



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E

TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – PPGCTA

JOSÉ HONÓRIO PEREIRA LOPES NETO

CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO OBTIDO

DE SORO DE LEITE FERMENTADO POR *Lactiplantibacillus*

***plantarum* E SUA UTILIZAÇÃO COMO AGENTE**

ENCAPSULANTE DE BACTÉRIA PROBIÓTICA

João Pessoa – PB

2023

JOSÉ HONÓRIO PEREIRA LOPES NETO

**CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO OBTIDO
DE SORO DE LEITE FERMENTADO POR *Lactiplantibacillus*
plantarum E SUA UTILIZAÇÃO COMO AGENTE
ENCAPSULANTE DE BACTÉRIA PROBIÓTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Haíssa Roberta Cardarelli

JOÃO PESSOA – PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L864c Lopes Neto, José Honório Pereira.

Caracterização de exopolissacarídeo obtido de soro de leite fermentado por *Lactiplantibacillus plantarum* e sua utilização como agente encapsulante de bactéria probiótica / José Honório Pereira Lopes Neto. - João Pessoa, 2023.

101 f. : il.

Orientação: Haíssa Roberta Cardarelli.
Tese (Doutorado) - UFPB/CT.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Bioatividade. 3. Laticínios. 4. Bactéria probiótica. I. Cardarelli, Haíssa Roberta. II. Título.

UFPB/BC

CDU 664(043)

JOSÉ HONÓRIO PEREIRA LOPES NETO

**CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO OBTIDO DE SORO DE
LEITE FERMENTADO POR *Lactiplantibacillus plantarum* E SUA UTILIZAÇÃO
COMO AGENTE ENCAPSULANTE DE BACTÉRIA PROBIÓTICA**

Tese APROVADA em 28/03/2023.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr^a. Haíssa Roberta Cardarelli – DTA/CTDR/UFPB
Coordenadora da Banca Examinadora



Prof^a. Dra. Patrícia Pinheiro Fernandes Vieira
Siape: 1549268

Prof^a. Dr^a. Patrícia Pinheiros Fernandes Vieira – DGA/CTDR/UFPB
Examinador Externo



Prof^a. Dr^a. Mônica Correia Gonçalves – UATA/UFCG
Examinador Externo



Prof^a. Dr^a. Taliana Kênia Alves Bezerra – DEA/CT/UFPB
Examinador Interno



Prof^a. Dr^a. Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro – DTA/CTDR/UFPB
Examinador Interno

**A Deus,
Dedico.**

Agradecimentos

A DEUS, o maior orientador da minha vida. Ele nunca me abandonou nos momentos de extrema dificuldades e quando tudo parecia sem sentido;

Aos meus PAIS, pilares da minha formação como ser humano, pela ajuda nas dificuldades, pelas comemorações frente a cada vitória e acima de tudo, pelo eterno amor;

A minha esposa, Kerolayne Santos, desde que você passou a fazer parte da minha vida que vivencio uma espiral construtiva. Esta é uma das muitas conquistas ao seu lado. Pelo amor em todos os momentos, principalmente nos desesperos (muitos), bem como as ajudas acadêmicas imensurável;

A Professora Dr.^a Haíssa Roberta Cardarelli, pela orientação nessa pesquisa;

A minha querida e amiga Saionara Soares, pela amizade e apoio desde o início, pelos momentos de desilusão, decepções, mas também de descontração e empatia. Sou eternamente agradecido pela sua amizade e seus preceitos, você faz parte da minha vida;

A professora Dr.^a. Marianna Sobral que me estendeu a mão, sem nem ao menos me conhecer, e fazer por mim o que muitos não fizeram;

A professora Dr.^a. Tatiane Gadelha que permitiu que as adversidades fossem vencidas e me consentiu a utilização das dependências do laboratório a qual é responsável;

Aos professores, apenas os merecidos, envolvidos direto e indiretamente nesta pesquisa, pela contribuição de alguma forma. Porque o trabalho dos professores não se limita à sala de aula. Os professores cuidam e se preocupam como pais, porque são eles que preparam e orientam as gerações futuras; deixo meu recado: “Sejam empáticos, sejam luzes sejam gentis, no mundo já existe muita maldade, a finalidade do professor não é fazer o mal”.

A Maria Isabel que nunca se negou a compartilhar seus conhecimentos comigo. Isso fez toda a diferença. Muito obrigado minha amiga;

A José Evangelista por sua contribuição inestimável nos momentos mais importantes da pesquisa;

Aos técnicos Cláudia Golveia, Karol Sampaio, Rene Silva, Kewen Luz, Natasha Diniz e Maristela Alcântara pelo apoio laboratorial prestado a mim, no momento essencial da pesquisa;

A Universidade Federal da Paraíba e ao Centro Tecnológico de Desenvolvimento Regional pelo suporte prestado;

Ao órgão de fomento CAPES pela concessão da bolsa de estudo do doutorado;

A todos meus amigos e colegas que de alguma forma contribuíram para a execução desta pesquisa.

Meu muito obrigado!

**“Não importa o que fizeram com você. O que importa é o que
você faz com aquilo que fizeram com você.”**

Jean Paul Sarte

RESUMO

As bactérias ácido lácticas são utilizadas devido ao seu potencial probiótico, além de serem capazes de produzir substâncias bioativas. Diante disso, sabe-se que o produto gerado por elas depende do substrato utilizado. O soro de leite é um subproduto que pode ser uma alternativa de baixo custo para produção dessas substâncias através de sua fermentação por ação de bactérias lácticas. A integração do composto obtido com uma tecnologia emergente, como a encapsulação, pode ser capaz de assegurar a bioatividade. O presente trabalho objetivou caracterizar o exopolissacarídeo obtido de soro de leite fermentado (EPS-LN60) por *Lactiplantibacillus plantarum* DF60Mi e utilizá-lo como agente encapsulante de bactéria probiótica. Foram determinados o escore prebiótico, atividade antioxidante e a citotoxicidade do EPS-LN60. Soluções de 0% (F0), 0,5% (F1) e 1,0% (F2) do EPS-LN60 foram produzidas e utilizadas como cobertura de cápsulas de alginato contendo *L. acidophilus* LA-3 e avaliadas quanto à morfologia, sobrevivência do LA-3 durante o armazenamento e após a exposição a condições gastrointestinais simuladas. O rendimento de EPS obtido foi de 777 mg/L, apresentando 43,78% de açúcares totais e 1,82% de proteínas. O espectrograma do EPS apresentou ligações e grupos funcionais compatíveis com polímeros de carboidratos, bem como alta estabilidade térmica (310 °C), proporcionando potencial aplicação industrial. A composição monossacarídica mostrou presença de galactose (51,1%), manose (22,9%), glicose (20,8%) e ramnose (5,2%), resultando em um heteropolissacarídeo. O escore prebiótico do EPS ($1,45 \pm 0,17$) foi superior ao do frutooligossacarídeo ($0,24 \pm 0,05$), a atividade antioxidante foi relevante de $1.862 \pm 23,08 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ e houve a inibição de $36\% \pm 2,78$ do crescimento de células tumorais (HCT-116) *in vitro*. As cápsulas de F1 e F2 com EPS-LN60 apresentaram-se esféricas e uniformes, e o recobrimento permitiu aproximadamente 85% de sobrevivência da cepa LA-3 após os 20 dias. Já F0 não possuiu células viáveis após 10 dias. Durante as condições de simulação gastrointestinal o EPS foi responsável por manter a sobrevivência da cepa LA-3 superior a 86%. Portanto, demonstrou-se a potencialidade do EPS-LN60 quanto a sua bioatividade e utilização como agente encapsulante da cepa LA-3, vislumbrando sua exploração como ingrediente funcional por indústrias de alimentos e farmacêutica.

Palavras-chave: Laticínios; fermentação; polímeros; bioatividade; encapsulação.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are used due to their probiotic potential, in addition to being able to produce bioactive substances. Therefore, it is known that the product generated by them depends on the substrate used. Whey is a by-product that can be a low-cost alternative for the production of these substances through fermentation by the action of lactic acid bacteria. The integration of the compound obtained with an emerging technology, such as encapsulation, may be able to ensure bioactivity. The present work aimed to characterize the exopolysaccharide obtained from fermented whey (EPS-LN60) by *Lactiplantibacillus plantarum* DF60Mi and use it as an encapsulating agent for probiotic bacteria. The prebiotic score, antioxidant activity and cytotoxicity of EPS-LN60 were determined. Solutions of 0% (F0), 0.5% (F1) and 1.0% (F2) of EPS-LN60 were produced and used as a cover for alginate capsules containing *L. acidophilus* LA-3 and evaluated for morphology, survival of LA-3 during storage and after exposure to simulated gastrointestinal conditions. The EPS yield obtained was 777 mg/L, with 43.78% of total sugars and 1.82% of proteins. The EPS spectrogram showed bonds and functional groups compatible with carbohydrate polymers, as well as high thermal stability (310 °C), providing potential industrial application. The monosaccharide composition showed the presence of galactose (51.1%), mannose (22.9%), glucose (20.8%) and rhamnose (5.2%), resulting in a heteropolysaccharide. The EPS prebiotic score (1.45 ± 0.17) was higher than that of the fructooligosaccharide (0.24 ± 0.05), the antioxidant activity was relevant at 1862 ± 23.08 $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ and there was an inhibition of $36 \pm 2.78\%$ of tumor cell growth (HCT-116) in vitro. The F1 and F2 capsules with EPS-LN60 were spherical and uniform, and the coating allowed approximately 85% survival of the LA-3 strain after 20 days. F0 did not have viable cells after 10 days. During the gastrointestinal simulation conditions, EPS was responsible for keeping the survival of the LA-3 strain above 86%. Therefore, the potential of EPS-LN60 was demonstrated in terms of its bioactivity and use as an encapsulating agent for the LA-3 strain, envisioning its exploitation as a functional ingredient by the food and pharmaceutical industries.

Keywords: Dairy products; fermentation; polymers; bioactivity; encapsulation.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1 Espectro do FTIR do EPS-LN60 obtido pela fermentação do soro de leite por *L. plantarum* DF60Mi.....64
- Figura 2 Curva de termogravimetria do EPS-LN60 obtido a partir da fermentação do soro de leite por *L. plantarum* DF60Mi.....66
- Figura 3 Termograma de calorimetria exploratória diferencial do EPS-LN60 a partir de *L. plantarum* DF60Mi.....67
- Figura 4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do EPS-LN60. (A) 500 vezes de magnitude e barra de escala igual a 100 µm. (B) 1000 vezes de magnitude e barra de escala igual a 50 µm..... 68

ARTIGO 2

- Figura 1 Escore da atividade prebiótica das cepas probióticas (DF60Mi e LA-3) utilizando o EPS-LN60 e FOS após 48 h de incubação..... 88
- Figura 2 Citotoxicidade nas linhagens (A) HCT-116, (B) SK-MEL-28, (C) MCF-7 e (D) HaCaT, após tratamento com exopolissacarídeo (EPS-LN60) por 72 horas, utilizando o ensaio de redução do MTT, expresso como percentual de viabilidade celular em diferentes concentrações de substrato..... 90
- Figura 3 Porcentagem de sobrevivência de *L. acidophilus* (LA-3) encapsulado com alginato + EPS-LN60 durante armazenamento a 4 °C..... 92
- Figura 4 Caracterização morfológica das cápsulas. (A) Microscopia óptica da cápsula produzida no aumento de 40 x e barra de escala igual a 100 µm; as setas pretas indicam o microrganismo. (B) Imagem ampliada com auxílio de lupa ótica das cápsulas F0 (alginato + LA-3), F1 (alginato + LA-3 + cobertura de 0,5% EPS-LN60) e F2 (alginato + LA-3 + cobertura de 1,0% EPS-LN60) com aumento de 55 x.....93
- Figura 5 Porcentagem de sobrevivência do *L. acidophilus* (LA-3) das cápsulas produzidas utilizando EPS-LN60 como agente encapsulante durante a exposição às condições gástricas simuladas..... 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condições para análise de simulação das condições gástricas.....	35
Tabela 2	Preparação dos fluidos de digestão simulada.....	36

ARTIGO 1

Tabela 1	Caracterização físico-química do soro <i>in natura</i> (T1) e tratado (T2).....	62
----------	---	----

ARTIGO 2

Tabela 1	Condições para análise de simulação das condições gástricas.....	85
Tabela 2	Preparação dos fluidos de digestão simulada	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius	27
UFC	Unidade Formadora de Colônia	32
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro	32
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por mililitro	35
EST	Extrato Seco Total	28
NaCl	Cloreto de Sódio	31
min	Minuto	28
Fig	Figura	63
CTDR	Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional	26
LSR	Laboratório de Solidificação Rápida	26
LA-3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	16
Chr.	Christian Hansen	26
p	peso	17
v	Volume	17
Ác.	Ácido	61
Log	Logaritmo	32
MRS	de Man, Rogosa e Sharpe	27
RPM	Rotação Por Minuto	27
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno	34
CaCl ₂	Cloreto de cálcio	26
cm	Centímetro	30
mL	Mililitros	27
M	Molar	28
L	Litros	29
g	Gramas	27
kV	Quilovolt	31
mm	Milímetro	30
HCl	Ácido Clorídrico	26
h	Hora	27
NaOH	Hidróxido de sódio	26
ANOVA	Análise de Variância	37

EPS	Exopolissacarídeo(s)	15
atm	Atmosférica	29
e.p.m	Erro padrão médio	34
° GL	Graus Gay-Lussac	29
pH	Potencial hidrogeniônico	17
BAL	Bactéria ácido láctica	18
sBAL	Bactéria ácido láctica <i>starter</i>	20
nsBAL	Bactéria ácido láctica <i>não-starter</i>	20
GRAS	Geralmente reconhecida como segura	20
ACE	Enzima conversora da angiotensina	20
FOS	Frutooligossacarídeo	31
TSA	Ágar triptona de soja	31
TCA	Ácido tricloroacético	33
Nm	Nanômetro	28
P.A	Para análise	26
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>	33

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro	29
mg	Miligrama	29
α	Alfa	17
β	Beta	17
γ	Gama	20
®	Marca registrada	26
%	Porcentagem	15
$\pm$	Mais ou menos	34
x	Vezes	27
Å	Angstrom	31
<	Menor	37
>	Maior	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1.	SORO DE LEITE: fonte de substrato para fermentação de BAL.....	18
2.2.	BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....	19
2.3.	EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIA LÁTICA.....	21
2.4.	ENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1.	LOCAL DE PESQUISA.....	26
3.2.	MATÉRIA-PRIMA, REAGENTES E CULTURA BACTERIANA.....	26
3.3.	FERMENTAÇÃO DO SORO DE LEITE.....	27
3.3.1.	Reativação de <i>L. plantarum</i> DF60Mi e <i>L. Acidophilus</i> LA-3.....	27
3.3.2.	Enumeração da cultura bacteriana.....	27
3.3.3.	Preparo do soro de leite.....	27
3.3.4.	Condições de cultivo.....	28
3.3.5.	Obtenção e Purificação do EPS-LN60.....	28
3.4.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EPS-LN60.....	29
3.4.1.	Rendimento, teor de açúcares e proteínas.....	29
3.4.2.	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	29
3.4.3.	Análise de termogravimetria (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	30
3.4.4.	Análise de monossacarídeos.....	30
3.4.5.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	31
3.5.	BIOATIVIDADE DO EPS-LN60.....	31
3.5.1.	Escore de atividade prebiótica.....	31
3.5.2.	Determinação de atividade antioxidante.....	32
3.5.2.1.	Método poder antioxidante redutor férrico (FRAP).....	32
3.5.2.2.	Poder redutor total.....	33
3.5.3.	Avaliação de citotoxicidade em células tumorais e não tumorais humanas.....	33
3.6.	ENCAPSULAÇÃO.....	34
3.6.1.	Preparo de soluções de reagentes.....	34
3.6.2.	Gelificação iônica.....	34
3.6.3.	Microscopia Ótica.....	35

3.6.4.	Exposição às condições gástricas simuladas.....	35
3.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38
4	RESULTADOS.....	54
	ARTIGO 1.....	55
	ARTIGO 2.....	77
5	CONCLUSÕES.....	103

1 INTRODUÇÃO

As bactérias ácido lácticas (BAL) são caracterizadas como bastonetes ou cocos não formadores de esporos, catalase negativas, anaeróbias ou microaerófilas, Gram-positivas, fermentadoras de carboidratos com produção principal de ácido láctico (MOKOENA et al., 2017; GEORGE et al., 2018) e são, geralmente, utilizadas com finalidade de gerar efeitos benéficos ao hospedeiro (FONG et al., 2020). Certos gêneros possuem efeitos benéficos à saúde humana, como exemplo as cepas com caráter probiótico que têm demonstrado sua potencialidade em produtos alimentícios (ADESULU-DAHUNSI et al., 2018; SILVA et al., 2018, LOPES NETO et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2023).

Do ponto de vista tecnológico, as BAL são amplamente utilizadas na fermentação de produtos lácteos como culturas *starters*, e têm a capacidade de prolongar a vida de prateleira, aumentar a segurança, valor nutricional e qualidade dos produtos (SUYABATMAZ et al., 2023). Ademais, podem produzir substâncias de interesse com aplicabilidade na indústria alimentícia como os polissacarídeos (AYYASH et al., 2018; LI et al., 2020; KORCZ e VARGA, 2021). Estes carboidratos são, em geral, de alta massa molecular produzidos também por plantas verdes, algas, sendo relevantes, do ponto de vista da saúde para os seres humanos (ZHAO e LIANG, 2022). Entretanto, a sua produção é afetada pelos parâmetros de fonte de carbono, nitrogênio, tempo e temperatura de incubação e meio de cultura utilizado (ZHANG et al., 2020).

O soro de leite é um subproduto da indústria de laticínios, obtido a partir da produção de queijos, que frequentemente é descartado de maneira inadequada provocando danos ambientais e perda econômica (SHARMA et al., 2017). Contudo, o soro é um substrato que contém notável valor nutritivo compondo-se de lactose (4,5-5,0%), proteínas (0,6-0,8%), ácido láctico (0,05%), lipídios (0,4-0,5%), minerais e vitaminas (FANGMEIER et al., 2019). Sua composição justifica a possibilidade de utilização como meio fermentativo para produção de outros ingredientes e/ou produtos como exopolissacarídeos (EPS) a partir de bactérias ácido lácticas (ANTUNES et al., 2015; PRAZERES et al., 2012).

Os exopolissacarídeos microbianos são extensamente utilizados como ingrediente alimentar. Na sua grande maioria, o uso de EPS, em âmbito industrial, destina-se a mudança reológica, como aumento de viscosidade, textura e diminuição da sinérese em diversos produtos lácteos, principalmente os leites fermentados (ABEDFAR et al., 2020; AYYASH et al., 2020). Além disso, os EPS microbianos apresentam funcionalidades biológicas como

propriedades antitumorais, antibiofilme, antioxidante, efeitos de redução de colesterol, adesão e colonização e efeito prebiótico (RAHBAR et al., 2019; AYYASH et al., 2020; SUNGUR et al., 2017).

A capacidade prebiótica dos exopolissacarídeos produzidos por BAL (*Weissella cibaria*, *Weissella confusa*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*) foi relatada em alguns estudos, indicando resistência ao suco gástrico e amilase pancreática humana e utilização por microrganismos probióticos como substrato (CUMMINGS e MACFARLANE, 1997; TOPPING e CLIFTON, 2001). Neste caso, a utilização de tecnologias emergentes, como a encapsulação, visa garantir a funcionalidade biológica e sobrevivência dos microrganismos benéficos. Entretanto, a maior dificuldade na manutenção da viabilidade dos probióticos como os *Lactobacillus acidophilus* é sua sensibilidade a passagem durante o sistema gastrointestinal humano (RAHALI et al., 2022).

A encapsulação refere-se a um processo que aprisiona compostos, principalmente os bioativos, como exemplo os microrganismos probióticos, circundados em uma membrana polimérica a fim de proteção bem como liberação específica (ZUIDAM e SHIMONI, 2010). A utilização dessa tecnologia vinculada com um ingrediente potencialmente prebiótico (polissacarídeos) visa melhorar a sobrevivência da cepa probiótica em produtos com caráter funcional bem como auxiliar na estabilidade do probiótico durante condições severas inerentes ao trato gastrintestinal humano (ABEDFAR et al., 2021). Estudos prévios já relataram a utilização da encapsulação com diferentes polissacarídeos (alginato, quitosana, amido, goma guar, gelatina) (ETCHEPARE et al., 2016; KUCK e NOREÑA, 2016; SILVA et al., 2018), entretanto, há escassez de estudos que reportam a utilização de exopolissacarídeos obtidos a partir da fermentação do soro de leite por BAL como agente cobertor de cápsulas probióticas.

Diante do exposto, o trabalho teve por objetivo caracterizar o exopolissacarídeo obtido de soro de leite fermentado por *Lactiplantibacillus plantarum* (EPS-LN60) e utilizá-lo como agente encapsulante de bactéria probiótica. Para isso, fez-se a caracterização físico-química e a avaliação da bioatividade do EPS produzido e sua aplicação como agente de cobertura de cápsulas contendo o *Lactobacillus acidophilus* LA-3.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. SORO DE LEITE: fonte de substrato para fermentação de BAL

O soro de leite é um líquido translúcido de coloração amarelo-esverdeado que é produzido durante a coagulação da caseína na produção de queijo. Existem dois tipos de soro, o soro doce (pH 5,9 a 6,8), que é obtido a partir da coagulação com coalho e o soro de leite ácido (pH 4,4 a 4,8), que é produzido pelo leite coagulado com ácido. Constituem cerca de 90% do volume do leite e deve ser descartado de forma adequada evitando a geração de poluição ao meio ambiente. São gerados de forma abundante pela indústria de laticínios e o gerenciamento desses efluentes vem se tornando um desafio devido aos requisitos legais ligados ao seu descarte, extremamente poluente, e custos desse tratamento muito elevados (LEÓN-LÓPEZ et al., 2020; MACEDO et al., 2020; SILVA e ALVES et al., 2018).

O soro é considerado um dos mais relevantes resíduos da indústria de laticínios e o mais contaminante se descartado de forma inadequada. Pode causar excesso de consumo de oxigênio, eutrofização das águas e toxicidade nos ambientes onde é descartado. No entanto, mesmo com o conhecimento da geração de poluição ambiental, ainda na atualidade, mais de 50% (cinquenta por cento) do produto mundial é descartado de forma irregular em estações de tratamento de águas, ou então, utilizado na alimentação de animais. A indústria aproveita apenas 40% (quarenta por cento) do soro produzido, transformando-o em concentrado de proteína de soro ou adicionando-o em produtos lácteos como bebidas para comercialização, gerando valor agregado e diminuindo os custos com o descarte adequado do soro (CHENGCHENG et al., 2020; LEÓN-LÓPEZ et al., 2020).

O soro de leite retém mais da metade dos nutrientes do leite, é constituído de lactose, sais, vitaminas, enzimas e proteínas ricas em aminoácidos essenciais com alta biodisponibilidade. O soro de leite *in natura* é composto por nutrientes como a lactose (4,5-5%, p/v), proteínas solúvel (0,6-0,8%, p/v) e lipídios (0,4-0,5%, p/v), bem como ácido láctico (0,05% p/v), minerais e vitaminas (FANGMEIER et al., 2019). Pode-se destacar que dos 5% de sólidos totais, aproximadamente 13% são proteínas com a seguinte composição: 50% de β -lactoglobulina, 25% de α -lactoalbumina e 25% de outras frações, mas esta composição pode variar devido a vários fatores como alimentação, raça, estação do ano, período de lactação dentre outros (ZOTTA et al., 2020).

A produção mais limpa e o desenvolvimento sustentável na fabricação de produtos tornam-se gradualmente padrões necessários às indústrias. Dentro dessa premissa, o soro do leite é uma fonte de bio-compostos que pode ser convertida em riqueza material, se utilizado como meio de fermentação de bactérias e leveduras (NGUYEN et al., 2021).

A atividade biológica do soro está relacionada com sua composição e sequências de aminoácidos que são obtidos durante a fermentação por BAL. O soro é considerado um agente antimicrobiano, antioxidante e com propriedades antivirais, devido à presença das proteínas β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas e lactoferrina. As propriedades nutricionais, fisiológicas e funcionais de seus componentes forneceram uma oportunidade importante para a utilização de tecnologias visando a valorização do soro de leite na indústria alimentícia (KASAPCOPUR et al., 2021; CHENGCHENG et al., 2020).

Dentre seus constituintes, a lactose do soro tem sido explorada pelo seu valor biotecnológico na utilização como substrato de fermentação para BAL no intuito de minimizar custos e tornar viável a fabricação de exopolissacarídeos em larga escala (CHENGCHENG et al., 2020; MACEDO et al., 2020; MILERIENE et al., 2021). Em geral, as BAL são bastante exigentes quanto aos nutrientes, necessitam de uma fonte de carbono, minerais, e estudos demonstram que a multiplicação desses microrganismos aumenta na presença de vários aminoácidos ácidos que estão presentes no soro de leite de vaca (RABAIOLIRAMA et al., 2019).

Entretanto, a produção de compostos bioativos, como os exopolissacarídeos, tem alto custo quando visa a produção em larga escala. Aproximadamente 30% dos custos de um processo fermentativo estão diretamente ligados ao tipo de substrato escolhido para estimular a multiplicação dos microrganismos e, conseqüentemente, a produção desses compostos (BALI et al., 2016; SABO et al., 2017). Logo, o soro torna-se acessível à indústria alimentícia pelo seu potencial nutricional e como fonte de substrato para fermentação por bactérias ácido lácticas (BAL), causando menos impacto na cadeia produtiva do ponto de vista ambiental e econômico (SABO et al., 2019).

2.2. BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

De acordo com Zheng et al. (2020), as BAL, mais especificadamente as inseridas na família *Lactobacillaceae*, incluem 261 espécies atualmente. A reclassificação do gênero dos lactobacilos agora possui 35 espécies identificadas através da técnica molecular de sequenciamento do gene da fração 16S do rRNA. São caracterizadas como bastonetes ou cocos não formadores de esporos, catalase negativas, anaeróbias ou microaerófilas, Gram-positivas, fermentadoras de carboidratos com produção principal de ácido lático (GEORGE et al., 2018; WANG et al., 2021), ou seja, são interligadas por características morfológicas, metabólicas e fisiológicas (VON WRIGHT e AXELSSON, 2012).

Diversas são as fontes de isolamento das bactérias lácticas como iogurte, queijos, kimchi, trato gastrointestinal de humanos e animais e diversos produtos fermentados (KWUN et al., 2020). São importantes na fermentação desejável dos alimentos, resultando em diferentes produtos com características particulares, sejam nutricionais, sensoriais ou de conservação (ADESULU-DAHUNSI et al., 2017; SILVA et al., 2018, LOPES NETO et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2023).

Nos últimos anos, as bactérias lácticas se destacaram, dentre outros fatores, pela prevenção de infecções, síntese e biodisponibilidade de nutrientes, sua capacidade de permanecer viável em ambientes ácidos, de reduzir níveis de colesterol sérico no hospedeiro e principalmente pela capacidade de adesão bacteriana que impossibilita a expulsão de outras bactérias do sistema intestinal, evitando a disbiose (LEEUEWENDAAL et al., 2021; GRUJOVIĆ et al., 2021; SUYABATMAZ et al., 2023).

No processo fermentativo podem ser classificadas em dois tipos: bactérias ácido lácticas *starter* (sBAL) e bactérias ácido lácticas *não-starter* (nsBAL) (GRUJOVIĆ et al., 2021). Segundo Medina-Pradas et al. (2017) as culturas *starter* são definidas como as que iniciam o processo de fermentação originando produtos com características diferentes do ponto de vista físico-químico e sensorial. Já as *não-starter* são derivadas do próprio processo como microbiota autóctone, podem ser utilizadas durante a maturação de queijos, para equilibrar a microbiota destruída pela pasteurização e preservar naturalmente os alimentos (BINTSIS, 2018; BLAYA et al., 2018). Um exemplo é a espécie *Lactiplantibacillus plantarum* que pode atuar tanto como cultura *starter* na fermentação de vinhos e carnes como *não-starter* em produtos diversos (BRIZUELA et al., 2018; LARANJO et al., 2017).

A espécie *L. plantarum* é considerada segura “generally recognized as safe” (GRAS) e já foi isolada de mucosas de organismos humanos e animais e de meios com alto teor nutricional (MAYO e FLÓREZ, 2022). Além disso, ganha destaque por possuir a capacidade heterofermentativa, ou seja, utiliza diferentes açúcares durante o processo fermentativo, sob

condições peculiares que resulta em variados compostos com potencial tecnológico e biológico, destinados à indústria alimentícia (ZANNINI et al., 2016).

Por serem consideradas GRAS são amplamente aplicadas para o consumo humano. Uma parte considerável desses microrganismos existentes possuem características de auxiliar na saúde do hospedeiro, como exemplo os probióticos. No entanto, o mecanismo de ação dos microrganismos probióticos ainda não está completamente elucidado. Diante de tal fato, faz-se necessária a correta identificação e conhecimento genético das bactérias ácido lácticas para utilização segura no aspecto tecnológico, nutricional e de saúde (AWAD et al., 2010; NIKOLIC et al., 2012; LANDETA et al., 2013).

A avaliação de funcionalidade probiótica abrange a sobrevivência à passagem pelo trato gastrointestinal e a multiplicação e colonização no intestino, ou seja, as cepas devem ser capazes de sobreviver na presença de sais biliares e enzimas, ou serem ingeridas utilizando um veículo alimentar com função de transportador e/ou protetor para garantir resistência a condições gástricas (FAO/ WHO, 2001).

Vale ressaltar que os benefícios ao hospedeiro gerados pelas bactérias probióticas são dependentes do metabolismo, podendo gerar diferentes peptídeos bioativos como as bacteriocinas, hormônios, enzimas, peptídeos com capacidade de inibir a enzima conversora da angiotensina (ACE) e aminoácido não-proteico (γ -aminobutírico – GABA). Além disso, atuam como cepas fermentativas e apresentam características metabólicas como a capacidade de hidrolisar proteínas, produzir ácido orgânicos, aromas, bacteriocinas, vitaminas e exopolissacarídeos a depender do substrato no qual estão inseridas (WANG et al., 2021).

2.3. EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de açúcares, provenientes de algas, fungos ou bactérias, não-tóxicos, naturais e geralmente de alto peso molecular (ZHAO e LIANG, 2022). Podem permanecer ligados à célula na parte externa (polissacarídeos capsulares), ou serem excretados para o meio externo, denominados de exopolissacarídeos (EPS) (AYYASH et al., 2018). Diversos microrganismos possuem a habilidade de produção de EPS, porém as bactérias ácido lácticas são amplamente utilizadas, pois são geralmente reconhecidas como seguras devido a sua grande utilização para consumo humano (ABUSHELAIBI et al., 2017).

O mecanismo biosintético para obtenção de EPS por microrganismos envolve a produção de dois tipos de componentes que diferem pela sua estrutura química, os homo e heteropolissacarídeos. Os homopolissacarídeos são formados a partir de ligações glicosídicas de apenas um monossacarídeo. O principal desta classe é o α -D-glucanos (dextranos) (ZHOU et al., 2019).

Já os heteropolissacarídeos são compostos com repetidas unidades de diferentes monossacarídeos como D-glicose, D-galactose, L-ramnose e seus derivados N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina e ácido glurônico (DE VUYST; DEGEEST, 1999). Já há relatos de que esse grupo contém de 100 a 90.000 unidades de oligossacarídeos, formando compostos lineares ou ramificados (OLDAK et al., 2017). De acordo com De Vuyst; Degeest (1999), o mecanismo de síntese desse grupo difere do homopolissacarídeos, pois unidades são formadas dentro das células, porém são transportadas através da membrana celular para posteriormente serem polimerizadas fora da célula. A condição de fermentação para sua obtenção é primordial para determinação da quantidade e tipo de substância formada.

Sabe-se que, alterando as condições de fermentação como substrato, temperatura de incubação, pH, oxigênio, fontes de carbono e nitrogênio, pode-se aumentar o rendimento do EPS a ser obtido (BENGOA et al., 2018). Os maiores níveis de EPS já obtidos por BAL foram de 2,775 g/L utilizando *L. rhamnosus* RW-9595M (MACEDO et al., 2002) e 2,5 g/L usando *L. kefiranofaciens* WT-2B (MAEDA et al., 2004).

Os EPS têm sido extensamente utilizados com o objetivo de modificar as características reológicas e sensoriais de produtos alimentícios, como iogurte, queijos (LYNCH et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2023) e sorvetes (DERTLI et al., 2016). São geralmente utilizados industrialmente como bioespessantes devido a sua capacidade emulsificante, gelificante e estabilizante (HUSSAIN et al., 2017; LLUIS-ARROYO et al., 2014). Entretanto, eles também possuem propriedades fisiológicas que resultam em benefícios à saúde. Autores já relataram atributos prebióticos, antitumoral, imunomodulação e redução do colesterol (RAHBAR et al., 2019; AYYASH et al., 2020). Além disso, podem oferecer proteção à célula bacteriana na presença de metais pesados, possuírem capacidade de reconhecimento, adesão a superfícies e desenvolvimento de biofilmes (LIMOLI et al., 2015).

Estudos já relataram algumas propriedades biológicas dos EPS microbianos, mais especificamente das espécies de *L. plantarum* como antioxidante e apresentaram citotoxicidade frente a células tumorais humanas (WANG et al., 2014; XU et al., 2019; AYYASH et al., 2020). A atividade prebiótica também já foi demonstrada por Lee et al. (2021) ao estudarem o polissacarídeo extraído de *L. plantarum* MG989.

De acordo com Zannini et al. (2016), o estudo dos EPS microbianos visa aplicações que sejam inovadoras e agreguem valor aos produtos gerados pela indústria alimentícia. Dentro desta visão, a relação da pesquisa acadêmica com a indústria torna-se fundamental para permitir o emprego de novas tecnologias. Conforme demonstrado anteriormente, o uso do EPS de origem microbiana tem se limitado à melhoria de características reológicas e sensoriais de alimentos, assim como à promoção de efeitos benéficos à saúde. Atualmente, há escassez de estudos na aplicação de exopolissacarídeos provenientes de subprodutos e atuando como agente de cobertura na encapsulação de microrganismos, sendo uma área propícia ao desenvolvimento de pesquisas inovadoras.

2.4. ENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS

Encapsulação é uma técnica que visa proteção de um determinado componente sensível a condições adversas através de uma matriz polimérica (ZUIDAM e SHIMONI, 2010). A encapsulação de probióticos se resume ao processo de aprisionamento de células através de um biopolímero a fim de reduzir danos em condições drásticas, incluindo o sistema gastrointestinal e reações indesejáveis, favorecendo sua sobrevivência e liberação no alvo desejado (RAZAVI et al., 2021).

Diversos são os benefícios dessa tecnologia, sendo importante destacar a aptidão em minimizar os impactos sensoriais do composto encapsulado, impedir sua reação com outros compostos na matriz e reações de oxidações, bem como a perda significativa de viabilidade celular durante o processamento, armazenamento, vida de prateleira e digestão gastrointestinal, assim como permitir sua liberação controlada (LIU et al., 2017; TERPOU et al., 2019; PÉREZ-SOTO et al., 2021).

O processo de encapsulação envolve o agente ativo (fase interna) e o material de parede (fase externa), o primeiro refere-se à substância a ser encapsulada e o segundo está relacionado com o material encapsulante (ZUIDAM e SHIMONI, 2010). Um dos grandes desafios da encapsulação de agentes bioativos é a identificação do material estrutural adequado, que sejam substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS), assim como o método de produção das partículas ou cápsulas que possa ser introduzido em produtos alimentícios.

Segundo Joye e McClements (2014), inúmeros são os fatores que influenciam na escolha de um material biopolimérico para utilização como material de parede na encapsulação, dentre eles destacam-se (i) propriedades funcionais e físico-químicas das partículas desejadas, como tamanho, polaridade, permeabilidade e perfil de liberação; (ii) propriedades do biopolímero, como exemplo, polaridade e solubilidade; (iii) natureza do agente a ser encapsulado (estabilidade). Dentre os materiais de parede mais estudado estão o alginato de sódio e cálcio, goma gelana e xantana, carragena, quitosana, amido e outros polímeros emergentes, sendo que seu uso mais apropriado deve ser adequado para a técnica a ser empregada (TA et al., 2021).

O alginato de sódio é definido como um polímero de açúcar aniônico com cadeia linear de monômeros de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônicos que se agrupam formando os homo ou heteropolissacarídeos. São produzidos através da fermentação por microrganismos do gênero *Azotobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. e tem a capacidade de formar géis insolúveis em cloreto de cálcio, que ao entrarem em contato com este, os íons de cálcio se ligam aos grupos carboxilas da cadeia dos ácidos gulurônicos formando géis, portanto denomina-se de gelificação iônica (LEE et al., 2012; ZIKMANIS et al., 2020). Do ponto de vista da indústria alimentar, o alginato é amplamente utilizado devido a sua natureza não tóxica, biodegradável e a capacidade de modificação nas propriedades reológicas, por isso é usado como aditivo alimentar na função de estabilizante e gelificante (ETCHEPARE et al., 2016; RATHER et al., 2017; ZIKMANIS et al., 2020). Além do mais pode ser usado com diferentes técnicas de encapsulação (LOPES et al., 2019; KIM et al., 2020; ROMERO-CHAPOL et al., 2022; LI et al., 2023).

O mecanismo de encapsulação pode ser definido em três etapas: (i) formação da parede ao redor do agente ativo; (ii) garantir o não vazamento do agente encapsulado; (iii) proporcionar a exclusão dos materiais indesejáveis (FANG e BHANDARI, 2010; ZUIDAM e SHIMONI, 2010). Segundo Terpou et al. (2019), foram relatados diversos tipos de técnicas para encapsulação de probióticos como *freeze-drying*, *spray-drying*, separação de fases, emulsificação, extrusão e processo de revestimento.

A técnica de gelificação iônica é comum tratando-se de microencapsulação para geração de micropartículas (SANDOVAL-MOSQUEDA et al., 2019; LOPES NETO et al., 2021; PANDEY et al., 2021), além disso, Polleto et al. (2019) afirmaram que esta técnica não proporciona riscos severos ao composto ativo como altas temperaturas e solventes químicos, além de ser considerada uma técnica de baixo custo, simples e facilmente acessível. A encapsulação através da técnica de gelificação iônica com alginato de sódio é vista como uma

das mais usuais pela indústria. Entretanto, o gel formado é poroso e tolera a permeabilidade da umidade e de fluidos gástricos e intestinais, que por sua vez, provoca diminuição na proteção da cápsula formada, deixando o composto ativo vulnerável (LIU et al., 2017).

Diante disso, pesquisas vêm sendo desenvolvidas para suprir a deficiência principal do alginato, a alta porosidade. Estudos de encapsulação de probióticos utilizando alginato com diferentes polímeros já foram relatados, por exemplo, por Bekhit et al. (2016) com amido, De Prisco et al. (2017) com quitosana, Kim et al. (2020) com extrato de raiz de chicória e Luca e Orian et al. (2021) com inulina e oligofructose. Pelo fato da grande maioria dos alginatos provir de fontes vegetais e estar associada a limitações como possibilidade de provocar danos às bactérias além de não serem fontes digeríveis por elas, a atenção está voltada para a obtenção de polissacarídeos a partir de fontes biológicas (URTUVIA et al. 2017; VETRIK et al., 2018) como os exopolissacarídeos.

Os exopolissacarídeos, tem se destacado pela ampla área de aplicação, por funcionarem como protetores de probióticos frente as condições gástricas severas, utilizados como melhoradores de reologia e textura em produtos alimentícios, bem como propriedades antioxidantes, anticoagulantes e antitumorais (ZHAO et al., 2016; RAJOKA et al., 2018; ZHOU et al., 2019).

Além dos benefícios anteriormente citados dos exopolissacarídeos, sua utilização como recobrimento de cápsulas de alginato de sódio contendo probióticos pode garantir o aumento da estabilidade das cápsulas formadas, e consequentemente, maior sobrevivência do agente ativo, principalmente pela diminuição dos poros do alginato. A técnica de recobrimento tem demonstrado eficiência na taxa de sobrevivência de probióticos quando se utilizou quitosana e fitato de sódio na encapsulação de *Lactobacillus pentosus* (WANG et al., 2019). Anselmo et al. (2016) relataram que recobrimento de cápsulas de alginato com quitosana aumentou a sobrevivência de microrganismos probióticos frente aos sais biliares e condições ácidas. Por fim, os autores ainda evidenciaram que o recobrimento foi responsável por promover uma proteção adicional ao microrganismo e que esta técnica pode ser útil na encapsulação de probióticos com diversos polímeros. A vantagem do EPS na microencapsulação pode estar relacionada aos benefícios resultantes da rápida produção a partir da utilização de resíduos industriais como fonte de carbono. Entretanto, a carência de estudos com a utilização de EPS, proveniente do processo fermentativo utilizando o soro como substrato, na encapsulação de bactérias probióticas constitui tema com potencial de exploração por novas pesquisas científicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LOCAL DE PESQUISA

A produção e caracterização físico-química do soro de leite de vaca foram realizadas nos Laboratórios de Processamento de Alimentos e de Análises Físico-Químicas, respectivamente. Os experimentos microbiológicos foram efetuados no Laboratório de Microbiologia, todos pertencentes ao Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR) da Universidade Federal da Paraíba – UFPB. As análises de microestrutura das cápsulas e as análises de caracterização físico-química do EPS-LN60 foram realizadas no Laboratório de Metais e Laboratório de Solidificação Rápida (LSR) no Centro de Tecnologia – UFPB, exceto a análise de composição de monossacarídeos que foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná – UFPR. A análise de citotoxicidade do EPS-LN60 foi realizada no Laboratório de OncoFarmacologia do Centro de Ciências da Saúde – UFPB. A produção das cápsulas contendo LA-3 foi realizada no Laboratório de Microbiologia – CTDR/UFPB.

3.2. MATÉRIA-PRIMA, REAGENTES E CULTURA BACTERIANA

O leite de vaca pasteurizado utilizado foi proveniente da empresa Betânia Lácteos S.A, localizada no município de Fortaleza, Ceará, Brasil. O soro de leite foi obtido a partir da fabricação do queijo minas frescal, sem adição de culturas lácticas. Além disso, cloreto de cálcio 40% (v/v) (Rica Nata, Piracema, Minas gerais, Brasil) e coagulante (Ha-la, Chr. Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil) foram utilizados. A cultura probiótica utilizada para fermentação do soro foi *Lactiplantibacillus plantarum* DF60Mi isolada de Furtado et al. (2014) e cedida em colaboração pela Universidade de São Paulo, e registrada no Patrimônio Genético do Brasil (SISGEN) sob código A5C7E65, NaOH (Neon, Suzano, São Paulo, Brasil) e HCl (Química Moderna, Barueri, São Paulo, Brasil) para ajuste de pH. Os materiais utilizados para a encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* LA-3[®] (Sacco, Campinas, São Paulo, Brasil) foram alginato de sódio (Ultrapan, Valinhos, São Paulo, Brasil), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl₂)

(Química moderna, Barueri, São Paulo, Brasil), citrato de sódio P.A (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e o EPS-LN60 obtido neste estudo.

3.3. FERMENTAÇÃO DO SORO DE LEITE

3.3.1. Reativação de *L. plantarum* DF60Mi e *L. acidophilus* LA-3

O processo de reativação da cultura *L. plantarum* e *L. acidophilus* mantida em glicerol foi adaptado de Gebara (2015) e Silva (2016). Reativou-se a cultura mantida em glicerol em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), transferindo-se 100 µL da cultura para 5 mL de meio e incubando-se a 37 °C por 24 h. Em seguida, transferiu-se, mantendo a mesma proporção, a cultura do primeiro repique para um tubo contendo volume maior de caldo MRS, e incubou-se sob as mesmas condições, seguido da centrifugação a 6500 rpm em centrífuga (6428 x g) (Modelo: 5430R, Eppendorf, Hamburgo – Alemanha) a 4 °C por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* com mesmo volume de água peptonada 0,1% (p/v) (Kasvi, São José dos Pinhais – PR).

3.3.2. Enumeração da cultura bacteriana

A enumeração de células viáveis de *L. plantarum* DF60Mi e *L. acidophilus* LA-3 foi realizada em superfície pela técnica de microgota, em ágar MRS, através de diluições decimais seriadas utilizando água peptonada 0,1% (p/v). As placas foram incubadas a 37 °C por 72 h em jarras de anaerobiose (Permutation, Curitiba – PR) com auxílio de vela (IDF, 1995).

3.3.3. Preparo do soro de leite

O soro de leite obtido a partir da fabricação de queijo Minas frescal em escala laboratorial (SILVA, 2005) foi tratado a fim de se obter um substrato livre de possíveis contaminantes durante a etapa de fermentação conforme adaptação de Prathima et al., 2014. O soro obtido foi centrifugado a 6500 rpm (6428 x g) a 4 °C durante 10 min para auxiliar na remoção de gordura. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em tecido tipo *voil* estéril e o pH foi ajustado para 4,3 com auxílio de solução esterilizada de HCl a 1 M (Química Moderna, Barueri, São Paulo, Brasil), a fim de precipitar a caseína residual. Posteriormente, realizou-se o tratamento térmico com vapor fluente a 100 °C durante 30 min e pressão atmosférica. Então, centrifugou-se novamente sob as mesmas condições para retirar as proteínas precipitadas pela ação do calor. Após o tratamento, o pH foi ajustado para 6,5 - 6,8 com auxílio de solução de NaOH a 1 M (Neon, Suzano, São Paulo, Brasil), obtendo-se, assim, o soro tratado. Os soros, *in natura* (T1) e após tratamento (T2), foram analisados quanto às características físicas e químicas: pH, teor de gordura (%); acidez titulável (g ácido lático/ 100 mL), teor de proteínas (%), resíduo mineral fixo (%), umidade (%) e extrato seco total (EST) (AOAC, 2019).

3.3.4. Condições de cultivo

Inicialmente, a cultura *L. plantarum* DF60Mi foi reativada conforme item 3.3.1, padronizada com densidade óptica de 1,5 a 1,6 a 600 nm lida em espectrofotômetro (Eppendorf BioSpectrometer® Basic, Hamburgo, Alemanha). A partir deste concentrado, cerca de 6% (v/v), foi adicionado em 1 L de soro tratado, conforme item 3.3.2, adicionado de 2% (p/v) de glicose (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil), sendo incubado a 37 °C pelo período de 48 h (Cerning et al., 1992). A viabilidade celular e o pH foram monitorados durante o processo de fermentação nos tempos 0, 24 e 48 h. O tempo de fermentação foi definido através da literatura e testes preliminares a fim de evitar a degradação do EPS produzido.

3.3.5. Obtenção e Purificação do EPS-LN60

O processo de extração consistiu em submeter o soro fermentado ao banho ultrassônico durante 30 min, a fim de romper as células bacterianas que possivelmente produziram exopolissacarídeos do tipo capsular. Em seguida, o pH foi ajustado próximo da neutralidade (7,0) com solução de NaOH a 1 M. O soro fermentado foi submetido ao calor (vapor fluente, 1 atm, 100 °C/ 30 min) para inativação de possíveis enzimas que viessem a degradar açúcares e proteínas. Em seguida, o soro foi centrifugado a 6500 rpm (6428 x g) (Modelo: 5430R, Eppendorf, Hamburgo – Alemanha) a 4 °C por 10 minutos. Foi adicionado álcool a 96 °GL a -20 °C na proporção de 1:2 (v/v) ao sobrenadante. A mistura foi agitada manualmente e acondicionada a -20 °C durante 24 h para precipitação do EPS. O precipitado foi recolhido por centrifugação sob as mesmas condições já mencionadas, seguindo para a diálise utilizando membrana de celulose de 3 kDa (Sigma, Missouri – EUA) contra água destilada durante 48 h, sendo necessária a troca da água a cada 12 h. O exopolissacarídeo úmido purificado foi liofilizado (Freeze-drier, Liobras, Model: L101, São Carlos, São Paulo, Brasil) a - 34 °C e 280 micrômetros de mercúrio (µmHg) durante 2 dias e utilizado para análise posterior (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2015; CERNING et al., 1992; NGUYEN et al., 2018; GEEL-SCHUTTEN et al., 1998).

3.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EPS-LN60

3.4.1. Rendimento, teor de açúcares totais e proteínas

O rendimento foi obtido através da concentração do exopolissacarídeo purificado liofilizado em mg por litro de soro de leite (mg/L). O extrato foi analisado quanto ao conteúdo de açúcares totais conforme método de antrona (HEDGE e HOFREITER, 1962), usando glicose como padrão. O teor de proteínas foi estimado de acordo com o método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2019).

3.4.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR é uma ferramenta essencial para identificar as frequências vibracionais das moléculas que ao absorverem a radiação tendem a sofrer reações de transição vibracional e/ou rotacional que permitem identificar os tipos de ligações químicas presentes no material (MISHRA e JHA, 2009). Os grupos funcionais foram analisados pela espectroscopia de infravermelho com transformação de Fourier (FTIR), de acordo com a metodologia proposta por Li et al. (2014), na qual a amostra (1 mg) é misturada com 100 mg de KBr e escaneada de 500 – 4000 cm^{-1} .

3.4.3. Análise de termogravimetria (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O comportamento térmico do exopolissacarídeo foi determinado através de termogravimetria e análise calorimétrica diferencial. A termogravimetria envolve a aplicação de temperaturas de 30–500 °C sob atmosfera de nitrogênio, a uma velocidade de cerca de 10 °C/ min a fim de determinar a perda de peso.

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC), a qual estuda a variação da entalpia com indução de calor (AHMED et al., 2013), ou seja, a propriedade térmica do EPS, foi realizada utilizando 5 mg da amostra purificada em uma bandeja de alumínio, a qual foi selada e analisada. Os pontos de entalpia e de fusão foram determinados a uma taxa de aquecimento de 10 °C/ min até temperatura máxima de 400 °C (WANG et al., 2010).

3.4.4. Análises de monossacarídeos

A composição de monossacarídeos foi determinada em amostra do EPS purificado (2 mg) através da hidrólise com solução de ácido trifluoracético (1 mL) a 2 M (100 °C/ 8 h), e posteriormente reduzidas com solução de NaBH_4 (WOLFROM; THOMPSON, 1963a) e acetiladas com ácido acético anidrido-piridina (1:1, v/v) (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Por fim, as misturas de acetado de aldiol resultantes foram examinadas através de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-MS) (Varian Ion-Trap 2000R, Santa Clara, EUA), usando coluna DB225 (30 m x 0,25 mm, Agilent Folsom, EUA)

programada para 50-220 °C a 40 °C/ min, e hélio como gás de arraste. Os componentes foram identificados pelo tempo de retenção típicos de impacto de elétrons e foram expressos em porcentagem de cada açúcar presente na amostra (JANSSON et al., 1976). Utilizou glicose, xilose, arabinose, galactose, lactose, sacarose, ramnose, frutose, manose, inositol como padrões analíticos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

3.4.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura foi analisada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) com detector eletrossecundário, Modelo LEO 1430 (Zeiss, Goettingen, Alemanha). Cerca de 5 mg da amostra, purificada e liofilizada, foram dispostos em papel adesivo de carbono e cobertos com ouro 200 Å (ångström) e submetidos a uma tensão de aceleração de 10 kV. A distância de trabalho foi de 10 mm conforme adaptado de Castro-Cislaghi et al. (2012) e Wang et al. (2015).

3.5. BIOATIVIDADE DO EPS-LN60

3.5.1. Escore de atividade probiótica

A multiplicação da cultura probiótica na presença do EPS-LN60 foi determinada de acordo com a metodologia adaptada de Huebner et al. (2007) e de Lee et al. (2021). Ainda de acordo com os autores a atividade probiótica reflete a aptidão do substrato de suportar a multiplicação de bactérias probióticas frente às entéricas, como a espécie *Escherichia coli*, comparada à multiplicação em substrato não-probiótico (glicose).

As culturas probióticas (DF60Mi e LA-3) foram reativadas de acordo com o item 3.3.1. A cepa *E. coli* 8739 foi reativada em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) seguindo o mesmo procedimento. O teste consistiu em adicionar 1% (v/v) da cultura reativada nos tubos contendo caldo MRS (DF60Mi e LA-3) ou caldo M9 (KH₂PO₄ – 15 g/L; NaCl – 2,5 g/L; Na₂HPO₄ – 33,9 g/L; NH₄Cl – 5,0 g/L) (*E. coli*) com 1%

(p/v) de glicose ou 1% (p/v) de EPS ou do frutooligossacarídeo (FOS) (Orafti® P95 Beneo, Mannheim, Germany). O FOS foi utilizado com o controle positivo, enquanto que a glicose foi usada como substrato não-prebiótico. Os tubos foram incubados a 37 °C em anaerobiose e após 0, 24 e 48 h retirou-se alíquotas para enumeração em ágar MRS (LA-3) ou ágar TSA (Tryptic Soy Agar, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) (aerobiose) (*E. coli* 8739), 37 °C/ 48 h.

Os substratos com alta taxa de atividade prebiótica sustentam, em geral, a multiplicação das bactérias probióticas, com densidades celulares (UFC/mL) comparáveis àquelas quando cultivadas em glicose. O escore da atividade prebiótica foi definido de acordo com a Equação 1.

$$\left\{ \frac{(\text{probiótico log UFC mL}^{-1} \text{ no prebiótico a 48 h} - \text{probiótico log UFC mL}^{-1} \text{ no prebiótico a 0 h})}{(\text{probiótico log UFC mL}^{-1} \text{ em glicose a 48 h} - \text{probiótico log UFC mL}^{-1} \text{ em glicose a 0 h})} - \frac{(E.coli \text{ log UFC mL}^{-1} \text{ no prebiótico a 48 h} - E.coli \text{ log UFC mL}^{-1} \text{ no prebiótico a 0 h})}{(E.coli \text{ log UFC mL}^{-1} \text{ em glicose a 48 h} - E.coli \text{ log UFC mL}^{-1} \text{ em glicose a 0 h})} \right\} \quad (\text{Eq. 1})$$

3.5.2. Determinação da atividade antioxidante

3.5.2.1. Método poder antioxidante redutor férrico

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) é definido pela redução do complexo Fe^{+3} a Fe^{+2} na presença de 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) e de uma substância com capacidade antioxidante em ambientes ácidos (Benzie e Strain, 1996). Inicialmente, prepararam-se as soluções de TPTZ a 10 mM (Dinâmica, São Paulo, Brasil) diluído em uma solução de HCl a 40 mM (Química Moderna, São Paulo, Brasil); cloreto férrico a 20 mM (Dinâmica, São Paulo, Brasil); tampão acetato a 0,3 M, pH 3,6; sulfato ferroso a 2 mM (Dinâmica, São Paulo, Brasil).

O reagente FRAP foi preparado a partir da mistura das soluções de tampão de acetato a 0,3 M, de TPTZ a 10 mM e de cloreto férrico a 20 mM na proporção de 10:1:1. Cerca de 2,7 mL do reagente FRAP foram adicionados a 120 µL de solução de EPS (1 mg/mL) e submetidos a 37 °C/ 10 min. A absorbância foi medida em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 593 nm após 30 min, usando o reagente FRAP como branco. A curva de calibração foi determinada com auxílio do reagente sulfato ferroso (FeSO_4) (Synth,

São Paulo, Brasil) com concentrações que variaram de 500-2000 mM. O resultado foi expresso em $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ de amostra (ALCÂNTARA et al., 2019; RUFINO et al., 2006).

3.5.2.2. *Poder redutor total*

A atividade redutora total do EPS-LN60 foi avaliada de acordo com Krunić e Rakin (2022) com adaptações. O EPS-LN60 (1 mg/mL) foi solubilizado na proporção de 1:2,5:2,5 com solução de tampão fosfato de sódio (NaH_2PO_4) (Exôdo Científica, São Paulo, Brasil) (0,2 M pH 6,6) e solução de ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) (Synth, São Paulo, Brasil) (1%, p/v). A mistura foi incubada em banho-maria a 50 °C por 30 min. Após o resfriamento, a solução de ácido tricloroacético (TCA) (Dinâmica, São Paulo, Brasil) (10%, p/v) foi adicionada na mesma proporção e então a mistura foi centrifugada a 2.000 x g por 10 min. Após a centrifugação, 1 mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de água ultrapura e 200 μL de uma solução de cloreto de ferro III (FeCl_3) (Synth, São Paulo, Brasil) (1% p/v). Após 10 min, a absorbância foi medida a 700 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis (Drawell-DU 8200, Shanghai Drawell Scientific Instrument Co., Ltd.) e água destilada foi usada como branco.

3.5.3. **Avaliação de citotoxicidade em células tumorais e não tumorais humanas**

O ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi utilizado para avaliar a citotoxicidade do EPS-LN60 frente às linhagens de células tumorais de carcinoma colorretal (HCT-116), melanoma (SK-MEL-28) e adenocarcinoma de mama (MCF-7), e não tumorais de queratinócitos (HaCaT). O método consiste na avaliação da viabilidade e proliferação celular através da atividade redutora de desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983).

As células foram semeadas em placas de 96 poços em uma concentração de 3×10^5 células/mL. Após 24 horas, as células foram incubadas com diferentes concentrações do EPS-LN60 testadas com base na literatura (50, 100, 200, 400 ou 800 $\mu\text{g/mL}$) por 72 horas.

Após o período de incubação, foi retirado o sobrenadante e adicionada uma solução de MTT (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram incubadas por 4 horas adicionais, então 100 μ L de 10% de uma solução de dodecil sulfato de sódio e ácido clorídrico (SDS-HCl) foram adicionados e os cristais de formazana produzidos e mantidos *overnight* para dissolução. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro (leitor de microplacas BioTek Instruments, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 570 nm. Foram realizados três experimentos independentes em quadruplicata e os dados foram expressos como média do percentual de viabilidade celular $\pm$ e.p.m (erro padrão da média).

3.6. ENCAPSULAÇÃO

3.6.1. Preparo das soluções de reagentes

Soluções-mãe de alginato de sódio a 4% (p/v) e solução de cloreto de sódio a 4% (p/v) foram preparadas com água deionizada, mantidas sob agitação constante, posteriormente esterilizadas em autoclave a 121 °C. As soluções de EPS-LN60 a 0,5 e 1,0% (p/v) foram preparadas com vidrarias e água destilada estéreis, filtradas em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com diâmetro de 0,22 μ m (Bonna-Agela, Delaware, EUA). O probiótico foi adicionado diretamente na solução biopolimérica.

3.6.2. Gelificação Iônica

Cápsulas de géis foram formadas a partir do gotejamento por seringa da solução biopolimérica contendo o LA-3 sobre uma solução aquosa de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 4% (p/v) sob fraca agitação, conforme adaptação de Lopes Neto et al. (2021). A concentração de LA-3 utilizada foi estabelecido de acordo com a densidade ótica de 1,5-1,6 que corresponde a 8-9 Log UFC/mL. As soluções biopoliméricas foram gotejadas com auxílio de seringa com saída da agulha de dimensões 0,70/ 25 mm. Após ficarem imersas na solução de CaCl_2 por 30

min as cápsulas foram coletadas por filtração com papel de filtro qualitativo 18 cm de diâmetro (Qualy, Fortaleza, Ceará, Brasil). Uma porção das cápsulas foi reservada e denominadas de F0. Em seguida, as demais foram imersas em soluções de EPS-LN60 a 0,5% (F1) e 1,0% (F2) sob fraca agitação por 30 min, atuando como agente de cobertura e foi feita a filtração conforme já mencionado. Por fim, as cápsulas (F0, F1 e F2) foram mantidas a 37 °C por 2 h a fim de diminuir o teor de água nas cápsulas.

As cápsulas úmidas produzidas foram armazenadas a 4 ± 2 °C para acompanhamento da viabilidade (Log UFC/g) durante 0, 5, 10, 15 e 20 dias e para demais análises.

3.6.3. Microscopia Ótica (MO)

Analizou-se a microestrutura das cápsulas úmidas através de microscópio óptico (Leica DM1000, Wetzlar, Alemanha) e lupa (Leica S9i, Wetzlar, Alemanha) seguindo metodologia adaptada de Lopes Neto et al. (2021).

3.6.4. Exposição às condições gástricas simuladas

A análise foi adaptada de Minekus et al. (2014) e Brodkorb et al. (2019). As condições de análise estão descritas na Tabela 1. As etapas são constituídas da fase oral (boca), gástrica (esôfago-estômago) e intestinal (duodeno e íleo).

Tabela 1 – Condições para análise de simulação das condições gástricas

Etapas	Enzimas	Agitação (rpm)	pH	Tempo (min)
Oral	α -amilase	200	6,9	2
			5,5	10
			4,6	10
			3,8	10
Gástrica	Pepsina	130	2,8	20
			2,3	20

			2,0	20
	Pancreatina +		5,0	30
Intestinal	sais biliares	45	6,5	60

Fonte: Adaptado de Minekus et al., 2014.

Na fase oral utilizaram-se 2,5 g de cápsulas úmidas e adicionou-se 0,25 mL da solução da enzima alfa-amilase (A3176, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) obtida pela diluição em água estéril na proporção de 0,15% (p/v) e 2 mL do fluido salivar simulado que foi preparado conforme descrito na Tabela 2. Em seguida, foram adicionados 12,5 µL da solução de $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$ (0,3 M) e 0,238 mL de água estéril completando o volume total de digestão para 5 mL. A mistura foi incubada em estufa com agitação orbital e rotação de 200 rpm a 37 °C/ 2 min.

Tabela 2 – Preparação dos fluidos de digestão simulados

Substâncias	Fluido Salivar Simulado (pH 7,0)*	Fluido Gástrico Simulado (pH 3,0)*	Fluido Intestinal Simulado (pH 7,0)*
KCl (0,5 M)	3,775	1,175	1,700
KH₂PO₄ (0,5 M)	0,925	0,225	0,200
NaHCO₃ (1 M)	1,700	3,130	10,630
MgCl₂CO₃ (0,15 M)	0,125	0,100	0,275
(NH₄)₂CO₃ (0,5 M)	0,015	0,125	-
HCl (6 M)	0,023	0,325	0,175
Nacl (2 M)	-	2,950	2,400
Água	93,437	91,970	84,620
Total (mL)	100	100	100

Adaptado de Minekus et al. (2014). - Não adicionado. *Os volumes foram calculados para um volume final de 100 mL para cada fluido simulado.

Na etapa gástrica foi utilizada água estéril para preparação da solução da enzima pepsina (P7000, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) na proporção de 3,2% (p/v). A partir do volume da etapa oral (5 mL), na fase gástrica foram adicionados 4 mL de fluido gástrico simulado, 2,5 µL da solução de $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$ (0,3 M) e 0,25 mL da solução de pepsina, ácido (HCl 6 M) para redução do pH e água, totalizando volume final de digestão de 10 mL. A mistura foi incubada em estufa incubadora com agitação orbital e rotação de 130 rpm e 37 °C.

Na etapa intestinal foi utilizado o fluido intestinal simulado como diluente das soluções de bile (0,16%, p/v) (B8756, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e pancreatina (0,4%, p/v) (P7545, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A partir do volume da etapa gástrica (10 mL), nesta fase foram adicionados 4,25 mL de fluido intestinal simulado, 20 µL da solução de $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$ (0,3 M) e 2,5 mL da solução de pancreatina, 1,25 mL da solução de bile, base (NaOH 1 M) para elevar o pH e água, totalizando volume final de digestão de 20 mL. A mistura foi incubada em estufa incubadora com agitação orbital e rotação de 45 rpm a 37 °C.

O probiótico foi liberado das cápsulas utilizando citrato de sódio (0,06 mol/L) e submetendo à agitação magnética (120 rpm) a 37 °C/ 30 min em estufa incubadora com agitação orbital. A enumeração do probiótico foi realizada ao início do processo e após o período de exposição em cada fase da simulação, retirando assepticamente uma alíquota da mistura que foi analisada conforme item 3.3.2 a fim de estimar a porcentagem de sobrevivência do probiótico (LA-3). O controle para cada formulação foi feito com as cápsulas mantidas a 37 ± 2 °C sem submetê-las às condições gastrointestinais simuladas, denominado de não-submetido (NS).

Todas as soluções enzimáticas foram preparadas no momento da análise e esterilizadas através de membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com diâmetro de 0,22 µm (Bonna-Agela, Delaware, EUA). Todas as soluções foram mantidas em banho de gelo durante todo o período da simulação.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram executados em triplicata e os resultados expressos como média seguida do desvio padrão. Estes foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA) a fim de verificar se houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre valores encontrados e o teste de Tukey foi empregado para comparação das médias. Foi utilizado o programa GRAPHPAD prisma, versão 8.0.

REFERÊNCIAS

ABEDFAR, A.; HOSSEININEZHAD, M.; RAFE, A. Effect of microbial exopolysaccharide on wheat bran sourdough: Rheological, thermal and microstructural characteristics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 371-379, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.149>

ABEDFAR, A.; HOSSEININEZHAD, M.; SADEGHI, A.; RAEISI, M. Comparative survival of exopolysaccharide encapsulated *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* in simulated gastrointestinal conditions and storage time. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, p. 594-603, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00664-1>

ABUSHELAIBI, A.; AL-MAHADIN, S.; EL-TARABILY, K.; SHAH, N. P.; AYYASH, M. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. **LWT-Food Science and Technology**, v. 79, p. 316-325, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.041>

ADESULU-DAHUNSI, A. T.; JEYARAM, K.; SANNI, A. I. Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based nigerian fermented food products. **Food Control**, n. 92, p. 225-231, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.062>

AHMED, Z.; WANG, Y.; ANJUM, N.; AHMAD, A.; KHAN, S. T. Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranoferiens* ZW3 isolated from Tibet Kefir – Part II. **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 343-350, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.06.009>

ALCÂNTARA, M. A.; POLARI, I. de L. B.; MEIRELES, B. R. L. de A.; LIMA, A. E. A. de.; SILVA JUNIOR, J. C.; VIEIRA, E. de A.; dos SANTOS, N. A.; CORDEIRO, A. M. T. de M. Effect of the solvent composition on the profile of phenolic compounds extracted from chia seeds. **Food Chemistry**, v. 275, p. 489-796, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.133>

ALMEIDA JÚNIOR, W. L. G.; FERRARI, I. S.; SOUZA, J. V.; SILVA, C. D. A.; COSTA, M. M.; DIAS, F. S. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food Control**, v. 53, p. 96–103, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.013>

ANSELMO, A. C.; MCHUGH, K. J.; WEBSTER, J.; LANGER, R.; JAKLENEC, A. Layer-by-Layer Encapsulation of Probiotics for Delivery to the Microbiome. **Advanced Materials**, v. 28, p. 9486–9490, 2016. <https://doi.org/10.1002/adma.201603270>

ANTUNES, S.; FREITAS, F.; ALVES, V. D.; GRANDFILS, C.; REIS, M. A. Conversion of cheese whey into a fucose and glucuronic acid-rich extracellular polysaccharide by *Enterobacter* A47. **Journal of Biotechnology**, v. 210, p. 1-7, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.05.013>

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 18th ed, 3th Review, Washington: AOAC, 2010. 1094p.

AWAD, W. A.; GHAREEB, K.; BÖHM, J. Effect of addition of a probiotic micro-organism to broiler diet on intestinal mucosal architecture and electrophysiological parameters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, p. 486–494, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2009.00933.x>

AYYASH, M.; ABU-JDAYIL, B.; ITSARANUWAT, P.; GALIWANGO, E.; TAMIELLO-ROSA, C.; ABDULLAH, H.; ESPOSITO, G.; HUNASHAL, Y.; OBAID, R. S.; HAMED, F. Characterization, bioactivities, and rheological properties of exopolysaccharide produced by novel probiotic *Lactobacillus plantarum* C70 isolated from camel milk. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 938-946, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.171>

BALI, V.; PANESAR, P. S.; BERA, M. B. Trends in utilization of agro-industrial byproducts for production of bacteriocins and their biopreservative applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, p. 204–214, 2016. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.947916>

BEKHIT, M.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; MESSAOUD, G. B.; DESOBRY, S. Design of microcapsules containing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in alginate shell and xanthan gum with nutrients core. **LWT – Food Science and Technology**, v. 68, p. 446–453, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.037>

BENGOA, A. A.; LHAMAS, M. G.; IRAPORDA, C.; DUENAS, M. T.; ABRAHAM, A. G.; GARROTE, G. L. Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic Properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. **Food Microbiology**, v. 69, p. 212-218, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.012>

BINTSIS, T. Lactic acid bacteria: Their applications in foods. **Journal of Bacteriology and Mycology**, v. 6, n. 2, p. 89–94, 2018. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00182>

BLAYA, J.; BARZIDEH, Z.; LAPOINTE, G. Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 3611–3629, 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13345>

BRIZUELA, N.; TYMCZYSZYN, E. E.; SEMORILE, L. C.; LA HENS, D. V.; DELFEDERICO, L.; HOLLMANN, A.; BRAVO-FERRADA, B. *Lactobacillus plantarum* as a malolactic starter culture in winemaking: A new (old) player? **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 38, p. 10-18, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.12.002>

BRODKORB, A.; EGGER, L.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; ASSUNÇÃO, R.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU-LACANAL, C.; BOUTROU, R.; CARRIÈRE, F.; CLEMENTE, A.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EDWARDS, C.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; LE FEUNTEUN, S.; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A. R.; MARTINS, C.; MARZE, S.; MCCLEMENTS, D. J.; MÉNARD, O.; MINEKUS, M.; PORTMANN, R.; SANTOS, C. N.; SOUCHON, I.; SINGH, R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S. J.; WEITSCHIES, W.; RECIO, I. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature protocols**, p. 1-24, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

CASTRO-CISLAGHI, F. P. DE.; SILVA, C. DOS. R. E.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; LOREZ, J. G.; SANT'ANNA, E. S. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food engineering**, v. 113, p. 186-193, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.06.006>

CERNING, J.; BOUILLANNE, C.; LANDON, M.; DESMAZEAUD, M. Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from Slime-Forming Mesophilic Lactic Acid Bacteria. **Journal of Dairy Science**, n. 75, p. 692–699, 1992. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77805-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77805-9)

CHENGCHENG, L.; DING, J.; SHI, Z.; WANG, L. Bioconversion of cheese whey into a hetero-exopolysaccharide via a one-step bioprocess and its application. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, p. 107701, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107701>

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. **Clinical Nutrition**, v. 16, p. 3–11, 2007. [https://doi.org/10.1016/S0261-5614\(97\)80252-X](https://doi.org/10.1016/S0261-5614(97)80252-X)

DE PRISCO, A.; MARESCA, D.; ONGENG, D.; MAURIELLO, G. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 452-462, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.011>

DERTLI, E.; TOKER, O. S.; DURAK, M. Z.; YILMAZ, M. T.; TATLISU, N. B.; SAGDIC, O.; CANKURT, H. Development of a fermented ice-cream as influenced by *in situ* exopolysaccharide production: Rheological, molecular, microstructural and sensory

characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 427-440, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.047>

DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 153-177, 1999. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00395.x>

DI, W.; ZHANG, L.; WANG, S.; YI, H.; HAN, X.; FAN, R.; YINGCHUN, Z.
 Physicochemical characterization and antitumour activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus casei* SB27 from yak milk. **Carbohydrate Polymers**, v. 171, p. 307–315, 2017.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.018>

ETCHEPARE, M. A.; RADDATZ, G. C.; FLORES, E. M. M.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, G. C.; BARIN, J. S.; GROSSO, C. R. F.; MENEZES, C. R. Effect of resistance starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **LWT- Food Science and Technology**, v. 65, p. 511-517, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.039>

FANGMEIER, M.; KEMERICH, G. T.; MACHADO, B. L.; MACIEL, M. J.; SOUZA, C. F. V. de. Effects of cow, goat, and buffalo milk on the characteristics of cream cheese with whey retention. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 122-128, 2019.
<https://doi.org/10.1590/fst.39317>

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510-523, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>

FAO/WHO. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba FAO/WHO, 2001.

FAVARO-TRINDADE, C. D.; HEINEMANN, R. J. B.; PEDROSO, D. L. Developments in probiotic encapsulation. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 6, p. 1-8, 2011.
<https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20116004>

FONG, W.; LI, Q.; YU, J. Gut Microbiota Modulation: A Novel Strategy for Prevention and Treatment of Colorectal Cancer. **Oncogene**, v. 39, p. 4925–4943, 2020.
<https://doi.org/10.1038/s41388-020-1341-1>

FURTADO, D. N.; TODOROV, S. D.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk:

characterization of the bacteriocin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1541-1550, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400052>

GEBARA, C.; RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GANDARA, A. L. N.; GIGANTE, M. L. Effectiveness of different methodologies for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* La5 from yoghurt and Prato cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 508-513, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.061>

GEEL-SCHUTTEN, G. H.; FLESCHE, F.; BRINK, B.; SMITH, M. R.; DIJKHUIZEN, L. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 50, p. 697–703, 1998. <https://doi.org/10.1007/s002530051353>

GEORGE, F.; DANIEL, C.; THOMAS, M.; SINGER, E.; GUILBAUD, A.; TESSIER, F.; REVOL-JUNELLES, A. M.; BORGES, F.; FOLIGNÉ, B. Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: a multifaceted functional health perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2899, 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.02899

GRUJOVIĆ, M. Ž.; MLADENOVIĆ, K. G.; SEMEDO-LEMSADDEK, T.; LARANJO, M.; STEFANOVIĆ, O. D.; KOCIĆ-TANACKO, S. D. Advantages and disadvantages of non-starter lactic acid bacteria from traditional fermented foods: Potential use as starters or probiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 21, p. 1537-1567, 2021. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12897>

HEDGE, J. E.; HOFREITER, B. T. In: **Carbohydrate Chemistry**, 17 (Eds. Whistler R.L. and Be Miller, J.N.), Academic Press, New York, 1962.

HUEBNER, J.; WEHLING, R. L.; HUTKINS, R. W. Functional activity of commercial prebiotics. **International dairy Journal**, v. 17, p. 770-775, 2007. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.10.006>

HUSSAIN, A.; MAHMOOD, K.; TABASUM, S.; NOREEN, A.; ALI, M.; IQBAL, R.; ZUBER, M. Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 10–27, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijbio mac.2016.09.104>

IDF – FERMENTED and NON-FERMENTED MILK PRODUCTS –: Detection and Enumeration of *Lactobacillus acidophilus*: culture media. In: **Bulletin of International Dairy Federation**, Brussels n. 306, p. 23, 1995.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LÖNNNGREN J. A practical guide to methylation analysis of carbohydrate. **Chemical Communications**, 8, 1-70, 1976.

JOYE, I. J.; McCLEMENTS, D. J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 19, n. 5, p. 417- 427, 2014.

KASAPCOPUR, E.; MOHAMMED, A. M.; COLAKOGLU, A. S. Effects of differences in whey composition on the physicochemical properties of whey butter. **International Journal of Dairy Technology**, v. 74, n. 3, p. 535–546, 2021.

KIM, M.; NAM, D. G.; LM, P.; CHOE, J. S.; CHOI, A. J. Optimal conditions for the encapsulation of *Weissella cibaria* JW15 using alginate and chicory root and evaluation of capsule stability in a simulated gastrointestinal system. **Food Engineering, Materials, Science, & Nanotechnology**, v. 00, p. 1-10, 2020. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15013>

KORCZ, E.; VARGA, L. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 375-384, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.014>

KRUNIĆ, T. Z.; RAKIN, M. B. Enriching alginate matrix used for probiotic encapsulation with whey protein concentrate or its trypsin-derived hydrolysate: Impact on antioxidant capacity and stability of fermented whey-based beverages. **Food chemistry**, v. 370, p. 130931, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130931>

KUCK, L. S.; NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation of grape (*vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. **Food Chemistry**, v. 194, p. 569-576, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.066>

KWUN, S. Y.; BAE, Y. W.; YOON, J. A.; PARK, E. H.; KIM, M. D. Isolation of acid tolerant lactic acid bacteria and evaluation of α -glucosidase inhibitory activity. **Food Science and Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 1125-1130, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00760-4>

LANDETA, G.; CURIEL, J. A.; CARRASCOSA, A. V.; MUÑOZ, R.; DE LA RIVAS, B. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. **Meat Science**, n. 95, p. 272-280, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.019>

LARANJO, M.; ELIAS, M.; FRAQUEZA, M. J. The use of starter cultures in traditional meat products. **Journal of Food Quality**, p. 1–18, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9546026>

LEEUEWENDAAL, N.; STANTON, C.; O'TOOLE, P. W.; BERESFORD, T. P. The potential of non-starter lactic acid bacteria from cheddar cheese to colonise the gut. **Journal of Functional Foods**, v. 83, p. 1044245, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104425>

LLUIS-ARROYO, D.; FLORES-NAJERA, A.; CRUZ-GUERRERO, A.; GALLARDO-ESCAMILLA, F.; LOBATO-CALLEROS, C.; JIMÉNEZ-GUZMAN, J.; GARCÍA-GARIBAY, M. Effect of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* on the yield and texture of Mexican manchego-type cheese. **International Journal of Food Properties**, v. 17, p. 1680–1693, 2014. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.599091>

LEE, H. B.; SON, S. U.; LEE, J. E.; LEE, S. H.; KANG, C. H.; KIM, Y. S.; SHIN, K. S.; PARK, H. Y. Characterization, prebiotic and immune-enhancing activities of rhamnogalacturonan-I-rich polysaccharide fraction from molokhia leaves. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 175, p. 443–450, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.019>

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 1, p. 106–126, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>

LEÓN-LÓPEZ, A.; PÉREZ-MARROQUÍN, X. A.; CAMPOS-LOZADA, G.; CAMPOS-MONTIEL, R. G.; AGUIRRE-ÁLVAREZ, G. Characterization of Whey-Based Fermented Beverages Supplemented with Hydrolyzed Collagen: Antioxidant Activity and Bioavailability. **Foods**, v. 9, n. 8, p. 1106, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9081106>

LI, C.; DING, J.; CHEN, D.; SHI, Z.; WANG, L. Bioconversion of cheese whey into a hetero-exopolysaccharide via a one-step bioprocess and its applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, p. 107701, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107701>

LI, S.; FAN, L.; LI, S.; SUN, X.; DI, Q.; ZHANG, H.; LI, B.; LIU, X. Validation of Layer-By-Layer Coating as a Procedure to Enhance *Lactobacillus plantarum* Survival during In Vitro Digestion, Storage, and Fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, p. 1701–1712, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07139>

LI, W.; JI, J.; RUI, X.; YU, J.; TANG, W.; CHEN, X.; JIANG, M.; DONG, M. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics in

vitro. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, p. 732-739, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.063>

LIMOLI, D. H.; JONES, C. J.; WOZNIAK, D. J. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. **Microbiology Spectrum**, v. 3, p. 1-30, 2015.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014>

LIU, L.; CHEN, P.; ZHAO, W.; LI, X.; WANG, H.; QU, X. Effect of microencapsulation with the maillard reaction products of whey proteins and isomaltooligosaccharide on the survival rate of *Lactobacillus rhamnosus* in white brined cheese. **Food Control**, v. 79, p. 44–49, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.016>

LIU, Z.; ZHANG, Z.; QIU, L.; ZHANG, F.; XU, X.; WEI, H.; TAO, X. Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 6895-6905, 2017.
<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11944>

LOPES, L. A. A.; CARVALHO, R. de S. F.; MAGALHÃES, N. S. S.; MADRUGA, M. S.; ATHAYDE, A. J. A. A.; PORTELA, I. A.; BARÃO, C. A.; PIMENTEL, T. C.; MAGNANI, M.; STAMFORD, T. C. M. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-05 and incorporation in vegan milks: Physicochemical characteristics and survival during storage, exposure to stress conditions, and simulated gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 135, p. 109295, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109295>

LOPES NETO, J. H. P.; dos SANTOS, M. C. G.; LEITE, K. S.; da SILVA, L. A.; CAMPOS, M. I. F.; da SILVEIRA, E. S.; AMARAL, J. B. S.; MADRUGA, M. S.; BRAGA, A. L. M.; CARADARELLI, H. R. Development and characterization of *Lactobacillus acidophilus* (LA-3) microparticles with reducing substances and its addition to Reino cheese. **LWT-Food Science and Technology**, v. 143, p. 111083, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111083>

LUCA, L.; ORIAN, M. Influence of Different Prebiotics on Viability of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* Encapsulated in Alginate Microcapsules. **Foods**, v. 10, p. 710, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10040710>

LYNCH, K. M.; MCSWEENEY, P. L. H.; ARENDT, E. K.; UNIACKE-LOWE, T.; GALLE, S.; COFFEY, A. Isolation and characterization of exopolysaccharide-producing *Weissella* and *Lactobacillus* and their application as adjunct cultures in Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, v. 34, p. 125–134, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.07.013>

MACEDO, C.; NUNES, M. C.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A. Rheology Methods as a Tool to Study the Impact of Whey Powder on the Dough and Breadmaking Performance of Wheat Flour. **Fluids**, v. 5, n. 2, p. 50, 2020. <https://doi.org/10.3390/fluids5020050>

MACEDO, M. G.; LACROIX, C.; GARDNER, N. J.; CHAMPAGNE, C. P. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. **International Dairy Journal**, 12, 419-426, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00173-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00173-X)

MAEDA, H.; ZHU, X.; SUZUKI, S.; SUZUKI, K.; KITAMURA, S. Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5533-5538, 2004. <https://doi.org/10.1021/jf049617g>

MAYO, B.; FLÓREZ, A. B. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus plantarum*. In **Encyclopedia of Dairy Sciences**, 3rd ed.; McSweeney, P.L.H., McNamara, J.P., Eds.; Academic Press: Oxford, UK, 2022; pp. 206–217.

MEDINA-PRADAS, E.; PÉREZ-DÍAZ, M. I.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A.; ARROYO-LÓPEZ, F. N. Review of vegetable fermentations with particular emphasis on processing modifications, microbial ecology, and spoilage. In A. Bevilacqua, M. A. Corbo, & M. Sinigaglia (Eds.), **The microbiological quality of food** (pp. 211–236), 2017. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00012-1>

MILERIENE, J.; SERNIENE, L.; KONDROTIENE, K.; LAUCIENE, L.; ANDRULEVICIUTE, V.; KASETIENE, N.; SEKMOKIENE, D.; MALAKAUSKAS, M. Effect of Indigenous *Lactococcus lactis* on physicochemical and sensory properties of thermo-coagulated acid whey protein. **Journal of food processing and preservation**, v. 45, 2021. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15420>

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIÈRE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EGGER, L.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; Le FEUNTEUN, S.; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; SANTOS, C. N.; SINGH, R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S. J.; WEITSCHIES, W.; BRODKORB, A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, v. 5, p. 1113, 2014. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>

MISHRA, A.; JHA, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3382-3386, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.006>

MOKOENA, M. P.; MUTANDA, T.; OLANIRAN, A. O. Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages. **Food & Nutrition Research**, v. 60, p. 29630, 2016. <https://doi.org/10.3402/fnr.v60.29630>

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

NGUYEN, A. T. B.; NIGEN, M.; JEMENEZ, L.; AIT-ABDERRAHIM, H.; MARCHESSEAU, S.; PICART-PALMADE, L. Performances of different protocols for exocellular polysaccharides extraction from milk acid gels: Application to yogurt. **Food Chemistry**, v. 239, p. 742-750, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.121>

NGUYEN, H. T.; NGWABEBHOH, F. A.; SAHA, N.; ZANDRAA, O.; SAHA, T.; SAHA, P. Development of novel biocomposites based on the clean production of microbial cellulose from dairy waste (sour whey). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 139, n. 1, p. 51433, 2021. <https://doi.org/10.1002/app.51433>

NIKOLIC, M.; LÓPEZ, P.; STRAHINIC, I.; SUÁREZ, A.; KOJIC, M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M.; LJUBISA, T.; GOLIC, N.; PATRICIA, R. Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. **International Journal Food Microbiology**, v. 158, p. 155–162, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.015>

OLDAK, A.; ZIELINSKA, D.; RZEPKOWSKA, A.; KOLOZYN-KRAJEWSKA, D. Comparison of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski Cheese. **Biomed Research International**, v. 2017, p. 1-10, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6820369>

de OLIVEIRA, C. M. S.; GRISI, C. V. B.; SILVA, G. de S.; LOPES NETO, J. H. P.; de MEDEIROS, L. L.; dos SANTOS, K. M. O.; CARDARELLI, H. R. Use of *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC 003 for the manufacture of functional skimmed fresh cheese. **International Dairy Journal**, v. 141, p. 105658, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105628>

PANDEY, A.; NEHA.; PURANIK, V.; VERMA, A.; YADAV, N. Microencapsulation of *L. fermentum* isolated from traditional dairy products and its stability on exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Plants Archives**, v. 21, p. 875-880, 2021. <https://doi.org/10.51470/PLANTARCHIVES.2021.v21.no1.121>

PÉREZ-SOTO, E.; CENOBIO-GALINDO, A. J.; ESPINO-MANZANO, S. O.; FRANCO-FERNÁNDEZ, M. J.; LUDEÑA-URQUIZO, F. E.; JIMÉNEZ-ALVARADO, R.; ZEPEDA-VELÁZQUEZ, A. P.; CAMPOS-MONTIEL, R. G. The Addition of Microencapsulated or Nanoemulsified Bioactive Compounds Influences the Antioxidant and Antimicrobial

Activities of a Fresh Cheese. **Molecules**, v. 26, p. 2170, 2021.
<https://doi.org/10.3390/molecules26082170>

POLLETO, G.; FONCESA, B. de S.; RADDATZ, G. C.; WAGNER, R.; LOPES, E. J.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. de M.; MENEZES, C. R. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and different prebiotic agents by external ionic gelation followed by freeze-drying. **Ciência Rural**, v. 49, 2019. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180729>

PRATHIMA, P. C.; LULE, V. K.; TOMAR, S. K.; SINGH, A. K. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* NCDC 191 by response surface methodology. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 5, p. 835-854, 2014.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-68, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>

RABAIOLIRAMA, G.; KUHN, D.; BEUX, S.; JACHETTI MACIEL, M.; VOLKEN DE SOUZA, C. F. Cheese Whey and Ricotta Whey for the Growth and Encapsulation of Endogenous Lactic Acid Bacteria. **Food and Bioprocess Technology**, v. 13, n. 2, p. 308–322, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02395-8>

RAHALI, A.; ARIECH, M.; MOUSSAOUI, B.; RIAZI, A. Encapsulation effects of galactomannans combined with xanthan on the survival of two strains under simulated digestive hostilities. **European Journal of Biological Research**, v. 12, n. 3, p. 262-270, 2022. <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.7048634>

RAHBAR, S. Y.; KHOSROUSHAHI, A. Y.; GARGARI, B. P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 217, p. 79–89, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.025>

RAJOKA, M. S. R.; JIN, M.; HAOBIN, Z.; LI, Q.; SHAO, D.; JIANG, C.; HUANG, Q.; YANG, H.; SHI, J.; HUSSAIN, N. Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. **LWT-Food Science and Technology**, v. 89, p. 638-647, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.034>

RATHER, S. A.; AKHTER, R.; MASOODI, F. A.; GANI, A.; WANI, S. M. Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. **LWT-Food Science and Technology**, v. 83, p. 50–58, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.036>

RAZAVI, S.; JANFAZA, S.; TASNIM, N.; GIBSON, D. L.; HOORFAR, M. Microencapsulating polymers for probiotics delivery systems: Preparation, characterization, and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 120, p. 106882, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106882>

ROMERO-CHAPOL, O. O.; VARELA-PÉREZ, A.; CASTILLO-OLMOS, A. G.; GARCÍA, H. S.; SINGH, J.; GARCÍA-RAMÍREZ, P. J.; VIVEROS-CONTRERAS, R.; FIGUEROA-HERNÁNDEZ, C. Y.; CANO-SARMIENTO, C. Encapsulation of *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG: Probiotic Survival, In Vitro Digestion and Viability in Apple Juice and Yogurt. **Applied Science**, v. 12, p. 2141, 2022. <https://doi.org/10.3390/app12042141>

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de.; MORAIS, S. M. de.; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação de atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução de ferro (FRAP). *Comunicado técnico*, 1-4, 2006. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/664098/metodologia-cientifica-determinacao-da-atividade-antioxidante-total-em-frutas-pelo-metodo-de-reducao-do-ferro-frap>. Acessado em: 02/02/2023.

SAADAT, Y. R.; KHOSROUSHAHI, A. Y.; GARGARI, B. P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 217, p. 79–89, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.025>

SABO, S. S.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, N.; DOMÍNGUEZ, J. M.; OLIVEIRA, R. P. S. Inhibitory substances production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa cultured in hydrolyzed cheese whey supplemented with soybean flour and their antimicrobial efficiency as biopreservatives on fresh chicken meat. **Food Research International**, v. 99, p. 762–769, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.026>

SANDOVAL-MOSQUEDA, I.; LLORENTE-BOUSQUETS, A.; MONTIEL-SOSA, J. F.; CORONA, L.; GUADARRAMA-ÁLVAREZ, Z. Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 and *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 in a freeze-dried alginate-gum arabic system and its in vitro testing under gastrointestinal conditions. **Journal of Microencapsulation**, v. 36, p. 591-602, 2019. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1660729>

SHARMA, P. TRIVEDI, N.; GAT, Y. Development of functional fermented whey-oat-based product using probiotic bacteria. **3 Biotech**, v. 7, p. 272-280, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0906-3>

SILVA E ALVES, A. T.; SPADOTI, L. M.; ZACARCHENCO, P. B.; TRENTA, F. K. H. S. Probiotic Functional Carbonated Whey Beverages: Development and Quality Evaluation. **Beverages**, v. 4, p. 49, 2018. <https://doi.org/10.3390/beverages4030049>

SILVA, F. F. P.; BISCOLA, V.; LEBLANC, J. G.; FRANCO, B. D. G. M. Effect of indigenous lactic acid bacteria isolated from goat milk and cheeses on folate and riboflavin content of fermented goat milk. **LWT – Food Science and Technology**, v. 71, p. 155-161, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.033>

SILVA, F. T. **Queijo Minas Frescal**. 1º. ed. Brasília – DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 50 p., 2005.

SILVA, K. C. G.; CEZARINO, E. C.; MICHELON, M.; SATO, A. C. K. Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival. **LWT – Food Science and Technology**, v. 89, p. 503-509, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.026>

SUNGUR, T.; ASLIM, B.; KARAASLAN, C.; AKTAS, B. Impact of Exopolysaccharides (EPSs) of *Lactobacillus gasseri* strains isolated from human vagina on cervical tumor cells (HeLa). **Anaerobe**, v. 47, p. 137–144, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.05.013>

SUYABATMAZ, Ş.; KARAOĞLU, Ş. A.; BOZDEVECI, A.; AKPINAR, R. Honeybee-associated lactic acid bacteria and their probiotic potential for human use. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 1-15, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03427-w>

TA, L. P.; BUJNA, E.; ANTAL, O.; LADÁNYI, M.; JUHÁSZ, R.; SZÉCSI, A.; KUN, S.; SUDHEER, S.; GUPTA, V. K.; NGUYEN, Q. D. Effects of various polysaccharides (alginate, carrageenan, gums, chitosan) and their combination with prebiotic saccharides (resistant starch, lactosucrose, lactulose) on the encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 01 strain. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1136-1144, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.170>

TERPOU, A.; PAPADAKI, A.; LAPPA, I.K.; KACHRIMANIDOU, V.; BOSNEA, L.A.; KOPSAHELIS, N. Probiotics in food systems: Significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. **Nutrients**, v. 11, p. 1591, 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11071591>

TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiological Reviews**, v. 81, p. 1031–1064, 2001.

URTUVIA, V.; MATURANA, N.; ACEVEDO, F.; PEÑA, C.; DÍAZ-BARRERA, A. Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 198, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2363-x>

VETRIK, M.; MATTOVA, J.; MACKOVA, H.; KUCKA, J.; POUCKOVA, P.; KUKACKOVA, O.; BRUS, J.; EIGNER-HENKE, S.; SEDLACEK, O.; SEFC, L.; STEPANEK, P.; HRUBY, M. Biopolymer strategy for the treatment of Wilson's disease. **Journal of Controlled Release**, v. 273, p. 131-138, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.026>.

VON WRIGHT, A.; AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: An introduction. In: **Sampo Lahtinen Acossavw** (Ed) Lactic Acid Bacteria: Microbiological and functional aspects, Fourth Edition. Crc Press, New York, 2012.

XU, Y.; CUI, Y.; WANG, X.; YUE, F.; SHAN, Y.; LIU, B.; ZHOU, Y.; YI, Y.; LÜ, X. Purification, characterization and bioactivity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* KX041. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 480-492, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.117>

WANG, J.; ZHAO, X.; TIAN, Z.; YANG, Y.; YANG, Z. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 16-25, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.003>

WANG, K.; LI, W. RUI, X. CHEN, X.; JIANG, M.; DONG, M. Structural characterization and bioactivity of released exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* 70810. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 71-78, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.056>

WANG, M.; YANG, J.; LI, M.; WANG, Y.; WU, H.; XIONG, L.; SUN, Q. Enhanced viability of layer-by-layer encapsulated *Lactobacillus pentosus* using chitosan and sodium phytate. **Food Chemistry**, v. 285, p. 260-265, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.162>

WANG, Y.; LI, C.; LIU, P.; AHMED, Z.; XIAO, P.; BAI, X. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 895-903, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.013>

WANG, Y.; WU, J.; LV, M.; SHAO, Z.; HUNGWE, M.; WANG, J.; BAI, X.; XIE, J.; WANG, Y.; GENG, W. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the

Expanding Applications in Food Industry. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 1-19, 2021. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. Methods Carbohydrates. **Chemistry**, 2, 65-67, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. Methods Carbohydrates. **Chemistry**, 2, 211-215, 1963b.

ZANNINI, E.; WATERS, D. M.; COFFEY, A.; ARENDT, E. K. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 3, p. 1121-1135, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7172-2>

ZHANG, L.; ZHAO, B.; LIU, C. J.; YANG, E. Optimization of Biosynthesis Conditions for the Production of Exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* SP8 and the Exopolysaccharides Antioxidant Activity Test. **Indian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 334-345, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12088-020-00865-8>

ZHAO, X.; WEI, X.; CHEN, D.; GUAN, W.; FENG, M. Acid and bile salt tolerance of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Dairy Science Technology**, v. 38, p. 245, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03439-6>

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C. M. A. P.; HARRIS, H. M. B.; MATARRELLI, P.; TOOLE, P. W. O.; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J.; WATANABLE, K.; WUYTS, S.; FELIZ, G. E.; GANZE, M. G.; LABEER, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Lauconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 2782-2858, 2020. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

ZHOU, Y.; CUI, Y.; QU, X. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: structure, bioactivity and associations: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, p. 317–332, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.093>.

ZIKMANIS, P.; KOLESOVS, S.; SEMJONOV, P. Production of biodegradable microbial polymers from whey. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 7, p. 36, 2020. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00326-6>

ZOTTA, T.; SOLIERI, L.; IACUMIN, L.; PICOZZI, C.; GULLO, M. Valorization of cheese whey using microbial fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 2749–2764, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10408-2>

ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, E. **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**. New York, U. S. A.: Springer, 2010.

4 RESULTADOS

O projeto de tese em questão gerou dois artigos que foram submetidos em revistas de alto impacto na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Ademais, foram submetidos e aprovados três capítulos de livro referente ao presente trabalho.

Capítulo I: **Caracterização físico-química de soro de queijo caprino sob diferentes tratamentos físicos**. Submetido ao II Congresso Brasileiro Online de Ciência dos Alimentos (2022).

Capítulo II: **Desenvolvimento de soro de queijo bovino desproteinizado como substrato para produção de exopolissacarídeos (EPS) microbiano**. Submetido a II Semana Nacional da Microbiologia de Alimentos na Indústria (2022).

Capítulo III: **Influência do tempo fermentação na viscosidade dos soros de leite bovino e caprino utilizando *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC001**. Submetido a VIII Encontro Nacional de Agroindústria (2022).

ARTIGO 1

CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO OBTIDO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE SORO DE LEITE POR *Lactiplantibacillus plantarum* DF60Mi

CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO OBTIDO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE SORO DE LEITE POR *Lactiplantibacillus plantarum* DF60Mi

RESUMO

O exopolissacarídeo (EPS) é um polímero composto por unidades de monossacarídeos produzidos por plantas, fungos e bactérias. A utilização do soro de leite como meio de cultura alternativo para fermentação por bactérias lácticas possibilita a geração de novos produtos (EPS) e evita danos ambientais e econômicos. Este trabalho teve como objetivo caracterizar o exopolissacarídeo obtido da fermentação do soro de leite (EPS-LN60) por *Lactiplantibacillus plantarum* DF60Mi a fim de identificar suas propriedades físicas e químicas. O EPS foi caracterizado em termos de açúcar total, proteína, rendimento, FTIR, termogravimetria, calorimetria, composição monossacarídica, microscopia óptica e MEV. O rendimento de EPS obtido foi de 777 mg/L, 43,78% de açúcares totais e 1,82% de proteínas. O EPS apresentou superfície porosa e formato de folha indicando potencial aplicação para alterações reológicas em alimentos. O espectrograma EPS-LN60 apresentou ligações e grupos funcionais semelhantes à identidade dos polissacarídeos e o termograma apresentou elevada estabilidade térmica (310 °C). Os monossacarídeos encontrados no EPS-LN60 foram galactose (51,1%), manose (22,9%), glicose (20,8%) e ramnose (5,2%). Os resultados obtidos neste estudo confirmaram a presença de um heteropolissacarídeo com alto rendimento e alta temperatura de degradação proveniente da fermentação do soro de leite. Portanto, pode-se vislumbrar a utilização do EPS como potencial ingrediente a ser explorado pela indústria alimentícia.

Palavras-chave: Subproduto; bactérias; composição química; açúcares.

1 INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de açúcares, provenientes de algas, fungos ou bactérias, não-tóxicos, naturais e geralmente de alto peso molecular, podendo estar aderidos à superfície celular ou serem excretados para o meio (Zhao e Liang, 2022). O EPS microbiano pode ser classificado em homopolissacarídeo (HoPS) composto por um tipo de monossacarídeo e heteropolissacarídeo (HePS) composto por dois ou mais monossacarídeos diferentes (Lynch et al., 2018).

Sabe-se que a síntese do EPS bacteriano está relacionada à adaptação do micro-organismo às condições de produção (Zhang et al., 2020), e pela codificação para biossíntese de EPS por diferentes genes que formam vários agrupamentos presentes dentre os genomas de bactérias lácticas (Deo et al., 2019). Sua busca tem sido evidenciada pela indústria alimentícia por ser eficaz na alteração proposital dos alimentos nos aspectos reológicos, sensoriais (Daba et al., 2021) e de biofuncionalidade. Já é provado que os gêneros *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. são capazes de produzi-los (Jiang e Yang, 2019).

A espécie *L. plantarum* tem visibilidade pela capacidade de fermentar diferentes fontes de carbonos, gerando uma infinidade de compostos, sob condições específicas de crescimento, que pode ter aplicabilidade tecnológica e funcional pelas indústrias alimentícias. São exemplos de metabólitos secundários as bacteriocinas e os exopolissacarídeos (Zannini et al., 2016). Entretanto, o EPS produzido varia de acordo com os parâmetros de fonte de carbono, nitrogênio, tempo e temperatura de incubação e meio de cultura utilizado (Zhang et al., 2020).

O soro de leite é um líquido translúcido de cor esverdeada, remanescente da produção de queijo, no qual é retirada a maior fração de gorduras e proteínas. É considerado um dos subprodutos mais gerados pela indústria de laticínios, o qual possui alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e geralmente é descartado de forma inadequada, apesar de ser rico em nutrientes (Sharma, Trivedi, Gat, 2017).

Os principais constituintes do soro de leite são a água, em maior quantidade, lactose, quantidades pequenas de aminoácidos, gorduras e sais minerais (PUENTES et al., 2022). Devido a isso, o soro de leite pode ser considerado um possível meio de cultura para utilização por bactérias ácido lácticas (LAB), principalmente do gênero *Lactobacillus* spp., visando a produção de novos produtos alimentícios.

Diante disso, o trabalho objetivou caracterizar o exopolissacarídeo (EPS) obtido a partir da fermentação de soro de leite por *Lactiplantibacillus plantarum* DF60Mi. Para isso, foi determinado a composição físico-química do EPS, incluindo rendimento, proteínas, açúcares, comportamento térmico e morfologia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATÉRIA-PRIMA, REAGENTES E CULTURA BACTERIANA

O leite de vaca pasteurizado utilizado foi proveniente da empresa Betânia Lácteos S.A, localizada no município de Fortaleza, Ceará, Brasil. O soro de leite foi obtido a partir da fabricação do queijo minas frescal, sem adição de culturas lácticas. Além disso, o cloreto de cálcio 40% (v/v) (Rica Nata, Piracema, Minas gerais, Brasil) e o coagulante (Ha-la, Chr. Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil) foram utilizados. A cultura láctica probiótica utilizada para fermentação do soro foi *Lactiplantibacillus plantarum* DF60Mi isolada de leite de cabra por Furtado et al. (2014) e registrada no Patrimônio Genético do Brasil (SISGEN) sob código A5C7E65.

2.2. FERMENTAÇÃO DO SORO DE LEITE

2.2.1. Reativação de *L. plantarum* DF60Mi

O processo de reativação da cultura *L. plantarum* mantida em glicerol foi adaptado de Gebara (2015) e Silva (2016). Reativou-se a cultura mantida em glicerol em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), transferindo-se 100 µL da cultura para 5 mL de meio e incubando-se a 37 °C por 24 h. Em seguida, transferiu-se, mantendo a mesma proporção, a cultura do primeiro repique para um tubo contendo volume maior de caldo MRS, e incubou sob as mesmas condições, seguido da centrifugação a 6500 rpm em centrífuga (6428 x g) (Modelo: 5430R, Eppendorf, Hamburgo – Alemanha) a 4 °C por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* com mesmo volume de água peptonada 0,1% (p/v) (Kasvi, São José dos Pinhais – PR).

2.2.2. Enumeração da cultura bacteriana

A enumeração de células viáveis de *L. plantarum* (DF60Mi) foi realizada em superfície pela técnica de microgota, em ágar MRS, através de diluições decimais seriadas utilizando água peptonada 0,1% (p/v). As placas foram incubadas a 37 °C por 72 h em jaras de anaerobiose (Permution, Curitiba – PR) com auxílio de vela (IDF, 1995).

2.2.3. Preparo do soro de leite

O soro de leite obtido a partir da fabricação de queijo Minas frescal em escala laboratorial (Silva, 2005) foi tratado a fim de se obter um substrato livre de possíveis contaminantes durante a etapa de fermentação conforme adaptação de Prathima et al., 2014. O soro obtido foi centrifugado a 6500 rpm (6428 x g) a 4 °C durante 10 min para auxiliar na remoção de gordura. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em tecido tipo *voil* estéril e o pH foi ajustado para 4,3 com auxílio de solução esterilizada de HCl a 1 M (Química Moderna, Barueri, São Paulo, Brasil), a fim de precipitar a caseína residual. Posteriormente, realizou-se o tratamento térmico com vapor fluente a 100 °C durante 30 min e pressão atmosférica a fim de precipitar as proteínas termossensíveis do soro. Então, centrifugou-se novamente sob as mesmas condições para retirar as proteínas precipitadas pela ação do calor. Após o tratamento, o pH foi ajustado para 6,5 - 6,8 com auxílio de solução de NaOH a 1 M (Neon, Suzano, São Paulo, Brasil), obtendo-se, assim, o soro tratado. Os soros, *in natura* (T1) e após tratamento (T2), foram analisados quanto às características físicas e químicas: pH, teor de gordura (%); acidez titulável (g ácido láctico/ 100 mL), teor de proteínas (%), resíduo mineral fixo (%), umidade (%) e extrato seco total (EST) (AOAC, 2019).

2.2.4. Condições de cultivo

Inicialmente, a cultura *L. plantarum* DF60Mi foi reativada conforme item 2.2.1, padronizada com densidade óptica de 1,5 a 1,6 a 600 nm lida em espectrofotômetro (Eppendorf BioSpectrometer® Basic, Hamburgo, Alemanha). A partir deste concentrado, cerca de 6% (v/v), foi adicionado em 1 L de soro tratado, conforme item 2.2.3, adicionado de 2% (p/v) de glicose (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil), sendo incubado a 37 °C pelo período de 48 h (Cerning et al., 1992). A viabilidade celular e o pH foram monitorados durante o processo de fermentação nos tempos 0, 24 e 48 h. O tempo de fermentação foi definido através da literatura e testes preliminares a fim de evitar a degradação do EPS produzido.

2.2.5. Obtenção e Purificação do EPS-LN60

O processo de extração consistiu em submeter o soro fermentado ao banho ultrassônico durante 30 min, a fim de romper as células bacterianas que possivelmente produziram exopolissacarídeos do tipo capsular. Em seguida, o pH foi ajustado próximo da neutralidade (7,0) com solução de NaOH a 1 M. O soro fermentado foi submetido ao calor (vapor fluente, 1 atm, 100 °C/ 30 min) para inativação de possíveis enzimas que viessem a degradar açúcares e proteínas. Feito isso, o soro foi centrifugado a 6500 rpm (6428 x g) (Modelo: 5430R, Eppendorf, Hamburgo – Alemanha) a 4 °C por 10 minutos. Foi adicionado álcool a 96 °GL a -20 °C na proporção de 1:2 (v/v) ao sobrenadante. A mistura foi agitada manualmente e acondicionada a -20 °C durante 24 h para precipitação do EPS. O precipitado foi recolhido por centrifugação sob as mesmas condições já mencionadas, seguindo para a diálise utilizando membrana de celulose de 3 kDa (Sigma, Missouri – EUA) contra água destilada durante 48 h, sendo necessária a troca da água a cada 12 h. O exopolissacarídeo úmido purificado foi liofilizado (Freeze-drier, Liobras, Model: L101, São Carlos, São Paulo, Brasil) a -34 °C e 280 micrômetros de mercúrio (µmHg) durante 2 dias e utilizado para análise posterior (Almeida Júnior et al., 2015; Cerning et al., 1992; Nguyen et al., 2018; Geel-Schutten et al., 1998).

2.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXOPOLISSACARÍDEO (EPS-LN60)

2.3.1. Rendimento, teor de açúcares totais e proteínas

O rendimento foi obtido através da concentração do exopolissacarídeo purificado liofilizado em mg por litro de soro de leite (mg/ L). O EPS foi analisado quanto ao conteúdo de açúcares totais conforme método de antrona (Hedge; Hofreiter, 1962), usando glicose como padrão. O teor de proteínas foi estimado de acordo com o método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2019).

2.3.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR é uma ferramenta essencial para identificar as frequências vibracionais das moléculas que ao absorverem a radiação tendem a sofrer reações de transição vibracional e/ou rotacional que permitem identificar os tipos de ligações químicas presentes no material (Mishra e Jha, 2009). Os grupos funcionais foram analisados pela espectroscopia de infravermelho de transformação de Fourier (FTIR), de acordo com a metodologia proposta por Li et al. (2014), na qual a amostra (1 mg) é misturada com 100 mg de KBr e escaneada de 500 – 4000 cm^{-1} .

2.3.3. Análise de termogravimetria (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O comportamento térmico do exopolissacarídeo foi determinado através de termogravimetria e análise calorimétrica diferencial. A termogravimetria envolve a aplicação de temperaturas de 30–500 °C sob atmosfera de nitrogênio, a uma velocidade de cerca de 10 °C/min a fim de determinar a perda de peso.

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC), a qual estuda a variação da entalpia com indução de calor (Ahmed et al., 2013), ou seja, a propriedade térmica do EPS, foi realizada utilizando 5 mg da amostra purificada em uma bandeja de alumínio, a qual foi selada e analisada. Os pontos de entalpia e de fusão foram determinados a uma taxa de aquecimento de 10 °C/ min até temperatura máxima de 400 °C (Wang et al., 2010).

2.3.4. Análises de monossacarídeos

A composição de monossacarídeos foi determinada em amostra do EPS purificado (2 mg) através da hidrólise com solução de ácido trifluoracético (1 mL) a 2 M (100 °C/ 8 h), e posteriormente reduzidas com solução de NaBH_4 (Wolfrom; Thompson, 1963a) e acetiladas com ácido acético anidrido-piridina (1:1, v/v) (Wolfrom; Thompson, 1963b). Por fim, as misturas de acetado de aldial resultantes foram examinadas através de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-MS) (Varian Ion-Trap 2000R, Santa Clara, EUA), usando coluna DB225 (30 m x 0,25 mm, Agilent Folsom, EUA) programada para 50-220 °C a

40 °C/ min, e hélio como gás de arraste. Os componentes foram identificados pelo tempo de retenção típicos de impacto de elétrons e foram expressos em porcentagem de cada açúcar presente na amostra (Jansson et al., 1976).

2.3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura foi analisada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) com detector eletrossecundário, Modelo LEO 1430 (Zeiss, Goettingen, Alemanha). Cerca de 5 mg da amostra, purificada e liofilizada, foram dispostos em papel adesivo de carbono e cobertos com ouro 200 Å (ångström) e submetidos a uma tensão de aceleração de 10 kV. A distância de trabalho foi de 10 mm conforme adaptado de Castro-Cislaghi et al. (2012) e Wang et al. (2015).

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios de caracterização físico-química do soro de leite foram executados em triplicata e os resultados expressos como a média dos dados obtidos seguido do desvio padrão. Estes foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de médias t ao nível de 5% de significância. Foi utilizado o programa GRAPHPAD prisma, versão 7.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SORO DE LEITE

A Tabela 1 apresenta os resultados físico-químicos do soro de leite *in natura* (T1) e após o tratamento (T2). Os soros T1 e T2 diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) para os parâmetros de pH, acidez, extrato seco total (EST), gordura, cinzas e proteínas. Entretanto, não se observou alteração significativa ($p > 0,05$) quanto ao conteúdo de carboidratos.

O aumento significativo do pH para T2 está relacionado ao ajuste efetuado durante o tratamento do soro para valores em torno de 6,5-6,8, desejáveis para início do processo fermentativo. Consequentemente, a acidez foi significativamente menor em T2 ($p < 0,05$).

Um aumento significativo foi observado no parâmetro de umidade em T2 comparado ao T1 ($p < 0,05$). Este fato pode ser explicado pela mudança nos parâmetros relacionados direta e indiretamente com a umidade como, proteínas e gorduras. Carrero-Puentes et al. (2021) encontraram valor abaixo do apresentado neste trabalho ($91,79 \pm 0,04$) para soro bovino ácido, entretanto os valores de proteínas e gorduras foram maiores, $0,85 \pm 0,03$ e $0,55 \pm 0,07$, respectivamente.

O teor de resíduo mineral fixo (cinzas) diminuiu significativamente após tratamento (T2) ($p < 0,05$), possivelmente pelo processo de centrifugação, o qual pode resultar em retirada de alguns minerais presentes no soro. Entretanto, o teor de $0,56 \pm 0,02\%$ é considerado próximo dos valores médios encontrados em soros doces (Macwan et al., 2016; León-López et al., 2020). O mesmo comportamento foi observado nos teores de EST entre os tratamentos, pois diminuíram significativamente ($p < 0,05$) em consequência das variações de proteínas, gorduras e cinzas.

Tabela 1 – Caracterização físico-química do soro *in natura* (T1) e tratado (T2)

Parâmetros	Médias $\pm$ Desvios	
	T1	T2
pH	$6,35 \pm 0,02^a$	$6,50 \pm 0,01^b$
Acidez titulável (g ác. Lático/ 100 g)	$0,20 \pm 0,01^a$	$0,10 \pm 0,01^b$
Umidade (%)	$93,15 \pm 0,08^b$	$93,96 \pm 0,02^a$
Cinzas (%)	$0,94 \pm 0,25^a$	$0,56 \pm 0,02^b$
Gordura (%)	$0,40 \pm 0,01^a$	$0,05 \pm 0,01^b$
Proteínas (%)	$0,53 \pm 0,12^a$	$0,22 \pm 0,06^b$
Carboidratos (%)	$4,94 \pm 0,17^a$	$5,20 \pm 0,03^a$
EST (%)*	$6,85 \pm 0,08^a$	$6,04 \pm 0,01^b$

*Extrato Seco Total. Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre os tipos de soro (teste t, $p < 0,05$). T1 (soro *in natura*); T2 (soro tratado).

Os teores de gorduras e proteínas diminuíram significativamente ($p < 0,05$) após o tratamento do soro (T2). Os valores para esses parâmetros apresentados neste trabalho estão significativamente inferiores aos encontrados na literatura (Pescuma; Valdez; Mozzi, 2015; León-López et al., 2020; Carrero-Puentes et al., 2021). Esses resultados são explicados devido à retirada majoritária da gordura e proteína através dos processos de filtragem (removeu coágulos maiores de caseínas remanescentes no soro), do tratamento térmico (provocou a precipitação das proteínas do soro de leite que são termossensíveis) e da centrifugação (retirada das proteínas precipitadas pela ação do calor e da gordura). A retirada de macronutrientes como proteínas e gorduras foi intencional e conveniente, a fim de evitar interferência no processo de extração e obtenção de exopolissacarídeos.

O tratamento feito com o soro (T2) não provocou alteração no conteúdo de carboidratos ($p > 0,05$). O teor encontrado neste trabalho está em consonância com Rako et al.

(2018) que reportam teor de 5% de lactose em soro doce. Este resultado demonstra que o tratamento é adequado uma vez que o teor de lactose, açúcar predominante no soro, é o principal substrato utilizado pelas bactérias ácido lácticas no processo fermentativo (Saez-Lara et al., 2015).

3.2. CARACTERIZAÇÃO DO EXOPOLISSACARÍDEO (EPS-LN60)

3.2.1. Rendimento, viabilidade, açúcares totais e teor de nitrogênio total

A quantidade de EPS seco encontrado foi de $777 \pm 0,160$ mg/ L. Já a viabilidade após 48 h de fermentação foi superior a 8 Log UFC/ mL ($8,73 \pm 0,30$ Log UFC/ mL). O teor de açúcares totais e proteínas do EPS foram de $43,78 \pm 1,29\%$ e $1,82 \pm 0,03\%$, respectivamente.

Vários estudos relatam rendimento de exopolissacarídeos inferiores ao reportado neste presente trabalho. Tsuda; Miyamoto (2010) relataram rendimento de 140 mg/ L para *L. plantarum*. Gangoiti et al. (2017) identificaram a cepa CIDCA 8327 como a maior produtora (160 mg/ L) ao estudarem diferentes cepas de *L. plantarum* incubadas utilizando leite desnatado como substrato. Nambiar et al. (2018) reportaram valor de 380 mg/ L, ao avaliarem a produção de exopolissacarídeo a partir de *L. plantarum* HM47. Entretanto, valor de 2324 mg/ L foi encontrado por Liu et al. (2019) a partir de *L. plantarum*. Este último apresenta-se superior ao encontrado neste estudo, atribuindo-se tal disparidade às condições de fermentação empregadas, como o meio de cultura utilizado (meio sintético), além da cepa (Dueñas et al., 2003; Torino et al., 2015; Zannini et al., 2016). Outro fator preponderante é que quanto maior o tempo de fermentação maior a probabilidade de produção da enzima glicohidrolase, que age degradando o produto final (Hassan; Ibrahim, 2017).

É sabido que a viabilidade do microrganismo influencia na quantidade de EPS. O presente trabalho obteve viabilidade eminente comparada a outros estudos que avaliaram cepas da mesma espécie como YO175 e OF101, as quais apresentaram contagens de $8,06 \pm 0,07$ e $8,16 \pm 0,06$ Log UFC/ mL, respectivamente (Adesulu-Dahunsi; Jeyaram, Sanni, 2018).

Os teores de açúcares totais contidos no EPS foram superiores aos relatados por Bonfim et al. (2020) quando caracterizaram o EPS extraído de *L. plantarum* CNPC003 produzido em meio MRS contendo glicose ($42,48 \pm 0,24\%$) e frutooligossacarídeos ($36,95 \pm 0,24\%$). No entanto, Wang et al. (2014) relataram um teor acima do encontrado neste trabalho, de cerca de 90% dos açúcares totais para EPS produzidos por *L. plantarum* 70810, provavelmente devido ao alto grau de pureza. Corroborando com este estudo, ambos os autores evidenciaram baixo teor de proteína (<1%).

3.2.2. Caracterização química

3.2.2.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro do EPS (Fig. 1) apresentou um amplo alongamento em torno da região de 3353 cm^{-1} , que está relacionada aos trechos vibracionais de alongamento dos grupos hidroxila de carboidratos, enquanto que, a banda vibracional em torno de 2926 cm^{-1} é atribuída a vibração de alongamento C-H assimétrico do grupo metil (Wang et al, 2019).

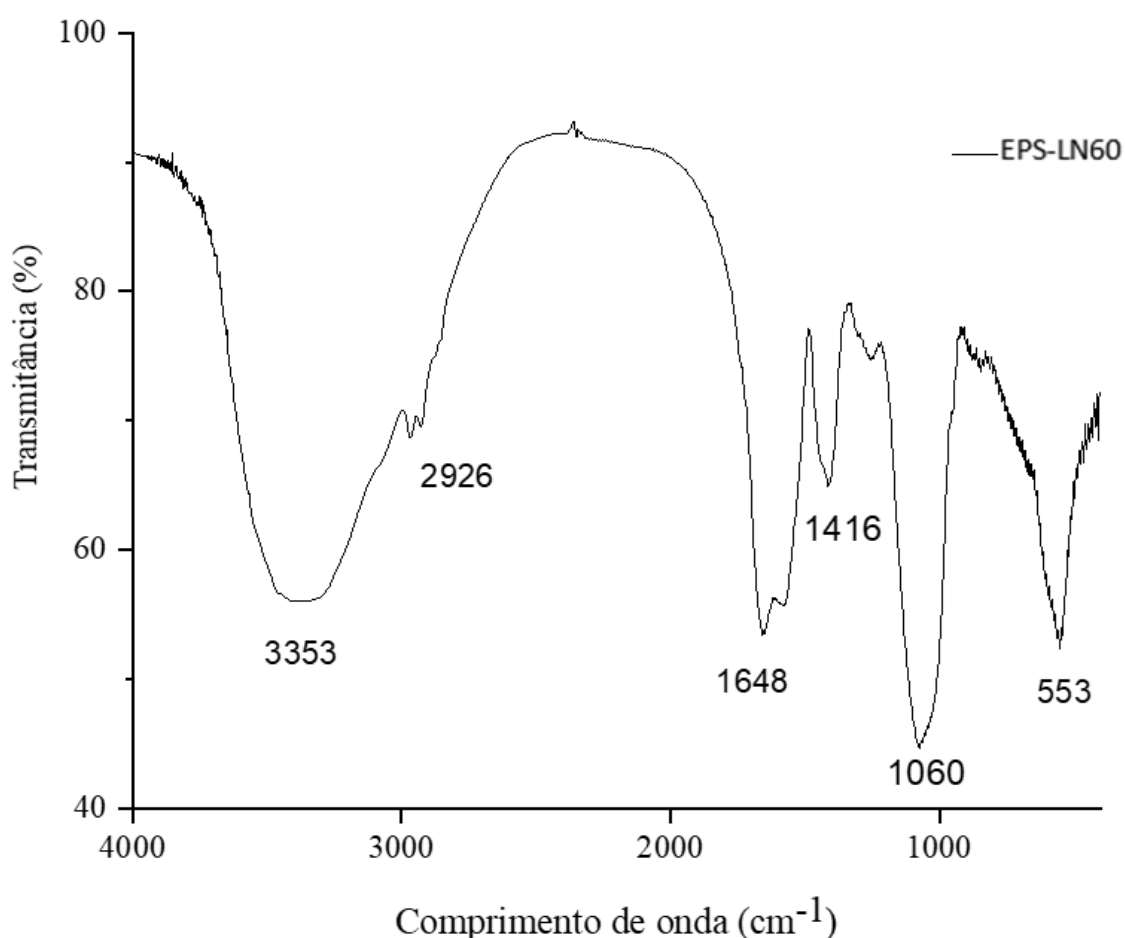


Figura 1 – Espectro do FTIR do EPS-LN60 obtido pela fermentação do soro de leite por *L. plantarum* DF60Mi.

A absorção em torno de 1648 cm^{-1} está relacionada à vibração de ligação do grupo carbonila (C=O) dos polissacarídeos (Kavitate et al, 2016). Wang et al. (2010) relatou que a região abaixo de 1500 cm^{-1} é conhecida como região da impressão digital de polissacarídeo onde a posição e a intensidade das bandas caracterizam a molécula como um todo, o que pode ser observado no espectro em questão, onde a banda em torno de 1416 cm^{-1} está relacionada à vibração da flexão da ligação C-H (Wei et al., 2016); já a existência da banda em torno de

1060 cm^{-1} corresponde à vibração de alongamento dos grupos laterais C-OH e a vibração do grupo C-O-C das ligações glicosídicas que contribuíram para o alongamento da vibração dos anéis de piranose (Wang et al., 2017).

O sinal em torno de 553 cm^{-1} está relacionado à formação do anel para o alongamento C-C, que demonstra a presença de haletos de alquila. Resultados semelhantes a este trabalho foram encontrados por Shankar et al. (2021) ao avaliarem o potencial biomédico e terapêutico de polímeros de açúcares produzidos por *L. paracasei*.

Logo, os resultados de FTIR indicam que a forma espectral do EPS está de acordo com as propriedades dos carboidratos.

3.2.2.2. Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O comportamento térmico do EPS está apresentado na Figura 2. A curva termogravimétrica foi obtida dinamicamente pelos parâmetros de perda de massa (%) vs temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e dividida em duas regiões (R1 e R2). A amostra demonstrou, na primeira região (R1), perda de 15% de massa de 0 a 100 $^{\circ}\text{C}$, a qual é atribuída à perda de água ligada. Pode ser explicado pela presença significativa de grupos carboxilas na amostra que estão ligadas a moléculas de água (Singh et al., 2011), consequentemente está relacionada à capacidade de retenção de água da amostra (Wang et al., 2010). O mesmo comportamento foi observado por Kavitate et al. (2016) em amostra de mesma natureza. A perda de peso permaneceu constante de 150 a 250 $^{\circ}\text{C}$, diminuindo apenas 5% neste intervalo.

Na região dois (R2), percebe-se uma perda de peso significativa (cerca de 35%) de 275 a 450 $^{\circ}\text{C}$, o que corresponde à despolimerização do composto como consequência de quebra de ligações C-C e C-O, originando CO, CO₂ e H₂O (Miao et al., 2015). A temperatura de degradação do material foi determinada em 310 $^{\circ}\text{C}$, com base na curva de TGA, e está acima do encontrado por autores como Kavitate et al. (2016) (287,5 $^{\circ}\text{C}$) para o polissacarídeo galactana e descrito por Wang et al. (2015) (287,7 $^{\circ}\text{C}$) para exopolissacarídeo extraído de *L. plantarum* YW11. Entretanto, vale ressaltar que os autores supracitados produziram os polissacarídeos a partir de meio semi-definido e MRS, respectivamente. Diferentemente, o presente estudo utilizou soro de leite fermentado como substrato. É sabido que o polímero produzido depende de vários fatores, entre eles as condições de fermentação (substrato) (De Vuyst; Degeest 1999).

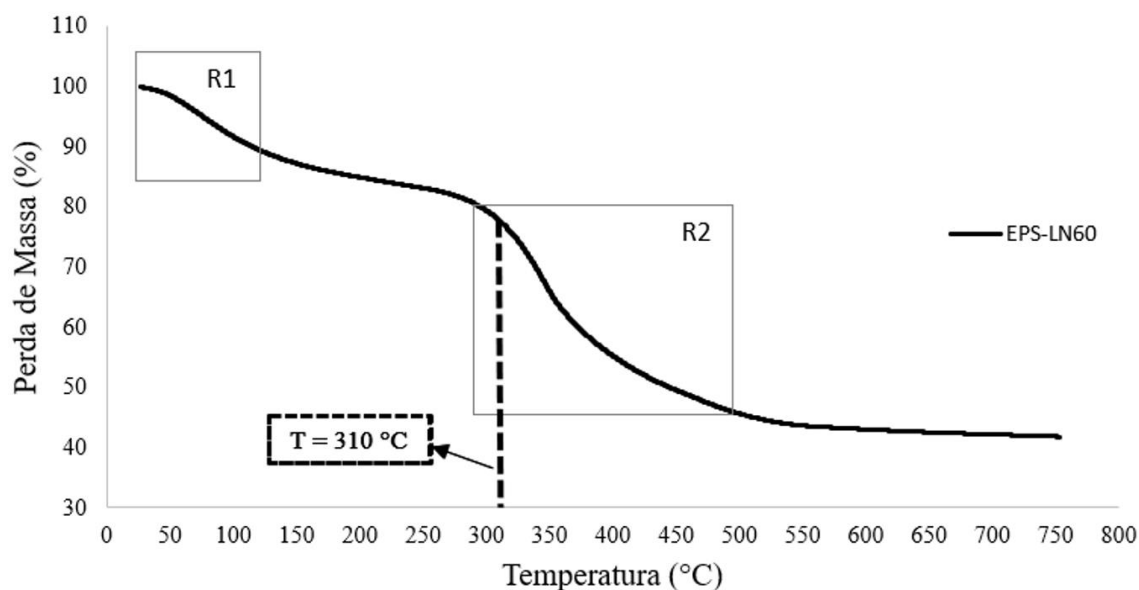


Figura 2 – Curva de termogravimetria do EPS-LN60 obtido a partir da fermentação do soro de leite por *L. plantarum* DF60Mi.

O termograma da análise calorimétrica (Fig. 3) do EPS obtido pela fermentação do soro de leite pela bactéria *L. plantarum* DF60Mi exibiu um pico endotérmico de maior relevância em torno de 92 °C, e dois picos exotérmicos próximos de 350 e 480 °C, respectivamente. O primeiro pode ser explicado pela expulsão da água e a fusão de algumas estruturas cristalinas do carboidrato presente na amostra (Nambiar et al., 2018).

Estudos mostram que os valores encontrados para a temperatura de fusão variam conforme a configuração molecular do polímero estudado (MIAO et al., 2015). Autores que estudaram polissacarídeos de origem microbiana relataram entalpia endotérmica com variações de valores de temperatura de fusão para as cepas ZW3, KF5, YW11 e SK24.003 de 97,38, 86,35, 147,7, 143,6 °C, respectivamente (Shrivastava; Ananthanarayan, 2014; Miao et al., 2015; Wang et al., 2010; Wang et al., 2015).

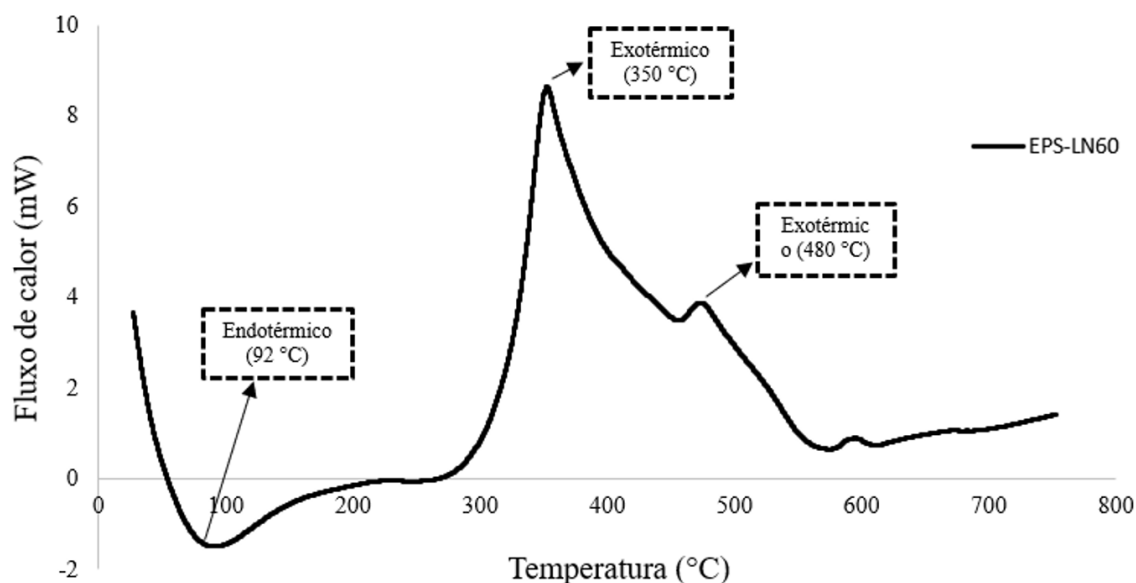


Figura 3 – Termograma de calorimetria exploratória diferencial do EPS-LN60 a partir de *L. plantarum* DF60Mi

É importante destacar que a aplicação em larga escala de um polímero está diretamente relacionada com seu comportamento térmico e reológico (WANG et al., 2015). O EPS obtido pela fermentação do soro de leite por *L. plantarum* DM60Mi apresentou alta estabilidade térmica, conseqüentemente, tem a capacidade de suportar temperaturas superiores às comumente utilizadas em processos industriais alimentícios.

3.2.3. Análises de monossacarídeos

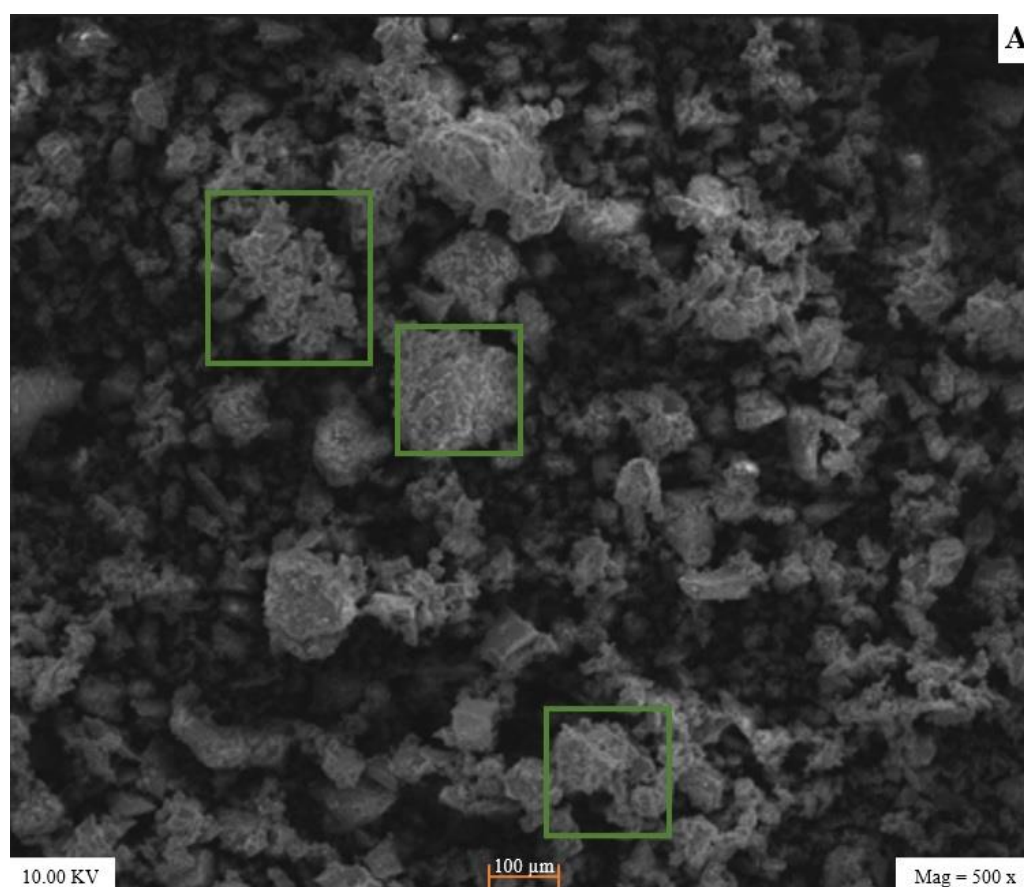
A composição monossacarídica do EPS-LN60 é composta de galactose (51,1%), manose (22,9%), glicose (20,8%) e ramnose (5,2%). A diversidade de monossacarídeos encontrados no EPS-LN60 indica ser um heteropolissacarídeo. Vários são os estudos que demonstraram presença majoritária de galactose e glicose em exopolissacarídeos obtidos a partir de *L. plantarum*, além da presença de outros monossacarídeos em diferentes concentrações (AYYASH et al., 2020; XU et al., 2019; ZHU et al., 2019; WANG et al., 2018). Como exemplo, o EPS produzido a partir de cepas de *L. plantarum* KX041 e RS20D demonstraram a presença em pequenas concentrações de ramnose (XU et al., 2019; ZHU et al., 2019). Corroborando o presente trabalho, Xu et al. (2019) reportaram que os EPS produzidos por *L. plantarum* geralmente são constituídos de glicose, galactose, manose e a

presença de outros monossacarídeos em menores quantidades como ramnose, arabinose e frutose.

Vale destacar que a variação na composição monossacarídica depende principalmente da cepa, condições de cultivo e meio fermentativo (PENG et al., 2015; HAN et al., 2017; LIU et al., 2019; AYYASH et al., 2020). Vale ressaltar que o substrato da fermentação foi o soro de leite, que contém em sua maioria o dissacarídeo lactose (glicose e galactose). Além disso, a matriz alimentar isolada da cepa pode influenciar na produção de alguns monossacarídeos de origem própria, como é o caso do DF60Mi que foi isolado do leite de cabra, o que pode explicar a presença significativa de concentrações de galactose no EPS-LN60.

3.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do EPS-LN60

A microestrutura morfológica do EPS purificado obtido a partir da fermentação de soro de leite bovino por *L. plantarum* DF60Mi (Fig. 4) apresentou-se em formato de conglomerado tridimensional irregular com superfícies porosas (Fig. 4A). Em maior ampliação é possível identificar mais detalhadamente a presença do formato de folhas de polissacarídeos (Fig. 4B).



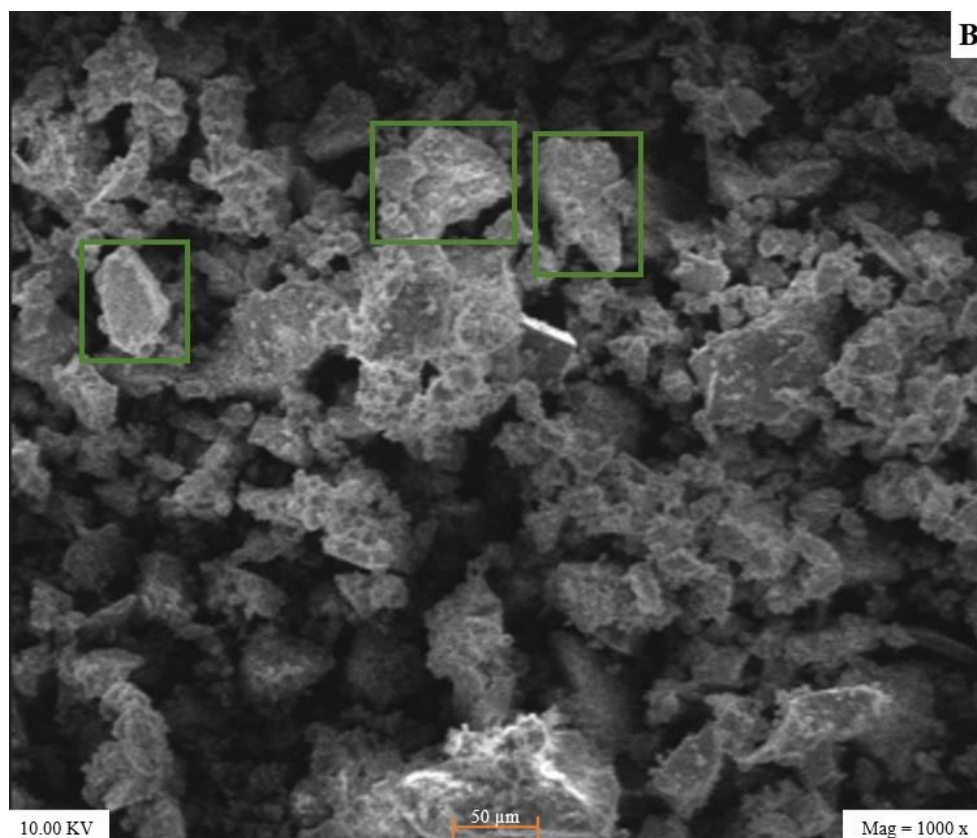


Figura 4 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do EPS-LN60. (A) 500 vezes de magnitude e barra de escala igual a 100 µm. (B) 1000 vezes de magnitude e barra de escala igual a 50 µm; retângulos verdes indicam porosidade visível (A) e formato de folhas (B).

Alguns autores já demonstraram que o EPS proveniente de algumas cepas de *L. plantarum* resultam em características morfológicas semelhantes ao encontrado neste estudo, como Liu et al. (2017) ao avaliar a cepa WLPL04, Liu et al. (2019) cepa HY e XU et al. (2019) cepa KX041.

O MEV é uma ferramenta para esclarecer a morfologia de superfície e com isso prever suas possíveis características químicas. A superfície porosa e em forma de folhas do EPS obtido da cepa DF60Mi como foi analisado neste estudo indica seu potencial de aplicação na indústria alimentar visando alterações nas propriedades reológicas como capacidade de retenção de água e viscosidade, pelo aumento da área de contato (WANG et al., 2015; XU et al., 2019).

4 CONCLUSÕES

O tratamento dado ao soro de leite com a finalidade de diminuição de teores de gorduras e proteínas foi efetivo, visto que esses componentes não interferiram na obtenção do

produto final. O rendimento do produto final, o teor de açúcares totais e proteínas estão dentro do esperado relacionando com a produção de EPS a partir de bactérias lácticas em larga escala.

O EPS-LN60 obtido é composto de galactose, manose, glicose e ramnose. Tendo em vista que a composição química é fundamental para possibilitar sua utilização como ingrediente com potencial funcional, o EPS apresentou espectro de carboidratos, e comportamento térmico adequado para utilização em processos industriais, atingindo temperatura de degradação em torno de 310° C. As imagens de morfologia mostraram uma estrutura tridimensional irregular (formato de folha) e porosa, o que indica potencial de alteração das propriedades reológicas dos alimentos.

Diante disso, pode-se vislumbrar a utilização do EPS-LN60 como potencial ingrediente a ser explorado pela indústria alimentícia, principalmente por sua alta estabilidade térmica e possível influência nas propriedades reológicas dos produtos.

Agradecimentos: Este trabalho foi financiado pela Universidade Federal da Paraíba/PRPG/PROPESQ [projeto nº PVM13515-2020] e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES [código do edital 001]. Os autores também agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de auxílio financeiro. Os autores também agradecem à Professora Dr^a. Bernadette D. G. M. Franco e Danielle Nader Furtado (Universidade de São Paulo) pela ajuda no fornecimento da linhagem *L. plantarum* DF60Mi.

REFERÊNCIAS

- ADESULO-DAHUNSI, A. T.; JEYARAM, K.; SANNI, A. I. Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based nigerian fermented food products. *Food Control*, v. 92, p. 225-231, 2018.
- AHMED, Z.; WANG, Y.; ANJUM, N.; AHMAD, A.; KHAN, S. T. Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranoferiens* ZW3 isolated from Tibet Kefir – Part II. *Food Hydrocolloids*, v. 30, p. 343-350, 2013.
- ALMEIDA JÚNIOR, W. L. G.; FERRARI, I. S.; SOUZA, J. V.; SILVA, C. D. A.; COSTA, M. M.; DIAS, F. S. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Control*, v. 53, p. 96–103, 2015.
- AOAC - Association of Official Agricultural Chemistry: **Official Methods of Analysis**. (21th ed.), AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, 2019.

- AYYASH, M.; ABU-JDAYIL, B.; ITSARANUWAT, P.; GALIWANGO, E.; TAMIELLO-ROSA, C.; ABDULLAH, H.; ESPOSITO, G.; HUNASHAL, Y.; OBAID, R. S.; HAMED, F. Characterization, bioactivities, and rheological properties of exopolysaccharide produced by novel probiotic *Lactobacillus plantarum* C70 isolated from camel milk. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 144, p. 938-946, 2020.
- CARRERO-PUENTES, S.; FUENMAYOR, C.; JIMÉNEZ-PÉREZ, C.; GUZMÁN-RODRÍGUEZ, F.; GÓMEZ-RUIZ, L.; RODRÍGUEZ-SERRANO, G.; ALATORRE-SANTAMARÍA, S.; GARCÍA-GARIBAY, M.; CRUZ-GUERRERO, A. Development and characterization of an exopolysaccharide-functionalized acid whey cheese (requesón) using *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*. *Journal of Food Processing and Preservation*, p. 1-8, 2021.
- CASTRO-CISLAGHI, F. P. DE.; SILVA, C. DOS. R. E.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; LOREZ, J. G.; SANT'ANNA, E. S. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *Journal of Food engineering*, v. 113, p. 186-193, 2012.
- DABA, G. M.; ELNAHAS, M. O.; ELKHATEEB, W. A. Contributions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria as biotechnological tools in food, pharmaceutical, and medical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 79–89, 2021.
- DAS, D.; BARUAH, R.; GOYAL, A. A food additive with prebiotic properties of an α -D-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. *International Journal of biological Macromolecules*, v. 69, p. 20-26, 2014.
- DEO, D.; DAVRAY, D.; KULKARNI, R. A diverse repertoire of exopolysaccharide biosynthesis gene clusters in *Lactobacillus* revealed by comparative analysis in 106 sequenced genomes, *Microorganisms*, v. 7, p. 527-537, 2019.
- DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 23, n. 2, p. 153-177, 1999.
- DUEÑAS, M.; MUNDUATE, A.; PEREA, A.; IRASTORZA, A. Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 87, p. 113–120, 2003.
- FURTADO, D. N.; TODOROV, S. D.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: characterization of the bacteriocin. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45 (4), p. 1541-1550, 2014.

- GANGOITI, M. V.; PUERTAS, A. I.; HAMET, M. F.; PERUZZO, P. J.; LLAMAS, M. G.; MEDRANO, M.; PRIETO, A.; DUEÑAS, M. T.; ABRAHAM, A. G. *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327: an α -glucan producing-strain isolated from Kefir grains. *Carbohydrate Polymers*, v. 170, p. 52-59, 2017.
- GEBARA, C.; RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GANDARA, A. L. N.; GIGANTE, M. L. Effectiveness of different methodologies for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* La5 from yoghurt and Prato cheese. *LWT - Food Science and Technology*, v. 64, p. 508-513, 2015.
- HAN, P. P.; YAO, S. Y.; GUO, R. J.; SHEN, S. G.; YAN, R. R.; TAN, Z. L.; JIA, S. R. The relationship between monosaccharide composition of extracellular polysaccharide and activities of related enzymes in *Nostoc flagelliform* under different culture conditions, *Carbohydrate Polymers*, v. 174, p. 11-119, 2017.
- HASSAN, S. W. M. & IBRAHIM, H. A. H. Production, characterization and valuable applications of exopolysaccharides from Marine *Bacillus subtilis* SH1. *Polish Journal of Microbiology*, v. 66, p. 449-461, 2017.
- HEDGE, J. E. & HOFREITER, B. T. **In: Methods in Carbohydrate Chemistry**, 17 (Eds. Whistler R.L. and Be Miller, J.N.), Academic Press, New York, 1962.
- IDF – FERMENTED and NON-FERMENTED MILK PRODUCTS –: Detection and Enumeration of *Lactobacillus acidophilus*: culture media. In: **Bulletin of International Dairy Federation**, Brussels n. 306, p.23, 1995.
- JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LÖNNGREN J. A practical guide to methylation analysis of carbohydrate. *Chemical Communications*, 8, 1-70, 1976.
- JIANG, Y.; YANG, Z. A functional and genetic overview of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Functional Foods*, v. 47, p. 229-240, 2018.
- KAVITAKE, D.; DEVI, P. B.; SINGH, S. P.; SHETTY, P. H. Characterization of a novel galactan produced by *Weissella confusa* KR780676 from an acidic fermented food, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 86, p. 681-689, 2016.
- LEÓN-LÓPEZ, A.; PÉREZ-MARROQUÍN, X. A.; CAMPOS-LOZADA, G.; CAMPOS-MONTIEL, R. G.; AGUIRRE-ÁLVAREZ, G. Characterization of whey-based fermented beverages supplemented with hydrolyzed collagen: Antioxidant activity and bioavailability. *Foods*, v. 9, p. 1-14, 2020
- LI, W.; JI, J.; RUI, X.; YU, J.; TANG, W.; CHEN, X.; JIANG, M.; DONG, M. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics *in vitro*. *LWT-Food Science and Technology*, v. 59, p. 732-739, 2014.

- LIU, T.; ZHOU, K.; YIN, S.; LIU, S.; ZHU, Y.; YANG, Y.; WANG, C. Purification and characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* HY isolated from home-made Sichuan Pickle. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 134, p. 516-526, 2019.
- LIU, Z.; ZHANG, Z.; QIU, L.; ZHANG, F.; XU, X.; WEI, H.; TAO, X. Characterization and bioactivities of exopolysaccharides from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 6895-6905, 2017.
- LYNCH, K. M.; ZANNINI, E.; COFFEY, A.; ARENDT, E. K. Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: Isolation, properties, characterization and health benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 9, p. 155–176, 2018.
- MACWAN, S. R.; PARMAR, S. C.; PRAJAPATI, J. B.; APARNATHI, K. D. Evaluation of cheddar cheese whey and paneer whey as a growth medium for lactic acid bacteria. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, v. 10, p. 1261-1268, 2016.
- MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, v. 44, n. 1, p. 465–470, 2011.
- MIAO, M.; MA, Y.; HUANG, C.; JIANG, B.; CUI, S. W.; ZHANG, T. Physicochemical properties of a water soluble extracellular homopolysaccharide from *Lactobacillus reuteri* SK24.003. *Carbohydrate Polymers*, v. 131, p. 377–383, 2015.
- MISHRA, A.; JHA, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresource Technology*, v.100, p. 3382-3386, 2009.
- NAMBIAR, R. B.; SELLAMUTHU, P. S.; PERUMAL, A. B.; SADIKU, E. R.; PHIRI, G.; JAYARAMUDU, J. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* HM47 isolated from human breast milk. *Process Biochemistry*, v. 73, p. 15–22, 2018.
- PENG, L.; QIAO, S. K.; XU, Z. H.; GUAN, F.; DING, Z. Y.; GU, Z. H.; ZHANG, L.; SHI, G. Y. Effects of culture conditions on monosaccharide composition of *Ganoderma lucidum* exopolysaccharide and on activities of related enzymes. *Carbohydrate Polymers*, v. 133, p. 104-109, 2015.
- PESCUMA, M.; VALDEZ, G. F.; MOZZI, F. Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, p. 6183-6196, 2015.
- PUNTES, C. S.; FUENMAYOR, C.; JIMÉNEZ-PÉREZ, C.; GUZMÁN-SANTAMARÍA, S.; GÓMEZ-RUIZ, L.; RODRÍGUEZ-SERRANO, G.; ALATORRE-SANTAMARÍA, S.;

- GARCÍA-GARIBAY, M.; CRUZ-GUERRERO, A. Development and characterization of an exopolysaccharide-functionalized acid whey cheese (requesón) using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 46, p. 1-8, 2022.
- RAKO, A.; KALIT, M. T.; KALIT, S.; SOLDÓ, B.; LJUBENKOV, I. Nutritional characteristics of Croatian whey cheese (Bračka skuta) produced in different stages of lactation. *LWT – Food Science and Technology*, v. 96, p. 657-662, 2018.
- SAEZ-LARA, M. J.; GOMEZ-LLORENTE, C.; PLAZA-DIAZ, J.; GIL, A. The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacterial in the prevention and treatment of inflammatory disease and other related diseases: A systematic review of randomized human clinical trials. *BioMed Research International*, p. 1-15, 2015.
- SHANKAR, T.; PALPPERUMAL, S.; KATHIRESAN, D.; SANKARALINGAM, S.; BALACHANDRAN, C.; BASKAR, K.; HASHEM, A.; ALQARAWI, A. A.; ABD-ALLAH, E. F. Biomedical and therapeutic potential of exopolysaccharides by *Lactobacillus paracasei* isolated from sauerkraut: Screening and characterization. *Saudi Journal of Biological Science*, v. 28, p. 2943-2950, 2021.
- SHARMA, P. TRIVEDI, N.; GAT, Y. Development of functional fermented whey-oat-based product using probiotic bacteria, *3 Biotech*, v. 7, p. 272-280, 2017.
- SHRIVASTAVA, N.; ANANTHANARAYAN, L. Use of the backslopping method for accelerated and nutritionally enriched *idli* fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 95, p. 2081–2087, 2015.
- SILVA, F. F. P.; BISCOLA, V.; LEBLANC, J. G.; FRANCO, B. D. G. M. Effect of indigenous lactic acid bacteria isolated from goat milk and cheeses on folate and riboflavin content of fermented goat milk. *LWT – Food Science and Technology*, v. 71, p. 155-161, 2016.
- SILVA, F. T. **Queijo Minas Frescal**. 1º. ed. Brasília – DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 50 p., 2005.
- SINGH, R. P.; SHUKLA, M. K.; MISHRA, A.; KUMARI, P.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 1019–1026, 2011.
- TORINO, M. I.; VALDEZ, G. F.; MOZZI, F. Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1-16, 2015.
- TSUDA, H.; MIYAMOTO, T. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide. *Food Science and Technology Research*, v. 16, p. 87–92, 2010.

- WANG, J.; WU, T.; FANG, X.; MIN, W.; YANG, Z. Characterization and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* JLK0142 isolated from fermented dairy tofu. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 115 p. 985–993, 2018.
- WANG, J.; ZHAO, X.; TIAN, Z.; YANG, Y.; YANG, Z. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, v. 125, p. 16-25, 2015.
- WANG, K.; LI, W. RUI, X. CHEN, X.; JIANG, M.; DONG, M. Structural characterization and bioactivity of released exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 67, p. 71-78, 2014.
- WANG, K.; MENG-MENG, N.; WU, Y.; ZHU, R. F.; ZHAO, J.; LU, B. X.; NIU, G. C. Physicochemical characterization and antioxidant activity of cell-bound exopolysaccharides from *Lactobacillus fermentum* S1 obtained by two extraction methods. *Process biotechnology*, v. 85, p. 195-205, 2019.
- WANG, M.; YANG, W.; ZHAO, J.; LU, C.; ZHU, W. Structural characterization and macrophage immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Smilax glabra* Roxb. *Carbohydrate Polymer*, v. 156, p. 390-402, 2017.
- WANG, Y.; LI, C.; LIU, P.; AHMED, Z.; XIAO, P.; BAI, X. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, p. 895-903, 2010.
- WEI, W.; FENG, L.; BAO, W.; MA, D.; LEUNG, C.; NIE, S.; HAN, Q. Structure characterization and immunomodulating effects of polysaccharides isolated from *Dendrobium officinale*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, p. 881-889, 2016.
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. Methods Carbohydrates. *Chemistry*, 2, 65-67, 1963a.
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. Methods Carbohydrates. *Chemistry*, 2, 211-215, 1963b.
- XU, Y.; CUI, Y.; WANG, X.; YUE, F.; SHAN, Y.; LIU, B.; ZHOU, Y.; YI, Y.; LÜ, X. Purification, characterization and bioactivity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* KX041. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 128, p. 480-492, 2019.
- ZANNINI, E.; WATERS, D. M.; COFFEY, A.; ARENDT, E. K. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, p. 1121–1135, 2016.

- ZHAO, X. & LIANG, Q. EPS-producing *Lactobacillus plantarum* MC5 as a compound starter improves rheology, texture, and antioxidant activity of yogurt during storage. *Foods*, v. 11, p. 1-20, 2022.
- ZHANG, L.; ZHAO, B.; LIU, C-J.; YANG, E. Optimization of biosynthesis conditions for the production of Exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* SP8 and the Exopolysaccharides antioxidant activities test. *Indian Journal of Microbiology*, v. 60, p. 334-345, 2020.
- ZHANG, Z.; LIU, Z.; TAO, X.; WEI, H. Characterization and sulfated modification of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its biological activities. *Carbohydrates Polymers*, v. 153, p. 25-33, 2016.
- ZHU, Y.; WANG, X.; PAN, W.; SHEN, X.; HE, Y.; YIN, H.; ZHOU, K.; ZOU, L.; CHEN, S.; LIU, S. Exopolysaccharides produced by yogurt-texture improving *Lactobacillus plantarum* RS20D and immunoregulatory activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 121, p. 342-349, 2019.

ARTIGO 2

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE EXOPOLISSACARÍDEO MICROBIANO E
SUA UTILIZAÇÃO COMO AGENTE ENCAPSULANTE DE *Lactobacillus acidophilus*
LA-3**

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE EXOPOLISSACARÍDEO MICROBIANO E SUA UTILIZAÇÃO COMO AGENTE ENCAPSULANTE DE *Lactobacillus acidophilus* LA-3

Resumo

O exopolissacarídeo microbiano pode apresentar funções bioativas e tecnológicas com aplicações de interesse para a indústria alimentícia e/ou para a saúde humana. O objetivo deste trabalho foi avaliar a bioatividade do exopolissacarídeo (EPS-LN60) obtido a partir de *L. plantarum* DF60Mi e sua utilização como agente encapsulante de *Lactobacillus acidophilus* (LA-3). Foi determinado o escore prebiótico, a atividade antioxidante e avaliada a citotoxicidade em células tumorais e não tumorais humanas. Soluções de 0% (F0), 0,5% (F1) e 1,0% (F2) de EPS foram produzidas e utilizadas como cobertura de cápsulas de alginato contendo *L. acidophilus* (LA-3) e avaliadas quanto à morfologia, sobrevivência do LA-3 durante armazenamento refrigerado e após a exposição a condições gastrointestinais *in vitro*. Observou-se que o EPS-LN60 possui capacidade prebiótica superior ($1,45 \pm 0,17$) ao prebiótico comercial frutooligossacarídeo ($0,24 \pm 0,05$) e atividade antioxidante de $1.862 \pm 23,08 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$. Além disso, o EPS-LN60 inibiu em $36\% \pm 2,78$ o crescimento de células tumorais (HCT-116). As cápsulas de F1 e F2 com EPS-LN60 apresentaram-se esféricas e uniformes, e o recobrimento foi eficiente com sobrevivência do LA-3 de aproximadamente 85% para ambas após os 20 dias. Já F0 não exibiu células viáveis após 10 dias. O EPS-LN60 promoveu uma proteção adicional à cápsula, evitando a perda de viabilidade durante as condições de simulação gastrointestinal, resultando em sobrevivência superior a 86% para F1 e F2, o que não foi observado em F0 quando submetida às mesmas condições. Portanto, demonstrou-se a potencialidade do EPS-LN60 quanto a sua bioatividade e utilização como agente encapsulante do *L. acidophilus* LA-3, com possibilidade futura de exploração como ingrediente funcional por indústrias de alimentos e farmacêutica.

Palavras-chave: Funcionalidade; prebiótico; polímero; agente de recobrimento.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias ácido lácticas, mais especificamente a espécie *Lactiplantibacillus plantarum* é heterofermentativa e é encontrada em meios com alto teor de nutrientes e em mucosas de organismos animais e humanos (Mayo & Flórez, 2022). Essa espécie já é

conhecida por possuir cepas com caráter probiótico e por possuir a capacidade de produção de diferentes compostos bioativos, como os exopolissacarídeos (EPS) (Yilmaz & Simsek, 2020).

Os EPS são polímeros de açúcares que podem ser extraídos de fontes como plantas, fungos e bactérias e são liberados para o meio externo (Ayyash et al., 2020; Zhao & Liang, 2022). Geralmente são usados na indústria alimentícia como aditivos em produtos lácteos melhorando a reologia, propriedades sensoriais e vida de prateleira dos produtos (Zhang et al., 2020). Apesar de ser uma temática emergente, o estudo do EPS microbiano na área de funcionalidade biológica tem demonstrado benefícios imunológicos e gastrointestinais à saúde do hospedeiro (Lynch, Zannini, Coffey, & Arendt, 2018; Zannini, Waters, Coffey, Arendt, 2016). Apesar disso, ao se tratar de probióticos como os *Lactobacillus acidophilus* seu maior obstáculo está voltado para a manutenção da viabilidade celular durante a passagem pelo sistema gastrointestinal humano (Rahali, Arieche, Moussaoui, & Riazi, 2022).

A encapsulação é definida como uma tecnologia de aprisionamento do agente ativo por meio de uma membrana biopolimérica a fim de promover proteção ao composto encapsulado (Zuidam & Shimon, 2010). A encapsulação de probióticos tem o objetivo de proteger o microrganismo das condições severas do sistema do trato gastrointestinal, aumentando assim sua sobrevivência após a exposição (Abedfar et al., 2021). A técnica de gelificação iônica é uma alternativa para a área de alimentos, pois não utiliza solventes químicos nocivos à saúde e nem temperaturas elevadas (Polleto et al., 2019).

Segundo Lopes et al. (2019) o alginato de sódio é amplamente utilizado no processo de encapsulação por ser acessível e biodegradável, entretanto possui desvantagens, principalmente pela alta porosidade que pode admitir a entrada de fluidos gastrintestinais, bem como a saída do agente encapsulado, reduzindo a proteção frente aos fatores ambientais. Assim, o EPS apresenta-se como uma alternativa de uso como material de parede ou agente de recobrimento a fim de minimizar os defeitos que o alginato isolado proporciona.

Diante do exposto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a bioatividade do EPS-LN60 obtido a partir da fermentação do soro de leite por *Lactiplantibacillus plantarum* DF60Mi e sua utilização como agente encapsulante do probiótico *Lactobacillus acidophilus* LA-3.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATÉRIA-PRIMA, REAGENTES E CULTURAS

O leite de vaca pasteurizado utilizado foi proveniente da empresa Betânia Lácteos S.A, localizada no município de Fortaleza, Ceará, Brasil. O soro de leite foi obtido a partir da

fabricação do queijo minas frescal, sem adição de culturas lácticas. O cloreto de cálcio 40% (v/v) (Rica Nata, Piracema, Minas gerais, Brasil) e o coagulante (Ha-la, Chr. Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil) foram utilizados. A cultura probiótica utilizada para fermentação do soro foi *Lactiplantibacillus plantarum* DF60Mi isolada de leite de cabra por Furtado, Todorov, Landgraf, Destro, & Franco (2014) e cedida em colaboração pela Universidade de São Paulo, e registrada no Patrimônio Genético do Brasil (SISGEN) sob código A5C7E65. A cultura probiótica utilizada foi *Lactobacillus acidophilus* (LA-3[®]) (Sacco, Campinas, São Paulo, Brasil). Os materiais utilizados para a encapsulação de LA-3 foram alginato de sódio (Ultrapan, Valinhos, São Paulo, Brasil), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$) (Química moderna, Barueri, São Paulo, Brasil), citrato de sódio P.A (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil).

2.2. FERMENTAÇÃO DO SORO DE LEITE

2.2.1. Reativação de *L. plantarum* (DF60Mi) e *L. acidophilus* (LA-3)

O processo de reativação das culturas mantidas em glicerol foi adaptado de Lopes Neto et al. (2021). Reativou-se em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e incubou-se a 37 °C por 24 h.

2.2.2. Enumeração das culturas bacterianas

A enumeração de células viáveis de DF60Mi e LA-3 foi realizada em superfície pela técnica de microgota, em ágar MRS, através de diluições decimais seriadas utilizando água peptonada 0,1% (p/v). As placas foram incubadas a 37 °C por 72 h em jarras de anaerobiose (Permutation, Curitiba – PR) com auxílio de vela (IDF, 1995).

2.2.3. Preparo do soro de leite

O soro de leite obtido a partir da fabricação de queijo Minas frescal (Silva, 2005) foi centrifugado a 6428 x g a 4 °C durante 10 min para auxiliar na remoção de gordura. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado e o pH foi ajustado para 4,3 a fim de precipitar a caseína residual. Posteriormente, realizou-se o tratamento térmico a 100 °C durante 30 min e pressão atmosférica. Então, centrifugou-se novamente e ajustou-se o pH para 6,5 a 6,8 obtendo-se, assim, o soro tratado.

2.2.4. Condições de cultivo

Inicialmente, a cultura DF60Mi foi reativada conforme item 2.2.1, padronizada com densidade óptica de 1,5 a 1,6 a 600 nm lida em espectrofotômetro (Eppendorf BioSpectrometer® Basic, Hamburgo, Alemanha). A partir desse cultivo, cerca de 6% (v/v), foi misturado em 1 L de soro tratado e adicionou 2% (p/v) de glicose (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil), sendo incubado a 37 °C por 48 h (CERNING et al., 1992). O tempo de fermentação foi definido através de testes preliminares a fim de evitar a degradação do EPS produzido.

2.2.5. Obtenção e purificação do EPS-LN60

O soro fermentado foi submetido ao banho ultrassônico durante 30 min. Em seguida, o pH foi ajustado para 7,0. O soro fermentado foi submetido ao calor (1 atm, 100 °C/30 min) para inativação de possíveis enzimas que viessem a degradar açúcares e proteínas. Em seguida, o soro foi centrifugado a 6428 x g (Modelo: 5430R, Eppendorf, Hamburgo – Alemanha) a 4 °C por 10 minutos. Foi adicionado álcool a 96 °GL a -20 °C na proporção de 1:2 (v/v) ao sobrenadante. A mistura foi agitada manualmente e acondicionada a -20 °C durante 24 h para precipitação do EPS. O precipitado foi recolhido por centrifugação sob as mesmas condições já mencionadas, seguindo para a diálise utilizando membrana de celulose de 3 kDa (Sigma, Missouri – EUA) contra água destilada durante 48 h, sendo necessária a troca da água a cada 12 h.

O exopolissacarídeo úmido purificado (EPS-LN60) foi liofilizado (Freeze-drier, Liobras, Model: L101, São Carlos, São Paulo, Brasil) a -34 °C e 280 micrômetros de mercúrio (µmHg) durante 2 dias e utilizado para análise posterior (Almeida Júnior et al., 2015; Cerning et al., 1992; Nguyen et al., 2018; Geel-Schutten, Flesch, Brink, Smith, & Dijkhuizen, 1998).

2.3 BIOATIVIDADE DO EPS-LN60

2.3.1 Escore de atividade prebiótica

A multiplicação da cultura probiótica na presença do EPS-LN60 foi determinada de acordo com a metodologia adaptada de Huebner; Wehling; Hutkins (2007) e Lee et al. (2021). Ainda de acordo com os autores a atividade prebiótica reflete a aptidão do substrato de suportar a multiplicação de bactérias probióticas frente às entéricas, como a espécie *Escherichia coli*, comparada à multiplicação em substrato não-prebiótico (glicose).

As culturas probióticas (DF60Mi e LA-3) foram reativadas de acordo com o item 2.2.1. A cepa *E. coli* 8739 foi reativada em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) seguindo o mesmo procedimento. O teste consistiu em adicionar 1% (v/v) da cultura reativada nos tubos contendo caldo MRS (DF60Mi e LA-3) ou caldo M9 (KH₂PO₄ – 15 g/ L; NaCl – 2,5 g/ L; Na₂HPO₄ – 33,9 g/ L; NH₄Cl – 5,0 g/ L) (*E. coli*) com 1% (p/v) de glicose ou 1% (p/v) de EPS ou do frutooligossacarídeo (FOS) (Orafti® P95 Beneo, Mannheim, Germany). O FOS foi utilizado com o controle positivo, enquanto que a glicose foi usada como substrato não-prebiótico. Os tubos foram incubados a 37 °C em anaerobiose e após 0, 24 e 48 h retirou-se alíquotas para enumeração em ágar MRS (LA-3) ou ágar TSA (Tryptic Soy Agar, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) (aerobiose) (*E. coli* 8739), 37 °C/ 48 h.

Os substratos com alta taxa de atividade prebiótica sustentam, em geral, a multiplicação das bactérias probióticas, com densidades celulares (UFC/mL) comparáveis àquelas quando cultivadas em glicose. O escore da atividade prebiótica foi definido de acordo com a Equação 1.

$$\frac{\left\{ \frac{(\text{probiótico log UFC mL}^{-1} \text{ no prebiótico a 48 h} - \text{probiótico log UFC mL}^{-1} \text{ no prebiótico a 0 h})}{(\text{probiótico log UFC mL}^{-1} \text{ em glicose a 48 h} - \text{probiótico log UFC mL}^{-1} \text{ em glicose a 0 h})} - \frac{(E.coli \text{ log UFC mL}^{-1} \text{ no prebiótico a 48 h} - E.coli \text{ log UFC mL}^{-1} \text{ no prebiótico a 0 h})}{(E.coli \text{ log UFC mL}^{-1} \text{ em glicose a 48 h} - E.coli \text{ log UFC mL}^{-1} \text{ em glicose a 0 h})} \right\}}{\quad} \quad (\text{Eq. 1})$$

2.3.2 Determinação da atividade antioxidante

2.3.2.1 Método poder antioxidante redutor férrico (FRAP)

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) é definido pela redução do complexo Fe⁺³ a Fe⁺² na presença de 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) e de uma substância com capacidade antioxidante em ambientes ácidos (Benzie & Strain, 1996). Inicialmente, prepararam-se as soluções de TPTZ (2,4,6-Tris-(2-piridil)-s-triazina) 10 mM (Dinâmica, São Paulo, Brasil) diluído em uma solução de HCl 40 mM (Química Moderna, São Paulo, Brasil); cloreto Férrico 20 mM (Dinâmica, São Paulo, Brasil); tampão acetato 0,3 M, pH 3,6; sulfato ferroso 2 mM (Dinâmica, São Paulo, Brasil).

O reagente FRAP foi preparado a partir da mistura das soluções de tampão de acetato 0,3 M, de TPTZ 10 mM e de cloreto férrico 20 mM na proporção de 10:1:1. Cerca de 2,7 mL do reagente FRAP foram adicionados a 120 µL de solução de EPS (1 mg/ mL) e submetidos a 37 °C/ 10 min. A absorbância foi medida em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 593 nm após 30 min, usando o reagente FRAP como branco. A curva de calibração foi determinada com auxílio do reagente sulfato ferroso (FeSO₄) (Synth, São Paulo, Brasil) com

concentrações que variaram de 500-2000 mM. O resultado foi expresso em $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ de amostra (Alcântara et al., 2019; Rufino et al., 2006).

2.3.2.2 Poder redutor total

A atividade redutora total do EPS-LN60 foi avaliada de acordo com Krunić & Rakin (2022) com adaptações. O EPS-LN60 (1 mg/mL) foi solubilizado na proporção de 1:2,5:2,5 com solução de tampão fosfato de sódio (NaH_2PO_4) (Exôdo Científica, São Paulo, Brasil) (0,2 M pH 6,6) e solução de ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) (Synth, São Paulo, Brasil) (1%, p/v). A mistura foi incubada em banho-maria a 50 °C por 30 min. Após o resfriamento, a solução de ácido tricloroacético (TCA) (Dinâmica, São Paulo, Brasil) (10%, p/v) foi adicionada na mesma proporção e então a mistura foi centrifugada a 2.000 x g por 10 min. Após a centrifugação, 1 mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de água ultrapura e 200 μL de uma solução de cloreto de ferro III (FeCl_3) (Synth, São Paulo, Brasil) (1% p/v). Após 10 min, a absorbância foi medida a 700 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis (Drawell-DU 8200, Shanghai Drawell Scientific Instrument Co., Ltd.) e água destilada foi usada como branco.

2.3.3 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumorais humanas

O ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) foi utilizado para avaliar a citotoxicidade do EPS-LN60 frente às linhagens de células tumorais de carcinoma colorretal (HCT-116), melanoma (SK-MEL-28) e adenocarcinoma de mama (MCF-7), e não tumorais de queratinócitos (HaCaT). O método consiste na avaliação da viabilidade e proliferação celular através da atividade redutora de desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983).

As células foram semeadas em placas de 96 poços em uma concentração de 3×10^5 células/mL. Após 24 horas, as células foram incubadas com diferentes concentrações do EPS-LN60 testadas com base na literatura (50, 100, 200, 400 ou 800 $\mu\text{g/mL}$) por 72 horas.

Após o período de incubação, foi retirado o sobrenadante e adicionada uma solução de MTT (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram incubadas por 4 horas adicionais, então 100 μL de 10% de uma solução de dodecil sulfato de sódio e ácido clorídrico (SDS-HCl) foram adicionados e os cristais de formazana produzidos e mantidos *overnight* para dissolução. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro (leitor de microplacas BioTek Instruments, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 570 nm. Foram realizados três experimentos independentes em quadruplicata e os dados

foram expressos como média do percentual de viabilidade celular $\pm$ e.p.m (erro padrão da média).

2.4 ENCAPSULAÇÃO

2.4.1 Preparo das soluções de reagentes

Soluções-mães de alginato de sódio a 4% (p/v) e solução de cloreto de sódio 4% (p/v) foram preparadas com água deionizada, mantidas sob agitação constante, posteriormente esterilizadas em autoclave a 121 °C. As soluções de EPS-LN60 a 0,5 e 1,0% (p/v) foram preparadas com vidrarias e água destilada estéreis, filtradas em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com diâmetro de 0,22 μ m (Bonna-Agela, Delaware, EUA). O probiótico foi adicionado diretamente na solução biopolimérica.

2.4.2 Gelificação iônica

Cápsulas de géis foram formadas a partir do gotejamento por seringa da solução biopolimérica contendo o LA-3 sobre uma solução aquosa de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 4% (p/v) sob fraca agitação, conforme adaptação de Lopes Neto et al., 2021. A concentração de LA-3 utilizada foi estabelecido de acordo com a densidade ótica de 1,5-1,6 que corresponde a 8-9 Log UFC/mL. As soluções biopoliméricas foram gotejadas com auxílio de seringa com saída da agulha de dimensões 0,70/ 25 mm. Após ficarem imersas na solução de CaCl_2 por 30 min as cápsulas foram coletadas por filtração com papel de filtro qualitativo 18 cm de diâmetro (Qualy, Fortaleza, Ceará, Brasil). Uma porção das cápsulas foi reservada e denominadas de F0. Em seguida, as demais passaram pelo processo de recobrimento sendo imersas em soluções de EPS-LN60 a 0,5% (F1) e 1,0% (F2) sob fraca agitação por 30 min, atuando como agente de cobertura e foi feita a filtração conforme já mencionado. Por fim, as cápsulas (F0, F1 e F2) foram mantidas a 37 °C por 2 h a fim de diminuir o teor de água nas cápsulas.

As cápsulas úmidas produzidas foram armazenadas a 4 ± 2 °C para acompanhamento da viabilidade (Log UFC/g) durante 0, 5, 10, 15 e 20 dias e para demais análises.

2.4.3 Microscopia ótica (MO)

Analisou-se a microestrutura das cápsulas úmidas através de microscópio óptico (Leica DM1000, Wetzlar, Alemanha) e lupa (Leica S9i, Wetzlar, Alemanha) seguindo metodologia adaptada de Lopes Neto et al. (2021).

2.4.4 Exposição à digestão gastrointestinal simulada

As condições de análise estão descritas na Tabela 1. As etapas são constituídas da fase oral (boca), gástrica (esôfago-estômago) e intestinal (duodeno e íleo).

Na fase oral utilizaram-se 2,5 g de cápsulas úmidas e adicionou-se 0,25 mL da solução da enzima alfa-amilase (A3176, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) obtida pela diluição em água estéril na proporção de 0,15% (p/v) e 2 mL do fluido salivar simulado que foi preparado conforme descrito na tabela 2. Em seguida, foram adicionados 12,5 µL da solução de $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$ (0,3 M) e 0,238 mL de água estéril completando o volume total de digestão para 5 mL. A mistura foi incubada em estufa com agitação orbital e rotação de 200 rpm a 37 °C/ 2 min.

Tabela 1 – Condições para análise de simulação das condições gástricas

Etapas	Enzimas	Agitação (rpm)	pH	Tempo (min)
Oral	α -amilase	200	6,9	2
			5,5	10
			4,6	10
			3,8	10
Gástrica	Pepsina	130	2,8	20
			2,3	20
			2,0	20
Intestinal	Pancreatina +		5,0	30
	sais biliares	45	6,5	60

Fonte: Adaptado de Minekus et al., 2014.

Na etapa gástrica, foi utilizada água estéril para preparação da solução da enzima pepsina (P7000, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) na proporção de 3,2% (p/v). A partir do volume da etapa oral (5 mL), na fase gástrica foram adicionados 4 mL de fluido gástrico simulado, 2,5 µL da solução de $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$ (0,3 M) e 0,25 mL da solução de pepsina, ácido (HCl 6 M) para redução do pH e água, totalizando volume final de digestão de 10 mL. A mistura foi incubada em estufa incubadora com agitação orbital e rotação de 130 rpm e 37 °C.

Tabela 2 – Preparação dos fluidos de digestão simulados

Substâncias	Fluido Salivar	Fluido Gástrico	Fluido Intestinal
	Simulado	Simulado	Simulado
	(pH 7,0)*	(pH 3,0)*	(pH 7,0)*
Kcl (0,5 M)	3,775	1,175	1,700
KH₂PO₄ (0,5 M)	0,925	0,225	0,200
NaHCO₃ (1 M)	1,700	3,130	10,630
MgCl₂CO₃ (0,15 M)	0,125	0,100	0,275
(NH₄)₂CO₃ (0,5 M)	0,015	0,125	-
HCl (6 M)	0,023	0,325	0,175
Nacl (2 M)	-	2,950	2,400
Água	93,437	91,970	84,620
Total (mL)	100	100	100

Adaptado de Minekus et al. (2014). - Não adicionado. *Os volumes foram calculados para um volume final de 100 mL para cada fluido simulado.

A etapa intestinal utilizou o fluido intestinal simulado como diluente das soluções de bile (0,16%, p/v) (B8756, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e pancreatina (0,4%, p/v) (P7545, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A partir do volume da etapa gástrica (10 mL), nesta fase foram adicionados 4,25 mL de fluido intestinal simulado, 20 µL da solução de CaCl₂ (H₂O)₂ (0,3 M) e 2,5 mL da solução de pancreatina, 1,25 mL da solução de bile, base (NaOH 1 M) para elevar o pH e água, totalizando volume final de digestão de 20 mL. A mistura foi incubada em estufa incubadora com agitação orbital e rotação de 45 rpm a 37 °C.

O probiótico foi liberado das cápsulas utilizando citrato de sódio (0,06 mol/L) e submetendo à agitação magnética (120 rpm) a 37 °C/ 30 min em estufa incubadora com agitação orbital. A enumeração do probiótico foi realizada ao início do processo e após o período de exposição em cada fase da simulação, retirando assepticamente uma alíquota da mistura que foi analisada conforme item 2.2.2 a fim de estimar a porcentagem de sobrevivência do probiótico (LA-3). O controle para cada formulação foi feito com as cápsulas mantidas a 37 ± 2 °C sem submetê-las às condições gastrointestinais simuladas, denominado de não-submetido (NS) (Minekus et al., 2014; Brodkorb et al., 2019).

Todas as soluções enzimáticas foram preparadas no momento da análise e esterilizadas através de membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com diâmetro de 0,22 µm (Bonna-Agela, Delaware, EUA). Todas as soluções foram mantidas em banho de gelo durante todo o período da simulação.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram executados em triplicata e os resultados expressos como média seguida do desvio padrão. Estes foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA) a fim de verificar se houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre valores encontrados e o teste de Tukey foi empregado para comparação das médias. Foi utilizado o programa GRAPHPAD prisma, versão 8.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3 Bioatividades do EPS-LN60

3.3.1 Escore de atividade prebiótica

O escore prebiótico das cepas probióticas (*L. acidophilus* LA-3 e *L. plantarum* DF60Mi), quando foram inoculadas conjuntamente com o EPS-LN60, apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao prebiótico controle (FOS) (Fig. 1). Para DF60Mi no EPS-LN60 notou-se o maior escore, de $1,45 \pm 0,17$ sendo 2,59 vezes maior quando comparado a LA-3 no mesmo substrato ($0,56 \pm 0,01$). Ao se comparar o carboidrato FOS para as cepas DF60Mi e LA-3 não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) atingindo escore de $0,24 \pm 0,05$ e $0,30 \pm 0,08$, respectivamente.

A cepa probiótica *L. plantarum* DF60Mi produziu EPS com escore prebiótico notadamente superior ao reportado por Lee et al. (2021) para o EPS extraído de *L. plantarum* MG989, atingindo aproximadamente 6 vezes mais ($\sim 0,24$). Os autores Huebner, Wehling e Hutkins (2007) avaliaram o escore prebiótico de diferentes polissacarídeos na presença de *L. plantarum* 12006 e também reportaram valores inferiores ao presente estudo para inulina (Inulina-S) e frutooligossacarídeo (Nutraflora P-95) comerciais $1,08 \pm 0,02$ e $0,46 \pm 0,10$, respectivamente.

Parâmetros como as ligações e as cadeias formadas pelos polissacarídeos podem afetar a multiplicação de microrganismos probióticos (Wang et al., 2015), adquirindo, assim escores diferentes de atividade prebiótica. Portanto os resultados evidenciaram que o EPS-LN60 possui escore de atividade prebiótica maior do que prebióticos comerciais como a inulina e frutooligossacarídeos, demonstrando seu potencial como ingrediente prebiótico.

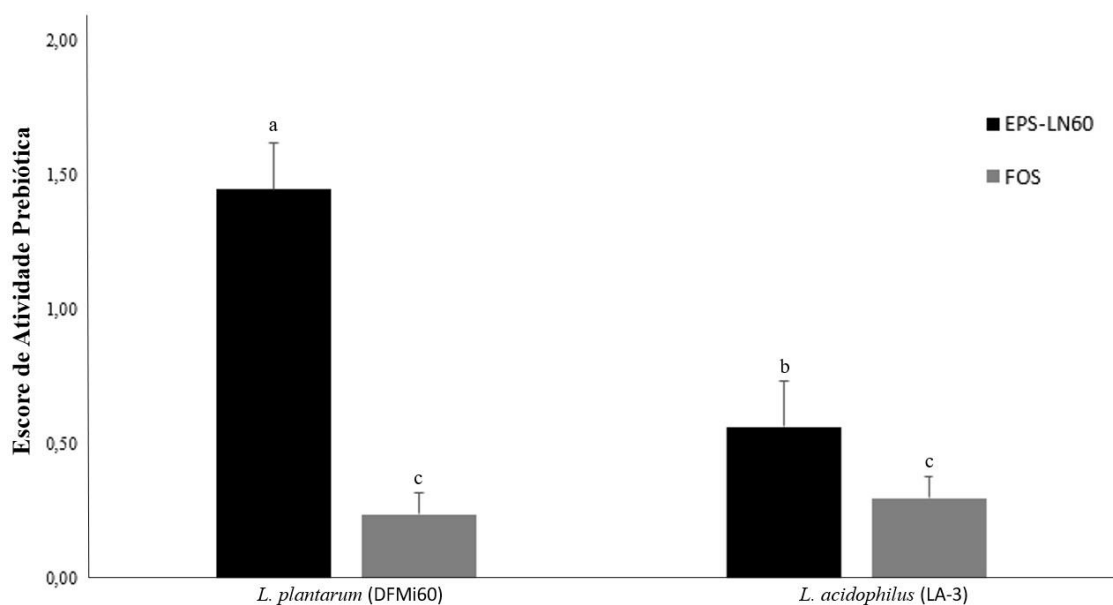


Figura 1 - Escore da atividade prebiótica das cepas probióticas (DF60Mi e LA-3) utilizando o EPS-LN60 e FOS após 48 h de incubação. ^{a-c}Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem estatisticamente entre si (teste de Tukey, $p < 0,05$).

3.3.2 Atividade antioxidante

3.3.2.1 Poder antioxidante redutor férrico (FRAP)

Os resultados demonstraram que o EPS-LN60 tem alta capacidade de doação de elétrons com cerca de $1862 \pm 23,08 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$. Bomfim et al. (2020) ao extrair EPS com glicose e FOS de *L. plantarum* CNPC003 relataram variação de $1279 \pm 10,63$ a $1131 \pm 5,31 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$, respectivamente, utilizando uma concentração de EPS 8 vezes maior do que o presente estudo e fermentando em meio de cultura padrão para bactérias ácido lácticas (MRS). Ainda, Wang et al. (2019) reportaram um valor de 9 vezes menor ($200 \mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$) obtido a partir de *L. fermentum* S1 utilizando concentração de 4 mg/mL.

O poder redutor significativamente maior do EPS-LN60 pode ser também atribuído ao soro de leite utilizado como meio fermentativo, que é um subproduto da indústria láctea que possui alto potencial biológico, incluindo-se a atividade antioxidante (Corrochano et al., 2019).

3.3.2.2 Poder redutor total

O poder redutor do EPS-LN60 apresentou absorvância de $0,15 \pm 0,01$ a 700 nm na concentração de 1 mg/mL. Este resultado foi menor quando comparado ao HY-EPS extraído de *L. plantarum* HY, cuja absorvância foi de 0,424, entretanto com EPS com concentração 4

vezes maior do que o EPS-LN60 (Liu et al., 2019). Rajoka et al. (2018) também reportaram poder redutor de EPS116 a 4 mg/mL de 0,49, superior ao EPS-LN60. Contudo, os autores afirmaram que o poder redutor do EPS aumentou de forma dose-dependente conforme o aumento de suas concentrações.

Já para os autores Sasikumar et al. (2017) que extraíram EPS a partir de *L. plantarum* BR2 obtiveram 0,19 na concentração de 2 mg/mL, valor bem próximo ao encontrado para EPS-LN60. Além disso, os resultados corroboraram o estudo da obtenção de EPS YO175 e EPS OF101 a partir de cepas de *L. plantarum* YO175 e OF101 na concentração de 1 mg/mL, cujo poder redutor na absorbância de 700 nm foi de $0,21 \pm 0,02$ e $0,19 \pm 0,01$, respectivamente (Adesulu-Dahunsi et al., 2018).

3.3.3 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais e não tumorais humanas

O EPS-LN60 apresentou baixa citotoxicidade para todas as linhagens testadas (Fig. 2). A linhagem não tumoral HaCaT (Fig. 2D) apresentou pouca sensibilidade, demonstrando, assim, a baixa toxicidade e a segurança do EPS-LN60. Nessa linhagem, foi observado efeito significativo apenas nas concentrações de 400 µg/mL e 800 µg/mL, cujos percentuais de inibição foram de $12,3 \pm 1,63\%$ e $15,3 \pm 1,38\%$, respectivamente. Dentre as células tumorais, a linhagem HCT-116 (Fig. 2A) foi a mais sensível ao EPS-LN60, que apresentou percentuais de inibição do crescimento celular variando de $10 \pm 0,83\%$ a $36 \pm 2,78\%$, respectivamente para as concentrações de 50 µg/mL a 800 µg/mL. Para a linhagem de melanoma SK-MEL-28 (Fig. 2B), o EPS-LN60 induziu o maior percentual de inibição do crescimento celular ($18 \pm 1,82\%$) na concentração de 100 µg/mL. Já em contrapartida, não foi observada citotoxicidade na linhagem de carcinoma mamário MCF-7 (Fig. 2C).

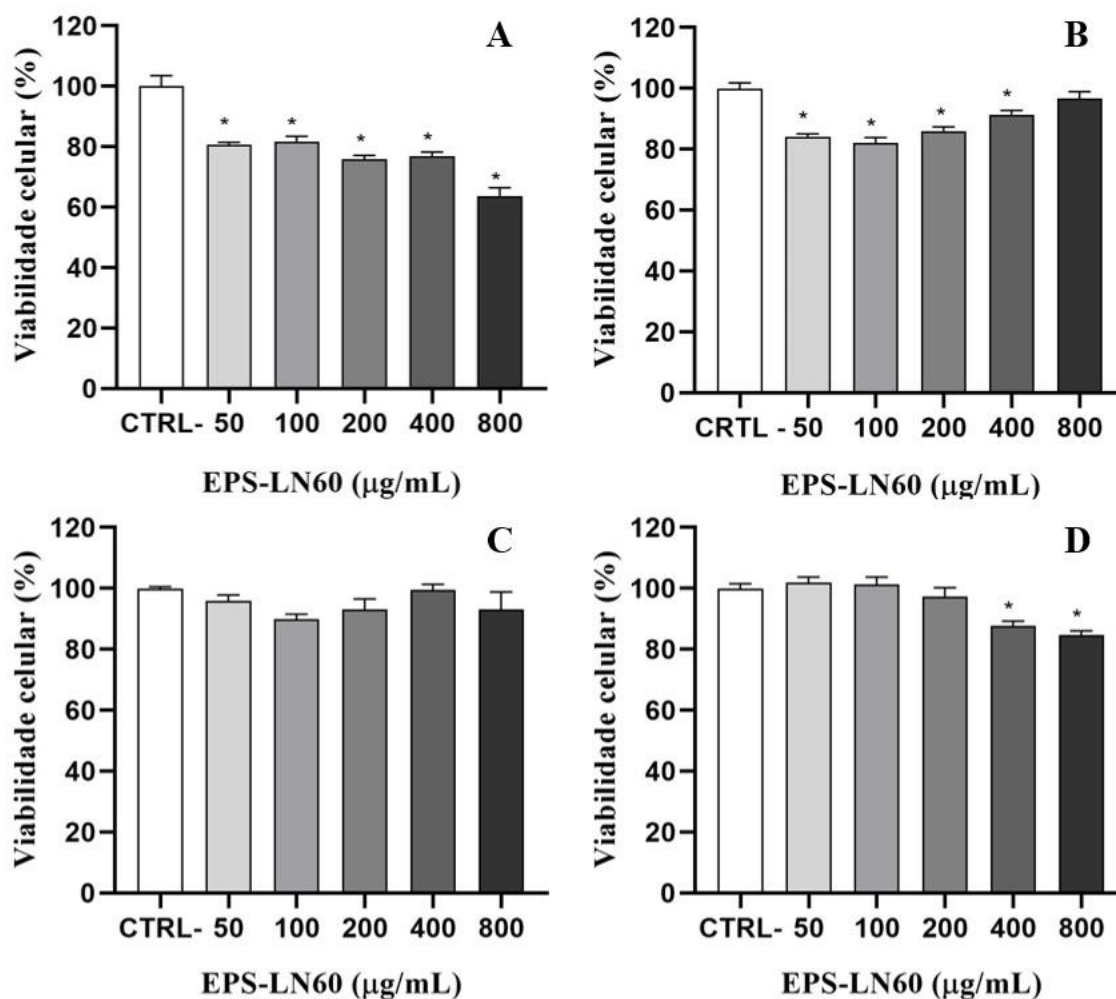


Figura 2 - Citotoxicidade nas linhagens (A) HCT-116, (B) SK-MEL-28, (C) MCF-7 e (D) HaCaT, após tratamento com exopolissacarídeo (EPS-LN60) por 72 horas, utilizando o ensaio de redução do MTT, expresso como porcentual de viabilidade celular em diferentes concentrações de substrato.

Ayyash et al. (2020) ao avaliar a atividade citotóxica de EPS-C70 frente a células de câncer de colón (Caco-2) e mama (MCF-7) encontraram percentuais superiores ao encontrado no presente estudo, com 69% e 36% inibição do crescimento celular, respectivamente. Não obstante, a concentração de EPS-C70 utilizada pelos autores foi cinco vezes maior (5 mg/mL). Logo, fica claro que a utilização de EPS-LN60 em maiores concentrações pode influenciar na citotoxicidade celular de forma diversa.

Os resultados promovidos pelo EPS-LN60 também podem ser explicados em função do antagonismo dos parâmetros de crescimento celular com os receptores da membrana da

célula cancerígena, pelo estímulo à morte celular ou pela habilidade de inibição da transcrição de genes responsáveis pela proliferação, crescimento e sobrevivência (Wang et al., 2015).

Como observado, o EPS apresentou baixa citotoxicidade para as linhagens testadas, sendo as células de carcinoma colorretal (HCT-116) as mais sensíveis. Todavia, nas linhagens testadas o EPS-LN60 não foi capaz de reduzir mais de 50% da viabilidade celular, portanto, a CI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento celular) foi considerada maior que 800 $\mu\text{g/mL}$.

3.4 Caracterização das cápsulas contendo *L. acidophilus* LA-3 e EPS-LN60

3.4.1 Porcentagem de sobrevivência de *L. acidophilus* LA-3 encapsulada durante refrigeração

A viabilidade de LA-3 na formulação sem o recobrimento de EPS-LN60 reduziu drasticamente nos primeiro 5 dias ($p < 0,05$), atingindo redução de $54,08 \pm 0,59\%$, enquanto que houve ausência de células viáveis a partir de 10 dias de armazenamento. Conforme já mencionado, a parede protetora do alginato possui porosidade elevada facilitando a saída do agente ativo para fora da cápsula, consequentemente dificulta a sobrevivência dos lactobacilos (Fig. 3).

Já as formulações F1 e F2 apresentaram decréscimo gradativo na sobrevivência de LA-3 durante o armazenamento. A F1 apresentou redução significativa na viabilidade durante o armazenamento ($p < 0,05$), com sobrevivência mínima de $84,72 \pm 1,78\%$, equivalente à redução de 1 log UFC/mL em relação à viabilidade inicial. Entretanto, ao final do armazenamento a formulação F2 não diferiu estatisticamente da F1 ($p > 0,05$) e demonstrou $85,67 \pm 0,94\%$ de sobrevivência do LA-3 em relação ao tempo inicial, que correspondeu à redução de 0,9 log UFC/mL.

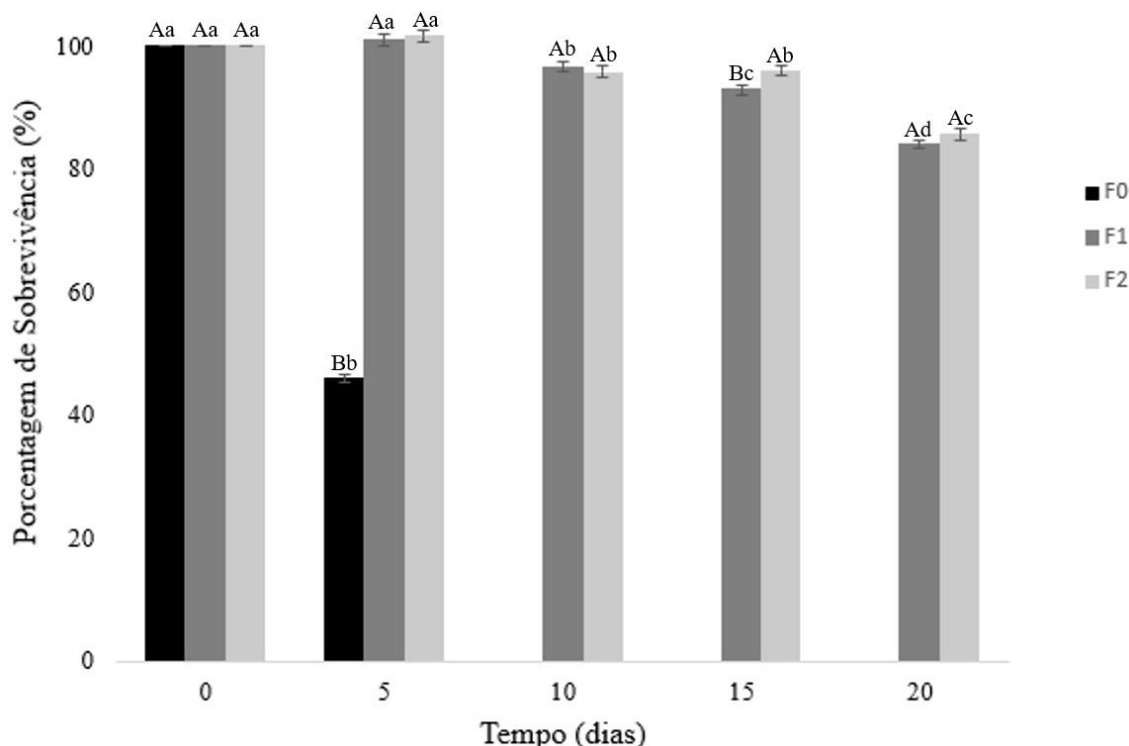


Figura 3 – Porcentagem de sobrevivência de *L. acidophilus* (LA-3) encapsulado com alginato + EPS-LN60 durante armazenamento a 4 °C. ^{a-d}Médias seguidas de diferentes letras minúsculas diferem estatisticamente na mesma formulação durante o tempo (Teste de Tukey, $p < 0,05$). ^{A-B}Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas diferem estatisticamente em cada tempo (Teste de Tukey, $p < 0,05$). F0 (alginato + LA-3), F1 (alginato + LA-3 + cobertura de 0,5% EPS-LN60) e F2 (alginato + LA-3 + cobertura de 1,0% EPS-LN60).

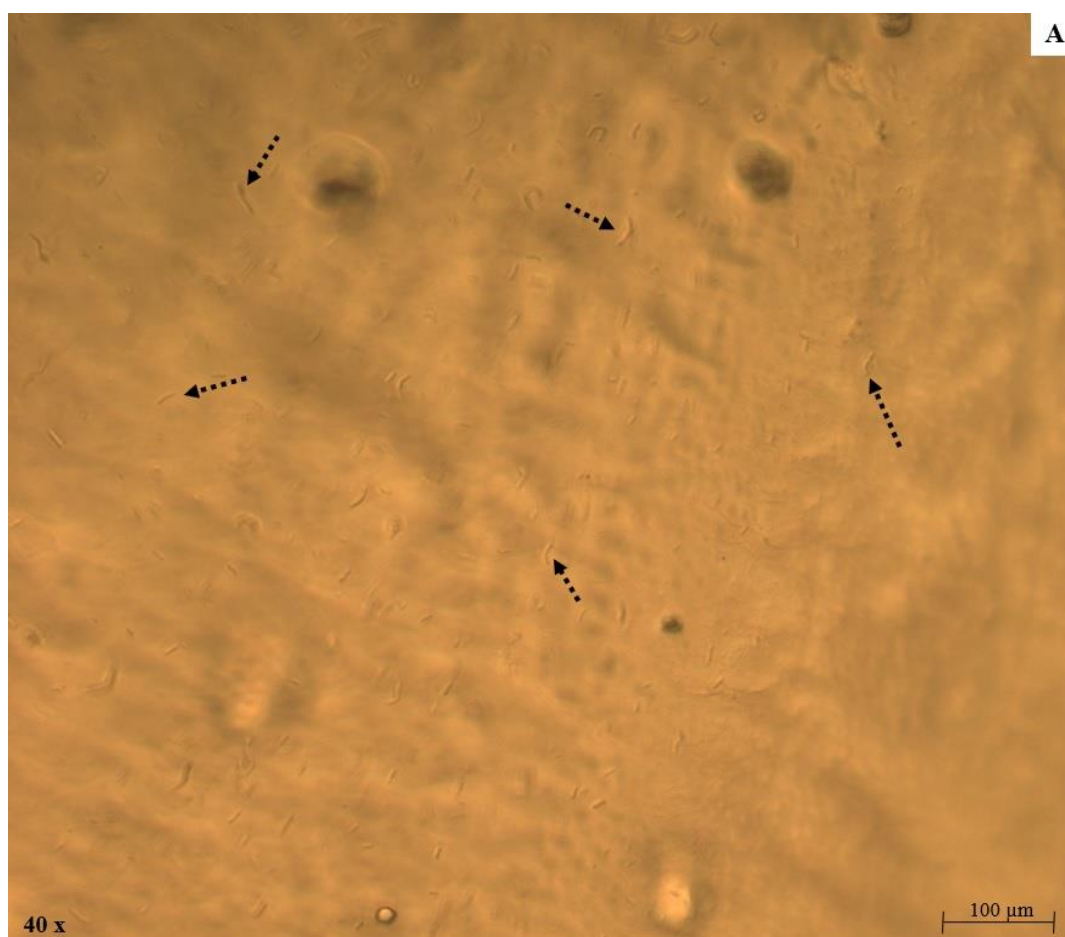
Outros estudos com encapsulação de probióticos empregando alginato de sódio e EPS ou outros materiais reportaram reduções de viabilidade ao longo do armazenamento refrigerado das micropartículas por períodos de tempo semelhantes, conforme Arepally, Redy, & Goswami (2020) (*L. acidophilus* NCDC 016, redução de 0,8 log UFC/mL); Abedfar, Hosseinienezhad, Sadeghi, & Raeisi (2021) (*L. plantarum* NR_104573.1, decréscimo de 0,7 log UFC/mL); Li et al. (2023) (*L. plantarum* 85% de sobrevivência).

Fica evidente que o uso de um exopolissacarídeo microbiano como o EPS-LN60 extraído de soro de leite cria uma barreira adicional com a finalidade de proteção do LA-3, dificultando sua difusão para fora da cápsula, e, conseqüentemente, a viabilidade do microrganismo é maior em relação à da formulação sem proteção suplementar.

3.4.2 Microscopia ótica (MO)

A microscopia ótica foi utilizada para avaliar a morfologia geral das cápsulas produzidas. Na figura 4A foi possível observar a presença do *L. acidophilus* LA-3 aprisionado pelo processo de encapsulação. As setas apontam a presença dos bastonetes característicos desse microrganismo. A ausência da cobertura do EPS-LN60 foi observada em F0, contrariamente a F1 e F2 (Fig. 4B), quando se observa a cápsula lisa, translúcida e com formato esférico parcialmente uniforme. O EPS-LN60 utilizado como revestimento da cápsula durante o processo de encapsulação demonstrou efeito visível na superfície capsular. F1 e F2 apresentaram o revestimento com o EPS-LN60 mais opaco, compacto e de formato esférico característico.

O formato esférico de cápsulas de alginato combinadas com outros polissacarídeos para incorporação de probióticos foi relatado por outros autores anteriormente, como Zanjani, Ehsani, Tarzi & Sharifan (2017) (*L. casei*) e Sandoval-Mosqueda, Llorente-Bousquets, Montiel-Sosa, Corona, Guadarrama-Álvarez (2019) (*L. plantarum* ATCC 8014). A uniformidade nas cápsulas obtidas atribuiu-se ao processo de gelificação iônica, controlando parâmetros como altura do gotejamento, tempo de permanência imersas na solução de cloreto de cálcio e o posicionamento da saída no bico extrusor (seringa), o que permite obter gotas em formato esférico e uniformes.



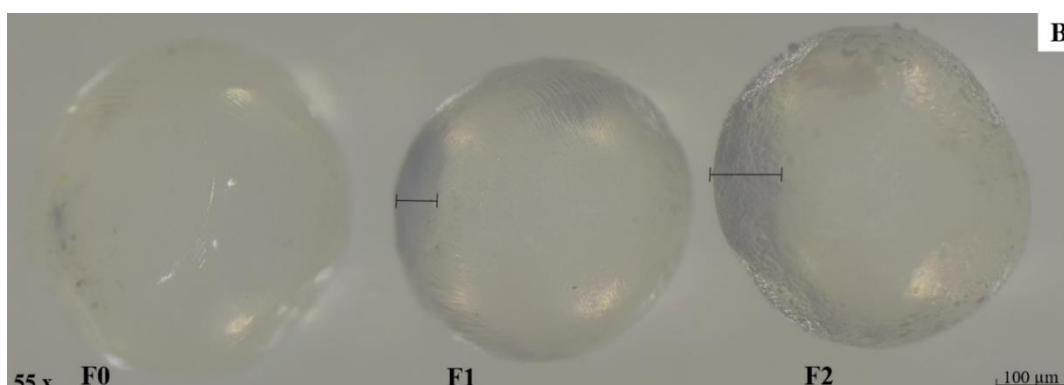


Figura 4 – Caracterização morfológica das cápsulas. (A) Microscopia óptica da cápsula produzida no aumento de 40 x e barra de escala igual a 100 µm; as setas pretas indicam o microrganismo. (B) Imagem ampliada com auxílio de lupa ótica das cápsulas F0 (alginato + LA-3), F1 (alginato + LA-3 + cobertura de 0,5% EPS-LN60) e F2 (alginato + LA-3 + cobertura de 1,0% EPS-LN60) com aumento de 55 x.

3.4.3 Exposição à digestão gastrointestinal simulada

Os resultados demonstraram que não houve decréscimo na sobrevivência do LA-3 nas três formulações submetidas ao processo simulando a fase oral, pois a alfa-amilase utilizada nesta etapa está principalmente ligada à digestão do amido, ausente nas cápsulas estudadas. Essa é uma enzima do tipo endo-hidrolase, responsável pela quebra de ligações glicosídicas α -1,4 (Aljabi & Pawelzik, 2021) (Fig. 5).

A passagem pela fase gástrica resultou na redução da sobrevivência do LA-3 em todas as formulações ($p < 0,05$). Para a formulação F0-S houve redução drástica ($p < 0,05$) na sobrevivência, correspondendo ao percentual de 3,68% em relação à fase oral, equivalente à viabilidade menor do que 1 log UFC/mL. Para F1-S e F2-S o percentual de sobrevivência após a fase gástrica foi de $85,79 \pm 2,48\%$ e $86,14 \pm 2,23\%$, respectivamente, equivalente a reduções de 0,81 e 0,94 log UFC/mL na viabilidade do probiótico. Logo, a presença do EPS-LN60 como agente encapsulante atuando como agente de cobertura, em ambas as concentrações, possibilitou uma maior proteção ao microrganismo facilitando sua sobrevivência durante essa etapa do trato gastrointestinal (TGI) e não permitindo a difusão do agente ativo para fora da cápsula e, conseqüentemente, dificultando a penetração do fluido gástrico.

Corroborando os resultados encontrados, Marcial-Coba et al. (2018), ao avaliarem *L. plantarum* ATCC 14917 microencapsulado utilizando uma mistura de goma xantana e gelana, encontraram sobrevivência de 83,55% após a passagem pelas condições gástricas simuladas.

Ainda, Liu, Sun, Sun, Rizwan-ur-Rehman, & Wang (2016), ao avaliarem micropartículas de polímero seminatural contendo *L. plantarum* MA2, relataram decréscimo de 0,69 log UFC/mL na viabilidade do probiótico.

As formulações submetidas ao processo simulado da etapa intestinal não apresentaram alteração significativa na sobrevivência do probiótico ($p>0,05$), exceto formulação F0-S, que ao final desta fase não apresentou contagem de células viáveis. Assim, as formulações F1-S e F2-S apresentaram sobrevivência de $86,14 \pm 2,23\%$ e $88,60 \pm 1,24\%$, respectivamente.

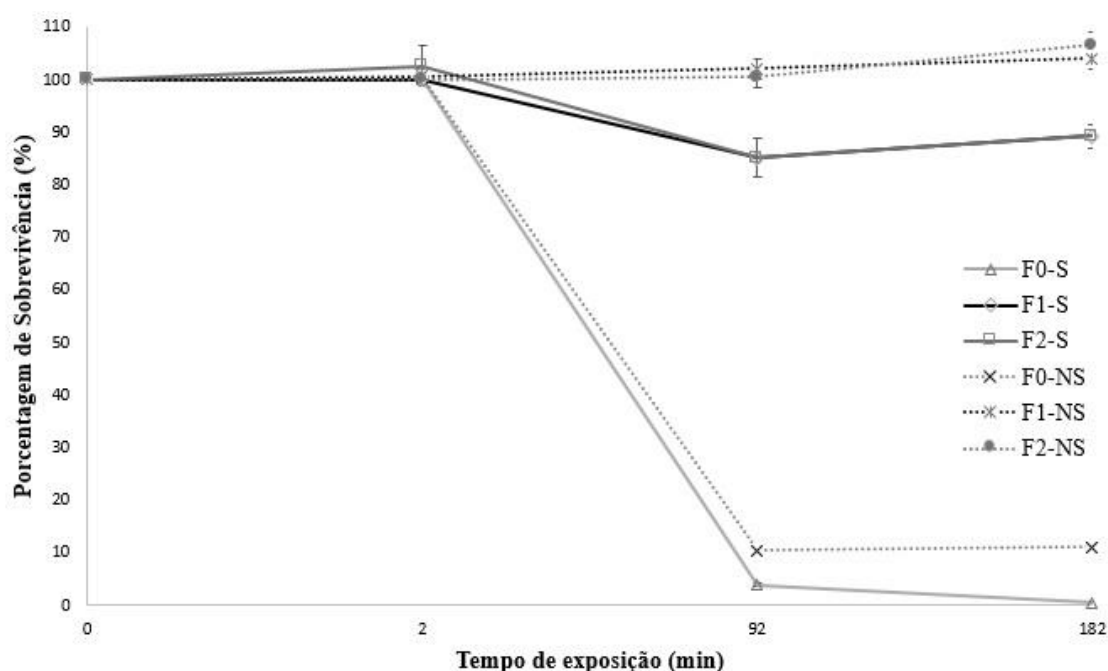


Figura 5 – Porcentagem de sobrevivência do *L. acidophilus* LA-3 das cápsulas produzidas utilizando EPS-LN60 como agente encapsulante durante a exposição às condições gástricas simuladas. F0-S (cápsula de alginato contendo LA-3 submetido a simulação); F1-S (cápsula de alginato contendo LA-3 + 0,5% EPS-LN60 submetido a simulação); F2-S (cápsula de alginato contendo LA-3 + 1,0% EPS-LN60 submetido a simulação); F0-NS (cápsula de alginato contendo LA-3 não-submetido a simulação); F1-S (cápsula de alginato contendo LA-3 + 0,5% EPS-LN60 não-submetido a simulação); F2-S (cápsula de alginato contendo LA-3 + 1,0% EPS-LN60 não-submetido a simulação).

Dentre as formulações não submetidas à análise simulada, observou-se que F0-NS, apesar de apresentar porcentagem de sobrevivência de LA-3 significativamente maior que F0-S ($p<0,05$) na etapa intestinal, a sobrevivência foi de apenas 9%, indicando que o alginato puro permite a passagem dos fluidos testados por causa da alta porosidade do material criando condições severas ao microrganismo e inviabilizando essa encapsulação para o fim de reduzir

o impacto das condições de simulação do TGI sobre o probiótico. F1-NS e F2-NS mantiveram a sobrevivência ($p>0,05$) durante o período avaliado.

O processo de encapsulação tem por objetivo favorecer a liberação do composto ativo no sítio desejado, que no caso das bactérias probióticas, o principal alvo é o intestino, a fim de poderem colonizá-lo e promover o efeito benéfico ao organismo humano (Cook et al., 2012). Os resultados de sobrevivência encontrados para F1-S e F2-S confirmam a proteção significativa prevista, enquanto outros estudos reportaram reduções de sobrevivência maiores ao final do processo de simulação do TGI, como Marcial-Coba et al. (2019), ao estudarem *L. plantarum* ATCC 14917 microencapsulado utilizando goma xantana e gelana (decréscimo de 2,6 log UFC/mL); e ainda Sandoval-Mosqueda, Llorente-Bousquets, Montiel-Sosa, Corona, Guadarrama-Álvarez (2019), em pesquisa com encapsulação de *L. plantarum* com alginato puro e alginato + goma arábica (redução de 20% na viabilidade).

Vale destacar que as cápsulas se apresentaram desintegradas apenas ao final da fase intestinal, devido ao alginato apresentar instabilidade em pH alcalino (McNelly & Pettitt, 1973). Além disso, apesar do alginato não ter sido desintegrado na fase gástrica, sua porosidade permitiu que o LA-3 da F0 fosse difundida para o meio provocando morte celular, o que não aconteceu nas demais formulações F1 e F2, devido à presença do recobrimento com EPS-LN60.

4 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou a potencialidade bioativa do EPS-LN60, o qual foi extraído após a fermentação do soro de leite pela cepa *L. plantarum* DF60Mi. O EPS-LN60 apresentou escore prebiótico acima do encontrado para prebiótico comercial, alta capacidade de doação de elétrons indicando a sua potencialidade antioxidante e predisposição na redução do crescimento celular de carcinoma colorretal humano (HCT-116).

A presença do EPS atuando como recobrimento, seja com 0,5% ou 1%, resultou em cápsulas de formato esférico e uniforme. Pode-se perceber resultado importante e favorável das cápsulas F1 e F2 após 20 dias de armazenamento, com redução de apenas 15% (1 log UFC/mL) na sobrevivência do LA-3. As cápsulas testadas que continham o recobrimento com o EPS-LN60 demonstraram eficácia na proteção do LA-3 durante a exposição gastrointestinal simulada, não permitindo a difusão do agente ativo para fora da célula preservando a sobrevivência celular.

Portanto, este estudo demonstrou a potencialidade do uso do EPS-LN60 como agente bioativo, assim como sua utilização no processo tecnológico de encapsulação, permitindo uma

proteção adicional e consequentemente sobrevivência mais eficaz do microrganismo encapsulado, podendo ser uma alternativa de ingrediente funcional de interesse para a indústria alimentícia e farmacêutica a ser explorada em estudos de aplicação *in vivo*.

Agradecimentos: Este trabalho foi financiado pela Universidade Federal da Paraíba/PRPG/PROPESQ [projeto nº PVM13515-2020] e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES [código do edital 001]. Os autores também agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de auxílio financeiro. Os autores agradecem à Professora Dr^a. Bernadette D. G. M. Franco e Danielle Nader Furtado (Universidade de São Paulo) pelo fornecimento da linhagem *L. plantarum* DF60Mi.

REFERÊNCIAS

- Abedfar, A., Hosseinienezhad, M., Sadeghi, A., & Raeisi, M. (2021). Comparative survival of exopolysaccharide encapsulated *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* in simulated gastrointestinal conditions and storage time. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 594-603. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00664-1>
- Adesulu-Dahunsi, A.T., Jeyaram, K., & Sanni, A.I. (2018). Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based nigerian fermented food products. *Food Control*, 92, 225-231. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.062>.
- Alcantara, M.A., Polari, I. de L.B., Meireles, B.R.L. de A., Lima, A.E.A. de., Silva Junior, J.C., Vieira, E. de A., dos Santos, N.A., & Cordeiro, A.M.T. de M. (2019). Effect of the solvent composition on the profile of phenolic compounds extracted from chia seeds. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.133>
- Aljabi, H.R., & Pawelzik, E. (2021). Impact of Cultivar and Growing Conditions on Alpha-Amylase Properties in Wheat. *Starch*, 73, 2000032. <https://doi.org/10.1002/star.202000032>
- Almeida Júnior, W.L. Ferrari, I.S., Souza, J.V., Silva, C.D.A., Costa, M.M., & Dias, F.S. (2015). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Control*, 53, 96–103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.013>.
- Arepally, D., Redy, R.S., & Goswami, T.K. (2020). Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCDC 016 cells by spray drying: characterization, survival after in vitro

digestion, and storage stability. *Food & Function*, 11, 8694.

<https://doi.org/10.1039/d0fo01394c>

Ayyash, M., Abu-Jdayil, B., Itsaranuwat, P., Galiwango, E., Tamiello-Rosa, C., Abdullah, H., Esposito, G., Hunashal, Y., Obaid, R.S., & Hamed, F. (2020). Characterization, bioactivities, and rheological properties of exopolysaccharide produced by novel probiotic *Lactobacillus plantarum* C70 isolated from camel milk. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 938-946. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.171>.

Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (Frap) as a measure of antioxidant power: the frap assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Bomfim, V.B., Lopes Neto, J.H.P., Leite, K.S., Vieira, E. de A., Iacomini, M., Silva, C.M., Santos, K.M.O. dos., & Cardarelli, H.R. (2020). Partial characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* CNPC003. *LWT-Food Science and Technology*, 127, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109349>

Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., & Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 1-24. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

Cerning, J., Bouilanne, C., Landon, M., & Desmazeaud, M. (1992). Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria, *Journal of Dairy Science*, 75, 692-699.

Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V.V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Control Release*, 162, 56-67. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.003>

Corrochano, A.R., Sariçay, Y., Arranz, E., Kelly, P.M., Buckin, V., & Giblin, L. (2019). Comparison of antioxidant activities of bovine whey proteins before and after simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Dairy Science*, 102, 54-67.

<https://doi.org/10.3168/jds.2018-14581>

Furtado, D.N., Todorov, S.D., Landgraf, M., Destro, M.T., & Franco, B.D. (2014). Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk:

- characterization of the bacteriocin. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45 (4), 1541-1550. <https://doi.org/10.1590/S1517-8382201400040005>.
- Geel-Schutten, G.H.V., Flesch, F., Brink, B.T., Smith, M.R., & Dijkhuizen, L. (1998). Screening and characterization of lactobacillus strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 697-703. <https://doi.org/10.1007/s002530051353>.
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 44 (2), 121-129. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00241-4)
- Huebner, J., Wehling, R.L., & Hutkins, R.W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 17, 770-775. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.10.006>
- Krunić, T.Z., & Rakin, M.B. (2022). Enriching alginate matrix used for probiotic encapsulation with whey protein concentrate or its trypsin-derived hydrolysate: Impact on antioxidant capacity and stability of fermented whey-based beverages. *Food chemistry*, 370, 130931. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130931>
- Lee, H.B., Son, S.U., Lee, J.E., Lee, S.H., Kang, C.H., Kim, Y.S., Shin, K.S., & Park, H.Y. (2021). Characterization, prebiotic and immune-enhancing activities of rhamnogalacturonan-I-rich polysaccharide fraction from molokhia leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*, 175, 443-450. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.019>
- Li, S., Fan, L., Li, S., Sun, X., Di, Q., Zhang, H., Li, B., & Liu, X. (2023). Validation of Layer-By-Layer Coating as a Procedure to Enhance *Lactobacillus plantarum* Survival during In Vitro Digestion, Storage, and Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71, 1701-1712. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07139>
- Liu, T., Zhou, K., Yin, S., Liu, S., Zhu, Y., Yang, Y., & Wang, C. (2019). Purification and characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* HY isolated from home-made Sichuan Pickle. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 516-526. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.010>.
- Liu, Y., Sun, Y., Sun, L., Rizwan-ur-Rehman, & Wang, Y. (2016). In vitro and in vivo study of sodium polyacrylate grafted alginate as microcapsule matrix for live probiotic delivery. *Journal of Functional Foods*, 24, 429-437. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.03.034>
- Lopes, L.A.A., Carvalho, R. de S.F., Magalhães, N.S.S. Madruga, M.S., Athayde, A.J.A.A., Portela, I.A., Barão, C.A., Pimentel, T.C., Magnani, M., Stamford, T.C.M. (2019). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-05 and incorporation in vegan milks:

Physicochemical characteristics and survival during storage, exposure to stress conditions, and simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 135, 109295.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109295>

Lopes Neto, J.H.P., Santos, M.C.G. dos., Leite, K.S., Silva, L.A. da., Campos, M.I.F., Silveira, E.S. da., Amaral, J.B.S., Madruga, M.S., Braga, A.L.M., & Cardarelli, H.R. (2021). Development and characterization of *Lactobacillus acidophilus* (LA-3) microparticles with reducing substances and its addition to Reino Cheese. *LWT*, 143, 111083.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111083>

Lynch, K.M., Zannini, E., Coffey, A., & Arendt, E.K. (2018). Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: Isolation, properties, characterization and health benefits. *Annual Reviews of Food Science and Technology*, 9, 155–176.

<https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012537>

Marcial-Coba, M.S., Cieplak, T., Cahú, T.B., Blennow, A., Knøchel, S., & Nielsen, D.S. (2018). Viability of microencapsulated *Akkermansia muciniphila* and *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, storage and in vitro simulated upper gastrointestinal tract passage. *Food & Function*, 9, 5868. <https://doi.org/10.1039/c8fo01331d>

McNelly, V., & Pettitt, D. J. (1973). Algin. Industrial gums. In: Roy L. Whistler and James N. Bemiller, eds. *Polysaccharides and their derivatives*. New York: Academy Press, 49-43.

Mayo, B., & Flórez, A.B. (2022). Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus plantarum*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 3rd ed.; McSweeney, P.L.H., McNamara, J.P., Eds.; Academic Press: Oxford, UK, 2022; pp. 206–217.

Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., & BrodKorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5, 1113. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Nguyen, A.T.B., Nigen, M., Jimenez, L., Ait-Abderrahim, H., Marchesseau, S., & Picart-Palmade, L. (2018). Performances of different protocols for exocellular polysaccharides extraction from milk acid gels: application to yogurt. *Food chemistry*, 239, 742-750. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.121>.

- Polleto, G., Fonseca, B.D.S., Raddatz, G.C., Wagner, R., Lopes, E.J., Barin, J.S., Flores, E.M. de M., and Menezes, C.R.D. (2019). Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and different prebiotic agents by external ionic gelation followed by freeze-drying. *Ciência Rural*, 49, 1–7. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180729>
- Prathima, P.C., Lule, V.K., Tomar, S.K., & Singh, A.K. (2014). Optimization of Exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* NCDC 191 by response surface methodology. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3 (5), 835-854.
- Rahali, A., Arieche, M., Moussaoui, B., & Riazi, A. (2022). Encapsulation effects of galactomannans combined with xanthan on the survival of two strains under simulated digestive hostilities. *European Journal of Biological Research*, 12 (3), 262-270. <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.7048634>
- Rajoka, M.S.R., Jin, M., Haobin, Z., Li, Q., Shao, D., Jiang, C., Huang, Q., Yang, H., Shi, J., & Hussain, N. (2018). Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. *LWT-Food Science and Technology*, 89, 638-647. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.034>
- Rufino, M. do S.M., Alves, R.E., Brito, E.S. de., Moraes, S.M. de., Sampaio, C. de G., Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F.D. (2006). Metodologia científica: determinação de atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução de ferro (FRAP). *Comunicado técnico*, 1-4. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/664098/metodologia-cientifica-determinacao-da-atividade-antioxidante-total-em-frutas-pelo-metodo-de-reducao-do-ferro-frap>. Acessado em: 02/02/2023.
- Sandoval-Mosqueda, I., Llorente-Bousquets, A., Montiel-Sosa, J.F., Corona, L., & Guadarrama-Álvarez, Z. (2019). Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 and *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 in a freeze-dried alginate-gum arabic system and its in vitro testing under gastrointestinal conditions. *Journal of Microencapsulation*, 36, 591-602. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1660729>
- Sasikumar, K., Vaikkath, D.K., Deventra, L., & Nampoothiri, K.M. (2017). An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods. *Bioresource Technology*, 241, 1152-1156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.075>
- Silva, F. T. (2005). *Queijo Minas Frescal*. 1º. ed. Brasília – DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 50 p.

- Wang, K., Meng-Meng, N., Wu, Y., Zhu, R.F., Zhao, J., Lu, B.X., & Niu, G.C. (2019). Physicochemical characterization and antioxidant activity of cell-bound exopolysaccharides from *Lactobacillus fermentum* S1 obtained by two extraction methods. *Process biochemistry*, 85, 195-205. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.017>.
- Wang, X., Huang, M., Yang, F., Sun, H., Zhou, X., Guo, Y., Wang, X., & Zhang, M. (2015). Rapeseed polysaccharides as prebiotics on growth and acidifying activity of probiotics in vitro. *Carbohydrates Polymers*, 125, 232-240. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.040>
- Yilmaz, T., & Simsek, Ö. (2020). Potential Health Benefits of Ropy exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus plantarum*. *Molecules*, 25, 3293. <https://doi.org/10.3390/molecules25143293>
- Zanjani, M.A.K., Ehsani, M.R., Tarzi, B.G., & Sharifan, A. (2017). Promoting *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium adolescentis* survival by microencapsulation with different starches and chitosan and poly L-lysine coatings in ice cream. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42, e13318. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13318>
- Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., & Arendt, E.K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 1121–1135. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-71722>
- Zhang, M., Luo, T. Q., Zhao, X., Hao, X., & Yang, Z. (2020). Interaction of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 with whey proteins and functionalities of the polymer complex. *Journal of Food Science*, 85, 4141–4151. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15522>
- Zhao, X., & Liang, Q. (2022). EPS-Producing *Lactobacillus plantarum* MC5 as a Compound Starter Improves Rheology, Texture, and Antioxidant Activity of Yogurt during Storage. *Foods*, 11, 1660. <https://doi.org/10.3390/foods11111660>
- Zhu, Y.T.; Wang, X.J.; Pan, W.S.; Shen, X.F.; He, Y.; Yin, H.; Zhou, K.; Zou, L.; Chen, S.; & Liu, S. (2019). Exopolysaccharides produced by yogurt-texture improving *Lactobacillus plantarum* RS20D and the immunoregulatory activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.201>
- Zuidam, N.J., & Shimon, E. (2010). *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. New York, U. S. A.: Springer.

5 CONCLUSÕES

O soro de leite apresentou teores de proteínas e gorduras reduzidos em função do tratamento a que foi submetido não permitindo a interferência desses macronutrientes na obtenção do EPS-LN60. O rendimento do produto final, o teor de açúcares totais e proteínas estão dentro do esperado relacionando com a produção de EPS a partir de bactérias lácticas em larga escala.

O EPS-LN60 foi definido como heteropolissacarídeo em função de sua composição monossacarídica (galactose, manose, glicose e ramnose). O espectrograma do EPS-LN60 evidenciou ligações e grupos funcionais que descrevem como sendo carboidratos. Além disso, apresentou alta estabilidade térmica (310 °C) sendo uma alternativa para uso na indústria alimentícia. As imagens de morfologia mostraram uma estrutura em formato de folha com porosidade aparente, o que indica um grande potencial de alteração das propriedades reológicas dos alimentos.

Também foi possível evidenciar a potencialidade bioativa do EPS-LN60 através do escore prebiótico superior ao de prebióticos comerciais. Além do mais, foi possível identificar alta capacidade de doação de elétrons indicando a sua potencialidade antioxidante e predisposição na redução do crescimento celular de carcinoma colorretal humano (HCT-116).

A presença do EPS atuando como recobrimento, seja com 0,5% ou 1%, resultou em cápsulas de formato esférico e uniforme. As cápsulas F1 e F2 apresentaram redução de apenas 15% na sobrevivência do LA-3 após 20 dias de armazenamento, e demonstraram eficácia na proteção do LA-3 durante a exposição gastrointestinal simulada, não permitindo a difusão do agente ativo para fora da célula preservando a sobrevivência celular.

Portanto, este estudo demonstrou a potencialidade do uso do EPS-LN60 como agente bioativo, assim como sua utilização no processo tecnológico de encapsulação, permitindo uma proteção adicional e, conseqüentemente, maior sobrevivência do microrganismo encapsulado, podendo ser uma alternativa de ingrediente funcional de interesse para a indústria alimentícia e farmacêutica a ser explorada em estudos de aplicação *in vivo*.