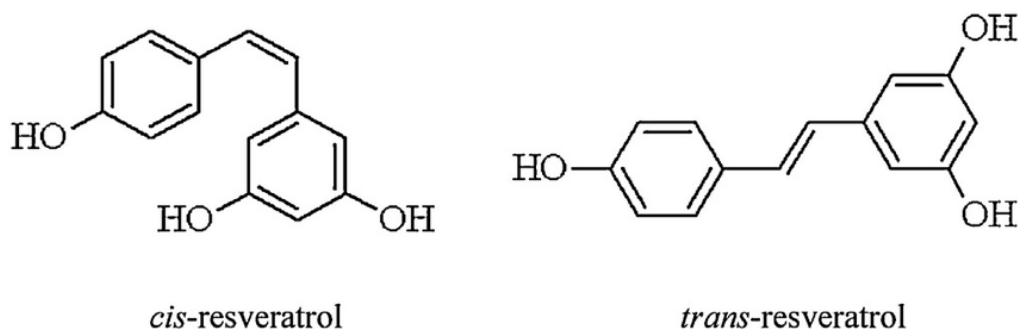
Os estilbenos têm recebido grande atenção por suas funções na saúde, como atividades antioxidante e anticâncer (ZHOU, 2020). O resveratrol é um estilbeno presente em muitas plantas, atuando na resposta a injúrias ou a patógenos, como bactérias e fungos. As fontes alimentares de resveratrol incluem uvas, mirtilos, framboesas e amoras, além de ser encontrado em elevada concentração no vinho tinto (REPOSSI, 2020). A literatura relata diversos efeitos bioativos desse composto, como antioxidante, anti-inflamatório, anticâncer, cardioprotetor, neuroprotetor e regulador da homeostase de glicose (CHEN *et al.*, 2019).

Apesar de apresentar boa taxa de absorção quando ingerido por via oral, podendo alcançar biodisponibilidade de 70%, o intenso metabolismo no fígado e nos intestinos reduz a disponibilidade sistêmica do resveratrol para 5%, formando compostos glicuronidados e sulfatados com menor atividade biológica. Seu isômero *trans* aparenta ser mais biologicamente ativo que seu isômero *cis*, mas fatores como a oxidação pelo ar, exposição a luz, bem como a oxidação enzimática e as altas temperaturas podem levar à conversão da forma *trans* para a *cis* (ROBERTSON *et al.*, 2022).

Sintomas gastrointestinais e diarreia podem aparecer em casos de suplementação de resveratrol com doses acima de 1 g por dia, sendo consenso da EFSA (2016) que a suplementação com doses de 150 mg por dia é considerada segura. Alguns estudos clínicos realizados com a suplementação de resveratrol com doses de 75 a 150 mg por dia obtiveram resultados positivos na redução de colesterol total e triglicerídeos em indivíduos dislipidêmicos (SIMENTAL-MENDÍA; GUERRERO-ROMERO, 2019), na melhora de

humor e cognição e redução do risco de desenvolvimento de demência em mulheres pós-menopausa (EVANS; HOWE; WONG, 2016), melhora da taxa de ultrafiltração renal (LIN; SUN; LIN, 2016) e aumento da capacidade de acoplamento neurovascular (WONG; RAEDERSTORFF; HOWE, 2016). No entanto, trona-se necessário o uso de estratégias para estabilizar o resveratrol durante a digestão, considerando que apenas 70% da quantidade ingerida é absorvida, revelando um alto metabolismo intestinal (NAVARRO *et al.*, 2018; WALLE *et al.*, 2004).

Figura 2. Estruturas químicas do resveratrol.



Fonte: Venuti *et al.* (2018).

No Quadro 1 são mostrados os resultados de estudos clínicos realizados com a suplementação de resveratrol e de quercetina, seja em dose única ou por um período de tratamento, principalmente no manejo de condições inflamatórias, dislipidêmicas e cardiovasculares.

Quadro 1. Ensaios clínicos com a suplementação de diferentes doses de quercetina ou resveratrol com efeitos avaliados sobre a saúde.

Autor	Composto	Dose	Resultados
ARZOLA-PANIAGUA <i>et al.</i> (2016)	Resveratrol	100 mg (6 meses)	Maior perda de peso, de circunferência da cintura e aumento dos níveis de leptina em indivíduos em dietas com restrição calórica, quando combinado com o medicamento orlistat.
BASHMAKOV <i>et al.</i> ... (2014)	Resveratrol	2x50 mg (60 dias)	Redução do tamanho de úlceras no pé e redução dos níveis de fibrinogênio no plasma em pacientes com diabetes mellitus tipo 2.
BHATT <i>et al.</i> (2012)	Resveratrol	250 mg (3 meses)	Redução da pressão sistólica sanguínea e dos níveis de colesterol total, LDL e hemoglobina glicada em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.
BRÜLL <i>et al.</i> (2015)	Quercetina	162 mg (6 semanas)	Redução de 3.6 mmHg da pressão sistólica sanguínea em indivíduos com sobrepeso e obesos.
BURAK <i>et al.</i> (2019)	Quercetina	190 mg (8 semanas)	Redução de biomarcadores cardiovasculares como colesterol total, colesterol não-HDL, endotelial e apolipoproteína B em adultos saudáveis não obesos.
CHEKALINA <i>et al.</i> (2018)	Quercetina	120 mg (2 meses)	Efeitos anti-inflamatórios, redução dos níveis de IL-1 β , IL-10, e TNF- α , e redução da atividade da NF- κ B em pacientes com doença arterial coronariana.
CHEN <i>et al.</i> (2015)	Resveratrol	2x150 mg (3 meses)	Redução de ALT, AST, marcadores inflamatórios (TNF- α), LDL, colesterol total, resistência à insulina e glicemia em indivíduos com esteatose hepática não-alcoólica.
CHOI <i>et al.</i> (2015)	Quercetina	100 mg (12 semanas)	Melhora de função endotelial através da dilatação fluxo-mediada em indivíduos com sobrepeso e obesos.
DOWER <i>et al.</i> (2015)	Quercetina	160 mg (4 semanas)	Efeitos cardioprotetores melhorando a função endotelial e reduzindo a inflamação em homens e mulheres hipertensos.
EVANS <i>et al.</i> , (2017)	Resveratrol	75 mg (14 semanas)	Melhora de humor e cognição, e redução do risco de desenvolvimento de demência em mulheres pós menopausa.
FUJITAKA <i>et al.</i> (2011)	Resveratrol	100 mg (3 meses)	Melhora de função endotelial através da dilatação fluxo-mediada em indivíduos com síndrome metabólica.
HUSSAIM <i>et al.</i> (2012)	Quercetina	400 mg (dose única)	Redução da glicemia pós-prandial por inibição da α -glucosidase em pacientes com diabetes mellitus tipo 2.
KIM & YIM (2015)	Quercetina	100 mg (12 semanas)	Efeito antioxidante prevenindo a redução da atividade da enzima superóxido dismutase, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio em mulheres obesas.
LEE <i>et al.</i> (2011)	Quercetina	100 mg (10 semanas)	Melhora do perfil lipídico, da glicemia e da pressão arterial em indivíduos homens fumantes saudáveis.

LEE <i>et al.</i> (2016)	Quercetina	100 mg (12 semanas)	Redução de peso e de percentual de gordura em indivíduos com sobrepeso e obesidade.
LIN <i>et al.</i> (2016)	Resveratrol	150 mg (12 semanas)	Melhora no volume e taxa de ultrafiltração em pacientes de diálise peritoneal.
MAZLOOM <i>et al.</i> (2014)	Quercetina	250 mg (8 semanas)	Melhora do perfil antioxidante e redução de LDL oxidado em pacientes com diabetes melittus tipo 2.
SIMENTAL-MENDÍA, GUERRERO-ROMERO (2019)	Resveratrol	100 mg (2 meses)	Redução nas concentrações de colesterol total e triglicerídeos em indivíduos com dislipidemia.
TIMMERS <i>et al.</i> (2011)	Resveratrol	150 mg (30 dias)	Redução da pressão sistólica sanguínea, do índice HOMA, da glicose e triglicerídeos circulantes, e de marcadores inflamatórios em homens obesos.
WITTE <i>et al.</i> (2014)	Resveratrol	200 mg (26 semanas)	Redução de TNF- α e IL-6 e melhora do perfil de hemoglobina glicada em adultos saudáveis com sobrepeso.
WONG <i>et al.</i> (2013)	Resveratrol	75 mg (6 meses)	Melhora de função endotelial através da dilatação fluxo-mediada em indivíduos obesos.
WONG <i>et al.</i> (2016)	Resveratrol	75 mg (dose única)	Melhora da capacidade de acoplamento neurovascular e do desempenho em teste multi-tarefa em indivíduos com diabetes melittus tipo 2.
ZAHEDI <i>et al.</i> (2013)	Resveratrol	40 mg (6 semanas)	Redução de TNF- α e IL-6 em jogadores de basquete profissionais.
ZHU <i>et al.</i> (2012)	Resveratrol	50 mg (12 semanas)	Redução da metilação de do gene supressor do câncer de mama RASSF-1 α com o aumento dos níveis séricos de resveratrol.

2.3 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

Probióticos são definidos como “organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” e podem atuar benéficamente sobre a microbiota intestinal. Esse grupo de micro-organismos começaram a ter seu valor comercial reconhecido apenas a partir do século 20, sendo uma área dominada pelas companhias de alimentos e suplementos nutricionais (O'TOOLE; MARCHESI; HILL, 2017). Para obterem essa nomenclatura, devem ser viáveis de armazenamento, e devem sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal, aderindo à mucosa intestinal do hospedeiro. Estudos têm comumente estabelecido uma dose de 10^6 - 10^8 UFC/g ou mL para resistir à digestão e chegar ao intestino nas quantidades adequadas, porém a quantidade mínima recomendada não é bem estabelecida, e os efeitos variam conforme a espécie e da matriz (GROM *et al.*, 2020).

Os produtos probióticos são encontrados em duas categorias, laticínios (alimentos funcionais) e não laticínios (incluindo suplementos farmacêuticos ou nutracêuticos), e podem conter uma ou mais cepas selecionadas. Os gêneros trabalhados mais comumente para o desenvolvimento de produtos probióticos são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. Algumas cepas do gênero *Bacillus* e *Saccharomyces* também são utilizadas. O mecanismo de ação, ainda não totalmente elucidado, pode ser resumido em três aspectos: i) modulação da composição da microbiota, ii) estimulação da função da barreira intestinal, e iii) indução de respostas imunológicas (AL-QYSI *et al.*, 2020).

Os gêneros de bactérias mais explorados como probióticos são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, os quais possuem o status *Generally Regarded as Safe* (GRAS) nos Estados Unidos, ou *Qualified Presumption of Safety* pela *European Food Safety Authority* (EFSA) (O'TOOLE; MARCHESI; HILL, 2017). O gênero *Lactobacillus* é um membro comum do intestino delgado de humanos e outros mamíferos, mostrando importante papel na regulação da homeostase. É uma bactéria láctica (BAL) heterofermentativa comumente encontrada em vegetais fermentados, possuindo alegação de GRAS. Além disso, faz parte da microbiota intestinal infantil, vaginal, e do

leite humano, além de serem frequentemente isoladas da microbiota fecal de idosos saudáveis (ALE *et al.*, 2020).

Limosilactobacillus fermentum, anteriormente denominado *Lactobacillus fermentum* (ZHENG *et al.*, 2020), é encontrado não apenas em ecossistemas vegetais de fermentação alimentar, mas também em ambientes como leite humano, cólon, trato urogenital e cavidade oral (VERCE, DE VUYST e WECKX, 2020). As bactérias lácticas possuem a enzima óxido nítrico sintase (NOS) que oxida a L-arginina em L-citrulina e óxido nítrico (NO). Em mamíferos, o NO está envolvido em processos biológicos relacionados à inibição patogênica da regulação da pressão sanguínea (LUO *et al.*, 2020). Os benefícios comprovados dos microrganismos probióticos à saúde são cepa dependentes e não devem ser extrapolados para outras cepas (ALMADA *et al.*, 2016; ZENDEBOODI *et al.*, 2020).

Toshimitsu *et al.* (2019) realizaram a suplementação de *Lactiplantibacillus plantarum* OLL2712 em 30 indivíduos de 35 a 65 anos com níveis de glicose entre 105 e 130 mg/dL e observaram melhora nos níveis de glicose plasmática, de glicalbumina e de resistência à insulina, além de redução de proteína quimiotática de monócitos 1 e interleucina 6. No estudo de Mikelsaar *et al.* (2020), a suplementação da cepa *L. plantarum* Inducia DSM21379 em 12 voluntários aumentou a excreção urinária de derivados de poliaminas, o que foi associado com elevação moderada de monócitos e interleucina 6, indicando uma modulação positiva da defesa imune inata.

Um estudo de revisão sistemática indicou que a suplementação de diferentes compostos bioativos, a exemplo de hesperidina, curcumina, rutina, ácido ferúlico, ácido gálico, extratos ricos em compostos fenólicos e flavonoides, é eficaz na melhora de sintomas e marcadores associados com doenças de Huntington, Alzheimer e Parkinson (ARRUDA *et al.* 2020).

Garcia *et al.* (2016) isolaram e identificaram BAL de subprodutos do processamento de frutas como abacaxi, acerola, graviola, manga e morango. A cepa *L. fermentum* 296 foi identificada dentre os demais gêneros e espécies. Foram realizados testes *in vitro* para avaliar o potencial probiótico por Albuquerque *et al.* (2017), seguindo uma série de testes para verificação das propriedades de segurança (susceptibilidade a antibióticos, atividade hemolítica e degradação de mucina), de funcionalidade fisiológica (tolerância a ácidos e sais biliares, desconjugação de sais

biliares, hidrofobicidade da superfície celular, autoagregação e coagregação com *L. monocytogenes* e *E. coli*, atividade antagonista a patógenos e exposição a condições de trato gastrointestinal simulado) e tecnológicas (atividade proteolítica e lipolítica, tolerância a NaCl e produção de exopolissacarídeo e de diacetil). Foram observados bons resultados nas condições avaliadas, estando a cepa *L. fermentum* 296 entre as que obtiveram melhor desempenho no conjunto de testes realizados, sendo compatível com propriedades probióticas e caracterizada como candidato para inclusão em testes *in vivo* e testes clínicos subsequentes.

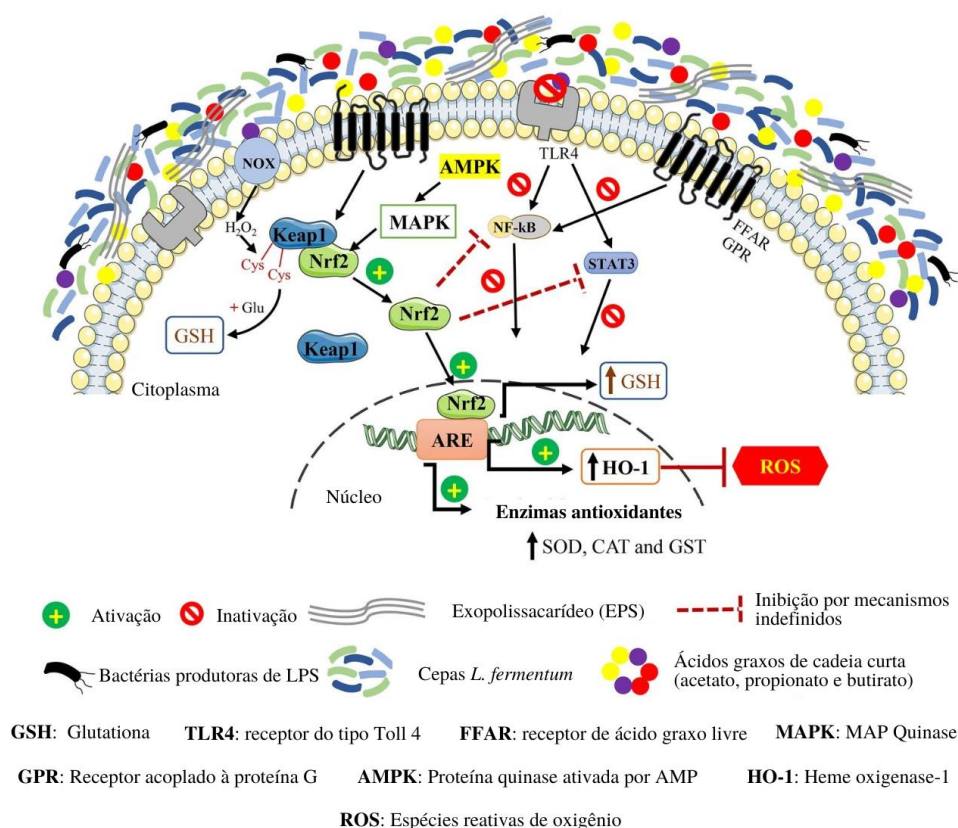
Cavalcante *et al.* (2019) realizaram testes *in vivo* suplementando 1×10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de *L. fermentum* 296 em ratos machos recebendo dieta *high fat*, com o objetivo de avaliar os efeitos em parâmetros de perfis lipídicos e glicídicos, além de parâmetros cardiovasculares. Após quatro semanas de intervenção, foram observadas melhoras em parâmetros alterados em desordens cardiometabólicas, como colesterol, triglicerídeos e pressão sanguínea, sugerindo-se que a administração de *L. fermentum* 296 pode ser uma estratégia para a prevenção da hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia induzidas pela dieta.

Oliveira *et al.* (2020) realizaram testes pré-clínicos com a suplementação pós-desmame de 1×10^9 UFC de *L. fermentum* 296 em ratos machos e fêmeas da prole expostos a dislipidemia materna durante gestação e lactação. Foram avaliados pressão sanguínea, tônus simpático, barorreflexo, quimiorreflexo periférico e parâmetros glicolipídicos. A intervenção por oito semanas produziu efeitos positivos de redução da colesterolemia, com melhora do perfil lipídico e dos níveis séricos de malondialdeído, além de ter atenuado a resposta excitatória simpática, o tônus simpático e o estresse oxidativo. A cepa *L. fermentum* 296 também foi administrada em um mix com outras cepas (*L. fermentum* 139 e *L. fermentum* 263) em ratos wistar submetidos à dieta *high fat*, sendo observados redução de hiperglicemia e hiperlipidemia e aumento da capacidade antioxidante no cólon e no coração em ratos machos (FREIRE *et al.*, 2021a), bem como elevação do conteúdo de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes e aumento da capacidade oxidativa no coração, cólon, fígado e rins nas fêmeas (FREIRE *et al.*, 2021b). Além disso, essa suplementação em ratos machos sob as mesmas condições de dieta causou melhora no perfil da microbiota intestinal, com aumento da população de Firmicutes e redução da população de Proteobactérias e Epsilonbacteraeota e melhora

do perfil lipídico, da resistência insulínica, da disfunção autonômica e da pressão sanguínea (FERREIRA *et al.*, 2022).

Há a hipótese de que a atividade antioxidante de *Lactobacillus* se deve a ativação da via Keap1/Nrf2/ARE e inativação da via NF- κ B/STAT3, com a produção de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase, conforme mostrado esquematicamente na Figura 3 (NASCIMENTO *et al.*, 2022).

Figura 3. Mecanismo de ação da atividade antioxidante de bactérias do gênero *Lactobacillus*.



Fonte: Traduzido e adaptado de Nascimento *et al.* (2022).

Dessa forma, o mecanismo proposto justificaria os resultados dos estudos em modelos animais, em que foram observados o aumento da capacidade antioxidante em órgãos específicos após a suplementação com cepa isolada ou com a combinação de diferentes cepas.

2.4 INTERAÇÃO ENTRE COMPOSTOS FENÓLICOS E PROBIÓTICOS

Comumente, os compostos antioxidantes são adicionados juntos às bactérias probióticas na formulação de nutracêuticos com a finalidade de causarem proteção a estes microrganismos contra danos oxidativos. Os agentes antioxidantes usados no encapsulamento podem ser naturais, como a quercetina, o α -tocoferol, o carvacrol e o catecol, ou compostos fenólicos sintéticos, ácidos orgânicos ou enzimas. Estudos com a incorporação de agentes antioxidantes no encapsulamento têm demonstrado bons resultados na redução da oxidação lipídica e no controle do crescimento microbiano em alimentos (BRAGA, 2019). Os compostos fenólicos afetam a sobrevivência de bactérias probióticas e possuem atividade antimicrobiana frente a microrganismos patogênicos, a exemplo de *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus mutans*, e fungos, como *Candida albicans*, *Microsporium gypseum* e *Trichophyton rubrum* (CHAN *et al.*, 2018).

Tem-se evidenciado os efeitos dos compostos fenólicos também no aumento da adesão, crescimento e sobrevivência de cepas probióticas, demonstrando proteção as células bacterianas frente as condições encontradas na passagem gastrointestinal (SOUZA *et al.*, 2018). Llano *et al.* (2017) consideraram que os efeitos benéficos dos compostos fenólicos sobre os probióticos se devem ao metabolismo desses compostos pelos probióticos, ao impacto dos compostos fenólicos na capacidade dos probióticos de inibirem a adesão de patógenos às células intestinais e à sua influência na viabilidade dos probióticos. Assim, os autores testaram a combinação dos polifenóis do vinho com cepas probióticas específicas de oito diferentes *blends* comerciais e comprovaram que algumas cepas de BAL são capazes de metabolizar compostos fenólicos, liberando metabólitos conhecidamente produzidos *in vivo* após o consumo do vinho.

Araújo *et al.* (2020) avaliaram o efeito protetor de subprodutos de frutas, como acerola, caju e goiaba, sobre a estabilidade das cepas *Lacticaseibacillus paracasei* L10, *Lacticaseibacillus casei* L-26 e *Lactobacillus acidophilus* LA-05 durante a liofilização e armazenamento. Foi observado aumento da estabilidade dos probióticos nos processos de desidratação e vida de prateleira sob refrigeração, o que foi associado com os altos teores de compostos fenólicos presentes nessas frutas e nos seus resíduos. Por sua vez, Oliveira *et al.* (2020) verificaram aumento do conteúdo de compostos fenólicos totais

no subproduto do processamento de acerola e goiaba quando fermentadas com um *blend* de *L. casei* L-26, *L. fermentum* 56, *L. paracasei* 106 e *L. plantarum* 53.

Características de tolerância a diferentes valores de pH, autoagregação, coagregação e antagonismo a patógenos por cepas de *Lactobacillus* na presença de quercetina e resveratrol foram avaliadas por Santos *et al.* (2019). Foi observado que, embora a tolerância das cepas testadas ao pH ácido e aos sais biliares não tenha sido alterada, houve aumento da sua hidrofobicidade da superfície e da habilidade de agregação e coagregação, e, em alguns casos, aumento da sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.

A combinação de quercetina e resveratrol também foi avaliada na modulação da microbiota intestinal em ratos com obesidade induzida por dieta *high fat* associada à disbiose. Foi demonstrada a redução do ganho de peso, da massa de tecido adiposo visceral, dos lipídios séricos e inflamação, bem como diminuição da abundância de *Firmicutes* nas fezes (ZHAO, *et al.*, 2017).

Sampaio *et al.* (2021) desenvolveram e avaliaram *in vitro* formulações nutracêuticas compostas pelas cepas de *L. fermentum* 139, 263 e 296, quercetina e resveratrol, com base na sua estabilidade durante o armazenamento e durante a simulação de trato gastrointestinal (TGI). Foram observadas contagens maiores que 9 log UFC/mL até o final de 90 dias de armazenamento sob refrigeração, enquanto sob temperatura ambiente houveram reduções significativas nas contagens das três cepas. Também foi observado que QUE e RES protegeram *L. fermentum* durante a exposição ao TGI simulado.

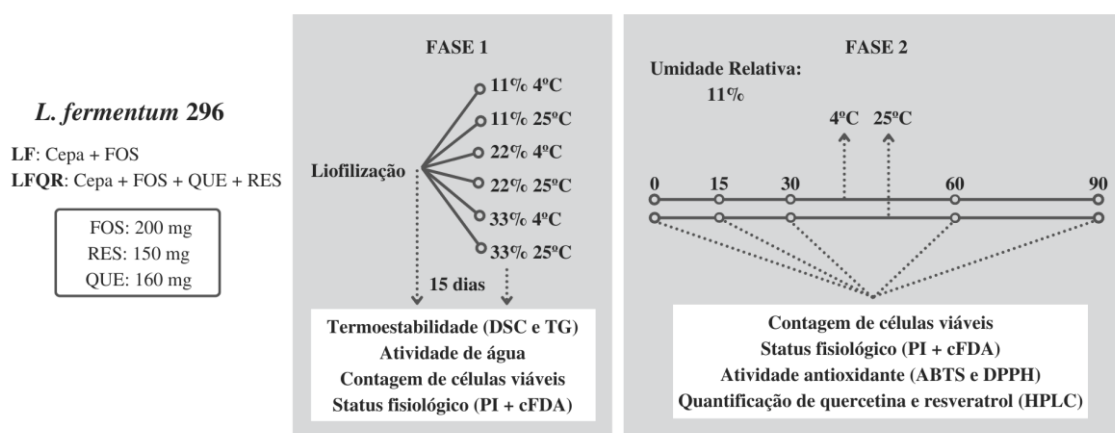
Considerando-se que a umidade, a temperatura, a oxidação e a temperatura de fusão de alguns compostos são fatores que influenciam na estabilidade biológica e na utilização tecnológica dos componentes dos nutracêuticos, especificamente os compostos fenólicos e probióticos, torna-se de interesse a investigação das características térmicas da formulação nutracêutica contendo *L. fermentum* 296, quercetina e resveratrol para determinação das temperaturas de transição vítrea, fusão e degradação dos seus componentes em diferentes umidades relativas e, conseqüentemente, valores de a_w , bem como verificar o efeito do armazenamento em diferentes temperaturas com umidade relativa controlada na estabilidade da formulação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO E DESENHO EXPERIMENTAL

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos/Departamento de Nutrição/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba (LMBA/CCS/UFPB), Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises/Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos/Universidade Federal da Paraíba (LMCA/IPeFarM/UFPB), Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico/Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba (LCQFC/DCF/UFPB) e no Laboratório de Bromatologia/Departamento de Nutrição/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba (LABROM/DN/UFPB). A Figura 4 abaixo representa o desenho condutor do estudo, contendo as etapas de umidificação (fase 1) e armazenamento (fase 2), e as respectivas análises realizadas em cada momento.

Figura 4: Fluxograma dos procedimentos metodológicos.



Fonte: Autor.

3.2 CEPA POTENCIALMENTE PROBIÓTICA E PREPARAÇÃO DO INÓCULO

A cepa *L. fermentum* 296 isolada de subprodutos de processamento de morango (GARCIA *et al.*, 2016) e previamente caracterizada como potencialmente probiótica

(ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; GARCIA *et al.*, 2016) foi utilizada para a produção das diferentes formulações nutraceuticas. Essa cepa foi identificada usando a análise de sequenciamento do gene 16S rRNA (GARCIA *et al.*, 2016). As culturas estoques foram armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em caldo de Mann, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, Índia) contendo glicerol (20 mL/100 mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Antes da utilização nos ensaios, a cepa foi cultivada em caldo MRS (HiMedia, Mumbai, Índia) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 - 24 h (fase estacionária de crescimento), centrifugada ($4000\times\text{ g}$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), lavada em solução salina esterilizada (0,85 g/100 mL) e ressuspensa em água esterilizada para obter suspensões celulares com contagens de células viáveis de aproximadamente 10 log de Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL) quando inoculada em ágar MRS (HiMedia).

3.3 PREPARAÇÃO DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES NUTRACÊUTICAS

A suspensão recém-preparada da cepa de *L. fermentum* 296 foi usada para produção de duas formulações diferentes, sendo: i) cepa suspensa em água destilada esterilizada (1 mL) com fruto-oligossacarídeos [FOS, 20% p/v; contendo de 30 a 42% de 1-Kestose (GF2), 45 A 57% de Nistose (GF3), e 5 a 15% de Frutofuranosil nistose (GF4)], denominada LfF (controle); e ii) cepa suspensa em água destilada esterilizada (1 mL) com RES (150 mg) + QUE (160 mg) + FOS (200 mg), denominada LfFQR. As concentrações de QUE e RES foram selecionadas de acordo com doses efetivas e seguras sugeridas por meta-análises de ensaios clínicos utilizando esses compostos para obtenção de benefícios cardioprotetores (DOWER *et al.*, 2015; EFSA, 2016). FOS, QUE e RES foram obtidos da Sigma-Aldrich (pureza $\geq 95\%$; St. Louis, EUA).

As diferentes formulações foram submetidas ao congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h, sendo em seguida liofilizadas em temperatura de $-55 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, com pressão de vácuo $<138\text{ }\mu\text{HG}$, taxa de liofilização de 1 mm/h, por aproximadamente 40 horas, utilizando liofilizador de bancada (LIOTOP, Modelo L-101, São Carlos, SP, Brasil). Em seguida, as amostras foram distribuídas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 dias sob proteção de luz em criotubos abertos dentro de dessecadores contendo soluções saturadas de cloreto de lítio (20 g/5 mL de água destilada), acetato de potássio (20 g/6,5 mL de água destilada) e

cloreto de magnésio (35 g/2 mL de água destilada) (Sigma Aldrich) para o alcance de atmosfera controlada em 11, 22 e 33% de umidade relativa, conferindo, respectivamente, atividades de água de 0,18, 0,26 e 0,30 para a formulação LF, e 0,19, 0,27 e 0,29 para a formulação LFQR na etapa de umidificação. Os valores de atividade de água foram determinados em equipamento medidor de atividade de água (Novasina apparatus, model LabSwift- a_w , Lachen, Suíça).

Após o período de umidificação, os criotubos foram tampados, sendo mantidos em dessecadores contendo a umidade relativa cujas amostras apresentaram as mais elevadas contagens de células viáveis, e armazenados sob refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) e temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) por 90 dias sob proteção de luz.

3.4 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL E TERMOGRAVIMETRIA

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) foram utilizadas para determinar mudanças físicas, químicas e estruturais nas formulações após a liofilização. As curvas DSC foram obtidas em um calorímetro modelo DSC-50 (Shimadzu, Kyoto, Japão) utilizando o software TasyS (Shimadzu) em uma única repetição. 2 mg de cada formulação foram pesados em um cadinho de alumínio fechado e a análise foi realizada a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min até atingir 450 °C sob atmosfera de nitrogênio e vazão de 50 mL/min. As curvas TG foram obtidas com um calorímetro modelo TGA-50 (Shimadzu) utilizando o software TasyS em uma única repetição. 5 mg de cada formulação foram pesados em cadinho de alumina e a análise foi realizada a uma taxa de 10 °C/min até atingir 900 °C sob atmosfera de ar sintético e vazão de 20 mL/min.

3.5 CONTAGENS DE CÉLULAS VIÁVEIS

As contagens de células viáveis de *L. fermentum* 296 foram determinadas antes e após liofilização, no dia 15 de umidificação e durante o armazenamento (dia zero, 15, 30, 60 e 90, a 11% UR). As formulações foram reidratadas com 1 mL de água destilada esterilizada à temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) por 15 min. Diluições seriadas foram

subsequentemente realizadas com solução salina esterilizada (NaCl, 0,85 g/100mL) e alíquotas de 100 µL dessas diluições foram inoculadas em ágar MRS (HiMedia) usando a técnica de espalhamento (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001), seguindo por incubação (48 h, 37 °C) sob anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, Reino Unido). No final do período de incubação, as colônias visíveis foram enumeradas e os resultados foram expressos como log UFC/g. O limite de detecção da análise foi <2 log UFC/g.

3.6 DETERMINAÇÃO DO ESTADO FISIOLÓGICO DAS CÉLULAS BACTERIANAS

Os tamanhos das subpopulações de *L. fermentum* 296 com diferentes estados fisiológicos foram medidos no dia 15 de umidificação e durante o armazenamento (dia zero, 15, 30, 60 e 90, a 11% UR) por meio da técnica de citometria de fluxo. As análises foram realizadas com uso de citômetro de fluxo com emissão de laser de argônio a 488 nm e 640 nm (BD Accuri C6, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo dois detectores de dispersão de luz (FSC e SSC) e quatro detectores de fluorescência. O detector de fluorescência denominado de canal FL1 detecta luz com comprimento de onda de 533 nm $\pm$ 30 nm e foi utilizado para coletar fluorescência na cor verde, a fim de verificar marcações com diacetato de carboxifluoresceína (cFDA). O detector de fluorescência denominado de canal FL3 detecta luz com comprimentos de onda >670 nm e foi utilizado para coletar fluorescência na cor vermelha, a fim de verificar marcações com iodeto de propídio (PI).

Os níveis do limiar para aquisição de dados foram definidos com os detectores de dispersão de luz. Na dispersão direta (forward scatter, FSC) utilizou-se o valor de 30 000 e na dispersão lateral (side scatter, SSC) foi utilizado o valor de 12 000 com o intuito de eliminar partículas muito menores do que as células intactas e delimitar as células bacterianas, respectivamente.

As amostras de cada formulação foram diluídas em 3 mL de água destilada e filtradas utilizando-se filtro de seringa com fibra de vidro e poro de 1 µm. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4500 rpm por 10 minutos a 4 °C, lavadas com PBS e submetidas novamente à centrifugação. O precipitado foi reidratado

em 600 μ L de PBS e dividido em amostras brancas e coradas. As amostras que foram duplamente coradas com PI e cFDA (3 μ L de cada, na proporção 1:100) foram incubadas por 15 minutos em local escuro, e reidratadas em 300 μ L de PBS, seguindo para a leitura no citômetro de fluxo.

Cada aquisição de amostra foi feita com uma configuração de baixa taxa de fluxo (12 μ L/minuto) e um total de 10 000 eventos foram analisados por amostra. Foi utilizada uma compensação automática para os dados obtidos. A coloração com o PI avalia a integridade da membrana celular, enquanto o fluorocromo cFDA identifica a presença de respiração celular. Dessa forma, os eventos lidos foram interpretados com base nas marcações como: i) células vivas íntegras (coradas apenas com o marcador cFDA), ii) células vivas injuriadas (coradas com os marcadores cFDA e PI), iii) células mortas (coradas apenas com o marcador PI), e iv) artefatos da amostra (não corados com nenhum dos marcadores). A análise dos dados foi realizada com o software BD Accuri C6 (Becton Dickinson and Company) (PEDROSA *et al.*, 2020; RODRIGUES; GARCIA; SOUZA, 2021).

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE QUERCETINA E RESVERATROL

O conteúdo de QUE e RES nas diferentes formulações foram quantificadas em diferentes intervalos de armazenamento após a liofilização (0, 15, 30, 60 e 90 dias) sob refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) e temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C), e umidade relativa de 11%. 25 mg das amostras foram diluídas em 50 ml de metanol (0,5 mg/mL), filtradas através de membranas de náilon de 0,45 μ m (Tedia, Fairfield, CT, EUA) e ultrassonicadas por 10 minutos.

A quantificação de QUE e RES foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando cromatógrafo Shimadzu (modelo Prominence, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) equipado com válvula solenoide (LC-20AT), desgaseificador, forno (CTO-20A) e amostrador automático (SIL-20A), acoplado a um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A). As outras condições analíticas foram: Coluna Kromasil® C18 (250 $\times$ 4,6 mm, 5 μ) e pré-coluna Kromasil® C18 (4,6 $\times$ 3,0 mm, 3,5 μ m), metanol como fase móvel (grau CLAE, Tedia): acetonitrila (grau CLAE, Tedia):

água ultrapura (0,1% de ácido fosfórico, v/v) (60:10:30, v/v), usando um sistema isocrático por 20 minutos, taxa de fluxo de 0,4 mL min, volume de injeção de 5 µL e detecção a 269 nm.

Os dados foram processados usando o software Lab Solutions® (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão). Os picos dos cromatogramas foram identificados comparando seus tempos de retenção com aqueles dos padrões de QUE e RES (Sigma-Aldrich). A água ultrapura foi obtida de um sistema MilliQ® (EMD Millipore, EUA). As injeções em triplicata foram realizadas e as áreas médias dos picos foram usadas para quantificação, e os resultados foram expressos como µg de QUE ou RES/mg de formulação. Curvas de calibração padrão foram construídas para a quantificação de QUE e RES, que foram $y = 20309x - 742098$ ($n = 5$, $R^2 > 0,99$), e $y = 13836x - 240815$ ($n = 5$, $R^2 > 0,99$), respectivamente. Concentrações de QUE e RES variando entre 180 e 350 µg/mL e 160 e 300 µg/mL, respectivamente, foram utilizados para a construção das curvas de calibração.

3.8 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante foi avaliada durante os intervalos de armazenamento (dia zero, 15, 30, 60 e 90) sob refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) e temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C), e umidade relativa de 11%. medindo-se a atividade de eliminação do radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico]) e do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), seguindo procedimentos descritos anteriormente (GARCEZ *et al.*, 2009, MORENO *et al.*, 2015).

ABTS (ácido 2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico]) foi dissolvido em água até uma concentração de 7 mM, e deixado reagir com uma solução de persulfato de potássio 2,45 mM (concentração final) por 16 h no escuro. A cationização dos radicais ABTS (ABTS^{•+}), representada por um azul cromóforo, foi produzida durante esse período. A solução ABTS^{•+} foi diluída com água destilada até uma absorbância inicial de 0,70 ($\pm 0,02$) a 734 nm. Uma alíquota (100 µL) da solução teste com concentrações variando de 0,5 a 3,5 µg/mL foram adicionadas a 100 µL desta solução em microplaca de 96 poços, e as porcentagens de redução de absorbância foram

registradas. O controle negativo consistiu em uma mistura (1:1) de solução de metanol e ABTS e o branco consistiu em uma mistura (1:1) de água destilada e a formulação nutracêutica testada. Após 30 min de incubação à temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) no escuro, a absorbância foi lida a 734 nm.

Uma solução de DPPH 0,03 mM (Sigma-Aldrich), bem como as soluções de cada formulação com concentrações variando de 5 a 35 µg/mL foram preparadas em metanol. Foram distribuídas alíquotas de 100 µL das diferentes soluções da formulação testada com concentrações variando de 5 a 35 µg/ml em uma microplaca de 96 poços, seguida pela adição de um volume igual da solução de DPPH em cada poço. O controle negativo consistiu em uma mistura (1:1) de solução de metanol e DPPH e o branco consistiu em uma mistura (1:1) de metanol e formulação nutracêutica testada. Após 30 min de incubação à temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C) no escuro, a absorbância foi lida a 517 nm.

Todas as medidas de absorbância foram feitas com um espectrofotômetro Biotek Multi-Detection Synergy HTX (Vinooski, VT, USA). Todos os testes foram realizados em triplicata. Uma curva de calibração (% de redução de absorbância vs. concentração da amostra) foi obtida. Soluções de ácido trolox (usadas como antioxidante padrão e controle positivo, Sigma-Aldrich) foram preparadas em metanol com concentrações variando de 50 a 500 µM para o DPPH, e de 5 a 50 µM para o ABTS. A capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (CAET) foi definida como a concentração (mg amostra/mL) produzindo a mesma redução de absorbância como 1 mM Trolox, obtidas a partir do EC50 da amostra e do Trolox.

A atividade antioxidante (%) de cada formulação foi calculada usando a equação:

Equação 1

$$\%AA = \{[ABS_{controle\ negativo} - ABS_{amostra}] \times 100\} / ABS_{controle\ negativo}$$

Onde: ABScontrole negativo = absorbância do controle negativo (DPPH ou ABTS incubado apenas com metanol); ABSamostra = absorbância da substância-teste (amostra incubada com DPPH ou ABTS). Os resultados obtidos foram expressos através da concentração efetiva para sequestrar 50% dos radicais livres (IC50) que foi determinada de acordo com o método de regressão linear ($R \geq 0.99$).

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os ensaios foram realizados em unicata (DSC e TG), duplicata (contagem de células viáveis e citometria) ou triplicata (capacidade antioxidante e HPLC), e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas para determinar diferenças significativas ($p \leq 0,05$) usando o teste t de Student ou Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Os resultados foram submetidos a análise de correlação de Pearson para verificar a associação entre variáveis dependentes. Os softwares Graphpad Prism 9.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA) e software R 2.15.3 (Ross & Robert Gentleman, University of Auckland, Auckland, Nova Zelândia) foram utilizados para realização das análises estatísticas.

4. RESULTADOS

O artigo apresentado no Apêndice A, intitulado: “Influence of storage conditions on the stability and potential functionalities of nutraceutical formulations composed of *Limosilactobacillus fermentum* 296, quercetin, and resveratrol” teve como objetivo avaliar os efeitos da umidade e temperatura sobre a estabilidade da cepa potencialmente probiótica, bem como dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante da formulação nutracêutica. As formulações apresentaram menores reduções de contagens de células viáveis na umidade relativa de 11%, em comparação com 22 e 33%, sem diferença significativa entre o percentual de células vivas da formulação umidificada nas diferentes temperaturas e umidades relativas, porém apresentando valores maiores para a formulação contendo QUE e RES quando comparada à formulação controle. Durante o armazenamento, apesar da atividade antioxidante da formulação ter reduzido, QUE e RES apresentaram efeito protetor sobre as contagens de células, bem como a condição de refrigeração manteve maiores contagens de células viáveis ($>6 \log \text{ UFC/mL}$) em comparação à temperatura ambiente ($>3 \log \text{ UFC/mL}$), sem diferença entre no tamanho das subpopulações de células vivas ao final do armazenamento entre nenhuma das temperaturas e formulações (LFQR e LF). O conteúdo de quercetina e resveratrol se manteve acima de 129.28 ± 0.96 e $132.33 \pm 1.78 \mu\text{g/mg}$ respectivamente, durante o armazenamento a 11% UR, sem interferência da temperatura de armazenamento sobre a quantificação desses compostos. Considerando as condições testadas, o maior potencial de funcionalidade da formulação durante armazenamento é garantido sob umidade relativa de 11% e temperatura de refrigeração.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T. M. R. *et al.* In Vitro Characterization of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 4, p. 704-716, 2017
- ALE, E. *et al.* *Limosilactobacillus fermentum*: Could the EPS production ability be responsible for the functional properties? **Food Microbiology**, p. 103465, 2020.
- ALMADA, C. N. *et al.* Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 58, p. 96- 114, 2016.
- AL-QYSI, L. *et al.* Investigate the characteristics of probiotics marketed in the Middle East and pharmacist perception of use in Muscat, Oman. **PharmaNutrition**, p. 100202, 2020.
- ARAÚJO, C. M. *et al.* Protective Effects of Tropical Fruit Processing Coproducts on Probiotic *Lactobacillus* Strains during Freeze-Drying and Storage. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 96, 2020.
- ARCANJO, N. O. *et al.* Resveratrol protects *Lactobacillus reuteri* against H₂O₂-induced oxidative T stress and stimulates antioxidant defenses through upregulation of the dhaT gene. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 135, p. 38–45, 2019.
- ARRUDA, H. S. *et al.* Recent advances and possibilities for the use of plant phenolic compounds to manage ageing-related diseases. **Journal of Functional Foods**, v. 75, p. 104203, 2020.
- ARZOLA-PANIAGUA, M.A. *et al.* Efficacy of an orlistat-resveratrol combination for weight loss in subjects with obesity: A randomized controlled trial. **Obesity**, v. 24, n. 7, p. 1454-1463, 2016.
- BANDYOPADHYAY, P. *et al.* Prediction of glass transition temperature and Young's modulus of an inaccessible polymer substrate in changing environment. **Polymers**, v. 191, p. 122274, 2020.
- BASHMAKOV, Y. K. *et al.* Resveratrol promotes foot ulcer size reduction in type 2 diabetes patients. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, 2014.
- BHATT, J. K.; THOMAS, S.; NANJAN, M. J. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. **Nutrition Research**, v. 32, n. 7, p. 537-541, 2012.
- BIANCATELLI, R. M. L. *et al.* Quercetin and vitamin C: an experimental, synergistic therapy for the prevention and treatment of SARS-CoV-2 related disease (COVID-19). **Frontiers in Immunology**, p. 1451, 2020.

BRAGA, L. R. *et al.* Evaluation of the antimicrobial, antioxidant and physicochemical properties of Poly (Vinyl chloride) films containing quercetin and silver nanoparticles. **LWT-Food Science and Technology**, v. 101, p. 491-498, 2019.

BRASIL, Resolução ANVISA RDC no 18 de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Poder Executivo, de 03 de maio de 1999.

BRASIL, Resolução ANVISA RDC no 19 de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Poder Executivo, de 03 de maio de 1999.

BRASIL, Resolução ANVISA RDC no 02 de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Poder Executivo, de 17 de julho de 2002.

BRASIL, Resolução ANVISA RDC no 240 de 26 de julho de 2018. Regulamento Técnico que estabelece as categorias de alimentos e embalagens dispensadas e com obrigatoriedade de registro sanitário. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Poder Executivo, de 27 de julho de 2018.

BRASIL, Resolução ANVISA RDC no 241 de 26 de julho de 2018. Regulamento Técnico que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Poder Executivo, de 27 de julho de 2018.

BRASIL, Resolução ANVISA RDC no 243 de 26 de julho de 2018. Regulamento Técnico que dispõe sobre os requisitos para composição, qualidade, segurança e rotulagem dos suplementos alimentares e para atualização das listas de nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar destes produtos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Poder Executivo, de 27 de julho de 2018.

BRASIL, Resolução ANVISA IN no 28 de 26 de julho de 2018. Regulamento Técnico que estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Poder Executivo, de 27 de julho de 2018.

BRÜLL, V. *et al.* Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre-) hypertension: a randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial. **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 8, p. 1263-1277, 2015.

BURAK, C. *et al.* Effect of alpha-linolenic acid in combination with the flavonol quercetin on markers of cardiovascular disease risk in healthy, non-obese adults: A randomized, double-blinded placebo-controlled crossover trial. **Nutrition**, v. 58, p. 47-56, 2019.

CAI, X. *et al.* Bioavailability of quercetin: problems and promises. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 20, p. 2572-2582, 2013.

CAVALCANTE, R. G. S. *et al.* The probiotic *Limosilactobacillus fermentum* 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 29, n. 12, p. 1408-1417, 2019.

CHÁVARRI, M. *et al.* Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1-2, p. 185–189, 2010.

CHAN, C. *et al.* Polyphenols from selected dietary spices and medicinal herbs differentially affect common food-borne pathogenic bacteria and lactic acid bacteria. **Food Control**, v. 92, p. 437-443, 2018.

CHEKALINA, N. *et al.* Quercetin reduces the transcriptional activity of NF-kB in stable coronary artery disease. **Indian Heart Journal**, v. 70, n. 5, p. 593-597, 2018.

CHEN, J. *et al.* Resveratrol in experimental Alzheimer's disease models: A systematic review of preclinical studies. **Pharmacological Research**, v. 150, p. 104476, 2019.

CHEN, J.; HU, L. Nanoscale delivery system for nutraceuticals: Preparation, application, characterization, safety, and future trends. **Food Engineering Reviews**, v. 12, n. 1, p. 14-31, 2020.

CHEN, S. *et al.* Resveratrol improves insulin resistance, glucose and lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. **Digestive and Liver Disease**, v. 47, n. 3, p. 226-232, 2015.

CHOI, E. *et al.* Effect of onion peel extract on endothelial function and endothelial progenitor cells in overweight and obese individuals. **Nutrition**, v. 31, n. 9, p. 1131-1135, 2015.

CHOUDHARY, A. *et al.* Quercetin loaded chitosan tripolyphosphate nanoparticles accelerated cutaneous wound healing in Wistar rats. **European Journal of Pharmacology**, p. 173172, 2020.

CHIU, H.; VENKATAKRISHNAN, K.; WANG, C. The role of nutraceuticals as a complementary therapy against various neurodegenerative diseases: A mini-review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, 2020.

DANTAS, A. *et al.* Current knowledge about physical properties of innovative probiotic spray-dried powders produced with lactose-free milk and prebiotics. **LWT-Food Science and Technology**, v. 151, p. 112175, 2021.

DE ANDRADE, F. H. D. *et al.* Solid-state characterization of the new antiparasitic drug 5-((5-bromo-1 H-indol-3-yl) methylene)-3-(2, 6-difluorobenzyl) thiazolidine-2, 4-dione (GQ-238). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 141, n. 4, p. 1379-1387, 2020.

DIANAWATI, D.; MISHRA, V.; SHAH, N. P. Effect of drying methods of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* on secondary protein structure and glass transition temperature as studied by Fourier transform infrared and differential scanning calorimetry. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 3, p. 1419-1430, 2013.

DOWER, J. I. *et al.* Supplementation of the pure flavonoids epicatechin and quercetin affects some biomarkers of endothelial dysfunction and inflammation in (pre) hypertensive adults: a randomized double-blind, placebo-controlled, crossover trial. **The Journal of Nutrition**, v. 145, n. 7, p. 1459-1463, 2015.

EASTWOOD, J. *et al.* The effect of probiotics on cognitive function across the human lifespan: A systematic review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 128, p. 311-327, 2021.

EFSA PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA). Safety of synthetic trans-resveratrol as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97. **EFSA Journal**, v. 14, n. 1, p. 4368, 2016.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to quercetin and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 1647), “cardiovascular system” (ID 1844), “mental state and performance” (ID 1845), and “liver, kidneys” (ID 1846) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. **EFSA Journal**, v. 9, n. 4, p. 2067, 2011.

EVANS, H. M.; HOWE, P. R. C.; WONG, R. H. X. Clinical evaluation of effects of chronic resveratrol supplementation on cerebrovascular function, cognition, mood, physical function and general well-being in postmenopausal women—rationale and study design. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 150, 2016.

FENG, K. *et al.* Colon-targeted delivery systems for nutraceuticals: A review of current vehicles, evaluation methods and future prospects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 102, p. 203-222, 2020.

FERREIRA, G. A. H. *et al.* Potentially Probiotic *Limosilactobacillus fermentum* Fruit-Derived Strains Alleviate Cardiometabolic Disorders and Gut Microbiota Impairment in Male Rats Fed a High-Fat Diet. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-11, 2022.

FOGACCI, F. *et al.* Effect of resveratrol on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled, clinical trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1605–1618, 2018.

FREIRE, M. O. L. *et al.* Effects of a Mixed *Limosilactobacillus fermentum* Formulation with Claimed Probiotic Properties on Cardiometabolic Variables, Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Male Rats Fed a High-Fat Diet. **Foods**, v. 10, n. 9, p. 2202, 2021a.

FREIRE, M. O. L. *et al.* *Limosilactobacillus fermentum* Strains with Claimed Probiotic Properties Exert Anti-oxidant and Anti-inflammatory Properties and Prevent Cardiometabolic Disorder in Female Rats Fed a High-Fat Diet. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-13, 2021b.

FUJITAKA, K. *et al.* Modified resveratrol Longevinex improves endothelial function in adults with metabolic syndrome receiving standard treatment. **Nutrition Research**, v. 31, n. 11, p. 842-847, 2011.

GARCEZ, F. R. *et al.* Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 407–411, 2009

GARCIA, E. F. *et al.* Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected *Lactobacillus* Strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1371, 2016.

GARZÓN, A. G.; VAN DE VELDE, F.; DRAGO, S. R. Gastrointestinal and colonic *in vitro* bioaccessibility of γ -aminobutyric acid (GABA) and phenolic compounds from novel fermented sorghum food. **LWT-Food Science and Technology**, p. 109664, 2020.

GHAFFARI, S.; ROSHANRAVAN, N. The role of nutraceuticals in prevention and treatment of hypertension: An updated review of the literature. **Food Research International**, v. 128, p. 108749, 2020.

GONG, X. *et al.* The interactions between gut microbiota and bioactive ingredients of traditional Chinese medicines: A review. **Pharmacological Research**, v. 157, p. 104824, 2020.

GONZÁLEZ, C. M. *et al.* Water sorption and glass transition in freeze-dried persimmon slices. Effect T on physical properties and bioactive compounds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 130, p. 109633, 2020.

GROM, L. C. *et al.* Probiotic dairy foods and postprandial glycemia: A mini-review. **Trends in Food Science & Technology**, 2020.

GUVEN, O. *et al.* Food processing and digestion: the effect of extrusion process on bioactive compounds in extrudates with artichoke leaf powder and resulting *in vitro* cynarin and cynaroside bioaccessibility. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, n. 1, p. 232–237, 2018.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121–129, 2001.

HUSSAIN, S. A. *et al.* Effect of quercetin on postprandial glucose excursion after mono-and disaccharides challenge in normal and diabetic rats. **Journal of Diabetes Mellitus**, v. 2, n. 1, p. 82-87, 2020.

IMRAN, M. *et al.* Topical nanostructured lipid carrier gel of quercetin and resveratrol: formulation, optimization, *in vitro* and ex vivo study for the treatment of skin cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 119705, 2020.

JÚNIOR, F. J. L. R. *et al.* Investigation of the thermal behavior of inclusion complexes with antifungal activity. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 133, n. 1, p. 641-648, 2018.

KIM, K.; YIM, J. Antioxidative activity of onion peel extract in obese women: a randomized, double-blind, placebo controlled study. **Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 3, p. 202, 2015.

KHAN, M. *et al.* Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review. **Food Research International**, v. 130, p. 108933, 2020.

KORZENIOWSKA, K.; ŁĘSKA, B.; WIECZOREK, P. P. Isolation and determination of phenolic compounds from freshwater *Cladophora glomerata*. **Algal Research**, v. 48, p. 101912, 2020.

LEE, J. *et al.* Onion peel extract reduces the percentage of body fat in overweight and obese subjects: a 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Nutrition Research and Practice**, v. 10, n. 2, p. 175-181, 2016.

LEE, K. *et al.* Effects of daily quercetin-rich supplementation on cardiometabolic risks in male smokers. **Nutrition Research and Practice**, v. 5, n. 1, p. 28-33, 2011.

LI, J. *et al.* Extraction and characterization of phenolic compounds with antioxidant and antimicrobial activities from pickled radish. **Food and Chemical Toxicology**, v. 136, p. 111050, 2020.

LIN, C.; SUN, X.; LIN, A. Supplementation with high-dose trans-resveratrol improves ultrafiltration in peritoneal dialysis patients: a prospective, randomized, double-blind study. **Renal Failure**, v. 38, n. 2, p. 214-221, 2016.

LLANO, D. G. *et al.* Reciprocal beneficial effects between wine polyphenols and probiotics: an exploratory study. **European Food Research and Technology**, v. 243, n. 3, p. 531–538, 2017.

LUO, H. *et al.* Nitrosylmyoglobin formation in meat by *Limosilactobacillus fermentum* AS1. 1880 is due to its nitric oxide synthase activity. **Meat Science**, p. 108122, 2020.

MACIOŁEK, U. *et al.* Thermal study, identification of intermediate solid products and evolved gas analysis (EGA) during pyrolysis and oxidative decomposition of sodium complex of quercetin-5'-sulfonic acid (Na-5'-QSA). **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 150, p. 104881, 2020.

MAZLOOM, Z. *et al.* The effect of quercetin supplementation on oxidative stress, glycemic control, lipid profile and insulin resistance in type 2 diabetes: a randomized clinical trial. **Journal of Health Sciences & Surveillance System**, v. 2, n. 1, p. 8-14, 2014.

MARTINS, G. N. *et al.* Technological aspects of the production of fructo and galacto-oligosaccharides. Enzymatic synthesis and hydrolysis. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, p. 78, 2019.

MICHEL, M.; FERRIER, E. Effect of curing temperature conditions on glass transition temperature values of epoxy polymer used for wet lay-up applications. **Construction and Building Materials**, v. 231, p. 117206, 2020.

MIKELSAAR, Marika *et al.* Polyamines of human strain *Lactobacillus plantarum* Inducia induce modulation of innate immune markers. **Journal of Functional Foods**, v. 72, p. 104064, 2020.

MONTELLA, R. *et al.* Bioactive compounds from hazelnut skin (*Corylus avellana* L.): Effects on *Lactobacillus plantarum* P17630 and *Lactobacillus crispatus* P17631. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, 306–315, 2013.

MORENO, O.; ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Effect of the incorporation of antimicrobial/antioxidant proteins on the properties of potato starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 353-364, 2015.

NASCIMENTO, L. C. P. *et al.* *Limosilactobacillus fermentum*, Current Evidence on the Antioxidant Properties and Opportunities to be Exploited as a Probiotic Microorganism. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-20, 2022.

NAVARRO, G. *et al.* Resveratrol and Related Stilbenoids, Nutraceutical/Dietary Complements with Health-Promoting Actions: Industrial Production, Safety, and the Search for Mode of Action. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 4, p. 808-826, 2018.

NIJHAWAN, P.; BEHL, T. Nutraceuticals in the management of obesity. **Obesity Medicine**, v. 17, p. 100168, 2020.

OBRADOVIĆ, Nataša *et al.* Microencapsulation of probiotic starter culture in protein–carbohydrate carriers using spray and freeze-drying processes: Implementation in whey-based beverages. **Journal of Food Engineering**, p. 110948, 2022.

OLIVEIRA, S. D. *et al.* Improvement in physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata* DC) and guava (*Psidium guajava* L.) fruit by-products fermented with potentially probiotic lactobacilli. **LWT-Food Science and Technology**, p. 110200, 2020.

OLIVEIRA, Y. *et al.* Oral administration of *Limosilactobacillus fermentum* post-weaning improves the lipid profile and autonomic dysfunction in rat offspring exposed to maternal dyslipidemia. **Food & Function**, 2020.

O'TOOLE, P. W.; MARCHESI, J. R., HILL, C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 17057, 2017.

OTEIZA, P. I. *et al.* Flavonoids and the gastrointestinal tract: Local and systemic effects. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 61, p. 41-49, 2018.

PAPARELLA, A. *et al.* Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 19, n. 12, p. 1174-1182, 2008.

PEDROSA, G. T. S. *et al.* Physiological alterations involved in inactivation of autochthonous spoilage bacteria in orange juice caused by Citrus essential oils and mild heat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 334, p. 108837, 2020.

PEI, R., LIU, S.; BOLLING, B. Flavonoids and gut health. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 61, p. 153-159, 2020.

PELLICER, J. A. *et al.* Stability of microencapsulated strawberry flavour by spray drying, freeze drying and fluid bed. **Powder Technology**, v. 347, p. 179–185, 2019.

PILATTI-RICCIO, D. *et al.* Impact of the use of saccharides in the encapsulation of *Ilex paraguariensis* extract. **Food Research International**, v. 125, p. 108600, 2019.

RAJAM, R.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 773-780, 2015.

RASCÓN, M. P. *et al.* Osmotic dehydration assisted impregnation of *Lactobacillus rhamnosus* in banana and effect of water activity on the storage stability of probiotic in the freeze-dried product. **LWT-Food Science and Technology**, v. 92, p. 490-496, 2018.

REPOSSI, G.; DAS, U. N.; EYNARD, A. N. Molecular Basis of the Beneficial Actions of Resveratrol. **Archives of Medical Research**, 2020.

ROBERTSON, I. *et al.* The science of resveratrol, formulation, pharmacokinetic barriers and its chemotherapeutic potential. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 121605, 2022.

RODRIGUES, Noádia Priscilla Araújo; GARCIA, Estefânia Fernandes; DE SOUZA, Evandro Leite. Selection of lactic acid bacteria with promising probiotic aptitudes from fruit and ability to survive in different food matrices. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 2257-2269, 2021.

ROMANO, N. *et al.* Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Food Research International**, v. 90, p. 251–258, 2016.

ROMANO, N. *et al.* Physico-chemical and structural properties of crystalline inulin explain the stability of *Lactobacillus plantarum* during spray-drying and storage. **Food research international**, v. 113, p. 167-174, 2018.

RUMIŃSKA, Weronika *et al.* Effect of oil pomaces on thermal properties of model dough and gluten network studied by thermogravimetry and differential scanning calorimetry. **Food Chemistry**, v. 358, p. 129882, 2021.

SAMPAIO, K. B. *et al.* Development and *in vitro* evaluation of novel nutraceutical formulations composed of *LimosiLimosilactobacillus fermentum*, quercetin and/or resveratrol. **Food Chemistry**, p. 128264, 2020.

SANTOS, A. S. *et al.* Effects of Quercetin and Resveratrol on *in vitro* Properties Related to the Functionality of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2229, 2019.

SERBAN, M. *et al.* Effects of quercetin on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 7, p. 1–16, 2016.

SERNA-COCK, L.; VARGAS-MUÑOZ, D. P.; APONTE, A. A. Structural, physical, functional and nutraceutical changes of freeze-dried fruit. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 442-450, 2015.

SIACOR, F. D. C. *et al.* Physicochemical properties of spray-dried mango phenolic compounds extracts. **Journal of Agriculture and Food Research**, p. 100048, 2020.

SIEMONS, I. *et al.* Dextrose equivalence of maltodextrins determines particle morphology development during single sessile droplet drying. **Food Research International**, v. 131, p. 108988, 2020.

SIMENTAL-MENDÍA, L. E.; GUERRERO-ROMERO, F. Effect of resveratrol supplementation on lipid profile in subjects with dyslipidemia: A randomized double-blind, placebo-controlled trial. **Nutrition**, v. 58, p. 7-10, 2019.

SOUZA, E. L. *et al.* Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health- promoting properties and food functionalities – A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1645-1659, 2019.

TIMMERS, S. *et al.* Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 5, p. 612-622, 2011.

TRIPATHI, C. *et al.* Nutraceutical regulations: An opportunity in ASEAN countries. **Nutrition**, v. 74, p. 110729, 2020.

TOSHIMITSU, T. *et al.* Effects of 12-wk *Lactobacillus plantarum* OLL2712 treatment on glucose metabolism and chronic inflammation in prediabetic individuals: A single-arm pilot study. **Nutrition**, v. 58, p. 175-180, 2019.

TYMCZYSZYN, E. E. *et al.* Galacto-oligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Cryobiology**, v. 62, n. 2, p. 123-129, 2011.

TYMCZYSZY, E. E. *et al.* Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 13, p. 217–221, 2012.

VELLY, H. *et al.* Cyclopropanation of unsaturated fatty acids and membrane rigidification improve the freeze-drying resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 2, p. 907–918, 2015.

VERCE, M.; DE VUYST, L.; WECKX, S. Comparative genomics of *Limosilactobacillus fermentum* suggests a free-living lifestyle of this lactic acid bacterial species. **Food Microbiology**, v. 89, p. 103448, 2020.

VESTERLUND, S.; SALMINEN, K.; SALMINEN, S. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 319-321, 2012.

VOLSTATOVA, T. *et al.* Effect of apple extracts and selective polyphenols on the adhesion of potential probiotic strains of *Lactobacillus gasseri* R and *Lactobacillus casei* FMP. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 391–397, 2017.

WALLE, T. *et al.* High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 12, p. 1377-1382, 2004.

WANG, Y. *et al.* Drug delivery based pharmacological enhancement and current insights of quercetin with therapeutic potential against oral diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 128, p. 110372, 2020.

WANG, Z. *et al.* Characterization and bacteriostatic effects of β -cyclodextrin/quercetin inclusion compound nanofilms prepared by electrospinning. **Food Chemistry**, v. 338, p. 127980, 2021.

WITTE, A. V. *et al.* Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 23, p. 7862-7870, 2014.

WONG, R. H. X. *et al.* Evidence for circulatory benefits of resveratrol in humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1290, n. 1, p. 52-58, 2013.

WONG, R. H. X.; RAEDERSTORFF, D.; HOWE, P. R. C. Acute resveratrol consumption improves neurovascular coupling capacity in adults with type 2 diabetes mellitus. **Nutrients**, v. 8, n. 7, p. 425, 2016.

YAO, M. *et al.* Progress in microencapsulation of probiotics: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 2, p. 857-874, 2020.

YING, D. *et al.* Effect of encapsulant matrix on stability of microencapsulated probiotics. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 447–458, 2016.

ZAHEDI, H. S. *et al.* Effects of Polygonum cuspidatum containing resveratrol on inflammation in male professional basketball players. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. Suppl 1, p. S1, 2013.

ZENDEBOODI, F. *et al.* Probiotic: conceptualization from a new approach. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 103–123, 2020.

ZHAO, L. *et al.* A combination of quercetin and resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed rats by modulation of gut microbiota. **Food & Function**, v. 8, n. 12, p. 4644–4656, 2017.

ZHOU, D. *et al.* Stilbenes from the tubers of *Bletilla striata* with potential anti-neuroinflammatory activity. **Bioorganic Chemistry**, v. 97, p. 103715, 2020.

ZHU, W. *et al.* Trans-resveratrol alters mammary promoter hypermethylation in women at increased risk for breast cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 3, p. 393-400, 2012.

APÊNDICES

Evaluating the stability of a novel nutraceutical formulation combining probiotic *Limosilactobacillus fermentum* 296, quercetin, and resveratrol under different storage conditions

Running title: Stability of nutraceutical with probiotic and phenolics

Abstract

This study evaluated the stability of a novel nutraceutical formulation composed of the probiotic *Limosilactobacillus fermentum* 296, quercetin (QUE), and resveratrol (RES) (LFQR) under different storage conditions. The effects of different relative humidities (RH; 11, 22, and 33%) and storage temperatures (refrigeration temperature: 4 °C and room temperature: 25 °C) on the stability of LFQR were evaluated through the determination of thermal stability, viable cell counts, bacterial physiological status, antioxidant capacity, and contents of QUE and RES during long-term storage. RH did not affect endothermic reactions and mass reduction in LFQR. After a 15-day-humidification period, *L. fermentum* 296 had higher viable cell counts in LFQR under refrigeration temperature storage when compared to room temperature storage regardless of the RH. The physiological status of *L. fermentum* 296 in LFQR was overall similar during 90 days of storage (11% RH) under refrigeration and room temperature. *L. fermentum* 296 had the highest viable cell counts (>6 log CFU/g) in LFQR up to day 90 of refrigeration storage (11% RH). LFQR kept high contents of QUE and RES and maintained antioxidant capacity during 90 days of storage under refrigeration and room temperature. The results showed that the higher stability and functionality of LFQR during long-term storage should be guaranteed under 11% RH and refrigeration temperature.

Keywords: Probiotics, phenolic compounds, nutraceutical, storability, functionality.

Introduction

The human gut microbiota is composed of a huge variety of microorganisms with hundreds of bacterial species in the colon [1]. The gut microbiota dysregulation has been linked to unwanted physiological conditions such as inflammatory bowel disease, celiac disease, hypertension, obesity, diabetes, non-alcoholic fatty liver disease, steatosis, and neurodegenerative disorders [2]. The use of nutraceuticals targeting the gut microbiota is a strategy for the prevention and treatment of these diseases. Nutraceuticals are dietary elements capable of promoting positive effects on health. Phenolic compounds and probiotics have received increasing attention from the nutraceutical industry to target gut microbiota [3].

Phenolic compounds are metabolites synthesized by plants and classified as simple phenols (e.g., phenolic acids and phenolic alcohols) and polyphenols (e.g., flavonoids, lignans, stilbenes, and tannins) [4]. Quercetin is a flavonoid, and its supplementation can reduce systolic blood pressure, cardiovascular biomarkers, and pro-inflammatory cytokines, besides increasing endothelial function [5, 6]. Resveratrol is a stilbene, and its supplementation can reduce cholesterol and serum triglycerides in dyslipidemic individuals and improve mood, cognition, renal ultrafiltration rate, and neurovascular coupling capacity [7, 8]. The beneficial health effects induced by quercetin and resveratrol supplementation have been usually linked to their strong antioxidant properties [9], although there is increasing evidence of their positive impacts on the human gut microbiota [10].

Probiotics are defined as live microorganisms capable of conferring health benefits to the host when consumed in adequate doses [11]. Previous studies isolated lactic acid bacteria

strains from fruit-processing by-products and identified the strain *Limosilactobacillus fermentum* 296 as having promising performance in a set of *in vitro* experiments to evaluate probiotic-related properties and safety [12, 13]. Further studies with animal models showed the efficacy of the supplementation of *L. fermentum* 296 to improve altered parameters in cardiometabolic disorders such as cholesterol and triglycerides serum levels, blood pressure, sympathetic excitatory response, sympathetic tone, and oxidative stress, besides increasing the colonic production of short-chain fatty acids. Still, it increased the oxidative capacity in the heart, colon, liver, and kidneys, and improved the intestinal microbiota profile in rats with dyslipidemia, as well as in the offspring of dyslipidemic mothers [14 - 18]. The literature evidence reinforces *L. fermentum* 296 as a novel probiotic candidate.

Antioxidants are commonly combined with probiotics to formulate nutraceuticals aiming to protect these microorganisms from oxidative damage [19]. In addition to their reported antioxidant properties, phenolic compounds can stimulate the growth, adhesion, and aggregation capacity, and protect probiotics from harsh conditions during the gastrointestinal passage [20, 21], which are effects to be exploited in the formulation of nutraceuticals combining probiotics and phenolic compounds. An early study developed a nutraceutical formulation combining *L. fermentum* 296, quercetin, and resveratrol and monitored the viable cell counts, quercetin and resveratrol contents, and antioxidant capacity during storage under uncontrolled humidity conditions [22]. However, some factors must be considered in the formulation and storage of nutraceuticals to maintain the stability of probiotics, mostly the presence of oxygen, relative humidity, and storage temperature. The stability of phenolic compounds in these formulations can be affected by the formation of more unstable and amorphous forms compromising the desired health-related functionality and storability [23].

This study hypothesized that storage conditions could affect the stability of a novel nutraceutical formulation with *L. fermentum* 296, quercetin (QUE), and resveratrol (RES). To test this hypothesis, the impacts of distinct relative humidities and temperatures on the stability and, consequently, the potential functionalities of this nutraceutical formulation were evaluated through the determination of thermal stability, viable cell counts, bacterial physiological status, antioxidant capacity, and contents of QUE and RES during long-term storage.

Materials and methods

Probiotic strain and inoculum preparation

The probiotic *L. fermentum* 296 was used to produce the nutraceutical formulations. This strain was identified with 16S rRNA gene sequence analysis [12]. Stock cultures were kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in de Mann, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth (HiMedia, Mumbai, India) with glycerol (20 mL/100 mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA). Prior to the assays, the strain was cultured in MRS broth at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 - 24 h, centrifuged ($1696 \times g \times 10\text{ min}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, MPW-351R refrigerated Laboratory Centrifuge, Boremlowska, WAW, Poland), washed and resuspended with sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL) to obtain cell suspensions with viable cell counts of approximately 10 log of colony forming units per mL (CFU/mL) when inoculated on MRS agar (HiMedia).

Preparation of the nutraceutical formulations

Suspensions of *L. fermentum* 296 were used to produce two distinct formulations: i) strain suspended in sterile distilled water (1 mL) with fructooligosaccharides [FOS, 20% w/v; containing 30 - 42% of 1-kestose (GF2), 45 - 57% of nystose (GF3), and 5 - 15% of

fructosylmaltose (GF4), Sigma-Aldrich], named LfF (control); and ii) strain suspended in sterile distilled water (1 mL) with resveratrol (RES, 150 mg, Sigma-Aldrich) + quercetin (QUE, 160 mg, Sigma-Aldrich) + FOS (200 mg, Sigma-Aldrich), named LfFQR. The concentrations of QUE and RES were selected to prepare the formulations considering the available literature evidence from clinical trials showing their safety and efficacy to cause health benefits [24, 25]. FOS, QUE, and RES had a purity of $\geq 95\%$.

The fresh formulations were frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h and freeze-dried ($-55 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, vacuum pressure: $<138\text{ mmHg}$, freeze-drying rate: 1 mm/h , 40 h) with a benchtop freeze dryer (Liotop, Model L-101, São Carlos, SP, Brazil). The freeze-dried formulations were aseptically distributed in commercially sterile open cryotubes inside desiccators containing saturated solutions of lithium chloride (20 g/5 mL of distilled water), potassium acetate (20 g/6.5 mL of distilled water), and magnesium chloride (35 g/2 mL of distilled water) (Sigma-Aldrich) to reach a controlled atmosphere relative humidity of 11, 22, and 33%, respectively, resulting in water activity of 0.18, 0.26, and 0.30 for LF, and 0.19, 0.27, and 0.29 for LFQR. Water activity was determined with a water activity measuring device (Novasina apparatus, model LabSwift- a_w , Lachen, Switzerland). The desiccators were stored at 4 ± 0.5 and $25 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 days with light protection.

Considering the results of the *L. fermentum* 296 viable cell counts, a specific humidification condition was selected to continue the storage. On day 15 of humidification, the cryotubes under this condition were sealed, kept in desiccators with the selected relative humidity, and stored under refrigeration ($4 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) and room temperature ($25 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) for 90 days at light protection.

Differential scanning calorimetry and thermogravimetry analysis of nutraceutical formulations

The differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TG) curves were determined on day 15 of the humidification period under room temperature (25 ± 0.5 °C). DSC curves were obtained with a calorimeter model DSC-50 (Shimadzu, Kyoto, Japan) using the Tasys software (Shimadzu) in a single repetition. Two mg of each formulation were weighed into a closed aluminum crucible and the analysis was performed at a heating rate of 10 °C/min until reaching 450 °C under a nitrogen atmosphere with a flow rate of 50 mL/min. TG curves were obtained with a calorimeter model TGA-50 (Shimadzu) using the Tasys software in a single repetition. Five mg of each formulation were weighed in an alumina crucible and the analysis was performed at a rate of 10 °C/min until reaching 900 °C under a synthetic air atmosphere with a flow rate of 20 mL/min.

Enumeration of the viable cell counts of *L. fermentum* 296 in the nutraceutical formulations

The viable cell counts of *L. fermentum* 296 were determined after freeze-drying, on day 15 of humidification, and during storage (day zero, 15, 30, 60, and 90) under refrigeration (4 ± 0.5 °C) and room temperature (25 ± 0.5 °C). The formulations were rehydrated with 1 mL of sterile distilled water (25 ± 0.5 °C) for 15 min, serial dilutions (1:9 v/v, $10^{-1} - 10^{-5}$) were prepared with sterile saline solution (NaCl, 0.85 g/100mL), aliquots (100 µL) of the dilutions were inoculated on MRS agar (HiMedia), incubated (48 h, 37 °C) under anaerobiosis (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK), and the visible colonies on agar were enumerated. The results were expressed as log CFU/g before and after freeze-drying and at different storage intervals [22]. The limit of detection was <2 log CFU/g.

Measurements of the populations of *L. fermentum* 296 with different physiological states in the nutraceutical formulations

The sizes of the subpopulations of *L. fermentum* 296 with different physiological states were measured with flow cytometry on day 15 of humidification, and during storage (day zero, 15, 30, 60, and 90) under refrigeration (4 ± 0.5 °C) and room temperature (25 ± 0.5 °C). The analyzes were performed using a flow cytometer with argon laser emission at 488 nm and 640 nm (BD Accuri C6, Becton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) containing two light scattering detectors (FSC and SSC) and four fluorescence detectors. The fluorescence detector FL1 detects light with a wavelength of $533 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$ to collect fluorescence in green color and verify markings with carboxyfluorescein diacetate (cFDA). The fluorescence detector FL3 detects light with wavelengths $>670 \text{ nm}$ to collect red fluorescence and verify markings with propidium iodide (PI). For forward scatter (FSC) a value of 30,000 was used and for lateral scatter (side scatter, SSC) a value of 12,000 was used to eliminate particles much smaller than the intact cells and delimit the bacterial cells, respectively.

The samples of each formulation were diluted in 3 mL of distilled water and filtered with a glass fiber syringe filter (pore size $1 \mu\text{M}$, Analítica, São Paulo, SP, Brazil). The samples were centrifuged ($3240 \times g$, 10 min, 4 °C), washed with phosphate buffer solution (PBS), and centrifuged again. The precipitate was rehydrated with PBS ($600 \mu\text{L}$) and divided into white and stained samples. Samples doubly stained with PI and cFDA ($3 \mu\text{L}$ of each, proportion 1:100) were incubated under room temperature (25 ± 0.5 °C) for 15 min with light protection and rehydrated with PBS ($300 \mu\text{L}$) before reading on a flow cytometer.

Each sample acquisition was performed at a low flow rate (12 $\mu\text{L}/\text{min}$) and a total of 10,000 events were analyzed per sample.

Staining with PI identified cell membrane integrity and cFDA identified the presence of metabolic activity. The events were interpreted considering the markings: i) intact live cells (stained with cFDA), ii) injured live cells (stained with cFDA and PI), iii) dead cells (stained with PI), and iv) sample artifacts (non-stained with none of the fluorochromes). Data analysis was performed with BD Accuri C6 software (Becton Dickinson and Company) [26].

Quantification of QUE and RES in the nutraceutical formulations

The contents of QUE and RES were determined during storage (day 0, 15, 30, 60, and 90) under refrigeration ($4 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) and room temperature ($25 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Twenty-five mg of samples were diluted into 50 mL of methanol (0.5 mg/mL), filtered with a nylon membrane (0.45 μm , Tedia, Fairfield, CT, USA), and ultrasonicated for 10 min. The quantification of QUE and RES was performed with high-performance liquid chromatography (HPLC) using a chromatograph (Prominence model, Shimadzu) equipped with a quaternary solvent pump (LC-20AT), degasser, thermostatic column compartment (CTO-20A), and automatic sampler (SIL-20A), coupled to a diode array detector (SPD-M20A), and analytical conditions previously described [22]. The data were processed with Lab Solutions software (Shimadzu). The peaks of the HPLC samples were identified by comparing their retention times with those of QUE and RES standards (Sigma-Aldrich). Triplicate injections were performed and mean peak areas were used for quantification. Standard calibration curves were constructed for the quantification of QUE and RES, which were $y = 20309x - 742098$ ($n = 5$, $R^2 > 0.99$) and $y = 13836x - 240815$ ($n = 5$, $R^2 > 0.99$), respectively. Contents of QUE

and RES in the range of 180 and 350 $\mu\text{g/mL}$ and 160 and 300 $\mu\text{g/mL}$, respectively, were used for the construction of the calibration curves.

Estimation of the antioxidant capacity of the nutraceutical formulations

The antioxidant capacity was evaluated during storage intervals (day zero, 15, 30, 60, and 90) under refrigeration ($4 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) and room temperature ($25 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) by measuring the scavenging activity of the ABTS radical (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]) and DPPH radical (2,2 -diphenyl-1-picrylhydrazyl) [27].

ABTS was dissolved in water to reach a 7 mM concentration and allowed to react with a 2.45 mM potassium persulfate solution for 16 h in the dark, when the cationization of ABTS radicals ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), represented by a blue chromophore, was produced. $\text{ABTS}^{\bullet+}$ solution was diluted with distilled water to reach an initial absorbance of 0.7 (± 0.02) at 734 nm. DPPH (Sigma-Aldrich) was dissolved in methanol to reach a 0.03 mM concentration.

An aliquot (100 μL) of the test solutions with concentrations ranging from 0.5 - 3.5 $\mu\text{g/mL}$ for the ABTS scavenging and 5 - 35 $\mu\text{g/mL}$ for the DPPH scavenging was added to 100 μL of the radical solution in a 96-well microplate, and the percentages of absorbance reduction were recorded. The negative control was a mixture (1:1, v/v) of methanol and ABTS or DPPH solution and the blank was a mixture (1:1, v/v) of distilled water and the tested nutraceutical formulation. The absorbance was read at 734 nm (ABTS) or 517 nm (DPPH) after 30 min of incubation at room temperature ($25 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) in the dark.

Absorbance measurements were done with a BioTek Eon Microplate spectrophotometer (Winooski, VT, USA). A calibration curve (% absorbance reduction vs. sample concentration) was obtained. Trolox acid (Sigma-Aldrich) solutions (positive control) were prepared in methanol with concentrations ranging from 50 - 500 μM for DPPH

and 5 - 50 μM for ABTS. The Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) was defined as the concentration of the formulation (mg/mL) producing the same perceived reduction in absorbance induced by 1 mM Trolox.

The antioxidant activity (%) was calculated with the equation:

$$\%AA = \{[ABS_{\text{negative control}} - ABS_{\text{sample}}] \times 100\} / ABS_{\text{negative control}} \text{ (Eq. 1)}$$

Where ABS negative control = absorbance of the negative control (DPPH or ABTS incubated with methanol) and ABSsample = absorbance of the test sample incubated with DPPH or ABTS. The total antioxidant capacity of LFQR formulation was expressed as an equivalent of Trolox (TEAC) per 1 μg of dry matter of a sample (mmol Trolox/ μg).

Statistical analysis

The assays were performed in triplicate on three independent occasions. Results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Statistical analyzes determined significant differences ($p \leq 0.05$) using Student's *t*-test or analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. The results were submitted to a Pearson's correlation analysis to verify the relationship among the dependent variables. Statistical analyzes were performed with Graphpad Prism 9.0 software (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA) and R software 2.15.3 (Ross & Robert Gentleman, University of Auckland, Auckland, New Zealand).

Results and discussion

DSC and TG analysis

Initially, the DSC and TG curves of FOS, QUE, and RES were determined separately to identify endothermic peaks and temperature ranges in which mass loss

occurred independently and later to identify the behavior of these components when forming LFQR and LF (Fig. 1A-C). DSC curves of FOS, composed of 1-kestose (GF2), nystose (GF3), and 1- β -fructofuranosyl nystose (GF4), showed two endothermic peaks at 60.2 and 219.75 °C (Fig. 1A). The endothermic peak at 65 °C could be linked to the FOS glass transition [28]. An early study reported two endothermic peaks at 220 and 226 °C, suggesting the thermal degradation of FOS composed of GF2 and GF3 [29]. TG curves of FOS showed mass loss between 89 and 126 °C (5.2%), 261 and 330 °C (67.7%), and 540 and 636 °C (23.2%) under air atmosphere (Fig. 1B), and between 84 and 134 °C (3.4%), 251 and 322 °C (59.7%), and 366 and 431 °C (11.9%) under nitrogen atmosphere (Fig. 1C). Mass loss up to 120 °C has been linked to FOS water loss, while between 261 and 330 °C to FOS decomposition [28].

DSC curve of QUE showed endothermic peaks at 110, 320, and 346 °C (Fig. 1A), which could be linked to the release of the incorporated solvent, the melting point, and the degradation of QUE, respectively [30]. TG curve of QUE under the air atmosphere showed mass loss between 94 and 120 °C (4.2%) (Fig. 1B) linked to the dehydration process, between 365 and 384 °C (19.8%) linked to the degradation of QUE and release of carbon dioxide [31], and between 481 and 601 °C (69%). The mass loss of QUE under the nitrogen atmosphere occurred between 102 and 125 °C (3.4%), 359 and 383 °C (22.9%), and 542 and 753 °C (56.5%) (Fig. 1C).

DSC curve of RES showed a single endothermic peak at 267 °C (Fig. 1A) linked to the melting point [32], while the TG curve under the air atmosphere showed mass reductions between 334 and 379 °C (31.8%) and between 583 and 687 °C (56.4%) (Fig. 1B) due to RES decomposition [32]. TG curve of RES under the nitrogen atmosphere showed only one peak between 309 and 383 °C (44.1%) (Fig. 1C). TG curves obtained under the air

atmosphere determine the inorganic contents, while TG curves obtained under the nitrogen atmosphere determine the contents of moisture and volatile or organic compounds [33]. It could justify the mass loss of FOS, QUE, and RES near to 100% up to reaching 700 °C under the air atmosphere, while the remaining mass was greater under the nitrogen atmosphere where RES had the lowest mass loss up to 800 °C (59.6%).

The endothermic peaks and the mass loss of LFQR and LF were overall similar in the three tested relative humidity (RH) conditions (11, 22, and 33%), as shown in the representative Figure 1A – 1C (11% RH condition), indicating the stability of these formulations not only to heating but also to relative humidity variations. These results could be linked to the low hygroscopicity of QUE and RES even under high relative humidity [34], as well as of FOS when encapsulated [35]. It was possible to identify an initial endothermic peak between 71 and 73 °C in LFQR and between 77 to 87 °C in LF possibly linked to the increase in the vitreous transition temperature (T_g) of FOS when it is complexed in these formulations, retarding the formation of more reactive rubbery matrices. The encapsulation of FOS by freeze-drying typically increases the T_g , facilitating its stability and use as a cryoprotectant to probiotic cells [36]. A second endothermic peak was identified between 113 and 114 °C in LFQR possibly linked to the dissociation of water molecules from QUE, and a third peak between 205 and 210 °C possibly linked to the FOS thermal degradation. Above 190 and 210 °C in LFQR and LF, respectively, occurred a few sequenced and close endothermic reactions making it difficult to distinguish what each compound refers to.

Overall, the results indicate that LFQR can keep a stable amorphous state (glassy matrix or vitrification) even when stored under room temperature since T_g is possibly reached over 60 °C. Vitrification is a necessary although not sufficient condition to

guarantee the stability of powdered probiotics and other bioactive compounds [37, 38], being necessary to conjoint other measurements indicative of the protection and potential functionalities of these components over time.

Viable cell counts of *L. fermentum* 296 in nutraceutical formulations

The viable cell counts of *L. fermentum* 296 in LFQR and LF after freeze-drying, on day 15 of humidification (11, 22, and 33%) and during storage under refrigeration and room temperature (11% RH) are shown in Table 1. LFQR and LF were prepared with viable cell counts of *L. fermentum* 296 of 9.55 ± 0.26 log CFU/g. These counts were reduced by approximately 1 log CFU/g after freeze-drying, reaching a viable cell count of 8.55 ± 0.25 log CFU/g. LFQR and LF were immediately submitted to humidification at three different RH (11, 22, and 33%) for 15 days. On day 15 of humidification at 33% RH under refrigeration temperature, the viable cell counts of *L. fermentum* 296 in LFQR and LF were 8.13 ± 0.20 and 8.15 ± 0.15 CFU/g, respectively, ($p > 0.05$) indicating that QUE and RES did not negatively impact the probiotic survival under this condition.

The viable cell counts of *L. fermentum* 296 in LFQR and LF on day 15 of humidification at 11% RH under refrigeration temperature were 8.56 ± 0.12 and 8.17 ± 0.18 CFU/g, respectively, and the viable cell counts on day 15 of humidification at 22% RH under refrigeration temperature were 8.43 ± 0.15 and 6.56 ± 0.21 CFU/g, respectively ($p \leq 0.05$). The viable cell counts of *L. fermentum* 296 were below the limit of detection (< 2 log CFU/g) in LFQR and LF on day 15 of humidification under room temperature regardless of the RH. Sharp reductions in viable cell counts of *L. fermentum* 296 in LFQR and LF kept under room temperature could be due to the occurrence of reactions releasing metabolites detrimental to the bacterial cells [39], the presence of oxygen that accelerates the lipid

oxidation [40] since the vials containing the examined formulations remained uncapped during humidification or the reduction of substrate available for bacterial cell use over time [41].

Considering that LFQR and LF on day 15 of humidification at 11% RH under refrigeration temperature had the higher survival rates of *L. fermentum* 296 based on viable cell counts, this condition was selected to humidify the formulations before the long-term storage (90 days, refrigeration and room temperature) after the vials were sealed. The viable cell counts of *L. fermentum* 296 in LFQR and LF (8.10 ± 0.16 and 7.90 ± 0.16 , respectively) on day 15 of refrigeration storage were higher than under room temperature storage (6.73 ± 0.16 and 6.25 ± 0.35 , respectively) ($p \leq 0.05$). This behavior was maintained up to day 90 of storage when LFQR and LF kept under refrigeration temperature had viable cell counts of 6.57 ± 0.18 and 6.11 ± 0.12 CFU/g ($p > 0.05$), respectively, while when kept under room temperature had viable cell counts of 3.30 ± 0.75 and 3.55 ± 0.93 CFU/g, respectively. LFQR and LF kept under room temperature had viable cell counts of >6 log CFU/g only up to day 15 of storage.

The viable cell counts of *L. fermentum* 296 in LFQR and LF up to day 90 of storage under refrigeration temperature were higher than the minimum probiotic doses (*i.e.*, 6 log CFU per g or mL) commonly cited to be consumed and cause health benefits to the host [42, 43], although the effective probiotic dose to cause a health benefit has moved to be a strain-specific feature [22, 44]. The viable cell counts of *L. fermentum* 296 on day 90 of storage were similar in LFQR and LF, indicating that QUE and RES did not impact negatively probiotic survival even after long-term refrigeration storage.

Subpopulations of *L. fermentum* 296 with different physiological states in the nutraceutical formulations

The sizes of the cell subpopulations of *L. fermentum* 296 with distinct physiological states on day 15 of humidification and during storage under refrigeration and room temperature (11% RH) are shown in Table 2. LFQR that underwent the humidification under room temperature, although with viable cell counts below the limit of detection in plate counting, had sizes of *L. fermentum* 296 cells subpopulations characterized as uninjured living cells (PI-_CFDA+) between 40.25 ± 4.46 and $41.75 \pm 0.35\%$, as injured cells (PI+_CFDA+) between 7.45 ± 3.18 and $9.10 \pm 0.99\%$, and as dead cells (PI+_CFDA-) between 3.25 ± 1.20 and $4.05 \pm 0.92\%$, with no significant differences among the three tested RH ($p > 0.05$). Similar results were overall found for LFQR humidified under refrigeration temperature, with sizes of cell subpopulations characterized as uninjured living cells (PI-_CFDA+) between 42.80 ± 0.60 and $46.15 \pm 6.29\%$, as injured cells (PI+_CFDA+) between 6.55 ± 0.35 and $7.70 \pm 2.26\%$, and as dead cells (PI+_CFDA-) between 2.55 ± 0.50 and $3.35 \pm 0.92\%$.

LF that underwent the humidification under room temperature had sizes of cell subpopulations characterized as uninjured living cells (PI-_CFDA+) between 16.90 ± 3.39 and $40.65 \pm 3.18\%$, as injured cells (PI+_CFDA+) between 9.35 ± 1.06 and $29.65 \pm 13.51\%$, and as dead cells (PI+_CFDA-) between 7.60 ± 0.14 and $36.35 \pm 3.89\%$. LF that underwent humidification under refrigeration temperature had sizes of cell subpopulations characterized as uninjured living cells (PI-_CFDA+) between 1.80 ± 0.71 and $27.70 \pm 6.48\%$, as injured cells (PI+_CFDA+) between 9.00 ± 6.34 and $23.00 \pm 4.56\%$, and as dead cells (PI+_CFDA-) between 17.80 ± 5.13 and $65.85 \pm 6.44\%$. The greatest cellular damage to *L. fermentum* 296 was induced in LF humidified at 22% RH under refrigeration temperature,

agreeing with the results from plate counting where this condition caused the greatest viable cell count reductions.

Possibly, colonies of *L. fermentum* 296 from LFQR and LF humidified at room temperature were not visualized in the culture medium due to imposed stressing conditions although keeping their vitality (functioning activities). These populations, called viable but nonculturable (VBNC), although still being putatively able to exert benefits to the host health, need methods that really prove their metabolically active state. Flow cytometry is a complementary method allowing the measurements of different parameters linked to the physiological characteristics and vitality of the examined microorganisms [26]. The flow cytometric results suggest that despite the sharp reductions in viable cell counts, the humidification temperature did not significantly affect the vitality of *L. fermentum* 296 cells in LF and LFQR, supporting the hypothesis that most of this cell population should be in a VBNC state reversible under specific favorable conditions [45].

At the end of the storage (day 90) at 11% RH, significant differences were observed between the sizes of cell subpopulations characterized as living cells (PI-cFDA+) in LFQR or LF kept under refrigeration ($4.70 \pm 0.28\%$ and $19.50 \pm 3.72\%$, respectively) ($p \leq 0.05$), but no significant differences were observed between LFQR and LF under room temperature ($17.40 \pm 7.92\%$ and $17.60 \pm 1.95\%$, respectively) ($p > 0.05$). On day 90 of storage, LFQR or LF had sizes of cell subpopulations characterized as injured cells (PI+cFDA+) of $10.85 \pm 0.50\%$ and $21.60 \pm 5.06\%$ under refrigeration temperature, and of $17.20 \pm 3.96\%$ and $14.60 \pm 3.11\%$ under room temperature, respectively. Only on day 30 of storage under refrigeration or room temperature, LFQR had lower sizes of cell subpopulations characterized as dead cells (PI+cFDA-) (7.70 ± 0.85 and $5.60 \pm 0.29\%$, respectively) when compared to LF (25.40 ± 4.45 and $11.25 \pm 0.07\%$, respectively). These results indicate that

QUE and RES helped to keep the active physiological status of *L. fermentum* 296 up to this storage time regardless of the temperature.

The results from plate counting and flow cytometry analysis indicated that room temperature at 11% RH could also lead *L. fermentum* 296 cells to get into the VBNC state during storage. This inference is reinforced due to the overall no significant difference among the sizes of cell subpopulations of *L. fermentum* 296 characterized as living or injured cells in LF or LFQR regardless of the storage temperature ($p > 0.05$), while the results of plate counting showed higher viable cell counts on day 90 of storage under refrigeration temperature in comparison with room temperature ($p \leq 0.05$).

Quantification of QUE and RES in LFQR during storage

The contents of QUE and RES in LFQR during refrigeration and room temperature storage under 11% RH are shown in Table 3. Representative HPLC chromatograms (day 30) of the quantification of QUE and RES separately as well as in LFQR are shown in Fig. 2. On day zero (baseline), the contents of QUE in LFQR stored under refrigeration and room temperature were 136.22 ± 8.77 and 130.00 ± 3.51 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively, while the contents of RES were 141.37 ± 16.42 and 149.92 ± 15.04 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively. The contents of QUE and RES did not decrease during refrigeration or room temperature storage ($p > 0.05$).

The contents of QUE were 142.22 ± 4.89 and 138.42 ± 7.64 $\mu\text{g}/\text{mg}$ on day 90 of storage under refrigeration and room temperature, respectively. The contents of RES were 132.33 ± 1.78 and 135.70 ± 14.76 $\mu\text{g}/\text{mg}$ on day 90 of storage under refrigeration and room temperature, respectively. Storage temperature did not affect the contents of QUE and RES in LFQR ($p > 0.05$), indicating the stability of the formulation to keep high contents of these

polyphenols during long-term storage with doses effective to cause health effects when ingested in dietary supplements [46, 47].

Estimation of the antioxidant capacity of LFQR during storage

The antioxidant capacity of LFQR measured with DPPH and ABTS radical scavenging activity method during refrigeration and room temperature storage under 11% RH is shown in Table 4. When measured by the DPPH radical reduction, LFQR kept under refrigeration and room temperature storage had an antioxidant capacity of 3.30 ± 0.27 and 3.62 ± 0.12 TEAC, respectively, on day zero (baseline), with values of 2.16 ± 0.04 and 2.44 ± 0.06 TEAC on day 90 of storage. When measured by the ABTS radical reduction, LFQR stored under refrigeration and room temperature had an antioxidant capacity of 8.42 ± 1.29 and 10.48 ± 1.34 TEAC on day zero of storage, respectively, with values of 4.34 ± 0.44 and 5.61 ± 0.17 TEAC on day 90 of storage. These results indicate that even with variable reductions, LFQR kept its antioxidant capacity during refrigeration and room temperature storage. The antioxidant capacity of polyphenols is directly associated with the number of hydroxyl groups in their molecular structures. QUE and RES have three and five hydroxyl groups in their molecules, respectively, enabling their action as antioxidant, antiradical, and anti-inflammatory agents, besides protecting tissues against cellular damage [20].

The detection of high viable counts of *L. fermentum* 296 and high contents of QUE and RES in LFQR, as well as the maintenance of antioxidant capacity up to 90 days of storage under 11% RH and refrigeration temperature are important results in a practical point of view. An early investigation showed the capability of this nutraceutical formulation to beneficially modulate the composition and metabolic activities of human colonic

microbiota [22] and these functionalities could remain during long-term storage under the more favorable conditions determined in this study.

The results of Pearson's correlation test showed that viable cell counts of *L. fermentum* 296 positively correlated with resveratrol contents ($p < 0.01$) and antioxidant capacity ($p < 0.01$). This correlation would justify the reported efficacy of some polyphenols in maintaining high viable cell counts of *Lactobacillus* in freeze-dried matrices, which has been linked to their antioxidant capacity and prevention of probiotic cells from oxygen toxicity [48].

Conclusion

The results showed the thermostability of LFQR after a 15-day-humidification period under distinct RH (11, 22, and 33%), indicating good stability of this formulation to humidity variations and heating. QUE and RES did not negatively affect the survival of *L. fermentum* 296 in LFQR during the humidification period under refrigeration temperature. *L. fermentum* 296 had the highest viable cell counts in LFQR that underwent 15-day-humidification with 11% RH. After the 15-day-humidification with 11% RH, *L. fermentum* 296 maintained high viable cell counts ($>6.5 \log \text{ CFU/g}$) in LFQR up to 90 days of refrigeration storage, while these counts were lower under room temperature storage. The measurements of the physiological state indicate that most of the *L. fermentum* 296 cells in LFQR that underwent humidification or long-term storage under room temperature could be in a VBNC state rather than dead, indicating the maintenance of cell vitality and functionality. LFQR kept high contents of QUE and RES and antioxidant capacity during long-term storage under refrigeration or room temperature. Considering the conditions tested

in this study, the higher stability and potential functionality of LFQR during long-term storage should be guaranteed under 11% RH and refrigeration temperature.

Funding

This study was funded by CNPq (Brazil) (Grant 404353/2021-5) and CAPES (Brazil) (Finance code 001).

Declaration of competing interest

The authors declare no competing interest.

Data availability

Data will be made available on request.

References

1. Eastwood J, Walton G, Van Hemert S, Williams C, Lamport D (2021) The effect of probiotics on cognitive function across the human lifespan: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev* 128:311-327. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.06.032>
2. Oteiza PI, Fraga CG, Mills DA, Taft DH (2018) Flavonoids and the gastrointestinal tract: Local and systemic effects. *Mol Aspects Med* 61:41-49. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.01.001>
3. Chiu HF, Venkatakrishnan K, Wang CK (2020). The role of nutraceuticals as a complementary therapy against various neurodegenerative diseases: A mini-review. *J Tradit Complement Med* 10:434-439. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2020.03.008>

4. Korzeniowska K, Łęska B, Wieczorek PP (2020) Isolation and determination of phenolic compounds from freshwater *Cladophora glomerata*. *Algal Res* 48:101912.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101912>
5. Brüll V, Burak C, Stoffel-Wagner B, Wolffram S, Nickenig G, Müller C, Langguth P, Alteheld B, Fimmers R, Naaf S, Zimmermann BF, Stehle P, Eger S (2015) Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre-) hypertension: a randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial. *Br J Nutr* 114:1263-1277.
<https://doi.org/10.1017/S0007114515002950>
6. Burak C, Wolffram S, Zurc B, Langguth P, Fimmers R, Alteheld B, Stehle P, Eger S (2019) Effect of alpha-linolenic acid in combination with the flavonol quercetin on markers of cardiovascular disease risk in healthy, non-obese adults: A randomized, double-blinded placebo-controlled crossover trial. *Nutrition* 58:47-56.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.06.012>
7. Lin CT, Sun XY, Lin AX (2016) Supplementation with high-dose trans-resveratrol improves ultrafiltration in peritoneal dialysis patients: a prospective, randomized, double-blind study. *Ren Fail* 38:214-221.
<https://doi.org/10.3109/0886022X.2015.1128236>
8. Simental-Mendía LE, Guerrero-Romero F (2019) Effect of resveratrol supplementation on lipid profile in subjects with dyslipidemia: A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition* 58:7-10. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.06.015>
9. Sharifi-Rad J, Quispe C, Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Santini A, Imran M, Moussa A Y, Mostafa NM, El-Shazly M, Sener B, Schoebitz M, Martorell M, Dey A, Calina D, Cruz-Martins N (2022) Resveratrol' biotechnological applications:

- Enlightening its antimicrobial and antioxidant properties. J Herb Med 100550.
<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2022.100550>
10. Zhang B, Xu Y, Lv H, Pang W, Wang J, Ma H, Wang S (2021a) Intestinal pharmacokinetics of resveratrol and regulatory effects of resveratrol metabolites on gut barrier and gut microbiota. Food Chem 357:129532.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129532>
 11. O'Toole PW, Marchesi JR, Hill C (2017) Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. Nat Microbiol 2:1-6.
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.57>
 12. Garcia EF, Luciano WA, Xavier DE, Costa WCA, Oliveira KS, Franco OL, Moraes Júnior MA, Lucena BTL, Picão RC, Magnani M, Saarela M, de Souza EL (2016) Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. Front Microbiol 7:1371.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>
 13. de Albuquerque TMR, Garcia EF, Araújo AO, Magnani M, Saarela M, de Souza EL (2017) *In vitro* characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. Probiotics Antimicrob Proteins 10:704–716.
<https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>
 14. Cavalcante RGS, Albuquerque TMR, Freire MOL, Ferreira GAH, Santos LAC, Magnani M, Cruz JC, Braga VA, de Souza EL, Alves JLB (2019) The probiotic *Lactobacillus fermentum* 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats. Nutr Metab Cardiovasc Dis 29:1408-1417. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2019.08.003>
 15. Oliveira Y, Cavalcante RGS, Neto MPC, Magnani M, de Andrade Braga V, de Souza EL, de Brito Alves JL (2020) Oral administration of *Lactobacillus fermentum* post-

weaning improves the lipid profile and autonomic dysfunction in rat offspring exposed to maternal dyslipidemia. *Food Funct* 11:5581-5594.

<https://doi.org/10.1039/D0FO00514B>

16. Freire MOL, Nascimento LCP, Oliveira KAR, Oliveira AM, Napoleão TH, Lima MS, Lagranha CJ, de Souza EL, de Brito Alves JL (2021a) Effects of a mixed *Limosilactobacillus fermentum* formulation with claimed probiotic properties on cardiometabolic variables, biomarkers of inflammation and oxidative stress in male rats fed a high-fat diet. *Foods* 10:2202. <https://doi.org/10.3390/foods10092202>
17. Freire MOL, Nascimento LCP, Oliveira KAR, Oliveira AM, Lima MS, Napoleão TH, Silva JHC, Lagranha CJ, de Souza EL, de Brito Alves JL (2021b) *Limosilactobacillus fermentum* strains with claimed probiotic properties exert anti-oxidant and anti-inflammatory properties and prevent cardiometabolic disorder in female rats fed a high-fat diet. *Probiotics Antimicrob Proteins* 1-13. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09878-1>
18. Ferreira GAH, Magnani M, Cabral L, Brandão LR, Noronha MF, Cruz JC, de Souza EL, Alves JLB (2022) Potentially probiotic *Limosilactobacillus fermentum* fruit-derived strains alleviate cardiometabolic disorders and gut microbiota impairment in male rats fed a high-fat diet. *Probiotics Antimicrob Proteins* 14:349-359. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09889-y>
19. Braga LR, Pérez LM, Soazo MDV, Machado F (2019) Evaluation of the antimicrobial, antioxidant and physicochemical properties of poly (vinyl chloride) films containing quercetin and silver nanoparticles. *LWT – Food Sci Technol* 101:491-498. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.082>

20. de Souza EL, Albuquerque TMR, Santos AS, Massa NML, Brito Alves JL (2019) Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities—A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59:1645-1659. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425285>
21. dos Santos AS, de Albuquerque TMR, de Brito Alves JL, de Souza EL (2019) Effects of quercetin and resveratrol on *in vitro* properties related to the functionality of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Front Microbiol* 10:1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02229>
22. Sampaio KB, do Nascimento YM, Tavares JF, Cavalcanti MT, de Brito Alves JL, Garcia E F, de Souza EL (2022) Development and *in vitro* evaluation of novel nutraceutical formulations composed of *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin and/or resveratrol. *Food Chem* 342:128264. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128264>
23. McClements DJ (2020) Advances in nanoparticle and microparticle delivery systems for increasing the dispersibility, stability, and bioactivity of phytochemicals. *Biotechnol Adv* 38:107287. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.08.004>.
24. Dower JI, Geleijnse JM, Gijsbers L, Schalkwijk C, Kromhout D, Hollman PC (2015) Supplementation of the pure flavonoids epicatechin and quercetin affects some biomarkers of endothelial dysfunction and inflammation in (pre) hypertensive adults: a randomized double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Nutr* 145:1459-1463. <https://doi.org/10.3945/jn.115.211888>
25. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2016) Safety of synthetic trans-resveratrol as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97. *EFSA J* 14:4368. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4368>

26. Rodrigues NPA, Garcia EF, de Souza EL (2021) Selection of lactic acid bacteria with promising probiotic aptitudes from fruit and ability to survive in different food matrices. *Braz J Microbiol* 52:2257-2269. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00543-x>
27. Moreno O, Atarés L, Chiralt A (2015) Effect of the incorporation of antimicrobial/antioxidant proteins on the properties of potato starch films. *Carbohydr Polym* 133:353-364. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.047>
28. Takahashi M, Tsushima M, Kurashige K, Yoshioka S (2016) Thermal study of fructooligosaccharides and water-soluble dietary fiber. *J Jap Soc Anal Chem* 65:667-670. <https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.65.667>
29. Bersaneti GT, Mantovan J, Magri A, Mali S, Celligoi MAPC (2016) Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *Carbohydr Polym* 151:1132-1138. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.081>
30. Kumar S, Baldi A, Sharma DK (2022) Characterization and in vitro investigation of antiscabietic effect of phytosomes assimilating quercetin and naringenin rich fraction of *Pistacia integerrima* galls extract against *Sarcoptes scabiei*. *J Drug Deliv Sci Technol* 67: 102851. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102851>
31. Borghetti GS, Carini JP, Honorato SB, Ayala AP, Moreira JCF, Bassani VL (2012) Physicochemical properties and thermal stability of quercetin hydrates in the solid state. *Thermochim Acta* 539:109-114. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2012.04.015>
32. Silva RDC, Teixeira JA, Nunes WDG, Zangaro GAC, Pivatto M, Caires FJ, Ionashiro M (2017) Resveratrol: A thermoanalytical study. *Food Chem* 237:561-565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.146>
33. Chakraborty S, Roy P, Pathak A, Debnath M, Dasgupta S, Mukhopadhyay R, Bandyopadhyay S (2011) Composition analysis of carbon black-filled polychloroprene

- rubber compound by thermo-oxidative degradation of the compound. *J Elastomers Plast* 43: 499-508. <https://doi.org/10.1177/0095244311413442>
34. Van Hecke E, Benali M (2022) Solid dispersions of quercetin-PEG matrices: Miscibility prediction, preparation and characterization. *Food Biosci* 49:101868. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101868>
35. Lin D, Xiao L, Li S, Qin W, Loy DA, Chen H, Zhang Q (2022) Effects of fructooligosaccharide and soybean protein isolate in the microencapsulation of walnut oil. *Ind Crops Prod* 177:114431. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114431>
36. Kalita D, Saikia S, Gautam G, Mukhopadhyay R, Mahanta CL (2018) Characteristics of synbiotic spray dried powder of litchi juice with *Lactobacillus plantarum* and different carrier materials. *LWT – Food Sci Technol* 87:351-360. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.092>
37. Tymczyszyn EE, Sosa N, Gerbino E, Hugo A, Gómez-Zavaglia A, Schebor C (2012) Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *Int J Food Microbiol* 155:217-221. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.008>
38. 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 Res Int* 90:251-258. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.003>
39. Oluwatosin SO, Tai SL, Fagan-Endres MA (2022) Sucrose, maltodextrin and inulin efficacy as cryoprotectant, preservative and prebiotic—towards a freeze dried *Lactobacillus plantarum* topical probiotic. *Biotechnol Rep* 33:e00696. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00696>

40. Albadran HA, Chatzifragkou A, Khutoryanskiy VV, Charalampopoulos D (2015)
Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. Food Res Int 74:208-216.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.016>
41. Khraisheh M, Al-Ghouti MA, Al Momani F (2020) *P. putida* as biosorbent for the remediation of cobalt and phenol from industrial waste waters. Environ Technol Innov 20:101148. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101148>
42. Champagne CP, Ross RP, Saarela M, Hansen KF, Charalampopoulos D (2011)
Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. Int J Food Microbiol 149:185-193.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005>
43. Grom LC, Rocha RS, Balthazar CF, Guimarães JT, Coutinho NM, Barros CP, Pimentel TC, Venâncio EL, Junior IC, Maciel PMC, Silva PHF, Granato D, Freitas MQM, Esmerino EA, Silva MC, Cruz AG (2020) Postprandial glycemia in healthy subjects: Which probiotic dairy food is more adequate? J Dairy Sci 103:1110-1119.
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17401>
44. Martinez RCR, Bedani R, Saad SMI (2015) Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: An update for current perspectives and future challenges. Brit J Nutr 114:1993-2015.
<https://doi.org/10.1017/S0007114515003864>
45. Zhang XH, Ahmad W, Zhu XY, Chen J, Austin B (2021b) Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms. Mar Life Sci Technol 3:189-203. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00041-3>

46. Najafi M, Nikpayam O, Tavakoli-Rouzbehani OM, Papi S, Sadat Ahmadiani E, Sohrab G. (2021) A comprehensive insight into the potential effects of resveratrol supplementation on SIRT-1: A systematic review. *Diabetes Metab Syndr* 15:102224. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2021.102224>
47. Popiolek-Kalisz J, Fornal E (2022) The effects of quercetin supplementation on blood pressure—meta-analysis. *Curr Prob Cardiol* 101350. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2022.101350>
48. Succi M, Tremonte P, Pannella G, Tipaldi L, Cozzolino A, Coppola R, Sorrentino E (2017) Survival of commercial probiotic strains in dark chocolate with high cocoa and phenols content during the storage and in a static in vitro digestion model. *J Funct Foods* 35:60-67. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.019>

Table 1. Viable cell counts (log CFU/g) of *Limosilactobacillus fermentum* 296 in LF and LFQR before and after freeze-drying, after the 15-day-humidification period with controlled relative humidity (RH; 11, 22, and 33%), and during storage under refrigeration (RefT, 4 ± 0.5 °C) and room temperature (RoT, 25 ± 0.5 °C) at 11% RH. LF: *L. fermentum* 296 + FOS; LFQR: *L. fermentum* 296 + FOS + quercetin + resveratrol.

Storage condition	Formulations	Before freeze-drying	After freeze-drying	After 15 days of humidification			Storage after humidification at 11% UR under refrigeration				
				11% RH	22% RH	33% RH	Day zero	Day 15	Day 30	Day 60	Day 90
RefT	LFQR	9.55 ± 0.26^A	8.55 ± 0.25^B	8.56 ± 0.12^{aB}	8.43 ± 0.15^{aBC}	8.13 ± 0.20^{aC}	8.92 ± 0.48^{aA}	8.10 ± 0.16^{aB}	8.04 ± 0.11^{aB}	6.29 ± 0.80^{aC}	6.57 ± 0.18^{aC}
	LF			8.17 ± 0.18^{bC}	6.56 ± 0.21^{bD}	8.15 ± 0.15^{aC}	8.46 ± 0.14^{aA}	7.90 ± 0.16^{aA}	7.20 ± 0.10^{aB}	6.50 ± 0.26^{aBC}	6.11 ± 0.12^{aC}
RoT	LFQR			$<2^c$	$<2^c$	$<2^c$	9.08 ± 0.37^{aA}	6.73 ± 0.16^{bB}	5.34 ± 0.06^{bC}	4.90 ± 0.47^{bC}	3.30 ± 0.75^{bD}
	LF			$<2^c$	$<2^c$	$<2^c$	8.56 ± 0.29^{aA}	6.25 ± 0.35^{bB}	4.77 ± 0.10^{bC}	3.78 ± 0.23^{cD}	3.55 ± 0.93^{bD}

Results are expressed as average ($n = 3$) $\pm$ standard deviation

a–c: Values in the same column for the different formulations and storage temperatures with different lowercase letters differ significantly ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test.

A-D: Values in the same row before and after freeze-drying, as well as for different humidity conditions (15-day-humidification period) or days of storage with different uppercase letters differ significantly, based on Tukey's test or Student's t-test ($p \leq 0.05$).

Table 2. Sizes (percent) of living (PI-cFDA+), injured (PI+cFDA+), and dead (PI+cFDA-) cells of *Limosilactobacillus fermentum* 296 in LFQR and LF after the 15-day humidification period with controlled relative humidity (RH; 11, 22, and 33%), and during storage under refrigeration (RefT, 4 ± 0.5 °C) and room temperature (RoT, 25 ± 0.5 °C) at 11% RH. LF: *L. fermentum* 296 + FOS; LFQR: *L. fermentum* 296 + FOS + quercetin + resveratrol.

Storage condition	Formulation	Physiological status	After 15 days of humidification			Storage after humidification at 11% RH under refrigeration				
			11% RH	22% RH	33% RH	Day zero	Day 15	Day 30	Day 60	Day 90
RefT	LFQR	Pi-cFDA+	42.80 $\pm$ 0.6 ^{aA}	43.80 $\pm$ 1.98 ^{aA}	46.15 $\pm$ 6.29 ^{aA}	50.05 $\pm$ 1.74 ^{bA}	47.70 $\pm$ 1.28 ^{aA}	30.25 $\pm$ 2.19 ^{abB}	19.10 $\pm$ 3.61 ^{abC}	4.70 $\pm$ 0.28 ^{bD}
		Pi+cFDA+	6.55 $\pm$ 0.35 ^{bA}	6.65 $\pm$ 0.50 ^{aA}	7.70 $\pm$ 2.26 ^{aA}	2.75 $\pm$ 0.50 ^{aB}	12.35 $\pm$ 6.29 ^{bB}	33.75 $\pm$ 2.62 ^{aA}	3.90 $\pm$ 1.63 ^{aB}	10.85 $\pm$ 0.50 ^{aB}
		Pi+cFDA-	2.55 $\pm$ 0.50 ^{bA}	2.85 $\pm$ 0.21 ^{cA}	3.35 $\pm$ 0.92 ^{bA}	0.65 $\pm$ 0.07 ^{aB}	5.95 $\pm$ 4.74 ^{bB}	7.70 $\pm$ 0.85 ^{bB}	4.90 $\pm$ 2.19 ^{aB}	34.00 $\pm$ 0.71 ^{aA}
	LF	Pi-cFDA+	15.80 $\pm$ 3.17 ^{bB}	1.80 $\pm$ 0.71 ^{bC}	27.70 $\pm$ 6.48 ^{bA}	59.60 $\pm$ 2.80 ^{aA}	48.70 $\pm$ 2.38 ^{aB}	20.70 $\pm$ 7.21 ^{cC}	13.10 $\pm$ 5.87 ^{bC}	19.50 $\pm$ 3.72 ^{aC}
		Pi+cFDA+	23.00 $\pm$ 4.56 ^{aA}	14.35 $\pm$ 1.34 ^{aAB}	9.00 $\pm$ 6.34 ^{aB}	3.80 $\pm$ 1.58 ^{aB}	20.70 $\pm$ 4.35 ^{aA}	28.80 $\pm$ 2.56 ^{aA}	3.40 $\pm$ 0.70 ^{aB}	21.60 $\pm$ 5.06 ^{aA}
		Pi+cFDA-	32.10 $\pm$ 2.39 ^{aB}	65.85 $\pm$ 6.44 ^{aA}	17.80 $\pm$ 5.13 ^{aC}	1.07 $\pm$ 0.30 ^{aB}	7.30 $\pm$ 6.95 ^{bB}	25.40 $\pm$ 4.45 ^{aA}	8.50 $\pm$ 1.41 ^{aB}	32.30 $\pm$ 4.39 ^{aA}
RoT	LFQR	Pi-cFDA+	41.75 $\pm$ 0.35 ^{aA}	41.50 $\pm$ 3.57 ^{aA}	40.25 $\pm$ 4.46 ^{aA}	57.25 $\pm$ 1.74 ^{abA}	53.00 $\pm$ 0.57 ^{aA}	35.35 $\pm$ 4.17 ^{aB}	26.50 $\pm$ 10.18 ^{aBC}	17.40 $\pm$ 7.92 ^{aC}
		Pi+cFDA+	9.10 $\pm$ 0.99 ^{bA}	7.45 $\pm$ 3.18 ^{aA}	8.45 $\pm$ 0.64 ^{aA}	3.45 $\pm$ 0.07 ^{aC}	11.30 $\pm$ 2.55 ^{bBC}	29.40 $\pm$ 3.54 ^{aA}	2.10 $\pm$ 0.57 ^{aC}	17.20 $\pm$ 3.96 ^{aB}
		Pi+cFDA-	4.05 $\pm$ 0.77 ^{bA}	3.25 $\pm$ 1.20 ^{cA}	4.05 $\pm$ 0.92 ^{bA}	0.70 $\pm$ 0.07 ^{aB}	2.95 $\pm$ 0.07 ^{bB}	5.60 $\pm$ 0.29 ^{bB}	3.40 $\pm$ 0.42 ^{aB}	22.10 $\pm$ 6.72 ^{bA}
	LF	Pi-cFDA+	16.90 $\pm$ 3.39 ^{bB}	35.50 $\pm$ 2.43 ^{aA}	40.65 $\pm$ 3.18 ^{aA}	57.30 $\pm$ 6.46 ^{abA}	38.80 $\pm$ 6.46 ^{bB}	25.85 $\pm$ 1.72 ^{bcC}	16.95 $\pm$ 0.50 ^{bC}	17.60 $\pm$ 1.95 ^{aC}
		Pi+cFDA+	29.65 $\pm$ 13.51 ^{aA}	11.10 $\pm$ 0.99 ^{aB}	9.35 $\pm$ 1.06 ^{aB}	3.40 $\pm$ 3.42 ^{aC}	28.60 $\pm$ 3.42 ^{aA}	29.80 $\pm$ 6.93 ^{aA}	3.10 $\pm$ 0.57 ^{aC}	14.60 $\pm$ 3.11 ^{aB}
		Pi+cFDA-	36.35 $\pm$ 3.89 ^{aA}	13.50 $\pm$ 1.64 ^{bB}	7.60 $\pm$ 0.14 ^{bB}	0.40 $\pm$ 4.58 ^{aC}	18.40 $\pm$ 4.58 ^{aA}	11.25 $\pm$ 0.07 ^{bAB}	3.85 $\pm$ 1.49 ^{aBC}	17.40 $\pm$ 1.49 ^{bA}

Results are expressed as average (n = 3) $\pm$ standard deviation

a–c: Values in the same column for the same physiological state in different formulations and storage temperatures with different lowercase letters differ significantly ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test.

A–D: Values in the same row for different humidity conditions or days of storage with different uppercase letters differ significantly ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test.

Table 3. Contents ($\mu\text{g}/\text{mg}$) of quercetin and resveratrol in LFQR formulation, as measured by HPLC, during storage under refrigeration (RefT, $4 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) and room temperature (RoT, $25 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) at 11% relative humidity. LFQR: *L. fermentum* 296 + FOS + quercetin + resveratrol.

Compounds	Storage condition	Day zero	Day 15	Day 30	Day 60	Day 90
Quercetin	RefT	$136.22 \pm 8.77^{\text{aAB}}$	$129.28 \pm 0.96^{\text{aB}}$	$138.85 \pm 12.94^{\text{aAB}}$	$150.47 \pm 2.19^{\text{aA}}$	$142.22 \pm 4.89^{\text{aAB}}$
	RoT	$130.00 \pm 3.51^{\text{aB}}$	$130.78 \pm 7.53^{\text{aB}}$	$133.44 \pm 4.36^{\text{aB}}$	$150.65 \pm 5.38^{\text{aA}}$	$138.42 \pm 7.64^{\text{aAB}}$
Resveratrol	RefT	$141.37 \pm 16.42^{\text{aA}}$	$142.26 \pm 7.64^{\text{aA}}$	$154.97 \pm 22.14^{\text{aA}}$	$138.46 \pm 4.50^{\text{aA}}$	$132.33 \pm 1.78^{\text{aA}}$
	RoT	$149.92 \pm 15.04^{\text{aA}}$	$149.69 \pm 6.20^{\text{aA}}$	$150.91 \pm 4.53^{\text{aA}}$	$145.49 \pm 10.23^{\text{aA}}$	$135.70 \pm 14.76^{\text{aA}}$

Results are expressed as average ($n = 3$) $\pm$ standard deviation

a–b: Values in the same column for the same compound under different storage temperatures with different lowercase letters differ significantly ($p \leq 0.05$), based on the Students' *t*-test.

A-B: Values in the same row with different uppercase letters differ significantly ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test.

Table 4. Antioxidant capacity of LFQR, expressed as TEAC (mmol Trolox/ μ g), measured by absorption measurements with DPPH and ABTS assays, during storage under refrigeration (RefT, 4 ± 0.5 °C) and room temperature (RoT, 25 ± 0.5 °C) at 11% relative humidity. LFQR: *L. fermentum* 296 + FOS + quercetin + resveratrol.

Assay	Storage condition	Day zero	Day 15	Day 30	Day 60	Day 90
DPPH	RefT	3.30 ± 0.27^{aA}	3.23 ± 0.18^{aA}	2.99 ± 0.14^{bAB}	2.64 ± 0.08^{bB}	2.16 ± 0.04^{aC}
	RoT	3.62 ± 0.12^{aA}	3.45 ± 0.17^{aA}	3.38 ± 0.20^{aAB}	3.01 ± 0.16^{aB}	2.44 ± 0.06^{aC}
ABTS	RefT	8.42 ± 1.29^{bA}	7.42 ± 0.26^{aA}	5.15 ± 0.77^{aB}	4.59 ± 0.21^{aB}	4.34 ± 0.44^{aB}
	RoT	10.48 ± 1.34^{aA}	7.31 ± 0.21^{aB}	5.75 ± 1.42^{aC}	5.74 ± 0.48^{aC}	5.61 ± 0.17^{aC}

Results are expressed as average ($n = 3$) $\pm$ standard deviation

a-b: Values in the same column for the different storage temperatures with different lowercase letters differ significantly ($p \leq 0.05$), based on the Students' *t*-test.

A-C: Values in the same row with different uppercase letters differ significantly ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test.

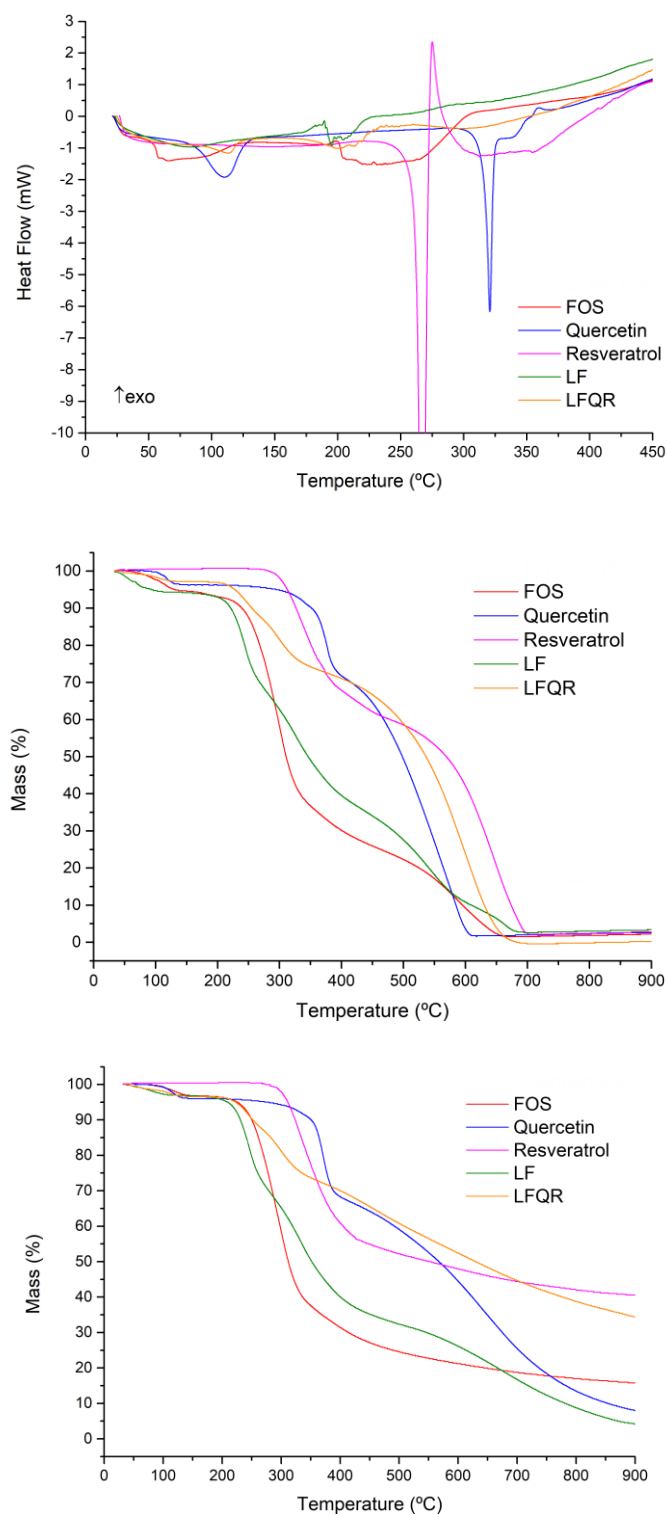


Figure 1. Representative DSC (A) and TG curves under air (B) and nitrogen (C) atmospheres of fructooligosaccharides (FOS), quercetin and resveratrol separately, as well as of LF and LRQF formulations under different humidity conditions (11% RH). LF: *Limosilactobacillus fermentum* 296 + FOS; LFQR: *L. fermentum* 296 + FOS + quercetin + resveratrol.

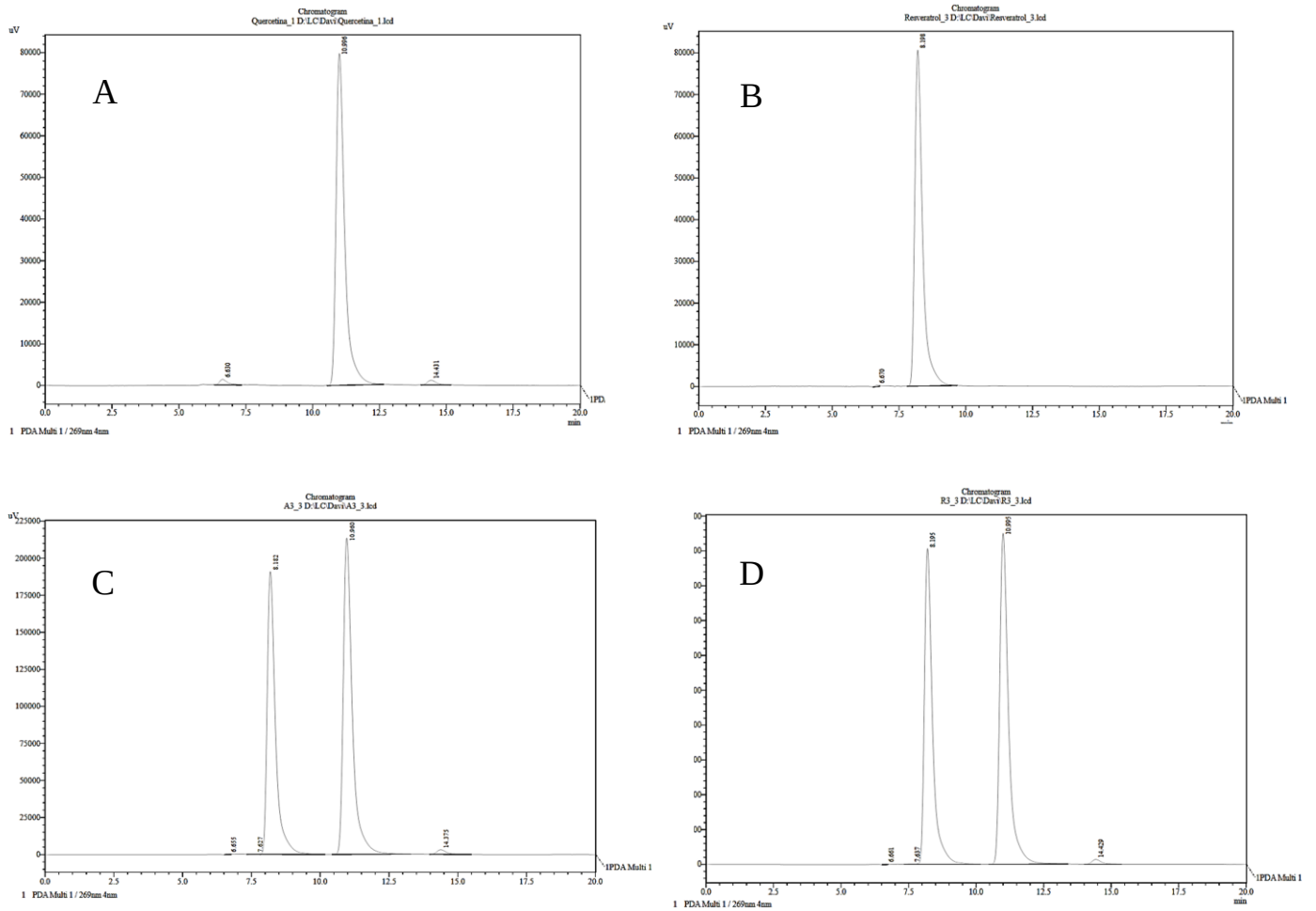


Figure 2. Representative HPLC chromatograms of quercetin (A) and resveratrol (B) separately, as well as in LFQR under day 30 of refrigeration (C) and room temperature (D) storage. LFQR: *L. fermentum* 296 + fructooligosaccharides + quercetin + resveratrol.