UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

CYNTHIA DE CARLI

**Nanoemulsões encapsulando quercetina produzidas
pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP):
estabilidade físico-química e avaliação da atividade
antioxidante *in vitro* e em produto cárneo**

Pirassununga

2017

CYNTHIA DE CARLI

**Nanoemulsões encapsulando quercetina produzidas pelo
método do ponto de inversão da emulsão (EIP): estabilidade
físico-química e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e
em produto cárneo**

“Versão Corrigida”

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como parte dos
requisitos para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências da
Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof^a Dr^a Samantha Cristina de
Pinho

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D257n De Carli, Cynthia
Nanoemulsões encapsulando quecetina produzidas
pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP):
estabilidade físico-química e avaliação (...) /
Cynthia De Carli ; orientador Profª Drª Samantha
Cristina de Pinho. -- Pirassununga, 2017.
139 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade
de São Paulo.

1. NANOPARTÍCULAS. 2. QUERCETINA. 3. PATÊ DE
FRANGO. I. de Pinho, Profª Drª Samantha Cristina ,
orient. II. Título.

*Aos meus pais, Irineu e Acileide, e meus
irmãos, Sibeli e Danilo, que são um grande
exemplo de vida e sempre me forneceram apoio
incondicional, incentivo, carinho e amor, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que se faz presente em todos os momentos da minha vida e zelando por mim em cada passo, amparando-me e guiando-me nos momentos difíceis e acima de tudo por tornar real mais este sonho.

Aos meus pais, razões da minha existência, que sempre me deram apoio e suporte durante todos estes anos de estudo. Só tenho a dizer que cada gota de suor que derramaram está simbolicamente representada neste trabalho. Sempre serei grata por tudo. Amo vocês!

À Prof^a Samantha C. de Pinho pela orientação, paciência, carinho e ensinamentos passados nestes dois anos. É uma grande mulher que eu admiro e respeito imensamente.

À Profa. Dra. Izabel C.F. Moraes pela ajuda com as análises reológicas.

À Profa. Dra. Ana Paula Ramos (DQ/FFLCRP/USP) pela ajuda com as análises de tensão interfacial.

Aos amigos de laboratório, em especial: Marília Moraes, Ivana Andrade, Nayla Souki, Marluci Ghiraldi, Mariana Echalar, Juliana Silveira, Thais Brito, Guilherme Silva, Matheus Chaves, pelas conversas descontraídas, sempre dispostos a ajudar e ensinar. São pessoas muito queridas e especiais. Serão sempre guardadas com um carinho enorme. Foi simplesmente excepcional conviver com vocês. Muito Obrigada por tudo!

A todos os professores do Departamento de Engenharia de Alimentos que contribuíram por meio das disciplinas para o ensinamento e desenvolvimento intelectual e científico.

Agradeço também aos meus irmãos, Sibeli e Danilo, sempre tão companheiros, atenciosos e compreensivos.

À minha avó, tios e primos, pelos animados almoços de família e pelo grande exemplo de união.

Aos meus amigos, pela cumplicidade e companheirismo.

Aos funcionários da FZEA, em especial os funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

À FAPESP pelo auxílio financeiro (processo 2012/01460-2).

Enfim, meu muito obrigado a todas as pessoas que de alguma forma participaram e ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho e do ser humano que o ensina.

RESUMO

DE CARLI, C. **Nanoemulsões encapsulando quercetina produzidas pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP): estabilidade físico-química e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e em produto cárneo**. 2017. 139 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

A quercetina é um flavonoide com alta atividade antioxidante reconhecida. Devido a este fato, a indústria alimentícia tem buscado alternativas para a aplicação deste bioativo como antioxidante em matrizes alimentícias. No entanto, incorporar a quercetina em formulações alimentícias pode ser desafiador, pois sua molécula tem relativo grau de hidrofobicidade. Os métodos de encapsulação em nanoemulsões podem tornar viável a proteção do flavonoide, bem como permitir sua dispersibilidade em meios aquosos. O objetivo do presente trabalho foi produzir nanoemulsões (fase oleosa: óleo de girassol) encapsulando quercetina pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP, *emulsion inversion point*), determinando parâmetros de operação que viabilizem um futuro escalonamento do processo, e a realização de um estudo de caso sobre a incorporação das nanodispersões em patê de frango. Os parâmetros de produção que foram avaliados foram: tipo e concentração de tensoativo (razão SOR, razão tensoativo:óleo), concentração de óleo, concentração de cosolvente e velocidade de agitação. Foram produzidas nanoemulsões utilizando dois tensoativos diferentes, Tween 80 e Brij 30. As porcentagens de quercetina encapsulada foram 0,15 e 0,30% (m/m). Dentre estas, a concentração de 0,30% foi a mais viável para a aplicação no patê de frango, por apresentar melhor distribuição de tamanho de gotícula (diâmetro hidrodinâmico), não apresentar variação significativa de oxidação lipídica e maior conservação da quercetina encapsulada por um período de 90 dias. Os valores de tensão interfacial obtidos mostram que a quercetina provoca abaixamento da tensão interfacial do sistema, o que pode indicar que a quercetina forma um complexo com os tensoativos utilizados, fato que influencia decisivamente na sua localização nas nanogotas. Das formulações testadas para patê de frango contendo quercetina, apenas a formulação usando quercetina livre não apresentou boa avaliação nos itens cor e sabor. Tal resultado justifica a necessidade da incorporação da quercetina em nanoemulsões para não causar alterações sensoriais no produto.

Palavras-chave: nanoemulsão. quercetina. emulsificação por método de baixa energia. patê de frango.

ABSTRACT

DE CARLI, C. **Nanoemulsions encapsulating quercetina produced by the emulsion inversion point method (EIP): physicochemical stability and evaluation of *in vitro* antioxidant activity and after incorporation in meat product.** 2017. 139 f. Dissertation (Master) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Quercetin is a flavonoid with recognized high antioxidant activity. Due to this fact, the food industry has been trying to use it as an alternative as a preservative in food matrices. However, incorporating quercetin into food formulations may be challenging due to its relative degree of hydrophobicity. Encapsulation methods in nanoemulsions may render the protection of the flavonoid viable, as well as enable its dispersibility in aqueous media. The objective of the present study was to produce nanoemulsions (oil phase: sunflower oil) encapsulating quercetin by the emulsion inversion point method (EIP), determining operating parameters that enable a future process scale-up. A case study on the incorporation of nanodispersions into chicken pâté was also carried out. The production parameters evaluated were: type and concentration of surfactant (SOR ratio, surfactant:oil ratio), soybean oil concentration, cosolvent concentration and stirring speed. Nanoemulsions were produced using two different surfactants, Tween 80 and Brij 30. The percentages of encapsulated quercetin were 0.15 and 0.30% (m / m). Among these, the concentration of 0.30% was the most feasible for application in chicken pâté, since it presented better droplet size distribution (hydrodynamic diameter), did not present significant variation of lipid oxidation and higher capacity of preserving encapsulated quercetina for a period of 90 days. The interfacial tension values obtained show that quercetin lowered the interfacial tension of the system, which may indicate that quercetin forms a complex with the surfactants used, a fact that decisively influences its location in the nanodroplets. Among the formulations tested in chicken pâté containing quercetin, only the formulation using free quercetin did not show good acceptance evaluation on the color and taste items. Such an evaluation was important as it justifies the need for the incorporation of quercetin into nanoemulsions in order to not cause significant sensorial changes in the product.

Keywords: nanoemulsions, flavonoid, low energy method, catastrophic inversion, chicken pâté

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática mostrando as gotas das emulsões óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O).	22
Figura 2: Fenômenos físico-químicos que podem afetar a estabilidade das nanoemulsões.	23
Figura 3: Representação esquemática do mecanismo utilizado em homogeneizador com válvula de alta pressão para produção de nanoemulsões.	31
Figura 4: Representação esquemática de um microfluidizador para produção de nanoemulsões.	32
Figura 5: Representação esquemática de um homogeneizador ultrassônico para produção de nanoemulsões.	32
Figura 6: Representação do mecanismo do processo de emulsificação espontânea para produção de nanoemulsões.	33
Figura 7: Dinâmica do comportamento de fases por inversão de fase transicional e catastrófico.	35
Figura 8: Esquematização da produção de nanoemulsão pelo método de da temperatura de inversão de fases (PIT).	37
Figura 9: Representação da mudança nas estruturas ao longo do método de produção de nanoemulsões pelo método da temperatura de inversão de fases (PIT).	39
Figura 10: Representação esquemática do método ponto de inversão da emulsão (inversão de fases catastrófica).	39
Figura 11: Representação esquemática da mudança das estruturas presentes no sistema, durante o processo de nanoemulsificação pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP), em função do tempo de agitação.	41
Figura 12: Mecanismo da auto-oxidação lipídica.	42
Figura 13: Mecanismo de ação para os antioxidantes primários.	43
Figura 14: Estruturas fenólicas dos antioxidantes sintéticos.	44
Figura 15: Estrutura de um ácido fenólico.	45
Figura 16: Estrutura química dos flavonoides.	46
Figura 17: Redução do ABTS ⁺ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	48
Figura 18: Estrutura química do DPPH• e mecanismo de reação com um antioxidante.	49
Figura 19: Redução do Fe(III) a Fe(II) pela ação de um antioxidante.	50
Figura 20: Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.	52
Figura 21: Estrutura molecular da quercetina.	52
Figura 22: Esquematização do processamento para produção das nanoemulsões pelo método ponto de inversão da emulsão.	61
Figura 23: Curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico de gota das nanoemulsões produzidas com tween 80, utilizando 20% de óleo de girassol e intensidade de agitação de 500 rpm e SOR =1,25.	73

Figura 24: Aspecto visual das amostras de nanoemulsões produzidas com Brij 30 em diferentes valores de SOR, na velocidade de agitação de 300, rpm após 24 h de produção.	74
Figura 25: Aspecto visual das amostras de nanoemulsões produzidas com Brij 30 com diferentes valores de SOR, na velocidade de agitação de 400 rpm, após 24 h de produção.	76
Figura 26: Aspecto visual das amostras de nanoemulsões produzidas com Brij 30 com diferentes valores de SOR, na velocidade de agitação de 500 rpm, após 24 h de produção.	77
Figura 27: Curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico de gota das nanoemulsões produzidas com Brij 30, utilizando 20% de óleo de girassol e intensidade de agitação de 500 rpm: (a) SOR=1,50 e (b) SOR= 1,75. O perfil temporal foi determinado nos dias: (—) 0, (—) 30, (—) 60 e (—) 90.	79
Figura 28: Análise da tensão interfacial do tensoativo Brij 30 em água e do complexo (tensoativo + quercetina a 1%) em água.	80
Figura 29: Análise da tensão interfacial do tensoativo Tween 80 em água e do complexo (tensoativo + quercetina a 1%) em água.	81
Figura 30: Variação da condutividade (■) e do módulo de armazenamento (G') (■), durante a adição da fase aquosa à fase oleosa, no processo produção das nanoemulsões estabilizadas com Tween 80.	83
Figura 31: Representação da mudança das estruturas presentes no sistema, durante o processo de nanoemulsificação pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP): (A) $\approx$ 10% de fase aquosa; (B) $\approx$ 30% de fase aquosa; (C) $\approx$ final da adição da fase aquosa.	84
Figura 32: Variação da condutividade (■) e do módulo de armazenamento (G') (■), durante a adição da fase aquosa à fase oleosa, no processo produção das nanoemulsões estabilizadas com Brij 30.	85
Figura 33: Variação da condutividade após a adição da fase aquosa à fase oleosa, no processo produção das nanoemulsões estabilizadas com Brij 30.	86
Figura 34: Aspecto visual das nanoemulsões encapsulando quercetina, estabilizadas com Tween 80, com concentração de fase oleosa 20% e SOR = 1,25.	87
Figura 35: Curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico de gota das nanoemulsões encapsulando quercetina estabilizadas com Tween 80, concentração de fase oleosa 20%, SOR =1,25: (a) 0,15% quercetina; (b) 0,30% quercetina. As amostras foram obtidas nos dias: (—) 0, (—) 30, (—) 60 e (—) 90.	88
Figura 36: Perfis temporais de concentração de quercetina nas nanoemulsões encapsulando: (■) 0,15% de quercetina e (▨) 0,30% durante o período de 90 dias de estocagem. C= concentração de quercetina no dia de amostragem e C_0 é a concentração inicial de quercetina.	89
Figura 37: Aspecto visual das nanoemulsões encapsulando quercetina, estabilizadas com Brij 30, com concentração de fase oleosa 20%, intensidade de agitação de 500 rpm e SOR =1,50: (a) 0,15% de quercetina e (b) 0,30% de quercetina.	90
Figura 38: Curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico de gota das nanoemulsões encapsulando quercetina estabilizadas com Brij 30, produzidas com 20%	

óleo e SOR =1,50: (A) 0,15% quercetina; (B) 0,30% quercetina. O perfil temporal foi determinado nos dias: (—) 0, (—) 30, (—) 60 e (—) 90.	91
Figura 39: Perfis temporais de concentração de quercetina nas nanoemulsões encapsulando: (■) 0,15% de quercetina e (▨) 0,30% durante o período de 90 dias de estocagem. C= concentração de quercetina no dia de amostragem e Co é a concentração inicial de quercetina.....	92
Figura 40: Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH• (%) das nanoemulsões encapsulando quercetina, produzidas com (■) Tween 80 e (▨) Brij 30. .	94
Figura 41: Determinação da capacidade redutora dos fenólicos totais das nanoemulsões: (■) Tween 80 e (▨) Brij 30 encapsulando quercetina.....	96
Figura 42: Aspecto visual das formulações de patê de frango produzidas com nanoemulsões encapsulando quercetina: tratamento 1 (sem antioxidantes); tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); tratamento 5 (adição de quercetina livre).....	97
Figura 43: Perfil temporal dos valores de pH para as amostras de patê de frango durante o período de 24 semanas de armazenamento sob refrigeração: (♦) tratamento 1 (sem antioxidantes); (■) tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); (▲) tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); (×) tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); (○) tratamento 5 (adição de quercetina livre).	98
Figura 44: Resultados de oxidação proteica para as amostras de patê de frango durante o período de 24 semanas de armazenamento sob refrigeração: (♦) tratamento 1(sem antioxidantes); (■) tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); (▲) tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); (×) tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); (○) tratamento 5 (adição de quercetina livre).	102
Figura 45: Resultados de índice de peróxido para as amostras de patê de frango durante o período de 24 semanas de armazenamento sob refrigeração: (♦) tratamento 1(sem antioxidantes); (■) tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); (▲) tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); (×) tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); (○) tratamento 5 (adição de quercetina livre).	104
Figura 46: Perfil temporal dos resultados de TBARS para as amostras de patê de frango durante o período de 24 semanas de armazenamento sob refrigeração: (♦) tratamento 1(sem antioxidantes); (■) tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); (▲) tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); (×) tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); (○) tratamento 5 (adição de quercetina livre).	106
Figura 47: Resultados da análise sensorial para as amostras de patê de frango durante o período de 90 dias de armazenamento sob refrigeração: (■) tratamento 1(sem antioxidantes); (■) tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); (■) tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); (■) tratamento	

4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); (■) tratamento 5 (adição de quercetina livre). 108

Figura 48: Resultados da comparação da amostra controle de patê de frango com os quatro tratamentos: (■) tratamento 1 (adição de BHT e nitrito de sódio); (■) tratamento 2 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); (■) tratamento 3 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); (■) tratamento 4 (adição de quercetina livre). 109

Figura 49: Resultados da comparação da amostra controle de patê de frango com os quatro tratamentos: (■) tratamento 1(sem antioxidantes); (■) tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); (■) tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); (■) tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); (■) tratamento 5 (adição de quercetina livre). 110

Figura 50: Resultados do teste de intenção de compra de patê de frango para cada tratamento: (■) certamente não compraria o produto; (■) possivelmente não compraria o produto; (■) talvez compraria/ talvez não compraria; (■) possivelmente compraria o produto; (■) certamente compraria o produto. Tratamento 1- sem antioxidantes; tratamento 2 - adição de BHT e nitrito de sódio; tratamento 3 - adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina; tratamento 4 - adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina; tratamento 5 - adição de quercetina livre.111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de produtos para aplicação da nanotecnologia em alimentos.....	19
Tabela 2: Influência de propriedades físico-químicas das fases oleosa e aquosa sobre a estabilidade e o desempenho de nanoemulsões óleo-em-água de qualidade alimentar.	27
Tabela 3: Exemplos de tensoativos para aplicações alimentícias.	30
Tabela 4: Classificação e fonte de flavonoides.	47
Tabela 5: Formulações testadas para definição da relação SOR para o tensoativo Brij 30 (% mássicas).....	62
Tabela 6: Descrição dos tratamentos aplicados à base de patê de frango produzida. ...	67
Tabela 7: Valores de diâmetros médios hidrodinâmicos de nanoemulsões produzidas com tensoativo Tween 80.	74
Tabela 8: Valores de diâmetro médio hidrodinâmico das nanoemulsões produzidas com tensoativo Brij 30 durante o período de estocagem.....	79
Tabela 9: Formulações das nanoemulsões produzidas com tween 80 encapsulando quercetina (% m/m).	87
Tabela 10: Avaliação da estabilidade das nanoemulsões produzidas com Tween 80 contendo quercetina encapsulada pelo período de estocagem de 90 dias.	88
Tabela 11: Formulações das nanoemulsões encapsulantes.	90
Tabela 12: Avaliação da estabilidade físico-química das nanoemulsões produzidas com Brij 30 contendo quercetina encapsulada pelo período de estocagem de 60 dias.	91
Tabela 13: Resultados do pH para as amostras de patê de frango durante o período de 24 semanas de armazenamento sob refrigeração: tratamento 1 (sem antioxidantes); tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); tratamento 5 (adição de quercetina livre).98	98
Tabela 14. Valores de L*, a*, b*, Croma (C*), ângulo Hue (H*) e diferença total de cor (ΔE) durante o armazenamento (16 semanas) dos tratamentos: 1- sem antioxidantes, 2- adição de BHT e nitrito de sódio, 3- adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e quercetina a 0,30%, 4- adição da nanoemulsão produzida com Brij 30 e quercetina a 0,30% e 5- adição de quercetina livre.....	101
Tabela 15: Valores médios da oxidação proteica para as amostras de patê de frango durante o período de 24 semanas de armazenamento sob refrigeração: tratamento 1(sem antioxidantes); tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e quercetina a 0,30%); tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e quercetina a 0,30%); tratamento 5 (adição de quercetina livre).	103
Tabela 16: Valores médios de TBARS para as amostras de patê de frango durante o período de 24 semanas de armazenamento sob refrigeração: tratamento 1(sem antioxidantes); tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); tratamento 5 (adição de quercetina livre).	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O – água/óleo

A/O/A – água/óleo/água

BHA – hidroxianisol butilano

BHT - hidroxitolueno butilano

CMC – concentração cicelar crítica

DMSO - dimetilsulfóxido

EIP – ponto de inversão da emulsão (*emulsion inversion point*)

FDA – *Food and Drug Administration*

GP – galato de propila

GRAS – *generally recognized as safe*

HCl – ácido clorídrico

HLD – desvio hidrofílico lipofílico (*hydrophilic lipophilic desviation*)

KCl – cloreto de potássio

LCT – *long chain triglycerides* (ácidos graxos de cadeia longa)

MCT – *medium chain triglycerides* (ácidos graxos de cadeia média)

NLS – nanopartículas lipídicas sólidas

NNI – *National Nanotechnology Initiative*

O/A – óleo em água

O/A/O – óleo em água em óleo

PIC – *phase inversion composition* (*composição de inversão de fases*)

PIT – *phase inversion temperature* (*temperatura de inversão de fase*)

SCT – *short chain triglycerides* (ácidos graxos de curta)

SOR – *surfactant/oil ratio* (*razão tensoativo/óleo*)

TBHQ – terc-butilhidroquinona

WOR – *water/oil ratio* (*razão óleo/água*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Nanotecnologia em alimentos	17
2.2 Nanoencapsulação de bioativos.....	20
2.3 Nanoemulsões.....	21
2.4 Estabilidade Físico-Química das Nanoemulsões.....	22
2.5 Composição e Estabilidade das Nanoemulsões.....	24
2.6 Produção de nanoemulsões: métodos de alta energia.....	31
2.7 Produção de nanoemulsões por métodos de baixa energia: emulsificação espontânea	33
2.8 Métodos de produção de nanoemulsões de baixa energia por inversão de fases	34
2.9 Método da Temperatura de Inversão de Fases (PIT – <i>phase inversion temperature</i>).....	37
2.10 Método do Ponto de Inversão da Emulsão (EIP – <i>emulsion inversion point</i>).....	39
2.11 Oxidação e atividade antioxidante em alimentos	41
2.12 Métodos de avaliação da atividade antioxidante	47
2.13 Quercetina: estrutura química, atividade antioxidante e desafios tecnológicos para sua utilização como ingrediente alimentício	52
2.14 Carne de Frango e Patê de Frango.....	53
3. OBJETIVOS.....	58
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1 MATERIAIS	59
4.1.1 Produção das nanoemulsões	59
4.1.2 Determinação da eficiência de encapsulação	59
4.1.3 Testes de atividade antioxidante <i>in vitro</i>	60
4.1.4 Produção e caracterização do patê de frango.....	60
4.1.5 Determinação da oxidação lipídica.....	60
4.1.6 Determinação de oxidação proteica.....	60
4.2 MÉTODOS.....	61
4.2.1 Produção das nanoemulsões encapsulando quercetina pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP).....	61

4.2.2. Definição da razão tensoativo/óleo (SOR, surfactante/oil ratio) para a produção das nanoemulsões utilizando o tensoativo Brij 30	62
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES	63
4.3.1 Determinação de diâmetro médio e distribuição de tamanho de gota	63
4.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação de quercetina	63
4.3.3 Determinação do ponto de inversão da emulsão	63
4.3.4 Análises reológicas	64
4.3.5 Determinação da tensão interfacial	64
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DAS NANOEMULSÕES	65
4.4.1 Teor de fenólicos totais	65
4.4.2 Método DPPH•	65
4.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DAS NANOEMULSÕES ENCAPSULANDO QUERCETINA EM PATÊ DE FRANGO	65
4.5.1 Formulação e produção do patê de frango	65
4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL DO PATÊ DE FRANGO	67
4.6.1 Estabilidade físico-química do patê de frango durante o armazenamento	67
4.6.2 Determinação de pH	67
4.6.3 Oxidação dos pigmentos da cor	67
4.6.4 Determinação da oxidação proteica	68
4.6.5 Avaliação da oxidação lipídica	69
4.6.6 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	70
4.6.7 Contagem da viáveis totais, das bactérias aeróbicas e de Enterobacteriaceae	70
4.6.8 Avaliação sensorial do patê de frango	70
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	72
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DAS NANOEMULSÕES PELO MÉTODO DO PONTO DE INVERSÃO DA EMULSÃO (EIP)	73
5.1.1 Determinação dos parâmetros de produção e estabilidade das nanoemulsões produzidas com Tween 80	73

5.1.2 Determinação dos parâmetros de produção e estabilidade das nanoemulsões produzidas com Brij 30.....	74
5.2 DETERMINAÇÃO DA TENSÃO INTERFACIAL	80
5.3 DETERMINAÇÃO DO PONTO DE INVERSÃO DE FASES	82
5.4 ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES CONTENDO QUERCETINA ENCAPSULADA.....	87
5.4.1 Nanoemulsões produzidas com Tween 80	87
5.4.2 Nanoemulsões produzidas com Brij 30.....	90
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTES <i>IN VIITRO</i> DAS NANOEMULSÕES.....	93
5.5.1 Atividade sequestrante do radical livre DPPH•.....	93
5.5.2 Determinação do teor de fenólicos totais	95
5.6 AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DAS NANOEMULSÕES ENCAPSULANDO QUERCETINA EM PATÊ DE FRANGO.....	97
5.6.1 Análise de pH das amostras de patê de frango durante o armazenamento.....	97
5.6.2 Parâmetros colorimétricos	99
5.6.3 Oxidação proteica: quantificação do teor de carbonilas	102
5.6.4 Oxidação lipídica: índice de peróxido e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	104
5.7 ANÁLISE SENSORIAL DO PATÊ DE FRANGO	1078
6. CONCLUSÕES.....	1133
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	1144
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	1155
APÊNDICES	1365

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, existe uma grande tendência na indústria de alimentos na direção da substituição de ingredientes sintéticos por naturais, como, por exemplo, os antioxidantes. Na aplicação de antioxidantes naturais em alimentos, diferentes aspectos tecnológicos e nutricionais importantes podem ser destacados, como a conservação da qualidade dos alimentos, principalmente em formulações ricas em gorduras poli-insaturadas, podendo substituir os antioxidantes sintéticos; a preservação da saúde humana, ao ajudar na prevenção de danos oxidativos ao organismo, auxiliando na prevenção de diversas doenças. Atualmente os antioxidantes sintéticos mais utilizados são butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), galato de propila (GP) e terc-butilhidroquinona (TBHQ). Entretanto, a presença desses antioxidantes sintéticos em matrizes alimentícias vem sendo questionada. Neste contexto, a indústria alimentícia busca alternativas para que a substituição de compostos e antioxidantes químicos seja substituída por substâncias de origem natural que realizem a mesma função.

Nesse sentido, alguns compostos tais como os flavonoides têm se destacado dentre os compostos bioativos devido à principalmente suas propriedades antioxidantes. A quercetina é um exemplo que tem chamado atenção de pesquisadores uma vez que pode ser facilmente extraída de diferentes fontes vegetais. Tais bioativos podem ser empregados na indústria alimentícia, no entanto, enfrentam problemas quanto à sua aplicação devido a sua baixa solubilidade nas matrizes alimentícias, pois diversos compostos bioativos apresentam alta hidrofobicidade. Uma maneira interessante e capaz de contornar este problema típico, além de prevenir a alteração das características sensoriais e possibilitar a liberação controlada dos compostos ativos, é a partir da encapsulação desses compostos ativos por meio de nanoemulsões em sistemas lipídicos nanoestruturados.

Neste contexto, existe grande interesse em estudos sobre sistemas de encapsulação lipídicos, como as nanoemulsões, que podem encapsular estas moléculas hidrofóbicas tornando-as dispersíveis em meios aquosos, e aumentando sua disponibilidade.

A biocompatibilidade das matérias-primas empregadas para a obtenção de nanoemulsões (óleos de origem natural) faz com que estes sistemas sejam uma alternativa promissora para a produção de sistemas nanoemulsionado para a utilização na indústria alimentícia. As nanoemulsões podem ser definidas como sistemas heterogêneos nas quais um líquido (a fase dispersa) é disperso em outro (a fase

contínua) na forma de gotículas, na presença de um agente emulsificante, tais como os tensoativos. O tamanho médio das gotas encontra-se em escala nonométrica entre 20 a 200 nm, este tamanho reduzido das gotículas aumenta a estabilidade desse sistema uma vez que dificulta o fenômeno de desestabilização gravitacional. Suas propriedades físico-químicas, influenciadas pela composição e pelas condições de produção, devem ser controladas, visando a estabilidade das nanodispersões.

Dento do contexto exposto, o desenvolvimento deste projeto de Mestrado visou a produção de nanoemulsões encapsulando quercetina, bem como a caracterização físico-química desses nanossistemas em termos de diâmetro médio de gota, estudo da estabilidade ao longo do tempo de armazenagem, a determinação da capacidade antioxidante *in vitro* e, finalmente, da capacidade antioxidante em produto cárneo (patê de frango).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanotecnologia em alimentos

Nanociência e nanotecnologia são termos que surgiram na segunda metade do século 20, e suas aplicações na agricultura e no setor alimentício são recentes quando comparadas com o emprego na área farmacêutica. Entrega inteligente de nutrientes, biosseparação de proteínas, amostragem rápida de contaminantes químicos e biológicos e nanoencapsulamento de nutracêuticos são alguns dos tópicos mais atribuídos à nanotecnologia na agricultura e na indústria alimentícia (GARCÍA et al., 2010; BOCCUNI et al., 2008; MONCADA, 2007; CHAUDHRY et al., 2010). Segundo Allhoff et al. (2008), o rápido desenvolvimento da nanotecnologia movimenta anualmente uma indústria bilionária graças à sua ampla gama de aplicações; o mercado da indústria de alimentos e da indústria farmacêutica prevê uma expansão maior que 20,4 bilhões de dólares (KUAN et al., 2012).

A nanotecnologia tem o potencial de revolucionar o sistema alimentar global. Atualmente os Estados Unidos lideram esse ranking através da sua instituição denominada *National Nanotechnology Initiative* (NNI), em seguida aparece o Japão e a União Europeia. Outros países como a Índia, Coreia do Sul, Irã e Tailândia também investiram na nanotecnologia com aplicação em alimentos visando as suas necessidades e seu crescimento econômico. Na visão da União Europeia os novos desafios determinados pela crescente demanda por alimentos saudáveis e seguros, assim como pelas ameaças à produção agrícola e pesqueira frente às mudanças nos padrões climáticos induz a criação de uma bioeconomia, num processo complexo e desafiador envolvendo a convergência de diversos ramos da ciência (COMISSÃO EUROPEIA, 2004). Nos últimos cem anos, a humanidade desenvolveu uma quantidade expressiva de técnicas capazes de aumentar a produção no campo e, como consequência, oferecer a possibilidade de produzir alimentos para um maior número de pessoas. Dentre as inovações tecnológicas pode-se citar técnicas para a realização da produção em si, como por exemplo, correção de solos, irrigação e drenagem, passando pelos mecanismos de distribuição de novos produtos, tais como tipos de armazenagem e transporte dos produtos até o consumo final (em redes de supermercados) com relação a aceleração no ritmo de incorporação e difusão dessas novas tecnologias (SANTOS, 1994; MARTINS et al., 2008).

Atualmente muitos produtos produzidos com técnicas oriundas na nanotecnologia já estão no mercado, como as roupas com nanopartículas antibacterianas, loções de filtros solares transparentes, tecidos tão resistentes quanto o aço, tintas para veículos que não arranham janelas autolimpantes e liberação controlada de fármacos. As áreas de saúde, informação e materiais já podem se beneficiar com estes sistemas inovadores (CHAUDHRY et al., 2010). As maiores áreas da indústria de alimentos beneficiadas pela nanotecnologia são desenvolvimento de novos materiais funcionais, processamento em micro e nanoescala, desenvolvimento de novos produtos e nanossensores para a segurança alimentar (KUAN et al., 2012; CHAUDHRY et al., 2010).

O impacto da nanotecnologia na indústria de alimentos se tornou mais evidente nos últimos anos devido à difusão desse assunto por meio de conferências com intuito de divulgar as vantagens que podem ser obtidas com uma combinação entre alimentos e ou entre alimentos e moléculas ativas visando produtos melhores e mais seguros visto que a população atual valoriza um estilo de vida mais saudável. Atualmente é comum as propagandas que várias companhias da área de alimentos divulgam em relação aos seus programas de pesquisa em nanotecnologias em alimentos buscando, desta forma, permanecerem no mercado. Essas aplicações incluem: embalagens inteligentes, nanossensores com função de rastrear o produto além de alimentos interativos (ASSIS et al., 2012; WEISS et al., 2006).

O termo *alimentos interativos* é designado para alimentos os quais permitem que o consumidor modifique as suas características dependendo das suas necessidades de nutrição e sabor, no qual várias nanocápsulas contendo melhoradores de cor, sabor ou complexos de vitaminas, permanecem inertes dentro do alimento e só são ativados/liberados pela ação do consumidor. Já o termo “nanoalimentos” não significa que estes foram atômicamente modificados, mas se refere às técnicas ou ferramentas nanotecnológicas utilizadas durante o cultivo ou produção dos mesmos. A influência das propriedades do material em nanoescala, alterações do seu valor nutricional e na biodisponibilidade têm sido amplamente avaliada (BLUNDELL e THURLBY, 1987; AGUILERA, 2005).

Empresas gigantes do ramo como a Nestlé, Kraft, Heinz, e Unilever desenvolvem essas pesquisas buscando capturar uma parte do mercado de alimentos na próxima década (CHAUDHRY et al., 2008; CHAUDHRY et al., 2010). Na Tabela 1

estão exemplificados algumas aplicações dessa tecnologia desenvolvidas para grandes empresas de alimentos.

Tabela 1: Exemplos de produtos para aplicação da nanotecnologia em alimentos.

Empresa/Instituição	Produto	Referência
BioDelivery Sciences International	Nanopartículas derivadas da soja não-transgênica, as quais associadas ao cálcio carregam e entregam componentes farmacêuticos e nutrientes tais como licopeno e ômega-3 diretamente às células	ETC GROUP, 2005
Weston Foods	Pão com microcápsulas de óleo de atum, ricas em ômega-3, cujo sabor desagradável é mascarado, e que são liberadas apenas em contato com os fluidos estomacais	MARTINS et al., 2008
Unilever	Sorvete com baixo teor de gordura através da redução do tamanho das partículas da emulsão	MARTINS et al., 2008
Oilfresh Corporation	Nanocerâmica que reduz pela metade a utilização de óleo em restaurantes e <i>fastfoods</i>	JOSEPH e MORRISON, 2006
Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio	Embalagens para alimentos feitas de plástico que podem ser ingeridas e que contém quitosana na sua composição, responsável por aumentar a vida de prateleira dos produtos	Embrapa, 2015

Fonte: (ETC GROUP. Down on the farm. 2005. Disponível em: http://www.etcgroup.org/documents/NR_DownFarm_final.pdf. Acesso em 23 set. 2015; MARTINS, P. R. et al. Nanotecnologias na Indústria de Alimentos. CD ROM VI Ciclo de Debates em Economia Industrial, Trabalho e Tecnologia – EITT - São Paulo, PUC, p. 1-15, 2008; JOSEPH, T.; MORRISON, M. Nanotechnology in agriculture and food. 2006).

2.2 Nanoencapsulação de bioativos

Uma das maneiras de desenvolver novos alimentos que podem oferecer benefícios à saúde (os denominados “alimentos funcionais”) é a incorporação de componentes bioativos aos alimentos (CHEN et al., 2006). Devido a este motivo existe grande interesse da indústria no emprego de tecnologias de encapsulação para incorporar, proteger e entregar componentes ativos e melhorar as propriedades funcionais e/ ou sensoriais de formulações alimentícias (GIROUX e BRITTEN, 2011).

Diversos sistemas nanométricos coloidais, como nanoemulsões, nanopartículas lipídicas e nanopartículas proteicas, estão sendo pesquisados para a entrega efetiva de moléculas bioativas. Esses estudos envolvem desde a produção, caracterização físico-química e avaliação de vida de prateleira até ensaios para avaliação da digestibilidade *in vitro* e *in vivo* dos sistemas de nanoencapsulação, bem como avaliação da bioacessibilidade e biodisponibilidade do composto ativo encapsulado (NIK et al., 2010; KAYA-CELIKER e MALLIKARJUNAN, 2012). As nanoemulsões oferecem meios promissores de melhorar a biodisponibilidade de compostos bioativos, antioxidantes naturais e numerosos outros compostos que são largamente utilizados como ingredientes ativos em vários alimentos (TENG et al., 2012).

Segundo McCLEMENTS et al. (2009), um sistema de encapsulação em alimentos deve atender algumas necessidades essenciais, tais como:

- Encapsular eficientemente uma quantidade suficiente do componente funcional de forma que possa ser facilmente incorporado nos sistemas alimentícios;
- Proteger o componente funcional da degradação química (por exemplo, oxidação ou hidrólise) de modo que ele permaneça em seu estado ativo;
- Liberar o componente funcional em um sítio particular de ação a uma taxa controlada e/ ou em resposta a um estímulo ambiental específico;
- Ser compatível com o com a matriz alimentícia;
- Ser resistente a vários tipos de condições ambientais que um alimento sofre durante a sua produção, armazenamento, transporte e consumo.

Dentro desse contexto, as nanoemulsões podem satisfazer quase todos ou todos esses pré-requisitos para um sistema de encapsulação.

2.3 Nanoemulsões

Nanoemulsões são dispersões coloidais nas quais o tamanho médio das gotas se localiza na escala nanométrica entre 20 e 200 nm (MASON et al. 2006). As nanoemulsões são obtidas a partir da mistura entre dois líquidos imiscíveis, desde que, pelo menos um destes líquidos seja disperso sob a forma de nanogotículas (com diâmetro menor que 100 nm), possuindo assim, duas fases, em que pequenas gotículas de uma das fases (a fase *dispersa*) estão dispersas na outra fase (fase *contínua*); as nanoemulsões podem ser do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), conforme representado na Figura 1, e este tamanho reduzido das gotas aumenta a estabilidade das dispersões, pois evita ou dificulta fenômenos de desestabilização gravitacional, como a sedimentação (TADROS et al., 2004; HUNTER, 2001). Tais sistemas podem ser utilizados para proteger, encapsular e liberar componentes ativos lipofílicos, além de serem utilizados como nanorreatores e por esta razão têm sido cada vez mais investigadas e utilizadas nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e agroquímicas (McCLEMENTS, 2012).

Além disso, a encapsulação ainda permite, em diversos casos, o aumento da vida de prateleira dos bioativos encapsulados, devido à proteção contra oxidação e volatilização, e também possibilita a liberação controlada de componentes bioativos, com caráter nutracêutico, visto que tais moléculas se mantêm protegidas (DESAI e PARK, 2005; McCLEMENTS e RAO, 2011; GARCÍA et al., 2010).

Outra característica que beneficia a aplicação das nanoemulsões em produtos alimentícios que não podem sofrer alterações em relação à sua turbidez é o fato de possuírem gotas nanométricas; tal fato faz com que essas dispersões sejam opticamente transparentes e dessa forma não causam alterações visuais significativas nas matrizes as quais podem ser aplicadas (McCLEMENTS e RAO, 2011).

As nanoemulsões são sistemas metaestáveis, ou seja, podem permanecer cineticamente estáveis por longos períodos de tempo. A inerente estabilidade das nanoemulsões está relacionada ao emprego de tensoativos e/ou polímeros que conferem estabilização estérica às gotas reduzindo a possibilidade de coalescência (TADROS et al., 2004).

Figura 1: Representação esquemática mostrando as gotas das emulsões óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O).

Fonte: (adaptado de McCLEMENTS e RAO, 2011).

Por serem sistemas termodinamicamente metaestáveis, as nanoemulsões necessitam de aplicação de energia para que se formarem. Tal energia pode ser proveniente de dispositivos mecânicos, como no caso dos métodos de alta energia, como por exemplo, homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e homogeneizadores ultrassônicos; ou podem ser produzidas pela alteração da energia química dos componentes, por meio de métodos de baixa energia, como por exemplo, emulsificação espontânea ou métodos por inversão de fase (McCLEMENTS, 2012; SOLANS et al., 2005).

Atualmente, têm-se produzido nanoemulsões visando aplicações em alimentos, para encapsulação, proteção e liberação controlada de ingredientes funcionais lipofílicos, tais como, por exemplo, lipídios biologicamente ativos, vitaminas lipofílicas, agentes antioxidantes, carotenoides e flavonoides (McCLEMENTS e RAO, 2011, MAYER; WEISS; McCLEMENTS, 2013).

2.4 Estabilidade Físico-Química das Nanoemulsões

A estabilidade das nanoemulsões é um dos fatores mais importantes para aplicações bem-sucedidas em alimentos. A manutenção das suas propriedades ao longo do tempo em diferentes condições ambientais está relacionada diretamente com a estabilidade cinética desses sistemas. As nanoemulsões possuem maior vida de prateleira do que emulsões convencionais, pois estas apresentam instabilidade termodinâmica devido a maior área interfacial que possuem (McCLEMENTS, 2005; TADROS et al., 2004).

A instabilidade das nanoemulsões é causada pela energia livre positiva presente na interface entre a fase oleosa e a fase aquosa. A variação da energia livre determina se uma emulsão será estável termodinamicamente, mas não fornece indicações sobre a velocidade em que suas propriedades mudam com o tempo, ou ainda, o mecanismo físico responsável por tais propriedades (estabilidade cinética) (McCLEMENTS, 2005; DICKINSON, 1992).

A estabilidade cinética só pode ser entendida considerando a natureza dinâmica das nanoemulsões e as interações entre as gotículas que as contêm. Por ser um sistema dinâmico, as gotículas permanecem em estado contínuo de movimento e frequentemente colidem umas com as outras, o que ocorre devido ao movimento browniano ou por forças externas (McCLEMENTS, 2005). Os principais fenômenos físico-químicos que afetam a estabilidade cinética das nanoemulsões são apresentados na Figura 2.

Figura 2: Fenômenos físico-químicos que podem afetar a estabilidade das nanoemulsões.

Fonte: (adaptado de McCLEMENTS e RAO, 2011).

A separação gravitacional ocorre por ação da força gravitacional sobre as gotículas, e é resultado da diferença de densidade das gotículas e da fase contínua na qual estão dispersas. A cremeação ocorre quando as gotículas possuem densidade menor que a fase contínua e então elas tendem a se deslocar para cima (Figura 2). Por outro

lado, se as gotículas possuírem densidade maior que fase contínua, elas deslocam-se para baixo, e este fenômeno é conhecido como sedimentação. A densidade da maioria dos óleos comestíveis é menor do que a da água, e conseqüentemente a ocorrência de cremação é sempre maior que de sedimentação (McCLEMENTS, 2005). Porém, tal fenômeno deve ser controlado, porque faz com que as gotículas permaneçam em contato durante um tempo prolongado, o que pode levar a floculação ou coalescência, e, eventualmente, formação de uma camada de óleo puro na parte superior da emulsão, ocorrendo separação de fase (McCLEMENTS, 2005).

Outro fenômeno que pode desestabilizar as nanoemulsões é a floculação, que consiste no agrupamento de duas ou mais gotículas mantendo a integridade individual de cada uma. Este fenômeno causa aumento da viscosidade da emulsão e pode conduzir à formação de um gel, podendo ser benéfica ou não, dependendo da característica final que se deseja para as nanoemulsões (McCLEMENTS, 2005; TAN, 2004).

A coalescência é o processo em que duas ou mais gotículas se fundem para formar uma gotícula maior e desse moto, envolve uma diminuição da área de contato entre a fase contínua e a fase dispersa. Este fenômeno pode levar rapidamente a formação da cremação ou sedimentação e posteriormente à separação de fase. Este processo só ocorre quando as gotas estão próximas e a interface que as separa é rompida. Em geral, a ocorrência da coalescência é determinada pelo mecanismo físico responsável pelo contato entre as gotículas e as forças de curto alcance, como por exemplo, o movimento browniano (McCLEMENTS, 2005; WALSTRA, 2003).

Já o amadurecimento de Ostwald proporciona um crescimento do tamanho de partícula pelo aumento do tamanho das mesmas, o que ocorre à custa de gotículas pequenas dentro de um sistema, que diminuem e são absorvidas pelas maiores. Este fenômeno é devido à energia livre de gotículas pequenas serem maior do que a de gotículas maiores, deste modo durante um tempo indeterminado pode reduzir todas as gotículas para uma única provocando a separação de fase (ANTON e VANDAMME, 2011; McCLEMENTS e RAO, 2011; WANG e GLICKSMAN, 2007).

2.5 Composição e Estabilidade das Nanoemulsões

Fase oleosa

Para produzir nanoemulsões, a fase oleosa pode ser composta por vários tipos de substâncias, tais como monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis, além de ácidos graxos livres, óleos essenciais e vegetais, gorduras e ceras (McCLEMENTS e RAO,

2011; SADURN et al., 2005; HATANAKA et al., 2008). Podem compor esta fase substâncias bioativas e/ou nutraceuticas, as quais possuem caráter hidrofóbico, como por exemplo, vitaminas (RELKIN et al., 2009; HATANAKA et al., 2010), carotenoides (TAN e NAKAJIMA, 2005; YUAN et al., 2008; MAO et al., 2009), curcuminoides (LI et al., 2009) entre outros como, flavonoides e fitoesteróis (McCLEMENTS e RAO, 2011). A estabilidade das nanoemulsões está relacionada diretamente com as características físico-químicas dos componentes da fase oleosa, sendo que as propriedades que mais afetam a estabilidade são a polaridade, a solubilidade em água, a tensão interfacial, a viscosidade e a densidade (McCLEMENTS, 2005; WOOSTER et al., 2008). Os métodos para produzir as nanoemulsões estão limitados às características físico-químicas de seus componentes. As limitações e influências que podem ocorrer devido aos fatores físico-químicos das nanoemulsões durante a sua formulação estão resumidas na Tabela 2.

O uso de óleos ricos em triacilgliceróis pode ser desejável pela indústria de alimentos, pois apresentam baixo custo, são encontrados em abundância, e podem possuir propriedades funcionais e nutricionais interessantes. São exemplos de tais óleos: óleo de milho, soja, girassol, cártamo, oliva, linhaça ou peixe (SHEN et al., 2005; HATANAKA et al., 2008). A maioria destes óleos são constituídos principalmente de triacilgliceróis de cadeia longa (TCL). A produção de nanoemulsões utilizando triacilgliceróis de cadeia média (TCM) e triacilgliceróis de cadeia curta (TCS) é um desafio, pois essas moléculas possuem baixa polaridade, alta tensão interfacial e alta viscosidade (McCLEMENTS e RAO, 2011).

Uma vez que as nanoemulsões são produzidas usando-se triacilgliceróis de cadeia longa ou média, estas dispersões se tornam frequentemente estáveis; no entanto, é necessário modificar os métodos de produção convencionais para criar gotículas pequenas essenciais para a produção de nanoemulsões. Por outro lado, existem alguns tipos de óleos comestíveis que são altamente eficazes na formação de nanoemulsões contendo pequenas gotículas, mas são muito mais menos eficazes na estabilização dessas gotículas. Por exemplo, óleos essenciais têm alta polaridade, baixa tensão interfacial e baixa viscosidade, que facilita a formação de gotículas pequenas, tanto para os métodos de alta e baixa energia. No entanto, uma vez que estas nanoemulsões são formadas pode ocorrer desestabilização da sua estrutura devido à maturação de Ostwald (devido à alta solubilidade em água) ou coalescência (devido à baixa tensão interfacial do óleo). Por isso, alternativas têm que ser desenvolvidas para melhorar a estabilidade

em longo prazo de nanoemulsões produzidas com tais óleos, como, por exemplo, através da adição de inibidores para evitar maturação de Ostwald, ou alterando o tipo de emulsificante para prevenir coalescência.

Tabela 2: Influência de propriedades físico-químicas das fases oleosa e aquosa sobre a estabilidade e o desempenho de nanoemulsões óleo-em-água de qualidade alimentar.

Propriedade	Formação	Estabilidade	Atuação
Viscosidade (η)	- Eficiência do rompimento da gota em métodos de alta energia depende da relação da viscosidade;	- Cremação diminui com aumento da viscosidade da fase aquosa;	- Determina formação de produto, textura, prazo de validade;
-Tensão interfacial (γ)	- Baixa γ facilita a interrupção de gota por método de alta energia;	- Baixa γ promove coalescência da gota;	- Determina formação de produto, textura, prazo de validade;
	- Baixa γ facilita a formação de gotículas na inversão de fase por método de emulsificação espontânea;	- Baixa γ pode diminuir a afinidade do tensoativo como as superfícies das gotículas;	
Solubilidade	- A solubilidade em água dos agentes da fase oleosa afeta a formação de gotículas em métodos de emulsificação espontânea;	- Alta solubilidade da água de um óleo promove a maturação de Ostwald;	- Afeta o prazo de validade do produto;
Polaridade	-	- Determina a divisão dos componentes entre fase oleosa e a fase aquosa;	- Afeta características como cor e sabor;
Densidade (ρ)	-	- Taxa de cremação aumenta com aumentando da densidade;	- Determina o prazo de validade do produto;
Índice de refração (n)	-	-	- A turbidez aumenta com o aumento do índice de refração

Fonte: (adaptado de McCLEMENTS e RAO, 2011).

Emulsificantes

Um emulsificante é uma molécula que possui porção(ões) hidrofílica(s) e hidrofóbica(s) em sua estrutura, e tem capacidade de exercer atividade superficial (atividade tensoativa) e de se adsorver em interfaces, como na superfície de uma gota, protegendo-as de perturbações e/ou agregação (McCLEMENTS, 2005). A função dos emulsificantes em métodos de alta energia é facilitar o rompimento das gotas dentro do homogeneizador a partir da diminuição da tensão superficial, favorecendo a produção de gotas menores. Já em métodos de baixa energia, a formação de pequenas gotas é favorecida, pois o emulsificante é capaz de diminuir ainda mais a tensão superficial dependendo das condições ambientais que este método proporciona. Além de facilitar a formação e aumentar a estabilidade das dispersões, eles também podem modificar as propriedades da emulsão de uma série de outras maneiras, incluindo a formação de micelas, interagindo com os biopolímeros ou modificando a formação, crescimento e estrutura dos cristais dos lipídios (KRALOVA e SJOBLÖM, 2009).

A escolha do tensoativo adequado está relacionada ao tipo de nanoemulsão que se deseja produzir. A produção de nanoemulsões é classificada por métodos de alta e baixa energia, sendo que os tensoativos de baixo peso molecular podem ser empregados na produção de nanoemulsões por ambos os métodos. No entanto, as proteínas e polissacarídeos não são adequados para a produção de nanoemulsões usando métodos de baixa energia. Por outro lado, essas moléculas têm a vantagem de serem ingredientes naturais, muitas vezes GRAS (*generally recognized as safe*) e são consideradas “*label-friendly*”, e, portanto, existe um grande interesse na sua utilização na produção de nanoemulsões.

Os tensoativos são classificados de acordo com suas características elétricas como iônicos, não-iônicos e zwitteriônicos (eletricamente neutros). Os tensoativos não-iônicos são os mais utilizados devido à sua baixa toxicidade, baixa irritabilidade e facilidade de formar nanoemulsões pelos métodos de alta ou baixa energia (JAFARI et al., 2008; McCLEMENTS, 2005).

- Tensoativos iônicos: a maioria dos tensoativos iônicos de grau alimentício são carregados negativamente (McCLEMENTS, 2005), como por exemplo, o ácido cítrico com éster de MG (CITREM), o diacetil ácido tartárico com éster de MG (DATEM) e o lactilato esteroil de sódio (SSL). Surfactantes iônicos podem ser usados para formar nanoemulsões por métodos de baixa e alta energia.

- Tensoativos não-iônicos: são amplamente utilizados na produção de nanoemulsões de grau alimentício devido a sua baixa toxicidade e capacidade de formar nanoemulsões por métodos de alta e baixa energia. Exemplos deste tipo de emulsificante incluem tensoativos de ésteres de açúcar (por exemplo, monooleato de sorbitan, monopalmitato de sacarose), tensoativos do tipo éter polioxietilado (POE) (por exemplo, Brij 97, Brij 30) e ésteres de sorbitano etoxilados (por exemplo, Tweens) (CHIU, 2006; LIU et al, 2006; JAFARI et al, 2007; HENRY et al., 2009).
- Tensoativos neutros ou zwitteriônicos: Esses tensoativos possuem grupos ionizáveis de carga oposta na mesma molécula, consequentemente, dependendo do pH, eles podem ter carga líquida negativa, neutra ou positiva. A lecitina, assim como fosfolipídios naturais, podem ser utilizados para a produção de nanoemulsões de grau alimentício; no entanto, essas moléculas não garantem total estabilidade das partículas quando usados isoladamente, por outro lado podem ser mais eficazes quando utilizados em combinação com um co-solvente (TROTТА et al., 1996; DE MORAIS et al., 2006; HOELLER et al., 2009).

Uma grande variedade de tensoativos pode ser utilizada em produtos alimentícios, os mais comuns estão listados na Tabela 3.

Tabela 3: Exemplos de tensoativos para aplicações alimentícias.

Denominação química	Abreviatura	Solubilidade
Iônicos		
Sais de ácidos graxos	FA	Óleo/Água
Lactilato esteroil de sódio	SSL	Água
Lactilato estearoil de cálcio	CSL	Óleo
Ácido cítrico com éster de MG	CITREM	Água
Diacetil ácido tartárico com éster de MG	DATREM	Água
Não-Iônicos		
Monoglicerídeos	MG	Óleo
Ácido acético com éster de MG	ACETEM	Óleo
Ácido láctico com éster de MG	LACTEM	Óleo
Poliglicerol com éster de FA	PGE	Água
Propileno glicol com éster de FA	PGMS	Óleo
Monostearato de sorbitano	SMS	Água
Triestearato de sorbitano	STS	Óleo
Polioxietileno (20) monoestearato de sorbitano monoestearato	TWEEN 60	Água
Polioxietileno (20) triestearato de sorbitano triestearato	TWEEN 65	Água
Polioxietileno (20) monooleato de sorbitano monooleato	TWEEN 80	Água

Fonte: (adaptado de McCLEMENTS, 2005).

2.6 Produção de nanoemulsões: métodos de alta energia

As nanoemulsões não se formam espontaneamente, sendo necessário o fornecimento de energia ao sistema para que ocorra a emulsificação, e tal fornecimento pode ser feito métodos que envolvem alta ou baixa energia de emulsificação (ANTON et al., 2007). Os métodos de alta energia envolvem a introdução de energia ao sistema, a qual é realizada pelo emprego de homogeneizadores de alta velocidade e alta pressão, microfluidizadores e ultrassonicadores (WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008; McCLEMENTS e RAO, 2011).

Os homogeneizadores a alta pressão aplicam forças intensas de cisalhamento sobre as gotículas existentes (emulsão grosseira) reduzindo seu tamanho. Um esquema genérico mostrando o processo pelo qual as gotas passam está ilustrado na Figura 3, pode-se observar que as gotas são quebradas em tamanhos menores no momento em que são forçadas a passarem pela válvula do homogeneizador. O tamanho reduzido das gotas é determinado pela pressão exercida e pelo o número de vezes que este processo se repete (McCLEMENTS e RAO, 2011; SCHUBERT e BEHREND, 2003).

Figura 3: Representação esquemática do mecanismo utilizado em homogeneizador com válvula de alta pressão para produção de nanoemulsões.

Fonte: (adaptado de McCLEMENTS; RAO, 2011).

Por sua vez, nos microfluidizadores, uma emulsão grosseira, ou seja, uma emulsão com partículas maiores é forçada, por alta pressão, a escoar por pequenos orifícios, formando correntes que são direcionadas para uma câmara de interação, e neste local ocorre colisão desses fluxos e forças de cisalhamento são geradas, levando à desestabilização das gotas e transformando-as em gotículas menores (Figura 4) (McCLEMENTS e RAO, 2011; HATANAKA et al., 2010; WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008). Nos microfluidizadores também podem ser introduzidas correntes contendo os componentes em separado das nanoemulsões, e a própria colisão

entre os fluxos e as intensas forças de cisalhamento geradas na câmara de interação podem levar à produção das nanogotas (McClements, 2005).

Figura 4: Representação esquemática de um microfluidizador para produção de nanoemulsões.

Fonte: (adaptado de McCLEMENTS; RAO, 2011).

Já os homogeneizadores ultrassônicos operam aplicando alta intensidade de ondas ultrassônicas para gerar a força de cisalhamento, que por sua vez quebrará as gotas de emulsão em pequenas gotículas (LEONG et al., 2009). Essas ondas são geradas por um *probe* colocado dentro dos líquidos a serem homogeneizados e gera nestes, vibrações que possibilitam a formação, crescimento e quebra de pequenas gotículas (LEONG et al., 2009; McCLEMENTS e RAO, 2011). A representação deste mecanismo esta ilustrada na Figura 5:

Figura 5: Representação esquemática de um homogeneizador ultrassônico para produção de nanoemulsões.

Fonte: (adaptado de McCLEMENTS; RAO, 2011).

Apesar de escalonáveis, os processos de alta energia muitas vezes são desfavoráveis para aplicações industriais, por necessitar de equipamentos caros e implicarem em custos elevados para funcionamento. Além disso, existem outras preocupações na utilização destes métodos de alta energia, tais como desnaturação de proteínas, despolimerização de polissacarídeos, oxidação lipídica e até mesmo a

degradação de compostos termolábeis, que podem ocorrer durante o processo de homogeneização (FERNANDEZ et al., 2004; YANG et al., 2012).

2.7 Produção de nanoemulsões por métodos de baixa energia: emulsificação espontânea

Os processos de baixa energia para produção de nanoemulsões baseiam-se na formação espontânea de gotículas de óleo nos sistemas mistos óleo-água-tensoativo (SOW), quando as condições ambientais externas e internas ao sistema são alteradas, utilizando a energia química dos componentes do sistema. Os métodos de baixa energia podem ser classificados em dois tipos: métodos de inversão de fase e métodos de emulsificação espontânea (ANTON e VANDAMME, 2009; McCLEMENTS e RAO 2011; SOLANS e SOLÉ, 2012).

No método de emulsificação espontânea ocorre a formação de uma emulsão quando dois líquidos são misturados e agitados juntos, em condições específicas, e o seu mecanismo está representado esquematicamente na Figura 6. Várias condições podem ser modificadas simultaneamente neste método para que se obtenha emulsões estáveis, dentre essas variáveis estão as composições das duas fases bem como temperatura, pH, velocidade de agitação e ordem de adição das fases (YANG et al 2012; ANTON e VANDAMME, 2009).

Figura 6: Representação do mecanismo do processo de emulsificação espontânea para produção de nanoemulsões.

Fonte: (adaptado de McCLEMENTS e RAO, 2011).

Na Figura 6, pode-se observar que duas fases são misturadas, sendo uma delas a fase aquosa, e a outra uma mistura de óleo e tensoativo hidrofílico. Inicialmente, as

fases ficam em contato. Cada fase contém algum componente imiscível com a outra fase, porém, na fase oleosa contêm o componente que é parcialmente miscível com as duas fases (tensoativo), de tal modo que durante do contato entre as fases, o componente que é parcialmente miscível migra de uma fase para outra. A fase contínua é aquela na qual o tensoativo é mais solúvel. O deslocamento do tensoativo pelas fases causa grande turbulência na interface água/óleo, causando um estado de não-equilíbrio, aumentando a área interfacial, gerando o chamado “*budding*” (“brotamento”) o qual é seguido da formação espontânea de gotículas (ANTON E VANDAMME 2009, YANG et al.; 2012, McCLEMENTS e RAO, 2011). O tamanho das gotas pode ser controlado pela variação das composições das fases, bem como as condições de mistura. Por causa da simplicidade de implantação do método da emulsificação espontânea e das vantagens quanto ao custo de equipamentos de energia, e ainda, por gerar gotículas muito pequenas, este método tem sido muito utilizado pela indústria farmacêutica e alimentícia (ANTON e VANDAMME 2009; YANG et al.; 2012; McCLEMENTS e RAO, 2011).

2.8 Métodos de produção de nanoemulsões de baixa energia por inversão de fases

Os métodos de produção de nanoemulsões por inversão de fases consistem na conversão de uma emulsão de água em óleo (A/O) para uma emulsão óleo em água (O/A) ou vice-versa. Estes métodos fazem uso da energia química liberada através das transições de fases que ocorrem durante o processo de emulsificação (SOLANS et al., 2009). As metodologias de inversão de fases são classificadas em três tipos de métodos e incluem os métodos da temperatura de inversão de fase (PIT- *phase inversion temperature*), inversão da composição das fases (PIC- *phase inversion composition*) e ponto de inversão da emulsão (EIP- *emulsion inversion point*) (MAYER; WEISS; McCLEMENTS, 2013; McCLEMENTS e RAO, 2011).

Estes métodos são baseados nas inversões de fase do sistema que pode ser classificado com inversão catastrófica ou transicional. A inversão transicional ocorre quando há mudanças na formulação do sistema, tais como características físico-química do tensoativo, na fase oleosa ou na fase aquosa as quais podem alterar a afinidade hidrofílica ou lipofílica do tensoativo. Essas alterações na formulação originam uma grandeza denominada HLD, ou Desvio Hidrofílico-Lipofílico, HLD (*Hydrophilic Lipophilic Deviation*) (SALAGER et al., 2000; McCLEMENTS, 2011). HLD positivo significa que o tensoativo tem maior afinidade lipofílica, HLD negativo, maior

afinidade hidrofílica. HLD igual à zero indica que o tensoativo possui a mesma afinidade com as fases oleosa e aquosa e dessa forma interage igualmente na interface do óleo e água.

Já inversão catastrófica ocorre através de alterações na composição do sistema, ou seja, alterações na relação razão água/óleo (WOR), o que ocorre no método EIP (SAJJADI et al., 2004). A esquematização deste processo pode ser visualizada no diagrama de fases da Figura 7.

Figura 7: Dinâmica do comportamento de fases por inversão de fase transicional e catastrófico.

Fonte: (adaptado de PERAZZO et al., 2015).

Na abscissa do diagrama mostrado na Figura 7 localiza-se a razão óleo/água utilizada na produção da nanoemulsão, que é determinada pela sigla WOR (*water/ oil ratio*). A inversão de fases catastrófica é mostrada pela seta horizontal, sendo que ocorre por meio de variações na composição do sistema. Já a inversão de fase transicional é representada pela seta vertical, que indica a inversão das fases por meio de variações no HLD (ordenada do diagrama). (SAJJADI et al.; 2004, McCLEMENTS e RAO, 2011). Nas regiões denominadas como **A**, as fases oleosa e aquosa possuem valores bastante próximos, ($WOR \approx 1$) e assim, tanto a formação de emulsões O/A e A/O são favorecidas. Por outro lado, nas regiões denominadas como **B**, a fase oleosa está em maior quantidade e dessa forma as emulsões do tipo A/O são favorecidas. Já regiões denominadas como **C**, a fase aquosa está em maior quantidade e assim, a formação de emulsões do tipo O/A é favorecida. Se todos os fatores (HLD, sinal, WOR e letra) são

favoráveis à formação de um tipo de emulsão, então esta emulsão é denominada “normal” e tende a ser estável. Entretanto, se o fator formulação favorecer a formação de um tipo de emulsão, mas o fator composição favorecer à outra, este sistema é dito ser “anormal” e tende a ser instável. Assim, os regimes (A -, A +, B + e C-) são “normais” (estáveis) e os regimes (B e C +) são “anormais” (instáveis). As emulsões “anormais” são geralmente instáveis à coalescência e separação de fases, mas múltiplas emulsões múltiplas (O/A/O ou A/O/A) podem ser formadas nas regiões próximas aos limites das fases (LEAL – CALDERON; SCHNITT; BIBETTE, 2007; McCLEMENTS e RAO 2011).

A inversão de fases transicional é representada pela seta vertical, que indica a inversão das fases por meio de variações no HLD (representado na ordenada do diagrama). Como já citado, valores positivos de HLD indicam maior afinidade do tensoativo com a fase aquosa, por isso a preferência para formação de emulsões O/W nesta região do gráfico. Nesta região, ocorre também a formação da forma micelar do tensoativo que são representadas por letras e sinal positivo (A+, B+, C+), neste, a fase oleosa contém micelas formadas por tensoativo e a fase aquosa contém monômeros de tensoativo na concentração crítica micelar crítica (CMC). Por sua vez, valores negativos de HLD indicam maior afinidade do tensoativo com a fase oleosa, por isso há, preferencialmente, a formação de emulsões W/O na região negativa de HLD e nesta região ocorre a formação da estrutura micelar reversa, que são representadas por letras e sinal negativo (A-, B-, C-). Como dito também, em HLD igual a zero, o tensoativo apresenta afinidade lipofílica e hidrofílica, formando assim, estruturas bicontínuas ou lamelares (SAJJADI et al., 2004; BROOKS e RICHMOND, 1994; McCLEMENTS e RAO, 2011).

Uma vez que foram estabelecidas as condições ótimas (WOR/HLD) para a formação das nanoemulsões por inversão de fases, pode-se prever o comportamento (hidrofilicidade ou lipofilicidade) do tensoativo quando o sistema for modificado (por exemplo, por adição de sal, álcool, óleo e modificação da temperatura). Se uma nanoemulsão poderá ou não ser formada por estas modificações, irá depender da quantidade de tensoativo, bem como o método utilizado (alta ou baixa energia), visto que o tamanho das gotículas sofre variações antes e depois do ponto de inversão de fase (LEAL – CALDERON; SCHNITT; BIBETTE, 2007; McCLEMENTS e RAO 2011).

2.9 Método da Temperatura de Inversão de Fases (PIT – *phase inversion temperature*)

O método de inversão de fase por temperatura faz uso da energia química liberada pela transição de fases que ocorre durante a emulsificação. No processo, óleo, água e tensoativo não-iônico são misturados à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura é aquecida e durante este processo o tensoativo migra da fase aquosa para a fase oleosa (ANTON e VANDAMME, 2009; SOLANS e SOLÉ, 2012; ANTON et al., 2007). Este processo está representado na Figura 8.

Figura 8: Esquematização da produção de nanoemulsão pelo método de da temperatura de inversão de fases (PIT).

Fonte: (adaptado de McCLEMENTS e RAO, 2011).

Este método é uma por inversão de fase transicional, e a força motriz do método está baseada nas mudanças que ocorrem na curvatura do tensoativo não-iônico com a variação da temperatura; atingindo a curvatura média zero (PIT), como mostrado na Figura 8. No momento que este ponto é atingido ocorre a formação das estruturas bicontínuas ou lamelares as quais desempenham papel importante na formação das nanoemulsões. A partir dessas estruturas o tensoativo altera sua afinidade, mudando sua curvatura, e migra para outra fase, forçando uma transição de uma emulsão O/A para

uma emulsão (A/O) (FERNANDEZ et al., 2004; McCLEMENTS e RAO, 2011; SOLANS e SOLÉ, 2012). Em baixas temperaturas a cabeça de um tensoativo não-iônico é altamente hidratada e desse modo passa a ser mais solúveis em água. Com aumento da temperatura a cabeça polar progressivamente vai sendo desidratada e com isso, a solubilidade do tensoativo em água diminui. Na temperatura PIT, a solubilidade do tensoativo nas fases oleosa e aquosa é aproximadamente a mesma, a tensão interfacial é muito baixa e a curvatura espontânea do tensoativo zero, como mostrado na Figura 8. E ainda, sob altas temperaturas o tensoativo torna-se mais solúvel na fase oleosa. Na temperatura PIT, as barreiras que se opõem ao processo de coalescência são baixas e, portanto, a taxa de coalescência é extremamente alta. Consequentemente, nesta fase as emulsões são muito instáveis. Deste modo, a temperatura deve ser diminuída rapidamente por meio de resfriamento ou diluição com água fria, para se obter nanoemulsões estáveis cineticamente em função do tempo (McCLEMENTS e RAO, 2011; SOLANS e SOLÉ, 2012).

Durante o processo PIT ocorrem diversas alterações estruturais que estão esquematizadas na Figura 9: em (1), a temperatura está abaixo da temperatura PIT, uma emulsão é obtida e o tensoativo tem afinidade com fase aquosa; em (2), com o aumento da temperatura, o tensoativo torna-se gradualmente lipofílico, ou seja, começa a ter afinidade pela fase oleosa e assim é solubilizado nesta fase; em (3) a temperatura está no PIT e uma fase bicontínua é formada. Finalmente, em (4), a temperatura é elevada acima do PIT e a emulsão é invertida, uma vez que o tensoativo se torna lipofílico. O sistema é, em seguida, resfriado rapidamente através de diluição de água, fazendo com que o tensoativo migre espontaneamente para a fase aquosa, este deslocamento provoca a formação de partículas de tamanho reduzido, ou seja, da nanoemulsão (ANTON e VANDAMME, 2009). O método PIT apenas pode ocorrer com tensoativos sensíveis a alterações de temperatura, ou seja, tensoativos não-iônicos polietoxilados, em que mudanças de temperatura induzem uma mudança na hidratação das cadeias de polioxietileno, e uma consequente alteração da sua curvatura (SOLANS e SOLÉ, 2012).

Figura 9: Representação da mudança nas estruturas ao longo do método de produção de nanoemulsões pelo método da temperatura de inversão de fases (PIT).

Fonte: (adaptado de ANTON e VANDAMME, 2009).

2.10 Método do Ponto de Inversão da Emulsão (EIP – *emulsion inversion point*)

O método do ponto de inversão da emulsão (EIP) ocorre através da inversão de fase catastrófica no qual a razão das fases oleosa e aquosa é alterada, mas as propriedades do tensoativo permanecem constantes. O mecanismo de produção de nanoemulsões pelo método EIP é apresentado na Figura 10:

Figura 10: Representação esquemática do método ponto de inversão da emulsão (inversão de fases catastrófica).

Fonte: (adaptado de McCLEMENTS e RAO, 2011).

A partir da Figura 10, pode-se observar que inicialmente ocorre adição da fase aquosa para uma fase oleosa que contém um tensoativo hidrofílico. Em concentrações baixas da fase aquosa, gotas de água são formadas dentro da fase oleosa (emulsão A/O).

No entanto, quando o teor de água crítico é excedido, a taxa de coalescência das gotículas de água excede a taxa de coalescência de gotículas de óleo, assim, o equilíbrio entre a coalescência e a quebra das gotículas não pode mais ser mantido, ocorrendo a formação de emulsões múltiplas e após, as fases se invertem passando de uma emulsão A/O para O/A (SAJJADI; JAHANZAD; YIANNESKIS, 2004; BROOKS e RICHMOND; 1994).

A inversão da emulsão A/O para uma emulsão O/A pode ser explicada pelo fato de que a fase aquosa muda à curvatura espontânea do tensoativo e este forma uma monocamada flexível na interface da fase oleosa e aquosa. Com o aumento da fase aquosa, ocorre a migração do tensoativo da fase oleosa para a aquosa, visto que trata-se de um tensoativo hidrofílico que está inicialmente em um ambiente desfavorável - anormal (fase oleosa), migrando para sua fase de ambiente favorável (aquosa). Durante esta dispersão do tensoativo ocorre a emulsificação e modificações em sua estrutura; passando por estruturas intermediárias, como lamelar e bicontínua até o ponto de inversão (EIP), e finalmente, decompondo em gotículas de óleo menores (FERNANDEZ et al.; 2004; BROOKS e RICHMOND, 1994; JAHANZAD et al., 2009; BERNEWITZ et al., 2014). Devido ao aumento do volume de água no sistema, a partir de uma emulsão de A/O se forma uma emulsão múltipla (O/A/O), e, finalmente, uma emulsão O/A com gotículas de tamanho reduzido (FERNANDEZ et al.; 2004; BROOKS e RICHMOND, 1994; JAHANZAD et al., 2009).

Este processo ocorre por meio de dois tipos de difusões: primeiramente da fase aquosa na fase oleosa (emulsão externa) e posteriormente, das gotas de óleo dentro das gotículas de água (emulsão interna). Segundo Bernewitz et al., 2014 e Jahanzad et al., 2009 são nestes fenômenos que formam as emulsões múltiplas e estas levam então, à formação da emulsão final estável, invertendo assim uma emulsão inicial A/O à uma emulsão final O/A e vice – versa, como mostrado na Figura 11.

Figura 11: Representação esquemática da mudança das estruturas presentes no sistema, durante o processo de nanoemulsificação pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP), em função do tempo de agitação.

Fonte: (adaptado de JAHANZAD et al. 2009).

Esta formação de gotículas pequenas é facilitada porque a tensão interfacial é mínima no ponto EIP. Quanto maior a concentração de tensoativo e tempo de agitação (parâmetros de produção), melhor a formação das gotículas pequenas de óleo (solubilização do óleo), e melhor também a formação das estruturas intermediárias: lamelar e bicontínua (O/A/O). Estes dois fatores juntos contribuem para uma melhor distribuição de tamanho das gotículas e são fundamentais para a estabilidade destes sistemas (FERNANDEZ et al.; 2004; BROOKS e RICHMOND, 1994; JAHANZAD et al., 2009; BERNEWITZ et al., 2014).

2.11 Oxidação e atividade antioxidante em alimentos

Um composto com atividade antioxidante pode ser definido da seguinte maneira: “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparadas a do substrato oxidável, atrase ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz” (SIES; STAHL, 1995). A oxidação em alimentos é um fator determinante de qualidade, pois causa a degradação de alimentos, comprometendo a qualidade dos produtos e alterando suas características nutricionais e organolépticas (RODRÍGUEZ-CARPENA et al., 2011). Os antioxidantes são empregados largamente pela indústria alimentícia para evitar a deterioração dos produtos e para garantir seu valor nutricional.

Um exemplo importante relacionado com oxidação em alimentos é a oxidação lipídica que ocorre durante o processamento, distribuição, armazenamento e preparo final dos alimentos. No momento em que esses alimentos são expostos ao oxigênio, inicia-se a reação de oxidação o que leva à produção de sabores indesejáveis, odores de

ranço e descoloração, além de outras alterações que podem afetar a qualidade nutricional, a integridade e a segurança dos alimentos por meio da formação de compostos com potencial tóxico (KUBOW, 1993).

A oxidação lipídica é um fenômeno complexo induzido por oxigênio na presença de catalisadores, tais como radicais livres, luz, pigmentos e íons metálicos (LAGUERRE et al., 2007). Farmer et al. (1942) propuseram uma sequência de reações para explicar a auto-oxidação dos lipídios, sendo que o mecanismo da auto-oxidação lipídica é constituído por três etapas: a iniciação, a propagação e a terminação, sendo representado na Figura 12.

Figura 12: Mecanismo da auto-oxidação lipídica.

Fonte: (adaptado de REISCHE et al., 1998).

O início da oxidação lipídica ocorre a partir da interação de um iniciador como, por exemplo, o oxigênio, que uma vez ativado pode reagir com o ácido graxo insaturado ou os lipídios podem ser auto-oxidados em condições favoráveis de luz e calor. Uma vez iniciada, a reação segue em cadeia e somente termina quando estiverem esgotadas as reservas de ácidos graxos insaturados e oxigênio (FARMER et al., 1942; HALLIWELL, 1995). As reações de propagação levam à formação de diversos produtos, tais como os peróxidos, que podem ser mensurados e servem como parâmetro para determinação da extensão da oxidação lipídica em alimentos. Pelo fato dos radicais peróxidos serem instáveis as reações continuam a ocorrer até a etapa de terminação (SILVA et al., 1999). Com o esgotamento dos substratos, as reações de propagação vão

cessando e inicia-se a formação dos produtos finais que são estáveis (não-reativos). Os principais produtos finais da oxidação lipídica compreendem os derivados da decomposição de hidroperóxidos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos (SILVA et al., 1999; BERGER et al., 1995; HALLIWELL, 1999).

Os radicais livres são moléculas muito reativas devido à presença de elétrons isolados, livres para se ligarem a qualquer elétron, e, por isso, causam danos aos tecidos pela reação com lipídios das membranas celulares, nucleotídeos do DNA e ligações sulfidril em proteínas (MACHLIN; BENDICH, 1987).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, sequestrantes de oxigênio e biológicos (BAILEY, 1996). Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou a inativação dos radicais livres através da doação de átomos de hidrogênio a estes compostos e dessa forma interrompem a reação de propagação (SIMIC e JAVANOVIC, 1994). O mecanismo de atuação dos antioxidantes primários está representado na Figura 13.

Figura 13: Mecanismo de ação para os antioxidantes primários.

onde: $\text{ROO}^\bullet$ e $\text{R}^\bullet$ - radicais livres; AH - antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e $\text{A}^\bullet$ - radical inerte

Fonte: (adaptado de REISCHE et al., 1998).

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante reage com os radicais livres $\text{R}^\bullet$ e $\text{ROO}^\bullet$ com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Dessa forma, se formam espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte ($\text{A}^\bullet$) procedente do antioxidante. Este radical, estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas.

Por sua vez, os antioxidantes sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que, no entanto, podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada com os mesmos. Já os antioxidantes removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis tornando-os indisponíveis para atuarem como propagadores da auto-oxidação. Ácido ascórbico, seus isômeros e seus derivados

são os melhores exemplos deste grupo. Finalmente, os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas, como glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases. Estas substâncias podem remover oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício.

Dentre os antioxidantes alimentícios sintéticos mais importantes estão o butilhidroxianisol (BHA), o butilhidroxitolueno (BHT) e a terc-butilhidroquinona (TBHQ), amplamente empregados na indústria de alimentos. Por sua vez, dentre os antioxidantes naturais mais utilizados se destacam o ácido ascórbico e os tocoferóis (com destaque para o alfa-tocoferol) (RICE-EVANS et al., 1997).

As estruturas químicas dos antioxidantes sintéticos fenólicos mais utilizados estão representadas na Figura 14. Tais estruturas permitem a doação de um próton para um radical livre, regenerando a molécula do acilglicerol, e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Assim como a maior parte dos antioxidantes fenólicos, o BHA possui eficiência limitada em óleos insaturados de vegetais e é amplamente empregado na supressão da oxidação em gorduras animais. O BHT possui propriedades semelhantes ao BHA e ambos podem conferir odor em alimentos quando aplicados em altas temperaturas em condições de frituras, por longo período. O TBHQ é um pó cristalino pouco solúvel em óleos e gorduras e não forma complexo com íons de cobre e ferro. É considerado mais eficaz em óleos vegetais do que o BHA ou o BHT é também o melhor antioxidante para óleo de fritura já que resiste ao calor e proporciona uma maior estabilidade para os produtos processados em altas temperaturas.

Figura 14: Estruturas fenólicas dos antioxidantes sintéticos.

Fonte: (adaptado de RAMALHO e JORGE, 2006)

No entanto, apesar de extremamente utilizados, muito se discute a respeito da inocuidade de tais antioxidantes sintéticos em função da possibilidade de apresentarem potencial carcinogênico e/ ou teratogênico (DIAZ et al., 1997). O TBHQ não é permitido no Canadá e na Comunidade Econômica Europeia. No Brasil, o uso destes antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde, que permite concentrações máximas de 200 mg/kg para o BHA e o TBHQ e 100 mg/kg para o BHT. Sendo assim, diversos estudos estão sendo desenvolvidos para encontrar alternativas para a preservação dos produtos alimentícios, substituindo antioxidantes sintéticos por naturais, bem como sobre a possibilidade da remoção dos antioxidantes químicos utilizados (RAMALHO e JORGE, 2006).

Devido à problemática acerca dos antioxidantes sintéticos, atualmente, há atenção especial em substâncias naturais que possuem propriedades antioxidantes. Os compostos fenólicos são conhecidos como potentes antioxidantes, podendo agir como redutores de oxigênio singlete, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais (SATUÉ-GARCIA et al., 1997; HOPIA e HEINONEM, 1999). Os compostos antioxidantes estão naturalmente presentes nas frutas e vegetais e muitas delas apresentam grandes concentrações.

Entre os antioxidantes naturais mais utilizados na indústria de alimentícia e os mais estudados estão os a-tocoferóis, os ácidos fenólicos, o ácido caféico, o ácido gálico e o ácido elágico. Esses compostos podem inibir o processo de peroxidação lipídica (HALLIWELL et al., 1995).

Como exemplo, a estrutura genérica de um ácido fenólico está representada na Figura 15. A presença de um anel benzênico, de um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila, são responsáveis pela propriedade antioxidante desses compostos. Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação de processos oxidativos (SHAHIDE, 1996; SOARES, 2002).

Figura 15: Estrutura de um ácido fenólico.

Fonte: (adaptado de RAMALHO e JORGE, 2006).

Visando a substituição dos antioxidantes sintéticos, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para determinar a capacidade e a eficiências dos antioxidantes naturais. Dentre os compostos fenólicos, os mais ativos e mais facilmente encontrados estão os flavonoides, e sua capacidade antioxidante está relacionada com a sua capacidade de sequestrar os radicais livres. Dentre os flavonoides mais estudados estão a miricetina, a rutina, a naringenina e a quercetina (GASPAR et al., 1993; BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Os flavonoides possuem uma estrutura básica formada por C6-C3-C6, o difenil propano (Figura 16), sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal (BRAVO, 1998).

Figura 16: Estrutura química dos flavonoides.

Fonte: (Rice-Evans Miller e Paganda 1996).

Os flavonoides são classificados em flavanóis, flavanonas, flavonóis, flavonas e antocianidinas, e são encontrados em diversos vegetais como os apresentados na Tabela 4:

Tabela 4: Classificação e fontes de flavonoides.

CLASSES	NOME	FONTE
FLAVANÓIS	Epicatequina	Chás verde e preto, uvas, vinho tinto
	Catequina	
	Epigallocatequina	
	Epicatequina galato	
FLAVANONAS	Naringina	Casca de frutas cítricas e Frutas cítricas
	Taxofolina	
FLAVONÓIS	Canferol	Brócolis, chá preto, alho-poró, rabanete, cebola, alface, casca de maçã, cerejas, uvas
	Quercetina	
	Mirecetina	
FLAVONAS	Crisina	Casca de frutas, aipo, salsa
	Apigenina	
ANTOCIANIDINAS	Malvidina	Uvas roxas, morangos, cerejas, frutas de casca coloridas
	Cianidina	
	Apigenidina	

Fonte: (Rice-Evans Miller e Paganda 1996).

2.12 Métodos de avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Recentemente o interesse de pesquisadores da área nutricional, médica, bem como da ciência e tecnologia de alimentos, bem como do público em geral, tem aumentado em relação ao conhecimento acerca da composição e ação antioxidante dos alimentos que são consumidos. Entretanto, a concretização dessa busca é muitas vezes inviável, além de custosa, devido à complexidade da composição dos alimentos e da dificuldade em estudar separadamente cada substância antioxidante neles existente (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Com tais objetivos, diferentes métodos vêm sendo estudados e aperfeiçoados com o intuito de facilitar o mecanismo de ação dos antioxidantes que são largamente consumidos diariamente e revelar a real ação.

Os testes para medir a atividade antioxidante são realizados com base em reações químicas, mas podem não ser totalmente condizentes com situações reais, uma vez que são realizados a partir de ensaios *in vitro* (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Em alimentos, a busca pela determinação da atividade antioxidante torna-se cada vez mais importante nas áreas de tecnologia e de nutrição. Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a selecionar substâncias potencialmente interessantes para diversas aplicações, tais como em produtos que perdem qualidade pelo fato de ser alvo dos danos da oxidação lipídica.

Os métodos para a determinação da atividade antioxidante de produtos naturais são adequados quando associado a outros métodos. Dentre os mais utilizados estão o ABTS, DPPH, FRAP e Folin-Ciocalteu (OZGEN et al., 2006). Os métodos ABTS e DPPH são largamente empregados devido a sua praticidade (ESPIN et al., 2000).

✓ Atividade antioxidante pelo método ABTS⁺

O método do ABTS⁺ (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)) é muito utilizado para a determinação da atividade antioxidante. Este método é um dos mais rápidos e que oferece resultados reprodutíveis, além de outras vantagens, como por exemplo, oferecer máximos de absorção e uma boa solubilidade, permitindo análises de compostos tanto de natureza lipofílica como hidrofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

O método baseia-se na geração do ABTS⁺, de cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com perssulfato de potássio que possui absorção máxima entre 645, 734 e 815 nm (RE et al., 1999). O mecanismo da reação deste método está representado na Figura 17. Com a adição de um antioxidante ocorre a redução do ABTS⁺ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional. Com o aumento da perda de cor, a porcentagem de inibição do ABTS⁺ é determinada em função do Trolox, um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante. O método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais.

Figura 17: Redução do ABTS⁺ por um antioxidante e sua formação pelo perssulfato de potássio.

Fonte: (adaptado de MOON; SHIBAMOTO, 2009).

✓ **Atividade sequestrante do radical livre DPPH•**

O DPPH• (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, que possui coloração púrpura escura e faixa de absorção máxima entre 515-520 nm; O método da atividade sequestrante do radical DPPH• é um método colorimétrico rápido e eficaz para estimar a atividade antiradicalar. Neste método a atividade antioxidante é determinada e monitorada através do decréscimo da absorbância durante a reação entre o agente antioxidante e o radical DPPH• (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

A estrutura química e o mecanismo da reação entre o radical DPPH e um antioxidante está representado na Figura 18.

Figura 18: Estrutura química do DPPH• e mecanismo de reação com um antioxidante.

Fonte: (MOLYNEUX, 2004)

A reação acontece através da mudança de cor o radical DPPH• (violeta) adquire coloração amarela após ser reduzido. Um átomo de hidrogênio ou elétron presente na substância antioxidante reage o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio do DPPH• diminuindo a intensidade de absorção causando alteração de cor. Este método é considerado um método fácil e rápido para avaliar a atividade de substâncias antioxidantes (SHARMA; BHAT, 2009).

Os resultados dos testes realizados com o radical livre DPPH• podem ser apresentados de várias maneiras, como por exemplo, na determinação do valor do parâmetro EC₅₀, que é um dos mais utilizados, cujo valor representa a quantidade de um antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração de DPPH• inicial (SIDDHURAJU; MANIAN, 2007; LIM; LIM; TEE, 2007; LIU et al., 2008). Outra maneira de expressar a capacidade antioxidante é através da atividade de sequestro de radical (%) (BROINIZIL et al., 2007; ATMANI et al., 2009) de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Atividade de sequestro de radical (\%)} = \left(\frac{(\text{absorbância do controle} - \text{absorbância do composto})}{\text{absorbância do branco}} \right) \times 100$$

O método da atividade sequestrante do radical DPPH• se mostra bastante útil em uma série de investigações, tais como a determinação das propriedades de aminas, fenóis ou compostos naturais (vitaminas, extratos vegetais, medicamento) (VEDANA, 2008).

Dentre as vantagens deste método podemos citar: a capacidade de avaliar uma grande quantidade de amostras em um período curto de tempo; possuir alta sensibilidade e detectar pequenas concentrações do ativo testado; permite avaliar antioxidantes lipofílicos, já que o solvente do processo é o metanol ou etanol (VEDANA, 2008).

✓ Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro – FRAP

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) se baseia em reações de transferência de elétrons. A reação ocorre através da formação de um complexo TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) com o Fe (III), de cor amarela. Na presença de um antioxidante, o ferro presente é reduzido, dando origem ao complexo $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{3+}$, de coloração azul escura. O mecanismo desta reação está apresentado na Figura 19. A reação acontece em pH de 3,6 e a absorbância máxima é de 593 nm. Os valores de pH têm efeito importante na redução da capacidade de antioxidantes; em condições ácidas, a redução da capacidade pode ser diminuída devido à protonação com compostos antioxidantes, enquanto que em meio básico, ocorre a dissociação de prótons de compostos fenólicos que pode aumentar a capacidade de reduzir uma amostra (HUNG; OU; PRIOR, 2005).

Figura 19: Redução do Fe(III) a Fe(II) pela ação de um antioxidante.

Fonte: (adaptado de HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Uma das desvantagens deste método consiste no fato de que a capacidade de redução obtida não reflete necessariamente na atividade antioxidante da amostra, visto que se trata de um método indireto. Como o método não inclui um substrato oxidável, ou seja, uma degradação oxidativa real, não há informações fornecidas sobre as propriedades dos antioxidantes (ROGINSKY; LISSI, 2005).

✓ **Quantificação de fenólicos totais**

O método de Folin-Ciocalteu é um dos mais antigos ensaios de quantificação de fenóis em uma amostra, conhecido também como método de quantificação de fenólicos totais, sendo o mecanismo básico envolvido no processo uma reação de oxirredução (SINGLETON et al., 1999).

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstico, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI), resultando na cor amarela do complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Na presença de certos agentes redutores, tais como os compostos fenólicos, formam-se os complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$, nos quais o estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (DE OLIVEIRA, 2009).

A reação baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico-fosfotungstico pelas hidroxilas fenólicas, originando óxidos azuis de tungstênio (W_8O_{23}) e de molibdênio (Mo_8O_{23}), um complexo que absorve no comprimento de onda de 760 nm. A reação ocorre em meio alcalino e a solução de Na_2CO_3 é a base mais indicada. O grupo fenólico deve estar na forma de fenolato para que os ânions produzam a oxidação (MOYER et al., 2002).

O mecanismo de reação entre o ácido gálico e o molibdênio (reação de Folin-Ciocalteu) está representado na Figura 20. A desprotonação dos compostos fenólicos (no exemplo, o padrão ácido gálico) em meio básico gera os ânions (carboxilado). A partir daí, ocorre uma reação de oxi-redução entre o ânion e o reagente de Folin, na qual o molibdênio, componente do reagente de Folin, sofre redução e a meio reacional muda de coloração amarela para azul.

Figura 20: Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.

Fonte: (adaptado de DE OLIVEIRA et al., 2009).

Uma das desvantagens deste método é que pode ocorrer superestimação do conteúdo fenólico, em larga extensão. Vários interferentes não-fenólicos são conhecidos, como, por exemplo, a vitamina C (DE OLIVEIRA et al., 2009). No entanto, apesar de algumas desvantagens, o método de Folin-Ciocalteu é amplamente utilizado em pesquisa de produtos naturais antioxidantes, porque é simples, satisfatoriamente sensível e preciso.

2.13 Quercetina: estrutura química, atividade antioxidante e desafios tecnológicos para sua utilização como ingrediente alimentício

A quercetina, ou (3,3',4',5,7)-pentahidroxi-flavona, é um flavonoide encontrado na sua forma glicosilada e em grandes concentrações na cebola (284-486 mg/ kg), na couve (100 mg/kg) e na maçã (21-72 mg/ kg), por exemplo (PISKULA et al., 2012). Sua fórmula estrutural está mostrada na Figura 21.

Figura 21: Estrutura molecular da quercetina.

(Fonte: PISKULA et al., 2012).

Os flavonoides são antioxidantes naturais, como já citado anteriormente neste texto, e são eficientes devido à suas propriedades sequestrantes de radicais livres, bem por terem a capacidade de quelar íons metálicos (KANDASWAMI e MIDDLETON, 1994), protegendo assim os tecidos dos radicais livres e da oxidação lipídica. Particularmente, a quercetina sequestra radicais de oxigênio e inibe a ação da xantina oxidase e a oxidação lipídica. A quercetina é conhecida também por suas propriedades quelante e estabilizadora do ferro (SORATA et al., 1984).

Em 2010, a *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) concedeu à quercetina com uma pureza de 99,5% (QU995TM) o status de ingrediente *generally recognized as safe* (GRAS). Como consequência, a quercetina tem atraído a atenção de pesquisadores na área de alimentos (WANG et al., 2016; PETERSEN et al., 2016). Porém, um dos problemas da incorporação da quercetina em formulações alimentícias está relacionado à sua relativa hidrofobicidade ($\log P = 1,99$ de acordo com McCLEMENTS (2012)), baixa solubilidade em água, bem como da instabilidade sob diversas condições de processamento de alimentos e de estocagem, tais como estresses térmicos, exposição à luz e mudanças de pH, já que estas são usualmente aplicadas em base aquosa. Sendo assim, estes fatores limitam a aplicação em alimentos funcionais diminuindo os benefícios para a saúde humana (POOL et al., 2012).

No entanto, essas limitações podem ser superadas pela incorporação dessas substâncias em estruturas nanoemulsionadas, pois sabe-se que melhoram sua biodisponibilidade e faz com que resistam a degradação sob os fatores mencionados anteriormente (WANG et al., 2016; KHALID et al., 2016; LI et al., 2009; YUAN et al., 2006). Para viabilizar tal processo de incorporação de forma eficiente, é necessário estruturar sistemas de encapsulação que sejam capazes de incorporar as moléculas de interesse e, portanto, que possuam uma região hidrofóbica capaz de mantê-la encapsulada e, ao mesmo tempo, serem estruturas dispersíveis em meios aquosos. Neste sentido, a incorporação de tais bioativos em sistemas nanoemulsionados mostra-se como uma alternativa viável e interessante.

2.14 Carne de Frango e Patê de Frango

A produção brasileira de carne de frango teve um rápido desenvolvimento e elevou a posição do Brasil como um dos principais produtores mundiais. A produção passou de 7,05 milhões de toneladas, em 2002, para 12,75 milhões de toneladas, em 2014. Tal fato

representa ao longo do período, uma taxa média anual de crescimento de 15% ao ano (ABEF, 2015).

Segundo Triches (2004), o consumo da carne de frango está relacionado a quatro fatores básicos: i) a substituição das carnes vermelhas, em decorrência principalmente da crescente preocupação com saúde; ii) melhor capacidade de coordenação da cadeia agroindustrial do frango, aliado ao baixo preço relativo às outras carnes, além de constatar desenvolvimento de novos produtos e marcas; iii) grande aceitação da carne de frango pela maioria da população, e iv) crescentes ganhos de produtividade na indústria da carne de frango em relação das melhorias tecnológicas.

A carne de frango tem sido intensamente consumida mundialmente durante as últimas décadas (MAGDELAINE et al., 2008; LEE et al., 2008; LIU e NIU, 2008). No entanto, os consumidores estão cada vez mais exigindo qualidade e inocuidade dos produtos alimentícios que adquirem presando por informações a respeito da maneira como são tratados os animais para abate, como são alimentados, e quais substâncias são ingeridas pelos animais (FRANCISCO et al., 2007).

É interessante ressaltar que a carne de frango pode ser aproveitada integralmente a partir do consumo dos cortes descritos a seguir:

1. Asas: no Brasil é comercializada inteira, ou em partes, tais como, coxinhas da asa e meio das asas.
2. Peito: é a porção mais nobre do frango por possuir cor atraente e ser bastante utilizado na culinária requintada e em pratos de uma alimentação saudável, podendo ser consumido e comercializado inteiro, com osso e com pele e/ou e também em forma de filé.
3. Coxas com sobrecoxas: o corte é feito manualmente, são comercializados inteiros ou em cortes, resultando em coxas e sobrecoxas separadamente.
4. Outras partes e miúdos: o frango oferece outras partes apreciadas pelo consumidor e/ou que apresentam importância para a fabricação dos produtos industrializados. Dentre os produtos fabricados com os miúdos do frango, pode-se destacar o patê, que possui na sua composição fígado e gordura subcutânea do animal.

O Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal define como pasta, ou patê, o produto cárneo industrializado obtido a partir de carnes ou produtos cárneos (incluindo miúdos comestíveis), das diferentes espécies de animais comercializados e transformados em pasta, adicionado de ingredientes e submetido a um processamento

térmico adequado. O patê é um produto cozido, com tradições gastronômicas importantes e com propriedades sensoriais bastante apreciadas.

Novos produtos são constantemente lançados recentemente no mercado, aumentando a variedade de produtos cárneos emulsionados, tais como os patês. As emulsões cárneas são do tipo óleo em água, constituindo um sistema de duas fases. A fase dispersa é constituída por partículas de gordura sólida ou líquida, e a fase contínua é formada por água e proteínas solúveis formando uma matriz que encapsula os glóbulos de gordura, no qual as proteínas da carne atuam como emulsificantes. Em emulsões cárneas, a fase contínua não é simplesmente a água, mas sim um sistema coloidal complexo cujas propriedades são determinadas por macromoléculas de proteínas.

Segundo Schiffner et al., a quantidade ótima de gordura em um patê deve estar compreendida entre 20 e 60%, sendo que em concentrações maiores ou menores influenciam a qualidade final do produto. Um patê com menos de 20% de gordura perde sua untuosidade (característica gordurosa) e se resseca, ficando com um aspecto repulsivo ao ser embutido, e ao ressecar-se, adquire uma camada externa cinzenta. No entanto, se este contém gordura suficiente e distribuída corretamente evita-se a perda de água e o patê resiste a longos períodos de conservação sem se deteriorar.

Por possuírem grande quantidade de gordura na sua composição, os patês são altamente afetados pela oxidação lipídica e dessa forma a qualidade do produto pode ser comprometida durante sua armazenagem, sendo que uma curta vida de prateleira após abertos é característica marcante de tais produtos.

A oxidação lipídica é o principal processo no qual ocorre à perda de qualidade da carne e seus derivados, seguido da deterioração microbiana e alterações de cor (LORENZO et al., 2014). Os processos oxidativos em carnes de frango e nos demais produtos cárneos são intensos devido à grande porcentagem de gordura insaturada presentes nesses produtos, sendo que durante o armazenamento podem acarretar na degradação dos pigmentos e proteínas, causando a alteração de sabor, textura, cor e valor nutricional desses produtos (RODRÍGUEZ CARPENA et al., 2011). A aceitabilidade dos consumidores frente a produtos que sofreram mudanças de cor é um fator importante para a aceitabilidade de carne e seus derivados (LORENZO et al., 2014).

Outra desvantagem que a oxidação lipídica acarreta é a alteração significativa das propriedades sensoriais, visto que ocorre o desenvolvimento de *off-flavors* e a

produção de compostos potencialmente tóxicos, tais como de peróxidos de ácidos graxos, hidroperóxidos de colesterol e os radicais peroxi (JAKOBSEN e BERTELSEN, 2000). A oxidação de duplas ligações insaturáveis em ácidos graxos poli-insaturados produz compostos oxidantes secundários, tais como hexanal, pentanal, heptanal e octanal os quais são responsáveis pela deterioração da qualidade e representam riscos para a saúde, incluindo a carcinogênese (ARABSHAHI-D et al., 2007; GRÜN et al., 2006).

O patê é um produto cárneo derivado do frango altamente susceptível à oxidação lipídica e com vida de prateleira muito curta (ESTÉVEZ et al., 2007). Este produto é fabricado mundialmente e é considerado um produto popular e de fácil acesso econômico (DELGADO-PANDO et al., 2011). O patê de frango é constituído basicamente por fígado de frango, gordura e carne misturados com água e diferentes aditivos, o qual é embalado em recipiente de vidro e tratado termicamente (LORENZO e PATEIRO, 2013).

Os produtos cárneos cozidos como o patê são mais susceptíveis à oxidação em relação à carne fresca, devido à interação facilitada entre os ácidos graxos livres e oxigênio na presença de catalisadores, tais como calor e metaloproteínas (MORRISSEY et al., 1998). Por isso, a utilização de antioxidantes se torna uma das principais estratégias para prevenir oxidação lipídica e pode ser eficaz no controle e na redução da oxidação nos produtos à base de carne (PETERSEN et al., 2016). Porém, devido ao fato de antioxidantes sintéticos, como BHT e BHA, constituírem um perigo potencial para a saúde para os consumidores, o interesse em antioxidantes naturais, como flavonoides, e a pesquisa sobre outros compostos naturais com atividade antioxidante tem aumentado nos últimos anos (WANG et al., 2016; KHALID et al., 2016).

Além de ser um produto altamente oxidável, o patê possui uma curtíssima vida de prateleira após aberto (em média 4 dias), pois apesar de serem tratados para reduzir ou eliminar a microbiota normal, podem depois ser contaminados por bactérias pós-tratamento, como por exemplo, através de equipamentos e utensílios. A vida de prateleira muito curta é devida, portanto, tanto aos efeitos danosos da presença de oxigênio como também de eventual contaminação microbiana devido à manipulação inadequada, ou mesmo pela manipulação do consumidor.

Diante do exposto na Revisão Bibliográfica, o presente trabalho teve como objetivos determinar as condições de produção de nanoemulsões pelo método EIP, avaliar a atividade antioxidante da quercetina encapsulada em nanoemulsões e

incorporar as nanodispersões em patê de frango buscando evitar a oxidação lipídica deste alimento, e, desta forma, viabilizar este flavonoide como um possível substituinte dos antioxidantes sintéticos empregados atualmente nos alimentos.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral da presente Dissertação de Mestrado foi a produção e caracterização de nanoemulsões, obtidas pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP – *emulsion inversion point*), encapsulando quercetina, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* das nanodispersões, bem como após incorporação em produto cárneo (patê de frango).

Para alcançar o objetivo geral descrito, os seguintes objetivos específicos foram realizados:

- Determinação das condições de processo para obtenção de nanoemulsões pelo método do ponto de inversão da emulsão, com dois tensoativos diferentes (Tween 80 e Brij 30);
- Caracterização físico-química das nanoemulsões produzidas;
- Avaliação da estabilidade das nanoemulsões ao longo do tempo de estocagem;
- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* da quercetina nanoemulsionada;
- Avaliação da atividade antioxidante lipídica e proteica da quercetina nanoemulsionada após incorporação em patê de frango;
- Incorporação da nanoemulsão contendo quercetina encapsulada em patê de frango, caracterização físico-química do produto, e avaliação da aceitação do patê de frango por meio de avaliação sensorial ao longo do tempo de armazenagem.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Um dos objetivos principais desta Dissertação de Mestrado foi definir os parâmetros de produção das nanoemulsões encapsulando quercetina tanto com o polisorbato 80 (Tween 80) quanto com o tensoativo dodecil éter de polioetilenoglicol (Brij 30). No caso do Tween 80, foram utilizadas como ponto de partida as condições de processo obtidas por Borrin et al. (2016), em trabalho anterior do grupo de pesquisa. Já no caso do tensoativo Brij 30, foi necessário avaliar os parâmetros SOR (razão tensoativo/óleo), concentração de fase oleosa e intensidade de agitação, de modo a se obter nanoemulsões estáveis (em relação ao diâmetro médio hidrodinâmico) ao longo do período de armazenamento.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Produção das nanoemulsões

Na produção das nanoemulsões foi utilizado como fase oleosa o óleo de girassol comercial (Liza) produzido por Cargill (Mairinque, SP, Brasil). Os tensoativos testados foram o polisorbato 80 (Tween 80, Synth, Diadema, SP, Brasil) e o dodecil éter de polioetilenoglicol (Brij 30, CAS 9002-92-0, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ambos permitidos para uso em alimentos. Como co-solvente foi testado o glicerol (Synth, Diadema, SP, Brasil). A quercetina (CAS 849061-97-8, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como bioativo a ser encapsulado. Água deionizada, obtida de um sistema de ultrapurificação (Direct Q3, Billerica, MA, EUA) foi utilizada nos experimentos.

4.1.2 Determinação da eficiência de encapsulação

A determinação da eficiência de encapsulação foi realizada utilizando-se etanol absoluto p.a. (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) e membranas para centrifugação (Amicon® Ultra – Ultracel 30 kDa, Millipore, Billerica, MA, EUA). Já para a determinação da concentração de quercetina, foi utilizado o solvente dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, Diadema, SP, Brasil) e membranas de 0,45 µm (Millex LCR, Millipore, Billerica, MA, EUA).

4.1.3 Determinação de atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante das nanoemulsões foi determinada *in vitro* pelos métodos DPPH e fenólicos Totais. Para o método de sequestro de radicais DPPH foram utilizados os seguintes reagentes: reagente DPPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e etanol (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil). Para o método de Folin- Ciocalteu foram necessários: ácido gálico (Acros Organics, New Jersey, NJ, EUA) e reagente Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Alemanha).

4.1.4 Produção e caracterização do patê de frango

Para a produção do patê de frango, utilizou-se gordura subcutânea de frango, carne magra, e fígado de frango os quais foram obtidos do abatedouro (Avícola Finardi, Araras, SP, Brasil), além de água, sal refinado, margarina sem sal, maltodextrina (MOR-REX® 1920 Ingredion, Mogi-Guaçu, SP, Brasil), goma xantana (Grindsted 80®, Du Pont, Cotia, SP, Brasil), cebola e alho desidratado. O antioxidante BHT (hidroxitolueno butilado), nitrito de sódio e ácido láctico foram obtidos da Synth (Diadema, SP, Brasil).

4.1.5 Determinação da oxidação lipídica

Para a quantificação do índice de peróxido empregou-se sulfato de sódio anidro (Synth, Diadema, SP, Brasil), ácido acético, iodeto de potássio, tiosulfato de sódio, dicromato de potássio, ácido clorídrico, amido solúvel p.a., clorofórmio e metanol obtidos da Dinâmica (Diadema, SP, Brasil).

Para determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), foram utilizados ácido tricloroacético (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil), ácido tiobarbitúrico (J.T. Baker® Chemical Co. Phillipsburg, NJ, EUA), 1,1-3,3 tetraetoxihipropano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e sulfanilamida (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil).

4.1.6 Determinação de oxidação proteica

Para quantificação de carbonilas totais, utilizou-se cloreto de potássio (Synth, Diadema, SP, Brasil), ácido tricloroacético (TCA), ácido clorídrico (pureza 36,5 – 38%) 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), acetato de etila, etanol anidro (pureza 99,5%) obtidos da Dinâmica (Diadema, SP, Brasil), fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico obtidos da Synth (Diadema, SP, Brasil), guanidina HCl (Sigma-Aldrich,

St. Louis, MO, EUA), albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Produção das nanoemulsões encapsulando quercetina pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP)

O método empregado na produção das nanoemulsões foi o método de inversão de fase catastrófica, denominado ponto de inversão da emulsão (EIP), em que as nanoemulsões são produzidas a partir da adição gradual da fase aquosa na fase oleosa, que está misturada com um tensoativo hidrofílico. A fase oleosa consistiu de óleo de girassol e tensoativo (Tween 80 ou Brij 30) e a fase aquosa de água deionizada e glicerol (este somente no caso das nanoemulsões produzidas com Tween 80).

A metodologia para produção das nanoemulsões foi adaptada de Borrin et al. (2016). A fase oleosa (contendo óleo de girassol + tensoativo + quercetina) foi primeiramente agitada magneticamente (MA 089, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) por 15 minutos, e a seguir a fase aquosa foi adicionada na fase oleosa utilizando-se uma vazão de 12 ml/min utilizando-se uma bomba peristáltica (Masterflex Easy-Load II, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA); enquanto esta mistura se mantinha sob agitação por meio de agitador mecânico (MA 259, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) com impelidor tipo âncora com 5 cm de diâmetro, com intensidade de agitação de 500 rpm. Após a obtenção da emulsão esta foi mantida sob agitação mecânica (utilizando um agitador tipo âncora) por 30 minutos. A Figura 22 mostra esquematicamente o processo de produção das nanoemulsões utilizado:

Figura 22: Esquematização do processamento para produção das nanoemulsões pelo método ponto de inversão da emulsão.

Fonte: (adaptado de Borrin, 2015).

Para a produção das nanoemulsões contendo o tensoativo Tween 80 a concentração de glicerol (cosolvente) foi fixada em 20% e a concentração de óleo de girassol também foi de 20 % (m/m) com SOR (tensoativo/óleo) igual a 1,25.

4.2.2 Definição da razão tensoativo/óleo (SOR, *surfactant/oil ratio*) para a produção das nanoemulsões utilizando o tensoativo Brij 30

O primeiro parâmetro de processo estudado para a produção das nanoemulsões pelo método EIP foi a razão tensoativo/óleo (SOR). Para estes testes a concentração de óleo foi fixada em 20 % (m/m) e o impelidor utilizado foi do tipo âncora, com velocidade de agitação de 300 a 500 rpm e vazão de 12 mL/min. As emulsões foram deixadas em repouso por 24 horas e após este tempo foram avaliadas visualmente. A Tabela 5 mostra os valores testados para definição do SOR para o tensoativo Brij 30.

Tabela 5: Formulações testadas para definição da relação SOR para o tensoativo Brij 30 (% mássicas)

SOR	Tensoativo Brij 30 (%)	Óleo de Girassol (%)	Água (%)	SOR	Tensoativo Brij 30 (%)	Óleo de Girassol (%)	Água (%)
0,50	4,0	8,0	88,0	1,50	12,0	8,0	80,0
	5,0	10,0	85,0		15,0	10,0	75,0
	7,5	15,0	77,5		23,0	15,0	62,0
	8,0	16,0	76,0		24,0	16,0	60,0
	10,0	20,0	70,0		30,0	20,0	50,0
0,75	6,0	8,0	86,0	1,75	14,0	8,0	78,0
	7,5	10,0	82,5		17,5	10,0	72,5
	11,2	15,0	73,8		26,0	15,0	59,0
	12,0	16,0	72,0		24,0	16,0	60,0
	15,0	20,0	65,0		35,0	20,0	45,0
1,0	8,0	8,0	84,0	2,0	16,0	8,0	76,0
	10,0	10,0	80,0		20,0	10,0	70,0
	15,0	15,0	70,0		30,0	15,0	55,0
	16,0	16,0	68,0		32,0	16,0	52,0
	20,0	20,0	60,0		40,0	20,0	40,0
1,25	10,0	8,0	82,0				
	12,5	10,0	77,5				
	18,4	15,0	66,6				
	20,0	16,0	64,0				
	25,0	20,0	55,0				

Fonte: (Própria autoria).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

4.3.1 Determinação de diâmetro médio e distribuição de tamanho de gota

As medidas de tamanho de partícula, de distribuição de tamanho de partícula e da polidispersidade das nanoemulsões foram realizadas por espalhamento de luz quasi-elástico em equipamento Zeta Plus (Brookhaven Instruments Company, Holtsville, NY, EUA). O laser empregado foi de He-Ne com comprimento de onda de 627 nm, com ângulo de incidência de 90° e à temperatura de 25° C. Antes da análise as amostras foram diluídas com água deionizada para evitar o espalhamento múltiplo de luz. As análises de dados foram realizadas pelo software incluso no sistema (90Plus).

Para cada medida foram feitas dez corridas, fornecendo como resultado uma média do diâmetro hidrodinâmico e a distribuição de tamanho de gotículas encontrado em toda a amostra.

4.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação de quercetina

Foram adicionados 10 mL de cada uma das amostras em tubos de ensaio de 15 mL com membranas de ultrafiltração de massa molar de corte de 100 kDa.. As amostras foram submetidas à centrifugação por 30 minutos a 6000 rpm e 4°C. Os ultrafiltrados obtidos contendo a quercetina não-encapsulada foram coletados, diluídos na proporção de 1:20 em etanol e, em seguida, foram feitas as leituras de absorbância por espectrofotometria utilizando-se o comprimento de onda de 373 nm (LI et al., 2009). Para quantificação da quercetina, foi construída uma curva padrão para determinação da concentração do flavonoide em etanol anidro, com concentrações variando de 0 a 3 µg/mL.

4.3.3 Determinação do ponto de inversão da emulsão

As medidas de condutividade elétrica durante a inversão de fases, ou seja, enquanto ocorre a adição da fase aquosa na fase oleosa, foi feita utilizando-se condutivímetro aferido com solução padrão de KCl 0,1M, na temperatura de 25° C, em duplicata (Borrin et al., 2016).

4.3.4 Análises reológicas

Os testes reológicos das nanoemulsões foram realizados no reômetro rotacional (AR 2000, TA Instruments, New Castle, DE, EUA) e o software Rheology Advantage (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). A geometria utilizada foi a cone-placa (ângulo do cone de 2°, 60 mm de diâmetro e cilindros concêntricos de 15 mm de diâmetro). O período de relaxação das amostras antes do início do processo foi de 2 min. As curvas de escoamento foram obtidas através da taxa de deformação de 0,01 a 100 s⁻¹ (curva ascendente) e de 100 s⁻¹ a 0,01 s⁻¹ (curva descendente). Os dados experimentais foram ajustados a um modelo Lei da Potência de acordo com a Equação (1) (Borrin et al., 2016):

$$\sigma = K\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

em que: K é o índice de consistência (Pa.sn); σ é a tensão de cisalhamento (Pa); $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação (s⁻¹); e, n é o índice de comportamento de fluxo (adimensional). Os resultados serão analisados usando o software de análise de dados Advantage V.5.3.1 Reologia (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). As nanoemulsões foram analisadas a temperatura ambiente e o patê em 5° C. O módulo de armazenamento (G') foi obtido a 1 Hz fixo, o qual foi escolhido pela varredura de deformação no intervalo de viscoelasticidade de acordo com Borrin et al. (2016).

4.3.5 Determinação da tensão interfacial

O equipamento utilizado para a determinação da tensão superficial dinâmica foi um tensiômetro automático, modelo OCA-20 (Dataphysics Germany, Filderstadt, Alemanha) (sistema de medidas dinâmicas), no qual a tensão das dispersões (tensoativo em água e tensoativo com quercetina em água) foi determinada pelo método da gota pendente. A imagem da gota formada em seringa até o termostato óptico foi capturada usando uma câmera CCD, que através da captura da imagem analisa o formato da gota por assimetria de eixos (ADSA - *axisymmetric drop shape analysis*), estas análises foram realizadas no Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Coloides da USP de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP). Todos os ensaios foram conduzidos a 25 °C.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DAS NANOEMULSÕES

4.4.1 Teor de fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais foi realizada de acordo com Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999), utilizando-se 15 µL da amostra adicionados a 7,5 mL de água destilada e 0,30 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 min à temperatura ambiente, foram adicionados 1,0 mL de solução saturada de carbonato de sódio e 1,1 mL de água, os tubos foram colocados em banho a 37 °C durante 30 min para desenvolvimento de cor. A absorbância a 750 nm foi determinada em espectrofotômetro (DR 2800, Hach, Loveland, CO, EUA) e o conteúdo de fenólicos totais foi calculado utilizando-se curva-padrão de ácido gálico (Acros Organics, New Jersey, NJ, EUA). Os resultados obtidos foram expressos como mg equivalente de ácido gálico/grama de amostra.

4.4.2 Método DPPH•

A atividade antioxidante foi determinada medindo-se a capacidade de sequestro do radical DPPH• de acordo com Brand-Williams et al. (1995), com algumas modificações. Uma alíquota de 15 µL da amostra e 1985 µL de uma solução etanólica de DPPH• (0,5 mM) foram misturadas e após 1 h (tempo necessário para estabilizar a solução) a 25 °C no escuro, a absorbância foi lida no comprimento de onda de 517 nm em espectrofotômetro Libra S22 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido). A capacidade sequestrante de radicais DPPH• foi expressa através do decaimento da porcentagem da atividade antioxidante de DPPH•.

4.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DAS NANOEMULSÕES ENCAPSULANDO QUERCETINA EM PATÊ DE FRANGO

4.5.1 Formulação e produção do patê de frango

As amostras de patê de frango foram produzidas na Planta Piloto de Processamento de Alimentos, instalada na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP). O protocolo de produção do patê de frango foi realizado de acordo com Moraes-Lovison et al. (2017). No início do processo produtivo, a carne

magra e o fígado foram picados em cubos pequenos e posteriormente, a carne foi submetida a um processo de escaldagem, a 65° C por 10 min, e o fígado foi frito por aproximadamente por 5 min. A gordura foi triturada, peneirada e, posteriormente, aquecida por 5 min. Após atingirem temperatura ambiente, estes produtos foram colocados em um liquidificador, ao qual foram adicionados os outros ingredientes e então, submetidos ao processo de homogeneização.

A formulação para a produção da base de patê de frango foi determinada de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2000), a qual determina que o patê deve conter no mínimo 30% da matéria-prima que o designe, no caso a carne de frango, e também estabelece como ingredientes obrigatórios o sal e o nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio. Portanto, a formulação da base de patê foi a seguinte: 40% de carne magra de frango, 10% de fígado de frango, 10% de gordura subcutânea, 21% de água fria, 10% de margarina, 5% de maltodextrina, 2% de sal cloreto de sódio, 1% de goma xantana, 0,8% de cebola desidratada e 0,2% de alho desidratado. Após a preparação desta base de patê, foi adicionado acidulante ácido láctico com o objetivo de reduzir o pH com a finalidade de inibir o crescimento de *Clostridium botulinum* durante o armazenamento do produto, uma vez que o patê de frango embalado em condições de anaerobiose é um excelente meio de crescimento para esta bactéria.

Após a obtenção da base de patê, esta mistura foi dividida em 5 lotes, sendo que cada um deles receberá um tipo de tratamento (de acordo com a Tabela 6). Após esta etapa, as massas de patê foram embaladas em recipientes de 100 e 200 g e, em seguida, estas amostras foram submetidas a tratamento térmico por imersão em água a 80° C por 30 minutos. Após atingir temperatura ambiente, os recipientes foram armazenados sob refrigeração entre 7 a 10° C.

Tabela 6: Descrição dos tratamentos aplicados à base de patê de frango produzida.

Tratamentos	Descrição
1	Base de patê pura (sem nanoemulsão e sem aditivos)
2	Adição do antioxidante sintético (BHT, 100 mg/kg) e nitrito de sódio (150 mg/kg)*
3	Nanoemulsões encapsulando quercetina produzidas com Tween 80
4	Nanoemulsões encapsulando quercetina produzidas com Brij 30
5	Quercetina livre

* Valor máximo de adição de BHT e nitrito de sódio permitido pela legislação brasileira (BRASIL, 2006).

4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL DO PATÊ DE FRANGO

4.6.1 Estabilidade físico-química do patê de frango durante o armazenamento

As análises de pH, colorimetria, índice de peróxido, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quantificação de carbonilas foram realizadas, em triplicata, durante o armazenamento (semanas 1, 3, 5, 7, 10, 13, 16 e 24) das amostras de patê de frango estocadas sob refrigeração.

4.6.2 Determinação de pH

Os valores de pH foram medidos em triplicata, utilizando pHmetro (UltraBasic pH Meter, Denver Instruments, Arvada, CO, EUA) com eletrodo de punção em contato direto com as amostras, segundo Trindade et al. (2008). Estas análises foram realizadas nas semanas 1, 3, 5, 7, 10, 13, 16 e 24 de armazenamento, sendo que o teste foi realizado quando a amostra atingiu a temperatura ambiente de aproximadamente 25° C.

4.6.3 Oxidação dos pigmentos da cor

Os parâmetros de medição do sistema CIE L*a*b* (luminosidade: L*, teor de vermelho: a* e teor de amarelo: b*) foram determinados a partir de 3 leituras de cada

triplicata das amostras utilizando um colorímetro portátil (MiniScan XE, HunterLab, Reston, VA, EUA), com o iluminante D65, ângulo de observação de 10° e abertura de célula com 30 mm (Fernandes et al., 2014). O índice de intensidade de cor Croma (C*) e o ângulo Hue (H*) foram calculados a partir dos valores de a* e b*, de acordo com as equações a seguir:

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (3)$$

$$H^* = \arctg \left(\frac{b^*}{a^*} \right) * 57,29 \quad (4)$$

A diferença total de cor (ΔE) entre o início e o fim do armazenamento foram determinados de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta E_{(f-i)} = [(L_f - L_i)^2 + (a_f - a_i)^2 + (b_f - b_i)^2]^{1/2} \quad (5)$$

4.6.4 Determinação da oxidação proteica

O teor total de carbonilas totais foi determinado seguindo o método descrito por Oliver et al. (1987). As amostras de patê foram homogeneizadas com 20 ml de solução tampão de KCl 0,15 M, durante 60 s utilizando Ultra Turrax (IKA T-25, IKA, Alemanha). Duas alíquotas de 0,1 mL do homogeneizado foram transferidas para tubos Eppendorf, e em seguida, as proteínas foram precipitadas, em ambas alíquotas, pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10 % e centrifugação durante 5 min a 5000 g. Um sedimento foi tratado com 1 ml de solução HCl 2 M para a quantificação de proteína, e o sedimento da outra alíquota foi adicionado a 1 mL de uma solução HCl 2 M contendo 0,2 % de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) para quantificar o teor de carbonila. As amostras foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente, com agitação a cada 20 minutos. Após a incubação, foram adicionados 0,8 mL de TCA A 10 % e as amostras foram agitadas por 30 segundos e, em seguida, foram centrifugadas durante 5 minutos a 500 g. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado três vezes com 1 mL de acetato de etilo-etanol (1:1, v/v), em seguida, foram secas com Nitrogênio gasoso. Por fim, o sedimento foi dissolvido em 2 mL de guanidina-HCl 6 M em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH final 6,5), e após agitação, foi centrifugado durante 2 min a 5000g para retirar os fragmentos insolúveis. A concentração de proteína foi calculada por absorção a 280 nm, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A quantidade de carbonilas foi expressa em nmol de carbonila por miligrama de

proteína, utilizando um coeficiente de adsorção de $21,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 370 nm (LORENZO e GÓMES, 2012).

4.6.5 Avaliação da oxidação lipídica

Inicialmente, a gordura das amostras foi extraída pelo método de Bligh-Dryer (1959), no qual, foram adicionadas 25 mL de solução clorofórmio:metanol (7:3, v/v) em 7,5 g de patê de frango e, posteriormente, homogeneizadas em ultra-agitador (T-25, IKA, Staufen, Alemanha) a 16.000 rpm por 2 min. Após esta etapa, foram adicionados 10 mL de água deionizada e estas amostras foram submetidas à homogeneização nas mesmas condições. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C e 4.000 rpm (Z 306, Hermle Labortechnik, Wehingen, Alemanha) por 3 min e a fase inferior, contendo a gordura e o clorofórmio, foram retiradas. Adicionou-se 1 g de sulfato de sódio anidro e, posteriormente, as amostras foram filtradas em papel filtro, no qual foram coletados 3 mL do filtrado e submetidos à secagem em estufa a 105°C até atingir peso constante.

O índice de peróxido foi determinado de acordo com Pateiro et al. (2014). A gordura extraída da amostra foi dissolvida em 10 mL de clorofórmio, e em seguida, 15 mL de ácido acético e 1 mL de solução aquosa saturada de iodeto de potássio foram adicionados. A mistura foi agitada suavemente durante 1 min e posteriormente, mantida por 5 min em ambiente escuro. Após esta etapa, 75 mL de água destilada foram adicionadas e a amostra foi agitada novamente. O iodo liberado foi titulado com tiosulfato de sódio 0,01 M, utilizando uma solução indicadora de amido 1 %, e o índice de peróxido foi expresso em meqO₂/kg de amostra de patê de frango.

Antes de realizar a titulação, a solução de tiosulfato de sódio 0,01 M foi padronizada, e para isso, 10 mL da solução de dicromato de potássio (0,002 g/mL) foram adicionadas em 70 mL de água deionizada. Foram, então, adicionados 2 g de iodeto de potássio e 20 mL de ácido clorídrico; em seguida, esta mistura foi agitada e mantida em ambiente escuro por 10 min. Após esta etapa, foi adicionado 1 mL da solução indicadora de amido 1% e a mistura foi titulada com a solução de tiosulfato de sódio 0,01 M. O cálculo do fator de correção (f) foi realizado de acordo com a Equação 6:

$$f = \frac{m}{0,049 \times V \times M} \quad (6)$$

sendo:

m = massa de dicromato de potássio usados na titulação (g);

V = volume de solução de tiosulfato de sódio 0,01 M gastos na titulação (mL);

M = molaridade da solução de tiosulfato de sódio (0,01 M, no caso).

4.6.6 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O índice de TBARS foi medido de acordo segundo Pateiro et al. (2014), com modificações. A massa de 5 g da amostra de patê de frango foi dispersa em 10 mL de ácido tricloroacético 5% e homogeneizadas em Ultra Turrax (IKA T-25, IKA, Staufen, Alemanha) a 14.000 rpm por 2 min. O homogeneizado foi centrifugado à 4° C em 2360g (Z 306, Hermle Labortechnik, Wehingen, Alemanha) por 30 min. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de papel, no qual 5 mL do filtrado foi misturado com 5 mL de uma solução de 0,02 M de ácido tiobarbitúrico (TBA) e em seguida, colocado em banho-maria a 96° C durante 40 minutos. A absorbância foi medida a 532 nm e 600 nm (para corrigir a turbidez) e os valores do ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram calculados a partir de uma curva padrão de malonaldeído com 1,1-3,3 tetraetoxipropano. Os valores do índice de TBARS foram expressos em mg MDA/kg de amostra de patê de frango.

4.6.7 Contagem de viáveis totais, das bactérias aeróbias e de Enterobacteriaceae

Para garantir a segurança alimentar das amostras de patê de frango, que oram submetidas às análises sensoriais e para determinar a vida de prateleira do produto em termos microbilógicos, foram realizadas análises microbiológicas durante o armazenamento das amostras refrigeradas (4° C). As análises microbiológicas foram realizadas em duplicata de acordo com Delgado-Pando et al. (2012) e Lorenzo et al. (2014). As amostras de 10 g foram assepticamente pesadas e homogeneizadas com 90 mL de água estéril peptonada 0,1% em um misturador por 1 min. à temperatura ambiente. Para cada amostra, diluições seriadas decimais foram preparadas em solução peptonada 0,1% e posteriormente, 0,1 mL destas diluições foram espalhadas em placas com ágar seletivo. A contagem dos totais viáveis e das bactérias aeróbias foram enumeradas em Ágar Padrão para Contagem (PCA) após incubação a 30° C durante 72 horas e 7° C durante 10 dias, respectivamente. Enterobacteriaceae foram quantificadas em Ágar VRBG (violet red bile glucose), depois de uma incubação a 30° C durante 24 horas.

4.6.8 Avaliação sensorial do patê de frango

O patê produzido foi avaliado sensorialmente, após a aprovação de pedido de autorização pelo Comitê de Ética da FZEA/USP (sob número CAAE 57610616.6.0000.5422). A análise sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), em cabines individuais com luz fluorescente branca. A avaliação sensorial foi realizada através do teste de diferença do controle, teste de comparação e do teste de aceitação no primeiro dia após a produção do patê (dia 0) para avaliação dos atributos de sabor, cor e odor. As amostras foram avaliadas usando escala de hedônica de 9 pontos (1 - "desgostei muitíssimo e 9 – gostei muitíssimo) para os atributos de sabor, cor, odor e aceitabilidade geral. Cento e vinte provadores não-treinados (funcionários, alunos e docentes da FZEA/USP), de ambos os sexos e grupos etários diversos participaram do teste. O patê foi servido juntamente com torradas de forma monádica. Entre as amostras foi servido água e biscoito cream cracker, para evitar qualquer tipo de interferência entre uma amostra e outra. Os modelos da ficha que foram apresentados aos consumidores e o termo de consentimento são apresentados nos Apêndices B, C e D.

Para o teste de aceitação os ensaios foram realizados nas amostras no dia 0, 30, 60 e 90 de armazenamento.

- Teste de aceitação: Os julgadores receberam as amostras codificadas e avaliaram a aceitação dos atributos de acordo com a ficha de avaliação com escala hedônica estruturada de 9 pontos, sendo: 1= desgostei muitíssimo, 2= desgostei muito, 3= desgostei regularmente, 4= desgostei ligeiramente, 5= indiferente, 6= gostei ligeiramente, 7= gostei regularmente, 8= gostei muito e 9=gostei muitíssimo. A análise estatística dos resultados obtidos com a escala hedônica foi realizada por análise de variância (ANOVA) para avaliar se há preferência ou rejeição significativa das amostras, e posteriormente, foi utilizado o teste de Tuckey para a comparação entre as médias (DUTCOSKY, 2011).

- Teste de diferença do controle: Aos julgadores foi apresentada a amostra controle e as amostras devidamente codificadas. Cada amostra foi avaliada em relação ao controle segundo os atributos específicos por meio de uma ficha de avaliação com escala de diferença, sendo: 0= nenhuma diferença do controle, 1= ligeiramente diferente do controle, 2= pouco diferente do controle, 3= muito diferente do controle, 4= muitíssimo diferente do controle, 5= extremamente diferente do controle. Para isso, foi

adicionado nitrito em todas as amostras do patê por questão de segurança microbiológica. Os resultados relativos à pontuação atribuída à escala foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste de média Tuckey (FARIA e YOTSUYANAGI, 2002).

- *Teste de comparação:* Aos julgadores foi apresentada a amostra controle e as amostras devidamente codificadas. Cada amostra foi avaliada em relação ao controle segundo os atributos COR e SABOR por meio de uma ficha de avaliação com escala de diferença, sendo: 0= nenhuma diferença do controle, 1= ligeiramente diferente do controle, 2= pouco diferente do controle, 3= muito diferente do controle, 4= muitíssimo diferente do controle, 5= extremamente diferente do controle. Os resultados relativos à pontuação atribuída à escala serão avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste de média Tuckey (FARIA e YOTSUYANAGI, 2002).

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para obtenção das análises estatísticas dos resultados, foi utilizado o software estatístico Assistat 7.7 beta, o qual foi aplicado o teste de médias (Tukey) ao nível de 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DAS NANOEMULSÕES PELO MÉTODO DO PONTO DE INVERSÃO DA EMULSÃO (EIP)

5.1.1 Determinação dos parâmetros de produção e estabilidade das nanoemulsões produzidas com Tween 80

No caso das nanoemulsões produzidas com Tween 80, a porcentagem de fase oleosa foi fixada em 20% (m/m) com SOR (tensoativo/óleo) igual a 1,25, e a intensidade de agitação foi igual a 500 rpm. Tais parâmetros foram determinados no trabalho anterior do grupo, publicado em Borrin et al. (2016).

Como mostrado na Tabela 7, as nanoemulsões estabilizadas com Tween 80 se mantiveram estáveis em relação ao diâmetro médio de gota durante todo o período avaliado. No entanto, como o diâmetro médio é um parâmetro que não pode ser avaliado isoladamente, as curvas de distribuição dos diâmetros de gota foram analisadas e estão apresentadas na Figura 23. Pode-se observar que as curvas de diâmetro hidrodinâmico apresentam comportamento monomodal, e tal característica é importante visto que sistemas monomodais estão menos propensos à desestabilização ao longo do tempo de armazenagem.

Figura 23: Curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico de gota das nanoemulsões produzidas com tween 80, utilizando 20% de óleo de girassol e intensidade de agitação de 500 rpm e SOR =1,25.

Fonte: (Própria autoria).

Tabela 7: Valores de diâmetros médios hidrodinâmicos de nanoemulsões produzidas com tensoativo Tween 80.

Tensoativo	SOR	óleo (% mássica)	Diâmetro médio (nm)			
			Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90
Tween 80	1,25	20	156 ^A ± 2,80	163 ^A ± 3,20	164 ^A ± 2,20	173 ^A ± 2,50

* A: a média das amostras seguida pelas mesmas letras na mesma linha para cada formulação não diferem a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Fonte: (Própria autoria).

5.1.2 Determinação dos parâmetros de produção e estabilidade das nanoemulsões produzidas com Brij 30

Os parâmetros testados na produção das nanoemulsões estabilizadas com Brij 30 foram: SOR (razão tensoativo/óleo), concentração de óleo e intensidade de agitação, que já haviam se mostrado as variáveis de maior importância de acordo com Borrin et al. (2016).

As Figuras 24, 25 e 26 apresentam o aspecto visual das dispersões obtidas em cada condição após 24 horas de repouso depois da preparação:

Figura 24: Aspecto visual das amostras de nanoemulsões produzidas com Brij 30 em com diferentes valores de SOR, na velocidade de agitação de 300, rpm após 24 h de produção.

Fonte: (Própria autoria).

Figura 25: Aspecto visual das amostras de nanoemulsões produzidas com Brij 30 com diferentes valores de SOR, na velocidade de agitação de 400 rpm, após 24 h de produção.

Fonte: (Própria autoria).

Figura 26: Aspecto visual das amostras de nanoemulsões produzidas com Brij 30 com diferentes valores de SOR, na velocidade de agitação de 500 rpm, após 24 h de produção.

Fonte: (Própria autoria).

Como pode ser visualizado nas Figuras 24, 25 e 26, apenas duas formulações apresentaram estabilidade, que foram as nanoemulsões produzidas com SOR iguais a 1,50 e 1,75, ambas contendo 20% de óleo de girassol, nas três intensidades de agitação testadas (300, 400 e 500 rpm). A formação de gotículas pequenas é interessante para a formação de um sistema estável; no método EIP esta formação é alcançada através dos parâmetros de produção que podem ser alterados facilmente, tais como o tempo e a intensidade de agitação; além disso em concentrações maiores de tensoativo, melhor e mais estáveis serão a formação de nanoemulsões com gotículas pequenas de óleo. Estes parâmetros podem ser alterados de forma a otimizar a distribuição de tamanho das gotículas.

Dessa forma, as nanoemulsões produzidas com SOR igual a 1,50 e 1,75 nas três intensidades de agitação tiveram os comportamentos monitorados ao longo do tempo de estocagem, em relação às distribuições de diâmetro hidrodinâmico das gotículas e do diâmetro médio de gota.

As formulações produzidas com intensidade de agitação de 300 rpm não se mostraram estáveis após 24 h de armazenamento, e o tamanho médio de gota alcançou tamanho superior a 1000 nm, de modo que essas formulações não se caracterizaram como nanoemulsões. As formulações produzidas com velocidade de agitação de 400 rpm desestabilizaram após 30 dias de monitoramento e, portanto, também foram descartadas. Na Figura 27 e na Tabela 8 estão apresentados os resultados obtidos em relação ao tamanho médio e distribuição de tamanho de gotas nas nanodispersões estabilizadas com Brij 30 produzidas com velocidade de agitação de 500 rpm:

Figura 27: Curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico de gota das nanoemulsões produzidas com Brij 30, utilizando 20% de óleo de girassol e intensidade de agitação de 500 rpm: (a) SOR=1,50 e (b) SOR= 1,75. O perfil temporal foi determinado nos dias: (—) 0, (—) 30, (—) 60 e (—) 90.

Fonte: (Própria autoria).

Tabela 8: Valores de diâmetro médio hidrodinâmico das nanoemulsões produzidas com tensoativo Brij 30 durante o período de estocagem.

SOR	Fase oleosa (%)	Diâmetro médio (nm)			
		Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90
1,50	20	552 ^A ±3,80	563 ^A ± 5,30	536 ^A ± 6,70	530 ^A ± 2,70
1,75	20	356 ^A ± 8,70	557 ^A ± 8,90	310 ^B ± 8,30	764 ^C ± 4,10

* A, B, C e D: a média das amostras seguida pelas mesmas letras na mesma linha para cada formulação não diferem a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Fonte: (Própria autoria).

A partir dos resultados apresentados na Tabela 8, pode-se observar que as formulações produzidas com o tensoativo Brij 30 e intensidade de agitação igual a 500 rpm se mantiveram estáveis (não apresentaram separação de fases) durante o período avaliado. A formulação produzida com SOR de 1,50 apresentou diâmetro médio praticamente constante, mesmo sendo fora do intervalo aceito como nanoemulsões (até 200 nm) enquanto que a formulação com SOR de 1,75 apresentou expressiva variação do diâmetro médio de partícula.

5.2 DETERMINAÇÃO DA TENSÃO INTERFACIAL

A tensão interfacial entre os tensoativos utilizados (Brij 30 e Tween 80) em água e a tensão interfacial dos tensoativos na presença da quercetina e a água foram determinadas, e os resultados estão apresentados nas Figuras 28 e 29.

Figura 28: Análise da tensão interfacial do tensoativo Brij 30 em água e do complexo (tensoativo + quercetina a 1%) em água.

Fonte: (Própria autoria).

Figura 29: Análise da tensão interfacial do tensoativo Tween 80 em água e do complexo (tensoativo + quercetina a 1%) em água.

Fonte: (Própria autoria).

A concentração e a estrutura do tensoativo empregado para a produção de nanoemulsões é um dos principais fatores que controla o processo de emulsificação e consequentemente a tensão interfacial do sistema nanoemulsionado, uma vez que o aumento na concentração do tensoativo geralmente provoca diminuição da tensão interfacial, promovendo a emulsificação do sistema (BOUCHEMAL et al., 2004).

Analisando-se as Figuras 28 e 29, pode ser observado que a tensão interfacial para o tensoativo Brij 30 em água diminuiu rapidamente quando a quercetina é adicionada no sistema (Figura 28) e a partir disso pode ser concluído que o sistema Brij 30 + quercetina é mais estável do que o sistema contendo somente Brij 30. Por sua vez, a tensão interfacial do sistema contendo somente Tween 80 não é muito afetada com a adição da quercetina no meio (Figura 29).

Desta forma, podemos concluir que no caso do tensoativo Brij 30, há provavelmente a formação de um complexo na presença da quercetina, que é, provavelmente, mais eficiente na estabilização da interface óleo/água nas emulsões. É provável que a quercetina junto com os Brij 30 forma um “sistema” que induz a queda da tensão interfacial maior que o tensoativo sozinho, e essa característica pode estar relacionada com a localização do bioativo no sistema nanoemulsificado. Possivelmente,

parte da quercetina incorporada nas nanoemulsões está localizada e solubilizada na interface água/óleo deste sistema, pois a partir dos dados obtidos de tensão interfacial, há formação de um complexo estável entre o Brij 30 e a quercetina, fato demonstrado em sistemas contendo fosfolipídios. Sardone et al. (2004) estudaram a interação da quercetina-3-O-palmitato em filmes constituídos pelo fosfolipídio DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina). Em quantidades relativamente pequenas, cerca de 10%, de incorporação do bioativo nas matrizes do filme fosfolipídico, foi observado que houve aumento da fluidez das monocamadas do filme sugerindo que a quercetina é em parte solúvel em monocamadas de DMPC. Fato semelhante – a solubilização de parte da quercetina na monocamada (interface) formada pelo Brij 30 – pode ter acontecido nas nanoemulsões produzidas no presente trabalho.

A localização do bioativo encapsulado influenciaria significativamente na sua ação como antioxidante, por exemplo, uma vez que estaria mais disponível e permitiria aplicações potenciais.

5.3 DETERMINAÇÃO DO PONTO DE INVERSÃO DE FASES

Para determinar o ponto em que ocorre a inversão das fases durante a produção das nanoemulsões pelo método EIP, foram realizados ensaios reológicos e de determinação da condutividade elétrica, de modo a determinar o comportamento da viscosidade e da condutividade enquanto a fase aquosa era adicionada a fase oleosa. A Figura 30 mostra a variação da condutividade elétrica e do G' (módulo de armazenamento) em função da adição da fase aquosa durante a produção das nanoemulsões produzidas com o tensoativo Tween 80:

Figura 30: Variação da condutividade (■) e do módulo de armazenamento (G') (■), durante a adição da fase aquosa à fase oleosa, no processo produção das nanoemulsões estabilizadas com Tween 80.

Fonte: (Própria autoria).

A partir da Figura 30 observa-se que em 30% de adição de fase aquosa ocorrem, simultaneamente, valores máximos de condutividade e do módulo de armazenamento, indicando que neste ponto a troca de energia foi máxima, visto que o G' indica a energia armazenada na estrutura, assim, com aproximadamente 30% de fase aquosa a elasticidade foi maior, o que é característico de soluções concentradas (STEFFE, 1996).

Analisando a Figura 30 também é possível observar que a condutividade elétrica apresentou valores baixos quando foram adicionadas pequenas quantidades de água, indicando que o óleo de soja ainda era a fase contínua. A condutividade aumentou no intervalo de 10 a 30% de fase aquosa adicionada. Por sua vez, o valor de G' (módulo de armazenamento) atingiu seu valor máximo em cerca de 30% de água adicionada, provavelmente devido ao aumento do volume de gotículas de água nas emulsões internas A/O presentes emulsões múltiplas formadas, o que aumenta a elasticidade do sistema (MAYER; WEISS; McCLEMENTS, 2013; PAL et al., 2011; JAHANZAD et al., 2009). Resultados semelhantes foram obtidos por Borrin et al., (2016) que determinaram que o ponto de inversão de nanoemulsões produzidas pelo método EIP ocorreu em torno de 30% da adição da fase aquosa. Além disso, outros testes reológicos foram realizados neste trabalho indicando que a inversão de fase não ocorre diretamente, ou seja, ocorre através da formação das estruturas intermediárias: lamelar e bicontínua (O/A/O). Além disso, outras mudanças indicam a transição de fase, como por exemplo, o comportamento do sistema em newtoniano e pseudoplástico. Em torno

de 10% da adição da fase aquosa o sistema apresentou comportamento newtoniano, fato que pode ser explicado pela alta concentração de óleo vegetal e de tensoativo (Tween 80) na composição das nanoemulsões; e após o aumento da concentração de água no sistema (em torno de 30%) o sistema apresentou característica pseudoplástico indicando que a inversão catastrófica ocorreu neste ponto (BORRIN et al., 2016). Segundo Jahanzad et al. (2009), imediatamente antes da inversão de fases ocorre um grande aumento da viscosidade, ocasionado por haver neste ponto, provavelmente, a maior quantidade de emulsões múltiplas (Figura 31). Com o decorrer do processo, o aumento de volume das emulsões O/A/O atinge uma concentração crítica que leva à inversão de fases. O que indica que possivelmente que seja este o ponto de inversão de fase ($\approx 30\%$ fase aquosa), transformando uma emulsão O/A em uma A/O.

Figura 31: Representação da mudança das estruturas presentes no sistema, durante o processo de nanoemulsificação pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP): (A) $\approx 10\%$ de fase aquosa; (B) $\approx 30\%$ de fase aquosa; (C) final da adição da fase aquosa.

Fonte: (adaptado de JAHANZAD et al. 2009).

Para a determinação do ponto de inversão das fases para as nanoemulsões produzidas com o tensoativo Brij 30 foram feitas medidas de condutividade durante a adição da fase aquosa e após toda a fase aquosa ter sido adicionada (durante o período de 30 min de agitação), já que durante a adição da fase aquosa não houve um *plateau* na curva de condutividade elétrica do sistema. A Figura 32 mostra a variação da condutividade elétrica e do G' (módulo de armazenamento) em função da adição da fase aquosa durante a produção das nanoemulsões produzidas com o tensoativo Brij 30.

Figura 32: Variação da condutividade (■) e do módulo de armazenamento (G') (▣), durante a adição da fase aquosa à fase oleosa, no processo produção das nanoemulsões estabilizadas com Brij 30.

Fonte: (Própria autoria).

A partir da Figura 32, observa-se que mesmo apresentando valores máximos do módulo de armazenamento G' em torno de 30% de adição de fase aquosa, os valores de G' para as nanoemulsões produzidas com o tensoativo Brij 30 são maiores que os valores obtidos no processo de emulsificação com o Tween 80. Tal fato pode indicar que o sistema contendo Brij30 necessita de maior energia para formação e quebra das emulsões múltiplas intermediárias no processo de inversão de fases. Esse fato pode estar relacionado com o coeficiente de difusão do tensoativo na fase oleosa, ou seja, com a rapidez de migração do tensoativo da fase oleosa para a fase aquosa, que é menor para o tensoativo Brij 30 em relação ao tensoativo Tween 80, devido ao menor número de grupos polietoxilados (no Brij 30 são somente 4 grupos, em comparação com 20 grupos POE do Tween 80). O Brij 30 é menos hidrofílico que o Tween 80, o que torna sua difusão na fase aquosa mais lenta, fazendo com que a taxa de coalescência das emulsões múltiplas seja menor que no caso das emulsões produzidas com Tween. Coalescência mais lenta significa maior dificuldade de “rompimento” das gotículas internas, levando a um maior valor de G' . Portanto, o tempo formação das nanogotas será maior, e consequentemente, a curva de condutividade levará mais tempo para alcançar o *plateau*.

Em relação à condutividade (Figura 33), pode se observar que a condutividade elétrica apresentou valores baixos durante o processo de adição de água; entretanto,

logo após completada a adição da fase aquosa a condutividade atingiu ponto máximo e este valor se manteve constante até o final do processo de agitação. Estes resultados juntamente com o teste reológico indicam que o ponto de inversão das nanoemulsões produzidas com o tensoativo Brij 30 ocorre em um ponto diferente das nanoemulsões produzidas com Tween 80; para as nanoemulsões produzidas com o tensoativo Brij 30 a inversão de fase ocorre durante o período de agitação (após toda a fase aquosa ter sido adicionada) enquanto que para as nanoemulsões produzidas com o tensoativo Tween 80 a inversão de fase ocorre quando cerca de 30% da fase aquosa é adicionada no sistema. No entanto, o processo de inversão de fase é semelhante, independente do tensoativo utilizado; a transição se dá a partir de uma emulsão O/A, passando pelo intermediário, que é a formação de emulsões múltiplas bicontínuas (O/A/O) e por fim, ocorre a inversão em emulsões A/O.

Figura 33: Variação da condutividade após a adição da fase aquosa à fase oleosa, no processo produção das nanoemulsões estabilizadas com Brij 30.

Fonte: (Própria autoria).

5.4 ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES CONTENDO QUERCETINA ENCAPSULADA

5.4.1 Nanoemulsões produzidas com Tween 80

A partir dos resultados obtidos com as nanoemulsões vazias, as nanoemulsões foram produzidas encapsulando quercetina, nas formulações indicadas na Tabela 9:

Tabela 9: Formulações das nanoemulsões produzidas com Tween 80 encapsulando quercetina (% m/m).

SOR	Tween 80 (%)	Glicerol (%)	Óleo de girassol (%)	Água deionizada (%)	Quercetina (%)
1,25	25	20	20	35	0,15
1,25	25	20	20	35	0,30

Fonte: (Própria autoria).

A Figura 34 mostra o aspecto visual das nanoemulsões produzidas com quercetina:

Figura 34: Aspecto visual das nanoemulsões encapsulando quercetina, estabilizadas com Tween 80, com concentração de fase oleosa 20% e SOR = 1,25.

Fonte: (Própria autoria).

A estabilidade físico-química das nanoemulsões encapsulando quercetina foi avaliada por 90 dias. A Figura 35 mostra as curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico das nanoemulsões durante o referido período.

Figura 35: Curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico de gota das nanoemulsões encapsulando quercetina estabilizadas com Tween 80, concentração de fase oleosa 20%, SOR =1,25: (a) 0,15% quercetina; (b) 0,30% quercetina. As amostras foram obtidas nos dias: (—) 0, (—) 30, (—) 60 e (—) 90.

Fonte: (Própria autoria).

Tabela 10: Avaliação da estabilidade das nanoemulsões produzidas com Tween 80 contendo quercetina encapsulada pelo período de estocagem de 90 dias.

Parâmetro	Formulação/ Tempo							
	0,15% quercetina				0,30% quercetina			
	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90
Diâmetro médio (nm)	167 ^A ± 2,70	174 ^A ± 3,60	177 ^A ± 4,30	179 ^A ± 2,30	169 ^A ± 2,30	168 ^A ± 3,70	170 ^A ± 1,20	169 ^A ± 3,30
Quercetina (µg/ml)	208 ^A ± 1,70	142 ^B ± 1,10	109 ^C ± 2,40	93 ^C ± 2,9	300 ^A ± 6,90	225 ^B ± 1,70	220 ^B ± 2,60	212 ^B ± 1,70

* A, B e C: a média das amostras seguida pelas mesmas letras na mesma linha para cada formulação não diferem a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Fonte: (Própria autoria).

A Figura 35 mostra que as distribuições de tamanho do diâmetro hidrodinâmico para as duas concentrações de quercetina testadas apresentaram comportamento monomodal no dia 0. Tal resultado é relevante, visto que este método de produção de baixa energia não envolve o uso de quaisquer dispositivos de alta pressão, como homogeneizadores de alta pressão ou microfluidizadores. Ambas as nanoemulsões encapsulando 0,15 e 0,30% quercetina foram bastante estáveis em termos de

distribuição de tamanho e os diâmetros médios durante o período (Tabela 10), sem apresentar variação significativa ao nível de 5% para este último. Em especial, a amostra contendo 0,15% de quercetina apresentou melhor distribuição, ou seja, sem a formação de picos com maiores diâmetros o que não ocorreu para nanoemulsões encapsulando 0,30% de quercetina. As nanoemulsões contendo 0,30% quercetina apresentaram comportamento bimodal durante o período de tempo armazenado e, além disso, apresentaram picos com diâmetro menor durante o período de armazenamento (Figura 35).

Em relação à capacidade do sistema de proteger a quercetina presente nas nanoemulsões durante o período de armazenamento, os perfis temporais de concentração do flavonol podem ser vistos na Figura 36:

Figura 36: Perfis temporais de concentração de quercetina nas nanoemulsões encapsulando: (■) 0,15% de quercetina e (▨) 0,30% durante o período de 90 dias de estocagem. C = concentração de quercetina no dia de amostragem e C_0 é a concentração inicial de quercetina.

Fonte: (Própria autoria).

A partir da Figura 36, pode-se observar que a capacidade de preservação da quercetina encapsulada nas nanoemulsões contendo 0,15% e 0,30% de quercetina apresentaram características diferentes, pois a preservação da quercetina nas nanoemulsões contendo 0,30% foi cerca de 73% da quantidade inicial, enquanto que para a formulação contendo 0,15% de quercetina a preservação após os 60 dias de monitoramento foi menor que 50%. Este resultado pode estar relacionado com a quantidade inicial de quercetina (uma vez que em concentrações maiores, a

probabilidade do composto bioativo estar protegido e solubilizada dentro do núcleo das gotículas são maiores), com a interação dos componentes utilizados e ainda com a localização do bioativo nas nanoemulsões conforme hipótese descrita no item 5.3. é possível que nesta formulação o bioativo esteja presente majoritariamente dentro do núcleo oleoso das nanoemulsões estabilizadas com Tween 80.

5.4.2 Nanoemulsões produzidas com Brij 30

A partir dos resultados obtidos com as nanoemulsões vazias produzidas com Brij 30 (item 5.1.2), as nanoemulsões foram produzidas encapsulando quercetina, com velocidade de agitação igual a 500 rpm nas formulações descritas na Tabela 11:

Tabela 11: Formulações das nanoemulsões encapsulantes.

SOR	Brij 30 (%)	Óleo de girassol (%)	Água deionizada (%)	Quercetina (%)
1,75	30	20	45	0,15
1,75	30	20	45	0,30

Fonte: (Própria autoria).

A Figura 37 mostra o aspecto visual das nanoemulsões produzidas com Brij 30 e quercetina:

Figura 37: Aspecto visual das nanoemulsões encapsulando quercetina, estabilizadas com Brij 30, com concentração de fase oleosa 20%, intensidade de agitação de 500 rpm e SOR = 1,50: (a) 0,15% de quercetina e (b) 0,30% de quercetina.

Fonte: (Própria autoria).

A estabilidade físico-química das nanoemulsões encapsulando quercetina foi avaliada por 90 dias. A Figura 38 mostra as curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico das nanoemulsões durante o referido período.

Figura 38: Curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico de gota das nanoemulsões encapsulando quercetina estabilizadas com Brij 30, produzidas com 20% óleo e SOR =1,50: (A) 0,15% quercetina; (B) 0,30% quercetina. O perfil temporal foi determinado nos dias: (—) 0, (—) 30, (—) 60 e (—) 90.

Fonte: (Própria autoria).

Tabela 12: Avaliação da estabilidade físico-química das nanoemulsões produzidas com Brij 30 contendo quercetina encapsulada pelo período de estocagem de 60 dias.

Parâmetro	Formulação/ Tempo							
	0,15% quercetina				0,30% quercetina			
	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90
Diâmetro médio (nm)	257 ^A ± 3,70	239 ^A ± 2,50	217 ^A ± 4,30	249 ^A ± 2,30	209 ^A ± 2,30	238 ^A ± 2,30	270 ^A ± 2,90	178 ^A ± 2,10
Quercetina (µg/ml)	308 ^A ± 1,70	223 ^B ± 1,70	182 ^C ± 2,40	141 ^C ± 2,90	358 ^A ± 3,10	267 ^B ± 1,70	242 ^B ± 2,60	229 ^B ± 2,70

* As mesmas letras na mesma linha para cada formulação significa que não diferem a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Fonte: (Própria autoria).

A Figura 38 mostra que as distribuições de tamanho do diâmetro hidrodinâmico para as duas concentrações de quercetina testadas apresentaram comportamento

monomodal no dia 0. Este resultado é relevante, visto que este método de produção de baixa energia não envolve o uso de quaisquer dispositivos de alta pressão, como homogeneizadores de alta pressão ou microfluidizadores. Ambas as nanoemulsões encapsulando 0,15 e 0,30% quercetina foram bastante estáveis em termos de distribuição de tamanho e os diâmetros médios durante o período (conforme dados mostrados na Tabela 12), sem apresentar variação significativa ao nível de 5% para o teste de médio (Turkey) para este último.

A capacidade do sistema em proteger a quercetina presente nas nanoemulsões durante o período de armazenamento pode ser vistos nos perfis temporais de concentração do flavonol conforme mostrado na Figura 39:

Figura 39: Perfis temporais de concentração de quercetina nas nanoemulsões encapsulando: (■) 0,15% de quercetina e (▨) 0,30% durante o período de 90 dias de estocagem. C = concentração de quercetina no dia de amostragem e C_0 é a concentração inicial de quercetina.

Fonte: (Própria autoria).

A capacidade de preservação da quercetina encapsulada nas nanoemulsões com 0,15% e 0,30% de quercetina apresentaram características diferentes, pois a preservação da quercetina nas nanoemulsões contendo 0,30% foi maior, cerca de 64% da quantidade inicial (tomado dia 0 como 100%) enquanto que para a formulação contendo 0,15% de quercetina a preservação após os 90 dias de monitoramento chegou a 46%. Este resultado pode estar relacionado com a distribuição e interação da quercetina e do tensoativo utilizado na produção das nanoemulsões. Conforme apresentado no item 5.3, as nanoemulsões produzidas com o tensoativo Brij 30 formam um complexo com o

composto bioativo indicando que a quercetina esteja presente na interface água/óleo das gotículas da emulsão e desta forma reduz a tensão interfacial. Este resultado pode indicar o motivo pelo qual a preservação da quercetina nas nanoemulsões produzidas com o tensoativo Brij 30 foi menor quando comparadas as nanoemulsões produzidas com o tensoativo Tween 80, pois de acordo com a localização da quercetina nas nanoemulsões ela está mais disponível para ser degradada em relação às formulações com Tween 80 na qual a concentração do bioativo é maior dentro do núcleo oleoso.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTES *IN VITRO* DAS NANOEMULSÕES

De acordo com todos os resultados apresentados para as nanoemulsões encapsulando quercetina, verifica-se que as nanomulsões produzidas com os tensoativos Tween 80 e Brij 30 com 0,30% do bioativo apresentaram melhor estabilidade quanto ao tamanho de gotículas e boa manutenção da quercetina encapsulada e, portanto, foram escolhidas como as mais viáveis para a determinação da atividade antioxidante *in vitro* e posteriormente, para a aplicação em patê de frango.

5.5.1 Atividade sequestrante do radical livre DPPH•

Este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante (quercetina) para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. Desta forma, é possível avaliar apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes.

Os resultados da atividade antioxidante, medida em função da atividade do radical DPPH•, obtidos para as nanoemulsões produzidas com Tween 80 e Brij 30 encapsulando 0,30% de quercetina, estão apresentados na Figura 40.

Figura 40: Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH• (%) das nanoemulsões encapsulando quercetina, produzidas com (■) Tween 80 e (▨) Brij 30.

Fonte: (própria autoria).

Conforme apresentado na Figura 40, as nanoemulsões perderam atividade antioxidante ao longo do tempo de armazenamento, o que era esperado, pois a quercetina também foi degradada. No entanto, as formulações produzidas com Tween 80 preservaram por maior tempo a atividade antioxidante em comparação com valor inicial, em relação às formulações produzidas com Brij 30. Durante as quatro primeiras semanas de armazenamento o poder antioxidante das nanoemulsões produzidas com Tween 80 se manteve praticamente constante. O fato pelo qual as formulações produzidas com o tensoativo Tween 80 apresentaram maior preservação do poder antioxidante do composto bioativo pode estar relacionando com a localização da quercetina no interior das nanoemulsões, ou seja, por estar presente dentro do núcleo das gotículas seu poder antioxidante está mais protegido. As formulações contendo o tensoativo Brij 30 provavelmente contém parte da quercetina localizada na interface das gotículas, o que as tornam mais acessíveis aos agentes oxidantes, e consequentemente, o poder antioxidante foi afetado mais rapidamente ao longo do tempo de armazenagem. É interessante notar que capacidade antioxidante da quercetina diminuiu em ambas as estruturas; no entanto, a atividade antioxidante se manteve superior a 80% durante todo o período avaliado.

Kiokias e Varzakas (2014) avaliaram o poder antioxidante de flavonoides (catequina e quercetina) e β -caroteno encapsulados durante a auto-oxidação de emulsões do tipo óleo em água de semente de algodão e constataram que apenas a

quercetina reduziu significativamente a oxidação das emulsões. Em outros trabalhos encontrados na literatura são observados os mesmos resultados cuja capacidade antioxidante dos flavonoides nanoemulsionados (quercetina e rutina) foi superior à apresentada pelo ácido L-ascórbico e vitamina E encapsulados em diversas aplicações (SCHIMITT et al., 1995; RICE-EVANS et al., 1996; NOOROZI et al. 1998). Por sua vez, Hernández-Jaimes et al. (2013) avaliaram a capacidade antioxidante de nanoemulsões contendo extrato de *E. arvense* em várias concentrações durante 12 semanas e observaram que a taxa de perda do poder antioxidante das nanoemulsões foi aproximadamente 11 vezes mais lento comparado com a taxa de perda do poder antioxidante do extrato livre. Tais resultados indicam que a incorporação do extrato em nanoemulsões protege a integridade do composto bioativo, não só ao longo da produção das nanoemulsões, mas também durante o seu armazenamento.

5.5.2 Determinação do teor de fenólicos totais

A capacidade antioxidante das substâncias naturais está diretamente relacionada com a presença compostos fenólicos, uma vez que a estrutura química destes compostos permite a estabilização de radicais livres. A concentração total de fenólicos foi determinada nas nanoemulsões durante o período de 24 semanas. O perfil temporal está apresentado na Figura 41.

Durante o período avaliado, é possível notar que as nanoemulsões perderam a capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu, ou seja, a quantidade de fenólicos presente nas nanoemulsões diminuiu durante o período de armazenamento. Além disso, as nanoemulsões produzidas com o tensoativo Tween 80 apresentaram maior capacidade de preservação dos fenólicos.

Figura 41: Determinação da capacidade redutora dos fenólicos totais das nanoemulsões: (■) Tween 80 e (▨) Brij 30 encapsulando quercetina.

Fonte: (própria autoria).

A partir da Figura 41, pode-se observar que até a semana 2 as nanoemulsões produzidas com Brij 30 apresentaram maior capacidade de proteção dos fenólicos ($\approx 107 - 97$ mg EAG/g) quando comparadas com as nanoemulsões produzidas com Tween 80 ($\approx 101 - 96$ mg EAG/g). No entanto, após a terceira semana de armazenagem as nanoemulsões produzidas com o tensoativo Tween 80 apresentaram maior preservação dos fenólicos, sendo que tal condição se manteve até o final do período de monitoramento. Tal resultado está de acordo com a análise da atividade sequestrante do radical DPPH•, pois as nanoemulsões produzidas com o tensoativo Tween 80 também apresentaram a maior capacidade antioxidante (ou seja, essa estrutura é capaz de preservar por mais tempo os compostos fenólicos). Em geral, a preservação dos compostos fenólicos pelas nanoemulsões produzidas com o tensoativo Tween 80 foi eficiente até a quarta semana de monitoramento na qual a concentração de fenólicos se manteve praticamente constante. Já para as nanoemulsões produzidas com o tensoativo Brij 30 a preservação dos compostos fenólicos sofreu um rápido decaimento após a sexta semana de monitoramento.

Para a aplicação desses sistemas em matrizes alimentícias com o intuito de aumentar a vida de prateleira desses produtos deve ser considerado o tempo que as nanoemulsões conseguem efetivamente assegurar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos encapsulados.

5.6 AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DAS NANOEMULSÕES ENCAPSULANDO QUERCETINA EM PATÊ DE FRANGO

As nanoemulsões produzidas com Tween 80 e Brij 30 contendo 0,30% de quercetina encapsulada foram incorporadas em patê de frango. O aspecto visual das formulações produzidas de patê de frango está apresentado na Figura 42.

Figura 42: Aspecto visual das formulações de patê de frango produzidas com nanoemulsões encapsulando quercetina: tratamento 1 (sem antioxidantes); tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); tratamento 5 (adição de quercetina livre).

Fonte: (Própria autoria).

5.6.1 Análise de pH das amostras de patê de frango durante o armazenamento

De acordo com a Tabela 13 e a Figura 43, pode-se observar que apenas o tratamento contendo os antioxidantes nitrito de sódio e BHT (tratamento 2) apresentou valor maior de pH na primeira semana de armazenamento. Outros estudos encontraram valores de pH entre 6,34 a 6,39 para patê de fígado de porco (ESTÉVEZ et al., 2005; PATEIRO et al., 2014). Um dos motivos para o pH das amostras de patê de frango ter sido menor do que os valores encontrados na literatura é que houve a acidificação do produto após o processamento, com o intuito de inibir a esporulação de *Clostridium botulinum* durante o armazenamento do produto. Vale ressaltar que antes da etapa de pasteurização, o pH das amostras foi reduzido para abaixo de 4,5; entretanto, após o processamento térmico, o pH de todas amostras foi superior à este valor, indicando que a pasteurização influenciou o pH do produto.

Tabela 13: Resultados do pH para as amostras de patê de frango durante o período de 24 semanas de armazenamento sob refrigeração: tratamento 1 (sem antioxidantes); tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); tratamento 5 (adição de quercetina livre).

Semanas	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5	Sign.
1	4,98 ^{b12} ±0,056	5,27 ^{a3} ±0,009	4,92 ^{b3} ±0,000	4,99 ^{b3} ±0,016	4,97 ^{b3} ±0,006	**
3	5,03 ^{b1} ±0,017	5,26 ^{a3} ±0,017	4,94 ^{c23} ±0,007	4,99 ^{bc3} ±0,012	4,97 ^{bc3} ±0,007	**
5	4,90 ^{b23} ±0,002	5,18 ^{a4} ±0,002	4,81 ^{c4} ±0,000	4,89 ^{b4} ±0,020	4,89 ^{b4} ±0,034	**
7	4,85 ^{b3} ±0,002	5,07 ^{a6} ±0,002	4,65 ^{d5} ±0,042	4,77 ^{c5} ±0,013	4,75 ^{c5} ±0,009	**
10	5,04 ^{cd1} ±0,004	5,34 ^{a2} ±0,004	4,98 ^{d2} ±0,024	5,05 ^{c2} ±0,006	5,18 ^{c2} ±0,010	**
13	5,00 ^{b12} ±0,019	5,11 ^{a5} ±0,019	4,83 ^{d4} ±0,018	4,97 ^{bc3} ±0,007	4,96 ^{bc3} ±0,005	**
16	5,09 ^{d1} ±0,016	5,49 ^{a1} ±0,016	5,18 ^{c1} ±0,004	5,26 ^{b1} ±0,004	5,25 ^{b1} ±0,002	**
24	5,35 ^{d1} ±0,039	5,32 ^{a2} ±0,02	5,2 ^{c1} ±0,038	5,2 ^{b2} ±0,035	5,18 ^{c1} ±0,007	**
Sign.	**	**	**	**	**	

a-b-c-d - Médias seguidas com a mesma letra na mesma linha não se diferenciam ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

1-2-3-4-5- Médias seguidas pelo mesmo número na mesma coluna não se diferenciam ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

Sign.= Significância:** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$), n.s não significativo ($p \geq 0,05$).

Fonte: (própria autoria).

Figura 43: Perfil temporal dos valores de pH para as amostras de patê de frango durante o período de 24 semanas de armazenamento sob refrigeração: (♦) tratamento 1 (sem antioxidantes); (■) tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); (▲) tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); (×) tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); (○) tratamento 5 (adição de quercetina livre).

Fonte: (própria autoria)

5.6.2 Parâmetros colorimétricos

Na Tabela 14 estão representados os valores obtidos dos parâmetros colorimétricos. Pode-se observar que na primeira semana de análise os valores dos parâmetros de cor L^* e b^* não variaram significativamente entre todos os tratamentos, indicando que os antioxidantes BHT e nitrito de sódio, as nanoemulsões e a quercetina livre não diferiram entre si. Na análise do parâmetro a^* , o aumento significativo para o tratamento com nitrito de sódio, em relação aos demais tratamentos, ocorreu devido à coloração rósea que o nitrito de sódio confere aos produtos cárneos, preservando assim o teor de vermelho da amostra. O desenvolvimento da cor típica dos produtos curados à base de carne é um dos mais importantes efeitos do nitrito de sódio (DOOLAEGE et al. 2012).

De acordo com a Tabela 14 a variável Croma (C^*) não variou significativamente entre os tratamentos durante o armazenamento, sendo que ao avaliar a variação de cada tratamento ao longo do tempo, foi possível observar que apenas o tratamento 3 apresentou uma redução significativa na semana 16. No entanto, para o ângulo de Hue (H^*), houve um aumento significativo para todos os tratamentos inclusive para o tratamento contendo BHT e nitrito, no fim do período de armazenamento (24 semanas); o aumento no valor para o ângulo de Hue ao longo do tempo indica um processo de descoloração do produto cárneo (LEE et al. 2005). A alteração de cor observada durante o período de armazenamento pode ter sido influenciada pela oxidação proteica do produto (ESTÉVEZ e CAVA, 2004).

Em relação aos valores de ΔE (diferença total de cor) entre o início (semana 1) e o final do período de armazenamento (semana 24), os tratamentos contendo quercetina livre, as duas formulações de nanoemulsões encapsulando quercetina e BHT e nitrito de sódio (tratamentos 2, 3, 4 e 5) apresentaram valores inferiores ao tratamento controle sem antioxidantes. Alguns autores, que avaliaram as alterações de cor em patê de fígado suíno, associaram a alteração de cor com mudanças químicas ou na composição do produto, que podem ter ocorrido durante o armazenamento, e que não estão, necessariamente, diretamente relacionados com processos oxidativos (ESTÉVEZ, VENTANAS e CAVA, 2006).

Todos os tratamentos apresentaram valores de ΔE_{1-24} (diferença total de cor, semana 1 a semana 24) superiores a 2, conforme mostrado na Tabela 14, que é o limite determinado por Francis e Clydesdale (1975) para detecção visual de alteração de cor.

Portanto, após o armazenamento de 24 semanas, foi perceptível, ao menos instrumentalmente, a alteração na coloração de todas as amostras de patê de frango.

Tabela 14. Valores de L*, a*, b*, Croma (C*), ângulo Hue (H*) e diferença total de cor (ΔE) durante o armazenamento (24 semanas) dos tratamentos: 1- sem antioxidantes, 2- adição de BHT e nitrito de sódio, 3- adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e quercetina a 0,30%, 4- adição da nanoemulsão produzida com Brij 30 e quercetina a 0,30% e 5- adição de quercetina livre.

	Trat.	Tempo de armazenamento (semanas)									Sign.
		1	3	5	7	10	13	16	24		
L*	1	54,07±1,28 ^a	53,15±3,4 ^a	58,14±1,19 ^{a,1}	57,66±0,88 ^{a,1}	41,82±0,54 ^{b,1,2}	53,98±0,59 ^a	53,12±3,48 ^a	53,09±2,36 ^a	**	
	2	53,42±0,14 ^b	51,94±1,31 ^b	55,44±0,36 ^{a,2}	56,19±0,23 ^{c,2}	41,67±0,60 ^{b,1,2}	52,81±0,67 ^b	52,91±0,56 ^b	52,99±2,14 ^b	**	
	3	52,46±4,0 ^c	54,69±1,07 ^b	57,98±0,85 ^a	58,46±0,79 ^b	42,91±0,73 ^b	55,18±0,32 ^c	54,75±0,80 ^a	54,71±0,36 ^a	**	
	4	54,54±0,37 ^b	52,53±1,17 ^a	56,09±0,47 ^a	57,74±0,36 ^a	41,71±0,69 ^b	54,54±0,24 ^b	52,36±0,80 ^b	53,04±1,06 ^b	**	
	5	55,47±0,52 ^b	53,67±0,84 ^b	56,76±0,45 ^b	57,50±1,62 ^b	42,38±0,28 ^b	48,87±0,43 ^b	53,33±0,78 ^b	53,29±0,56 ^b	**	
	Sign	n.s	n.s	*	*	*	n.s	n.s	*		
a*	1	1,18±0,30 ^{b,2}	1,68±0,23 ^{a,b,2}	1,67±0,14 ^{a,b,2}	1,65±0,18 ^{a,b,2}	1,79±0,17 ^{a,1}	1,22±0,25 ^{b,1,2}	-0,05±0,11 ^c	-0,15±0,15 ^c	**	
	2	4,07±0,41 ^{a,1}	3,52±0,56 ^{a,1}	3,63±0,11 ^{a,1}	2,66±0,24 ^{b,1}	1,72±0,22 ^{b,1}	1,62±0,07 ^{b,1}	0,17±0,12 ^c	-0,25±0,21 ^c	**	
	3	1,37±0,94 ^{b,a}	0,95±0,22 ^{a,1}	0,80±0,31 ^{a,1}	1,20±0,11 ^{a,1}	1,39±0,38 ^{b,1,2}	1,15±0,22 ^{a,1}	-0,23±0,06 ^c	-0,13±0,02 ^c	**	
	4	0,74±0,15	0,75±0,45 ^{a,1}	1,06±0,10 ^{a,1}	1,04±0,14 ^{a,1}	1,52±0,20 ^{a,1}	1,23±0,16 ^{a,1,2}	-0,27±0,02 ^c	-0,25±0,14 ^c	**	
	5	0,81±0,44 ^{a,1}	0,91±0,3 ^{a,1}	0,57±0,61 ^{b,1}	1,17±0,2 ^{a,1}	1,55±0,16 ^{c,1}	1,14±0,41 ^{a,1}	-0,24±0,03 ^c	-0,25±0,19 ^c	**	
	Sign	**	**	**	**	**	**	n.s			
b*	1	14,84±0,72 ^a	15,38±0,44 ^a	14,86±0,07 ^{a,b}	16,13±0,67 ^a	12,71±0,42 ^c	14,69±0,82 ^{a,b}	13,64±0,80 ^{b,c}	13,64±0,75 ^b	**	
	2	15,34±0,44 ^a	15,32±0,69 ^a	15,07±0,48 ^a	15,59±0,31 ^a	12,84±0,10 ^b	15,68±0,35 ^a	15,10±0,27 ^a	13,56±0,66 ^a	**	
	3	16,51±1,99 ^a	15,26±0,7 ^a	15,24±0,39 ^a	15,15±0,47 ^a	12,37±0,13 ^a	14,77±0,40 ^a	14,54±0,41 ^a	13,24±0,24 ^b	**	
	4	14,94±0,24 ^a	15,95±0,96 ^b	15,26±0,16 ^a	14,76±0,71 ^a	12,45±0,33 ^c	14,62±0,38 ^a	14,36±0,37 ^a	13,52±0,23 ^b	**	
	5	15,21±0,62 ^a	15,81±0,67 ^a	15,52±0,30 ^a	16,0±0,26 ^b	12,86±0,23 ^c	14,51±0,50 ^a	14,69±0,48 ^a	13,49±0,45 ^a	**	
		n.s	*	n.s	n.s	**	n.s	n.s	n.s		
C*	1	14,89±0,72 ^a	15,47±0,45 ^a	14,96±0,07 ^{a,b}	16,21±0,65 ^b	12,84±0,42 ^c	14,74±0,83 ^{a,b}	13,64±0,80 ^{b,c}	14,44±0,71 ^b		
	2	15,87±0,49 ^a	15,73±0,56 ^a	15,50±0,45 ^a	15,82±0,27 ^a	12,96±0,10 ^b	15,76±0,36 ^a	15,10±0,27 ^a	15,05±0,11 ^a		
	3	16,56±0,27 ^b	15,28±0,12 ^a	15,25±0,45 ^a	15,19±0,54 ^a	12,45±0,35 ^c	14,81±0,76 ^{a,b}	14,54±0,23 ^a	13,64±0,56 ^b		
	4	14,95±0,30 ^a	15,96±0,21 ^a	15,29±0,74 ^a	14,79±0,34 ^a	12,54±0,11 ^c	14,67±0,87 ^{a,b}	14,35±0,61 ^{a,b}	14,22±0,58 ^b		
	5	15,22±0,41 ^a	15,83±0,32 ^a	15,52±0,31 ^a	16,03±0,75 ^b	12,96±0,34 ^c	14,55±0,34 ^{a,b}	14,69±0,70 ^{a,b}	14,64±0,29 ^a		
		n.s	n.s	n.s	n.s	*	n.s	n.s	n.s		
H*	1	85,41±1,12 ^b	83,74±0,77 ^{b,c,2}	83,53±0,55 ^{b,c,3}	84,10±0,78 ^{b,2}	81,91±0,83 ^{c,2}	85,22±0,67 ^{b,2,3}	89,54±0,17 ^a	90,54±0,07 ^a		
	2	75,09±1,28 ^d	76,94±2,50 ^{c,d,3}	76,41±0,73 ^{d,4}	80,25±1,05 ^{b,c,3}	82,33±0,95 ^{b,2}	84,04±0,13 ^{b,3}	89,30±0,45 ^a	90,04±0,23 ^a		
	3	85,24±0,30 ^b	86,43±0,98 ^{a,3}	86,98±0,56 ^a	85,44±1,03 ^{b,3}	83,59±0,99 ^{b,1}	85,54±0,45 ^{b,1}	89,07±0,98 ^{a,3}	89,02±0,17 ^a		
	4	87,15±0,87 ^a	87,30±0,88 ^{a,1}	86,02±0,34 ^{b,3}	85,97±0,67 ^{b,3}	83,01±0,67 ^c	85,17±0,78 ^b	88,93±0,67 ^{b,3}	90,01±0,45 ^a		
	5	86,93±0,89 ^c	86,68±0,99 ^{b,3}	87,87±0,78 ^a	85,80±0,45 ^{b,3}	83,10±0,73 ^{b,3}	85,48±0,81 ^{b,2}	89,04±0,87 ^a	90,31±0,24 ^a		
		**	**	**	**	**	**	n.s	n.s		
									ΔE ₍₂₄₋₁₎		
ΔE	1								4,29±1,03		
	2								3,14±0,49		
	3								3,94±0,59		
	4								2,58±0,93		
	5								2,67±0,82		
									n.s		

Fonte: (própria autoria)

5.6.3 Oxidação proteica: quantificação do teor de carbonilas

As alterações na qualidade da carne podem ser percebidas pelas mudanças de sabor, de cor, de textura, de valor nutricional e pela produção de compostos potencialmente tóxicos através de reações oxidativas. A carne de frango é um alimento altamente susceptível à oxidação lipídica em função do elevado teor de ácidos graxos insaturados na sua composição. O desenvolvimento dessas reações em produtos alimentícios à base de carne conduz à degradação de aminoácidos essenciais, e à posterior formação de ligações cruzadas bem como de carbonilas proteicas (STADTMAN e LEVINE, 2003).

O perfil temporal da oxidação das proteínas presentes nas amostras de patê de frango foi avaliado através da quantificação de carbonilas totais, e os resultados estão apresentados na Figura 43.

Figura 44: Resultados de oxidação proteica para as amostras de patê de frango durante o período de 24 semanas de armazenamento sob refrigeração: (♦) tratamento 1(sem antioxidantes); (■) tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); (▲) tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); (×) tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); (○) tratamento 5 (adição de quercetina livre).

Fonte: (própria autoria)

A quantificação do teor de carbonilas foi realizada para verificar se as nanoemulsões encapsulando quercetina foram capazes de inibir ou retardar a oxidação proteica no patê de frango.

De acordo com a Figura 43 e Tabela 15, houve variação do teor de carbonilas entre 0,74 e 1,55 nM carbonila/mg de proteína entre os tratamentos na primeira semana

de monitoramento, e durante o armazenamento de 24 semanas, foi possível observar que para todos os tratamentos houve aumento significativo no teor de carbonilas em relação à semana 1.

Tabela 15: Valores médios da oxidação proteica para as amostras de patê de frango durante o período de 24 semanas de armazenamento sob refrigeração: tratamento 1 (sem antioxidantes); tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e quercetina a 0,30%); tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e quercetina a 0,30%); tratamento 5 (adição de quercetina livre).

Semana	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5	Sign.
1	0,88 ^{b3} ±0,24	1,55 ^{a4} ±0,15	0,77 ^{b3} ±0,20	0,70 ^{b2} ±0,09	0,74 ^{b2} ±0,23	**
3	1,53 ^{a23} ±0,23	1,38 ^{a4} ±0,08	2,00 ^{a23} ±0,28	2,20 ^{a12} ±0,68	1,64 ^{a2} ±0,23	**
5	2,36 ^{a23} ±0,25	1,97 ^{a4} ±0,22	1,39 ^{a23} ±0,68	2,04 ^{a12} ±0,68	1,83 ^{a2} ±0,81	**
7	1,61 ^{b23} ±0,29	2,89 ^{a34} ±0,05	1,65 ^{b23} ±0,21	1,50 ^{b12} ±0,52	1,33 ^{b2} ±0,33	**
10	2,66 ^{bc23} ±0,62	3,63 ^{a2} ±0,26	2,58 ^{bc123} ±0,29	3,12 ^{b1} ±0,95	1,36 ^{c2} ±0,16	**
13	3,28 ^{b2} ±0,83	4,45 ^{a1} ±0,41	2,82 ^{b12} ±0,69	3,34 ^{b1} ±0,67	3,15 ^{a1} ±2,30	**
16	5,43 ^{a1} ±1,69	4,58 ^{ab23} ±1,55	4,54 ^{ab1} ±1,57	2,73 ^{b1} ±0,98	2,93 ^{ab2} ±0,40	*
24	5,59 ^{b23} ±1,02	5,02 ^{ac13} ±1,21	5,21 ^{c13} ±1,11	4,78 ^{b12} ±1,09	4,45 ^{b2} ±0,54	**
	**	**	**	**	**	

^{a-b-c} - Médias seguidas com a mesma letra na mesma linha não se diferenciam ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

¹⁻²⁻³⁻ Médias seguidas pelo mesmo número na mesma coluna não se diferenciam ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

Sign.= Significância: * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$), n.s não significativo ($p \geq 0,05$).

Fonte: (própria autoria).

Um comportamento semelhante foi observado em um estudo realizado por Estévez et al. (2006), que avaliaram o efeito dos antioxidantes naturais sálvia e alecrim na oxidação proteica de patê de fígado de porco sobre armazenamento refrigerado. Neste trabalho, a quantidade de carbonilas aumentou significativamente tanto para os tratamentos com sálvia e alecrim quanto para o controle (sem antioxidantes), e com o antioxidante sintético BHT, no período de 60 para 90 dias de armazenamento.

Segundo Jongberg et al. (2013) a inibição da formação de carbonilas proteicas após a adição de compostos antioxidantes fenólicos não é sempre observado, sendo que vários estudos não mostram nenhum efeito anti-oxidativo de extratos de plantas ricas em compostos fenólicos sobre a formação de carbonilas durante a produção e após o tratamento térmico de produtos cárneos. Os mesmos autores ainda relacionam o efeito de proteção à oxidação proteica com a dependência da composição da matéria-prima (tanto em relação ao tipo de carne quanto ao tipo de antioxidante), bem como com as

concentrações de antioxidantes empregadas e com as tecnologias de produção do produto cárneo.

5.6.4 Oxidação lipídica: índice de peróxido e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A partir da oxidação lipídica são gerados os peróxidos que são os produtos primários da oxidação e são intermediários instáveis. No decorrer da sua decomposição, ocorre a formação de compostos de natureza muito diversa, os quais são designados como produtos secundários. A análise de índice de peróxido foi utilizada para determinar os produtos primários da oxidação, enquanto que a análise de TBARS foi empregada para quantificar os produtos secundários da oxidação lipídica.

Os resultados obtidos de índice de peróxido estão apresentados na Figura 45.

Figura 45: Resultados de índice de peróxido para as amostras de patê de frango durante o período de 24 semanas de armazenamento sob refrigeração: (♦) tratamento 1(sem antioxidantes); (■) tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); (▲) tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); (×) tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); (○) tratamento 5 (adição de quercetina livre).

Fonte: (própria autoria).

Os valores do índice de peróxido para todos os tratamentos, na primeira semana de armazenamento apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$), indicando que a adição das nanoemulsões afetou positivamente na estabilidade oxidativa no início do armazenamento. A formação dos peróxidos se inicia durante o processamento e o

tratamento térmico do patê, o que justifica a presença de peróxido nas amostras de patê de frango nos primeiros dias de armazenamento (MORRISSEY et al. 1998). Os valores iniciais obtidos permaneceram próximo a 0,60 meq O₂/kg de amostra, conforme mostrado na Figura 45.

Para todos os tratamentos, após a semana 16 houve um decréscimo significativo nos valores do índice de peróxido durante o armazenamento. Este comportamento ocorre devido à auto-oxidação dos lipídios que compõem o produto, sendo que nas primeiras etapas a taxa de formação dos hidroperóxidos é superior à sua taxa de decomposição. O inverso ocorre na fase posterior, sendo que nesta fase os hidroperóxidos começam a se decompor mais rapidamente na medida em que são formados (AKARPAT et al. (2008).

Embora a redução significativa ($p < 0,05$) nos valores de índice de peróxido, que foi observado após a semana 16 de armazenamento, não houve, durante este período de 16 semanas, um aumento significativo dos valores de TBARS (Tabela 16), os quais são indicativos de oxidação secundária e que está relacionada com a instabilidade desses produtos primários (hidroperóxidos), que se decompõe para gerar produtos secundários (BOSELLI et al., 2005). Dessa forma, esses resultados indicam que os hidroperóxidos podem ter sido degradados em compostos que não podem ser detectados na análise de TBARS, tais como cetonas, álcoois, aldeídos, ácidos orgânicos voláteis ou epóxi (SHAHIDI e ZHONG, 2010).

Em um estudo realizado por Pateiro et al., (2014), também foi observada uma redução do índice de peróxido durante o armazenamento de patê de fígado de porco sobre o efeito de antioxidante obtidos a partir do chá verde, castanha e extrato de uva. Os resultados deste estudo mostraram que a quantidade de peróxidos diminuiu gradativamente durante o armazenamento refrigerado e os autores relacionaram o decaimento com a decomposição destes compostos em produtos de oxidação secundários.

A oxidação lipídica, determinada em termos de valores de TBARS, presentes nas amostras de patê de frango, foi avaliada durante 24 semanas e os resultados estão apresentados na Figura 46.

Figura 46: Perfil temporal dos resultados de TBARS para as amostras de patê de frango durante o período de 24 semanas de armazenamento sob refrigeração: (♦) tratamento 1(sem antioxidantes); (■) tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); (▲) tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); (×) tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); (○) tratamento 5 (adição de quercetina livre).

Fonte: (própria autoria).

A partir da Figura 46 pode-se observar que para todos os tratamentos, inicialmente, a concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrrico se manteve praticamente constante até a semana 13. No entanto, após esta semana houve um decréscimo significativo nos valores de TBARS e no final do período de armazenamento (24 semanas) houve aumento significativo de todas as amostras inclusive para os tratamentos-controle (1 e 2).

Em trabalhos com adição de alho desidratado e óleo de alho em diversas concentrações, aplicados em salsichas de frango, resultou em valores de TBARS iguais ou menores a salsichas adicionadas apenas do antioxidante sintético BHT (0,01%). Entretanto, a formulação destas salsichas de frango continha outros ingredientes que podem ter contribuído para a preservação deste produto tais como fosfato de sódio, glutamato monossódico, nitrato de sódio e outros condimentos como pimenta branca, noz moscada, sálvia (SALLAM et al., 2004; MARIUTTI et al., 2008).

Na Tabela 16 estão representados os valores de TBARS médios para as amostras avaliadas. Estes resultados mostram que a partir da semana 16 houve um aumento significativo para todos os tratamentos em relação à semana 1. Entretanto, ao comparar os valores entre os tratamentos na semana 24, foi possível observar que os tratamentos contendo quercetina livre e as nanoemulsões produzidas com Tween 80 e Brij 30

apresentaram valores de TBARS significativamente menores que os tratamentos controles (1 e 2).

Tabela 16: Valores médios de TBARS para as amostras de patê de frango durante o período de 24 semanas de armazenamento sob refrigeração: tratamento 1(sem antioxidantes); tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); tratamento 5 (adição de quercetina livre).

Semana	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5	Sign.
1	0,649 ^{a2} ±0,084	0,613 ^{a2} ±0,026	0,647 ^{a2} ±0,018	0,607 ^{a3} ±0,023	0,648 ^{a2} ±0,046	Ns
3	0,702 ^{a2} ±0,027	0,736 ^{a2} ±0,036	0,694 ^{a2} ±0,040	0,658 ^{a3} ±0,127	0,643 ^{a2} ±0,101	Ns
5	0,824 ^{a2} ±0,041	0,747 ^{a2} ±0,064	0,753 ^{a2} ±0,087	0,893 ^{a2} ±0,120	1,041 ^{a12} ±0,363	Ns
7	0,848 ^{a2} ±0,149	0,686 ^{a2} ±0,097	0,763 ^{a2} ±0,038	0,654 ^{a3} ±0,020	0,704 ^{a2} ±0,144	Ns
10	0,792 ^{a2} ±0,077	0,740 ^{a2} ±0,047	0,754 ^{a2} ±0,053	0,710 ^{a23} ±0,041	0,716 ^{a2} ±0,091	Ns
13	0,798 ^{a2} ±0,057	0,728 ^{a2} ±0,029	0,726 ^{a2} ±0,056	0,713 ^{a23} ±0,053	0,845 ^{a2} ±0,127	Ns
16	0,404 ^{a1} ±0,319	0,641 ^{b1} ±0,169	0,479 ^{b1} ±0,115	0,486 ^{b1} ±0,061	0,934 ^{b1} ±0,080	**
24	1,910 ^{c12} ±0,53	1,749 ^{c12} ±0,081	0,769 ^{a2} ±0,123	0,705 ^{a23} ±0,20	1,234 ^{c12} ±0,17	**
Signif.	**	**	**	**	**	

^{a-b-c} - Médias seguidas com a mesma letra na mesma linha não se diferenciam ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

¹⁻²⁻³ - Médias seguidas pelo mesmo número na mesma coluna não se diferenciam ao nível de significância de 5%, pelo teste de Tukey.

Sign.= Significância:** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$), n.s não significativo ($p \geq 0,05$).

Fonte: (própria autoria).

5.7 ANÁLISE SENSORIAL DO PATÊ DE FRANGO

Os resultados obtidos a partir das análises microbiológicas realizadas no patê de frango, um dia após o processamento, com a finalidade de quantificar sua qualidade microbiológica para garantir a segurança do produto indicaram que o processamento térmico realizado foi eficiente, e, portanto, o patê de frango empregado na análise sensorial não ofereceu risco microbiológico para a saúde dos provadores.

Para avaliar a oxidação lipídica a análise sensorial foi realizada nos dias 0, 30, 60 e 90 e os atributos cor, odor e aceitação global foram avaliados. As notas para cada atributo era de 0 - 9 em escala hedônica. A média dos resultados e a análise de estatística ao nível de 5% de significância estão apresentadas na Figura 47.

Figura 47: Resultados da aceitação sensorial para as amostras de patê de frango durante o período de 90 dias de armazenamento sob refrigeração: (■) tratamento 1(sem antioxidantes); (■) tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); (■) tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); (■) tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); (■) tratamento 5 (adição de quercetina livre).

Fonte: (própria autoria).

As cinco formulações de patê de frango apresentaram o mesmo grau de aceitação, pois as suas pontuações não foram significativamente diferentes. No entanto somente após 90 dias de armazenamento as notas atribuídas foram menores, indicando que os provadores perceberam as alterações no produto em todos os tratamentos (Odor, Cor e Qualidade Global) devido à oxidação lipídica. As maiores diferenças da amostra controle foram para o atributo qualidade global para o tratamento 3 e de odor, cor e qualidade global para o tratamento 5 (adição de quercetina livre). A incorporação de quercetina livre no patê de frango alterou visualmente a cor do produto (tornando-o mais escuro) e esse deve ser o motivo que mais influenciou no parâmetro odor e, consequentemente, na qualidade global do produto, visto que os provadores trataram essa amostra com um pré-conceito devido a forte diferença da amostra controle.

Para avaliar a diferença de odor, cor e sabor da amostra controle com os diferentes tratamentos aplicados ao patê de frango foi realizada a análise de comparação através do teste de médias (Dunnett). As notas para cada atributo era de 0 - 5 em escala hedônica. A média dos resultados e a análise de estatística ao nível de 5% de significância estão apresentadas na Figura 48.

Figura 48: Resultados da comparação da amostra controle de patê de frango com os quatro tratamentos: (■) tratamento 1 (adição de BHT e nitrito de sódio); (■) tratamento 2 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); (■) tratamento 3 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); (■) tratamento 4 (adição de quercetina livre).

Fonte: (própria autoria).

A partir da Figura 48 pode-se observar que houve diferença significativa (extremamente diferente do controle) apenas para a característica cor para o tratamento 4 (patê adicionado com quercetina livre). Este resultado torna-se interessante para este

trabalho, pois pode justificar a eventual necessidade de encapsular o bioativo utilizado. A alteração de cor causada pela aplicação de quercetina livre em patê de frango pode estar associada com a possibilidade de o bioativo atuar como um pró-oxidante; essa inversão de função da quercetina (antioxidante para pró-oxidante) está relacionada com sua concentração no produto sendo favorecida pela riqueza de substâncias que favorecem a oxidação do produto (causando, principalmente a alteração de cor). As outras características avaliadas não se mostraram diferentes da amostra controle (sem antioxidantes).

Para avaliar o quanto o provador gostou ou desgostou de cada amostra patê de frango (inclusive da amostra controle) de em relação aos atributos cor, odor e sabor foi utilizado o teste de aceitação. As notas para cada atributo foi de 0 - 9 em escala hedônica. As médias dos resultados e a avaliação estatística estão apresentadas na Figura 49.

Figura 49: Resultados da comparação da amostra controle de patê de frango com os quatro tratamentos: (■) tratamento 1(sem antioxidantes); (■) tratamento 2 (adição de BHT e nitrito de sódio); (■) tratamento 3 (adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina); (■) tratamento 4 (adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina); (■) tratamento 5 (adição de quercetina livre).

Fonte: (própria autoria).

A partir da Figura 49 pode-se observar que houve diferença significativa para as características cor e sabor para o tratamento 5 (adição de quercetina livre). Este resultado torna-se interessante para este trabalho, pois pode-se justificar a necessidade de encapsular o bioativo utilizado. As outras características avaliadas não se mostraram diferentes da amostra controle.

Finalmente, durante a análise sensorial também foi avaliada a intenção de compra pelos provadores após 90 dias de armazenamento. Os resultados estão apresentados na Figura 50.

Figura 50: Resultados do teste de intenção de compra de patê de frango para cada tratamento: (■) certamente não compraria o produto; (■) possivelmente não compraria o produto; (■) talvez compraria/talvez não compraria; (■) possivelmente compraria o produto; (■) certamente compraria o produto. Tratamento 1- sem antioxidantes; tratamento 2 - adição de BHT e nitrito de sódio; tratamento 3 - adição da nanoemulsão produzida com Tween 80 e 0,30% quercetina; tratamento 4 - adição de nanoemulsão produzida com Brij 30 e 0,30% quercetina; tratamento 5 - adição de quercetina livre.

Fonte: (própria autoria).

De acordo com a Figura 50 pode-se observar as amostras contendo os tratamentos 1, 2, 3 e 4 possivelmente seriam adquiridas pelos consumidores (45% dos provadores comprariam o produto). No entanto, as amostras contendo o tratamento 5 (adição de quercetina livre) apresentou aproximadamente 50% de rejeição pelos consumidores, indicando que a incorporação do bioativo livre leva a alterações sensoriais significativas do produto. Este resultado justifica-se a partir das notas de cor e sabor atribuído nos testes anteriores.

A adição de antioxidante natural (quercetina) em patê de frango se mostrou ter um efeito antioxidante interessante frente ao antioxidante sintético (BHT), pois não houve diferenças significativas dos aspectos sensoriais do produto. Resultados semelhantes também foram encontrado por Pateiro et al. (2014) que avaliaram o efeito da adição de antioxidantes naturais (óleos essenciais) em patê de fígado de porco.

Portanto, frente aos dados obtidos através das análises sensoriais, pode-se concluir que as nanoemulsões contendo quercetina encapsulada podem ser uma alternativa interessante na substituição de antioxidantes sintéticos na matriz alimentícia testada.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados experimentais obtidos na presente Dissertação de Mestrado, foi possível concluir que:

- Foi possível produzir nanoemulsões pelo método EIP.
- Os melhores parâmetros de produção das nanoemulsões pelo método EIP obtidos foram: 1 - Nanoemulsões usando tensoativo Tween 80: vazão de adição de fase aquosa de 12 ml / min, intensidade de agitação (500 rpm), com 20% glicerol como cosolvente, 20% de óleo de girassol e o tensoativo Tween 80 na razão $SOR = 1,25$; 2- Nanoemulsões usando tensoativo Brij 30: vazão de adição de fase aquosa de 12 ml / min, intensidade de agitação (500 rpm), 20% de óleo de girassol e o agente tensoativo Tween 80 na razão $SOR = 1,75$
- Dentre as porcentagens de quercetina encapsuladas nas nanoemulsões, as formulações com 0,30% apresentaram melhor distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos e preservação da quercetina encapsulada superior a 50% durante 90 dias de monitoramento.
- As nanoemulsões contendo quercetina encapsulada se mostraram eficazes na aplicação de patê de frango, apresentando viabilidade na preservação do produto (em termos da oxidação lipídica e oxidação proteica);
- Dentre os tensoativos utilizados o mais viável para a produção das nanoemulsões foi o Tween 80, já que diante dos resultados ambos apresentaram resultados semelhantes, no entanto o Tween 80 apresenta o menor valor de mercado;
- Com relação às características sensoriais, não houve grande diferença do controle adicionado de BHT e Nitrito.

Assim, a produção de nanoemulsão pelo método EIP com o uso dos parâmetros apresentados no presente projeto, pode ser considerada promissora para encapsulação de bioativos e também para aplicação em matrizes alimentícias.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo da encapsulação de outros bioativos nas nanoemulsões obtidas pelo presente método;
- Escalonamento da produção das nanoemulsões com os parâmetros obtidos;
- Aplicação das nanoemulsões contendo quercetina encapsulada em outros produtos alimentícios, como por exemplo, a salsicha.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKARPAT, A.; TURHAN, S.; USTUN, N.S. Effects of hot-water extracts from myrtle, rosemary, nettle and lemon balm leaves on lipid oxidation and color of beef patties during frozen storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 32, p.117–132, 2008.

ALLHOFF, F.; P. Lin; MOOR, J.; WECHERT, J. Nanoethics: The Ethical and Social Implications of Nanotechnology. apud P.R. Buseck; K. Adachi in **Nanoparticles in the Atmosphere**. Elements, v. 4, p. 389–394, 2008.

ALMEIDA, M. E; TEIXEIRA, H. F; KOESTER, L, S. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na Atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 10, p. 780, 2008.

ARORA, A., MURALEEDHARAN, G.N., STRASBURG, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, Philadelphia, v.24, p.1355-1363, 1998.

ABEF – Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango. Disponível em: Acesso em 03 Jan. 2016.

AGUILERA, J. M. Why food microstructure? **Journal of Food Engineering**, London, v. 67, p. 3–11, 2005.

AGUIYI, J.C. et al. Hyypoglycaemic activity of *Ocimum gratissimum* in rats. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.71, p.444-6, 2000.

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.49, p.4168-70, 2001.

ANTON, N.; GAYET, P.; BENOIT, J.P.; SAULNIER, P. Nanoemulsions and Nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature

cycling on the emulsion phase inversion. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 344, p. 44-52, 2007.

ANTON, N.; VANDAMME T. F. The University of low-energy nano-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 377, p. 142-147, 2009.

ARABSHAHI-D, S.; DEVI, D. V.; UROOJ, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 100, p. 1100–1105, 2007.

ARCILA-LOZANO, C.C. et al. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. **Archivos Nutrición**, San Salvado, v.54, p.100-11, 2004.

Arena: New Opportunities, New Questions, New Concerns.RSC. **Nanoscience & Nanotechnology**, Kuala Lumpur, v. 14, n. 14, p. 1-17, 2010.

ASSIS, L. M; ZAVAREZE, E. R; PRENTICE-HERNANDEZ, C; SOUZA-SOARES, L. A. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brasilian Journal of Food Technology**. Chichester, v.15, p. 99-109, 2012.

ATMANI, D.; CHAHER, N.; BERBOUCHA, M.; AYOUNI, K.; LOUNIS, H.; BOUDAUD, H.; DEBBACHE, N. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. **Food Chemistry**, Barking, v.112, p. 303-309, 2009.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.99, p.191-203, 2006.

BEDIN, C., GUTKOSKI, S.B., WIEST, J.M. Atividade antimicrobiana das especiarias. **Higiene Alimentar**, v. 13(65), p. 26 – 9, 1999.

BERGER, K. G.; HAMILTON, R. J. Em Developments in Oils and Fats; Hamilton, R. J., ed.; Chapman & Hall: London, cap. 7, 1995.

BAILEY, A. E.; Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 5th ed., John Wiley: New York, v. 3, 1996.

BERNEWITZ, R. et al. Structure of and diffusion in O/W/O double emulsions by CLSM and NMR-comparison with W/O/W. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 458, p. 10-18, 2014.

BIANCHI, M. L. P., ANTUNES, L. M. M. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Brasilian Journal of Nutrition**, Campinas, v. 12, 1999.

BOSELLI, E.; CABONI, M. A.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; TOSCHI, T. G.; DANIEL, M.; LERCKER, G. Photooxidation of cholesterol and lipids of turkey meat during storage under commercial retail conditions. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 91, p.705–713, 2005.

BLUNDELL, J. E., THURLBY, P. L. Experimental manipulations of eating advances in animal models for studying anorectic agents. **Pharmacological Therapy**, v. 34, p. 349–401, 1987.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaften und Technologie**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

BOCCUNI, F. et al. Potential occupational exposure to manufactured nanoparticles in Italy. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 16, p. 949-956, 2008.

BORRIN, T.R. et al. Curcumin-loaded nanoemulsions produced by the emulsion inversion point (EIP) method: an evaluation of process parameters and physicochemical stability. **Journal of Food Engineering**, London, v. 169, p. 1-9, 2016.

BORRIN, T.R. Nanoemulsões produzidas pelo método do ponto de inversão da emulsão (EIP) para encapsulação de curcumina: parâmetros de produção, estabilidade físico-química e incorporação em sorvete. 2015. Dissertação (Mestrado)

– Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

BOUCHEMAL, K., BRIANÇON, S., PERRIER, E., FESSI, H. Nanoemulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 280, p. 241-251, 2004.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, p. 317-333, 1998.

BROINIZI, P. R. B et al., Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, p. 902-908, 2007.

BROOKS, B. W.; RICHMOND, H. N. Phase inversion in non-ionic surfactant-oil-water systems – II. Drop size studies in catastrophic inversion with turbulent mixing. **Chemical Engineering Science**, Kidlington, v. 49, p. 1065-1075, 1994.

CARVALHO, H.H.C. Avaliação da atividade antibacteriana de plantas com indicativo etnográfico condimentar sobre contaminantes e inóculos padronizados. 200 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, 2004.

CHAUDHRY, Q. et al. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food Additives and Contaminants**, Abingdon, v. 25, p. 241-258, 2008.

CHAUDHRY, Q.; WATKINS, R.; CASTLE, L. Nanotechnologies in the Food Arena: New Opportunities, New Questions, New Concerns. **RSC Nanoscience & Nanotechnology**, Kuala Lumpur, v. 14, p. 1-17, 2010.

CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 17, p. 272–283, 2006.

CHIU, W. The Preparation and Physical Properties of Jojoba Oil Nano-Emulsion, Doctoral Dissertation, Department of Applied Chemistry, 2006.

COMISSÃO EUROPÉIA. Nanotechnology: innovation for tomorrow's world. Bruxelas: Directorate General for Research, 2004.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVES, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance (ORAC) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, p. 48-54, 2004.

DELGADO-PANDO, G.; COFRADES, S.; RODRÍGUEZ-SALAS, L.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients in low-fat pork liver pâté. **Meat Science**, Amsterdam, v. 88, p. 241-248, 2011.

DE MORAIS, J., SANTOS, O., DELICATO, T., GONCALVES, R., AND ROCHA, P.-FILHO. Physicochemical characterization of canola oil/water nano-emulsions obtained by determination of required hlb number and emulsion phase inversion methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 27, p. 109–115, 2006.

DE OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BACHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, Campinas, v. 32, p. 689-702, 2009.

DESAI, K. G. H.; PARK, J. H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, New York, v. 23, p. 1361-1394, 2005.

DIAZ, M. N.; FREI, B.; VITA, J.E.; KEANEY, J. F. Antioxidans and atherosclerotic heart disease. **Journal of Medicine and Nutrition England**, v. 337, p. 408-416, 1997.

DICKINSON, E. **Introduction to food colloids**. Oxford, UK: Oxford University Press, 1992.

DOOLAEGE, E. H. A.; VOSSEN, E.; RAES, K.; DE MEULENAER, B.; VERHÉ, R.; PAELINCK, H.; DE SMET, S. Effect of rosemary extract dose on lipid oxidation, colour stability and antioxidant concentrations, in reduced nitrite liver patés. **Meat Science**, Amsterdam v. 90, p. 925–931 2012.

DRISKO, J.A.; CHAPMAN, J.; HUNTER, V.J. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. *Gynecol. Oncol.*, v.88, p. 434-439, 2003.

ESPIN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHES, H. J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 1588-1592, 2000.

ESTÉVEZ, M.; CAVA, R. Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver pâté. **Meat Science**, Amsterdam v. 68, p. 551–558, 2004.

ESTÉVEZ, M.; CAVA, R. Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: Contradictory effects in different types of frankfurters. **Meat Science**, Amsterdam v. 72, p. 348–355, 2006.

ESTÉVEZ, M.; VENTANAS, S.; CAVA, R. Physicochemical properties and oxidative stability of liver pâté as affected by fat content. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.92, p. 449-457, 2005.

ESTÉVEZ, M.; VENTANAS, S.; CAVA, R. Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver paté. **Meat Science**, Amsterdam, v. 74, p. 396–403, 2006.

ESTÉVEZ, M.; RAMÍREZ, R.; VENTANAS, S.; CAVA, R. Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté. **LWT- Food Science and Technology**, London, v.40, p. 58–65, 2007.

FARMER, E. H.; BLOOMFIELD, G. G.; SUNDRALINGAM, S.; SUTTON, D. A.; *Trans. Faraday Soc*, v. 38, p. 348, 1942.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHNLE, A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 251, p. 53-58, 2004.

GANDRA, E, A. et al. Potencial antimicrobiano e antioxidante de extratos vegetais de alecrim, erva doce, estragão e orégano. *Review Ciência y tecnología*, v.20, p. 24-29, 2003.

GARCÍA, M; FORBE, T; GONZALEZ, E.; Potential applications of nanotechnology in the agro-food sector. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 30, 2010.

GASPAR, J., LAIRES, A., MONTEIRO, M., LAUREANO, O., RAMOS, E., RUEFF, J. Quercetin and the mutagenicity of wines. **Mutagenesis**, Oxford, v.8, p.51-55, 1993.

GHOSH, A et al., Hepatoprotective and neuroprotective activity of liposomal quercetin in combating chronic arsenic induced oxidative damage in liver and brain of rats. **Drug Delivery**, Philadelphia, v. 18, p. 451-459, 2011.

GIROUX, H. J.; BRITTEN, M. Encapsulation of hydrophobic aroma in whey protein nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, Abingdon, v. 28, p. 337–343, 2011.

GOULD, G.W. Industry perspective on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **Journal of Food Protection**. Des Moines, v. 58(1), p. 82 - 86, 1995.

GRÜN, I.; AHN, J.; CLARKE, A.; LORENZEN, C. Reducing oxidation of meat. **Food Technology**, Chicago, v. 1, p. 36–43, 2006.

GÜLÇİN, I. et al. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) assayed by different methodologies. **Phytotherapy Research**, Chichester, v.21, p.354-61, 2007.

HAIYING, T. et al. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Heidelberg, v.85, p.373-82, 2008.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, Amsterdam, v.48, p. 1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B. Antioxidant defence mechanisms: from the Beginning to the end (of the Beginning). **Free Radical Research**, London, v. 31, p. 261-272, 1999.

HATANAKA, J., KIMURA, Y., Z. LAI-FU, ONOUE, S., AND YAMADA, S. Physicochemical and pharmacokinetic characterization of water-soluble coenzyme Q10 formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 363, p.112–117, 2008.

HATANAKA, J. et al. Physicochemical and pharmacological characterization of alpha-tocopherol-inaded nanoemulsion system. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 396, p. 188-193, 2010.

HARTMAN, P.E., SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Hoboken, v.15, p.145-182, 1990.

HENRY, J., FRYER, P., FRITH, W., AND NORTON, I. emulsification mechanism and storage instabilities of hydrocarbon-in-water sub-micron emulsions stabilised with tweens (20 and 80), brij 96v and sucrose monoesters. **Journal of Colloid and Interface Science**, Maryland Heights, v. 338, p. 201–206, 2009.

HOELLER, S., SPERGER, A., AND VALENTA, C. Lecithin based nanoemulsions: a Comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 370, p. 181–186, 2009.

HOPIA, A; HEINONEM, M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Heidelberg, v. 76, p. 139-144, 1999.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUNTER, R. J. Foundations of colloid science. Oxford: Oxford University Press, 2001.

JAFARI, S., HE, Y., BHANDARI, B. Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. **Food Research and Technology**, Amsterdam, v. 225, p. 733–741, 2007.

JAFARI, S. M. et al. Recoalescence of emulsion droplets during high- energy emulsification. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 22, p. 1191-1202, 2008.

JAHANZAD, F. et al. Catastrophic phase inversion via formation of multiple emulsions: a prerequisite for formation of fine emulsions. **Chemical Engineering Research and Design**, London, v. 87, p. 492-498, 2009.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. Colour stability and lipid oxidation of fresh beef. Development of a response surface model for predicting the effects of temperature, storage time, and modified atmosphere composition. **Meat Science**, Amsterdam, v. 54, p. 49–57, 2000.

JUNTACHOTE, T. et al. Antioxidative effect of added dried holy basil and its ethanolic extracts on susceptibility of cooked ground pork to lipid oxidation. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.100, p.129-35, 2007.

KHALID, N; KOBAYASHI, I; NEVES, M. A; UEMURA, K; NAKAJIMA, M; NABETANI, H. Microchannel emulsification study on formulation and stability characterization of monodisperse oil-in-water emulsions encapsulating quercetin. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.212, p.27-34, 2016.

KANADASWAMI, C. et al. The antitumor activities of flavonoids. In Vivo, Attiki, v. 19, p. 895-909, 2005.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E.JR. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. Adv. Exp. Med. Biol., v. 366, p. 351-376, 1994.

KAYA-CELIK, H.; MALLIKARJUNAN, K. Better Nutrients and Therapeutics Delivery in Food Through Nanotechnology. **Food Engineering Reviews**, New York, v. 4, p. 114-123, 2012.

KRALOVA, I., AND SJOBLUM, J. Surfactants used in food industry: A review. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 30, p.1363–1383, 2009.

KUAN, C. Y., YEE-FUNG, W., YEUN, K. H., LOING, M.T. Nanotech: propensity in foods and bioactives. Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, Abingdon, v. 52:1, p. 55-71, 2012.

KUBOW, S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. **Nutrition Reviews**, New York, v. 51, p. 33-40, 1993.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 25, p. 726-732, 2005.

LAGOURI, V.; NISTEROPOULOU, E. Antioxidant properties of *O. onites*, *T. vulguris* and *O. basilicum* species grown in Greece and their total phenol and rosmarinic acid content. **Journal of Food Lipids**, Malden, v.16, p.484-98, 2009.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, Kidlington, v.46, p.244-82, 2007.

LAGOURI, V.; NISTEROPOULOU, E. Antioxidant properties of *O. onites*, *T. vulgaris* and *O. basilicum* species grown in Greece and their total phenol and rosmarinic acid content. **Journal of Food Lipids**, Malden, v.16, p.484-98, 2009.

LANDI-LIBRANDI, A. P. et al. Inhibitory activity of liposomal flavonoids during oxidative metabolism of human neutrophils upon stimulation with immune complexes and phorbol ester. **Drug Delivery**, Philadelphia, v. 19, p. 177-187, 2012.

LEAL-CALDERON, F.; SCHNITT, V.; BIBETTE, J. **Emulsion science: basic principles**. Berlin, Germany: Springer Verlag, 2007.

LEE Y, S., OWENS, C, M., MEULLENET, J, F. On the Quality of Commercial Boneless Skinless Broiler Breast Meat. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 73, p.253-261, 2008.

LEONARDUZZI, G. et al. Design and development of nanovehicle-based delivery systems for preventive or therapeutic supplementation with flavonoids. **Current Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 17, p. 74-95, 2010.

LEONG, T. et al. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 16, p. 721-727, 2009.

LI, H. et al. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 133, p. 238-244, 2009.

LIM, Y.Y.; LIM, T.T.; TEE, J.J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. **Food Chemistry**, Barking, v.103, p. 1003-1008, 2007.

LIU, F., NIU, Z. Carcass Quality of Different Meat - Typed chickens when achieve a common physiological body weight. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 7, p.319-322, 2008.

LIU, X.; CUI, C.; ZHAO, M.; WANG, J.; LOU, W.; YANG, B.; JIANG, Y. Identification of phenolics in the fruit of emblica (*Phyllanthus emblica* L.) and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, Barking, v.109, p.909-915, 2008.

LIU, W., SUN, D., LI, C., LIU, Q., AND XU, J. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Journal of Colloid and Interface Science**, Maryland Heights, v. 303, p.557–563, 2006.

LORENZO, J. M.; PATEIRO, M. Influence of fat content on physico-chemical and oxidative stability of foal liver pâté. **Meat Science**, Amsterdam, v. 95, p. 330-335, 2013.

LORENZO, J. M.; SINEIRO, J.; AMADO, I. R.; FRANCO, D. Influence of natural extracts on the shelf life of modified atmosphere-packaged pork patties. **Meat Science**, Amsterdam, v. 96, p. 526–534, 2014.

MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidants nutrients. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 1, p. 441-445, 1987.

MAGDELAINE, P., SPIESS, M, P., VALCESCHINI, E. Poultry meat consumption trends in Europe. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 64(1), p.53-63, 2008.

MAO, L.K., XU, D., X., YANG, J., YUAN, F., GAO, Y.X., AND ZHAO, J. Effects of small and large molecule emulsifiers on the characteristics of beta-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 47, p. 336–342, 2009.

MARTINS, P.R. Nanotecnologia, Sociedade e Meio Ambiente. **I Seminário Internacional**. São Paulo: Associação Editorial Humanitas, 2008.

MASON, T, G; WILKING, J, N; MELESON, K; CHANG, C, B; GRAVES, S, M. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, Bristol, v.18, p. 285-330, 2006.

MAYER, S.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. Vitamin-E enriched nanoemulsions formed by emulsion phase inversion: factors influencing droplet size and stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, Maryland Heights, v. 402, p. 122-130, 2013.

McCLEMENTS, D. J. Food emulsions: principles, practices and techniques. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2005.

McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; PARK, Y.; WEISS, J.. Structural Design Principles for Delivery of Bioactive Components in Nutraceuticals and Functional Foods. **Food Science and Nutrition**, New York, v. 49, p. 577–606, 2009.

McCLEMENTS, D.J. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, Amsterdam, v. 174, p. 1-30, 2012.

McCLEMENTS, D.J.; RAO, J. Food Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, New York, v. 51:4, p. 285-330, 2011.

MELO, A.S. et al. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum*L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.16, p.24-30, 2006.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Soungklanakarin Journal of Food Science and Technology**, Wiltshire, v.26, p. 211-219, 2004.

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1655-1666, 2009.

MONCADA, E. A. Nanotechnology, food and drug packaging applications. **Vitae**, Johannesburg, v. 14, n. 2, 2007.

MORAES-LOVISON, M. et al. Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pâté. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 77, p. 233-240, 2017.

KWEE, E. M.; NIEMEYER, E.D. Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 128, p.1044-1050, 2011.

NIK, A.M., CORREDIG, M., WRIGHT, A.J., CHANGES in WPI-stabilized emulsion interfacial properties in relation to lipolysis and β -carotene transfer during exposure to simulated gastric-duodenal fluids of variable composition. **Food Digestion**, New York, v. 1, p. 14-27, 2010.

NOBUYOKI, I. et al. Antioxidants: carcinogenic and chemopreventive properties. **Encyclopedia of Cancer**, New York, v.1, p.89-101, 2003.

NOVAK, J. et al. Ratios of cis- and trans- sabinene hydrate in *Origanum marjorana* L. and *Origanum midrophyllum* (Bentham) vogel. **Biochemical Systematics and Ecology**, Kidlington, v.28, p.697-704, 2000.

OLIVEIRA, A. G. et al. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, 2004.

OZGEN, M.; RESSE, R. N.; TULIO JR., A.Z.; SCHEERENS, J. C.; MILLER, A. R. Modified 2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 1151-1157, 2006.

PATEIRO, M.; LORENZO, J. M.; AMADO, I. R.; FRANCO, D. Effect of addition of green tea, chestnut and grape extract on the shelf-life of pig liver pâté. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.147, p.386-394, 2014.

PERAZZO, A; PREZIOSI, V; GUIDO, S. Phase inversion emulsification: Current understanding and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, p. 581 – 599, 2015.

PETERSEN, B; EGERT, S; BOSY-WESTPHAL, A; MÜLLER, M, J; WOLFFRAM, S; HUBBERMANN, E, M; RIMBACH, G; SCHWARZ, K. Bioavailability of quercetin in humans and the influence of food matrix comparing quercetin capsules and different apple sources. **Food Research International**, Kidlington, v. 88, p. 159-165, 2016.

PISKULA, M.K.; MUROTA, K.; TERAQ, J. Bioavailability of flavonols and flavones. In: CROZIER, A. (Ed.). *Flavonoids and related compounds: bioavailability and function*. Boca Raton: CRC Press, p. 93-107, 2012.

POOL, H. et al. Polymeric nanoparticles as oral delivery systems for encapsulation and release of polyphenolic compounds: impact on quercetin antioxidant activity & bioaccessibility. **Food Biophysics**, New York, v. 7, p. 276-288, 2012.

POOL, H., Quintanar, D., Figueroa, J. D. D., MarinhoMano, C., Bechara, J. E. H., Godinez, L. A., et al. Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, New York, 2012.

RAMALHO, V. C; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, 2006.

REISCHE, D. W.; LILLIARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. Antioxidants. In: Akoh CC, Min DB, editors. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**, New York: Marcel Dekker. p 423–448, 1998.

RELKIN, P., JUNG, J.M., AND OLLIVON, M. Factors affecting vitamin degradation in oil-in-water nano-emulsions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Budapest, v. 98, p.13–18, 2009.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidante properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.2, p. 152- 159, 1997.

RIZZI, A. T. Mudanças Tecnológicas e Reestruturação da Indústria Agroalimentar: o Caso da Indústria de Frango no Brasil. 1993. Doutorado (Tese) - Instituto de Economia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

RODRÍGUEZ-CARPENA, J. G.; MORCUENDE, D.; ESTÉVEZ, M. Avocado by-products as inhibitors of colour deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage. **Meat Science**, Amsterdam, v. 89, p. 166–173, 2011.

SADURN, N., SOLANS, C., AZEMAR, N., AND M. GARCA-CELMA. Studies on the formation of o/w nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 26, p.438–445, 2005.

SALAGER, J. L. et al. Partitioning of ethoxylated octylphenol surfactants in microemulsion-oil-water systems: influence of temperature and relation between partitioning coefficient and physicochemical formulation. **American Quemical Society**, v. 16, p. 5534-5539, 2000.

SARDONE, L et al. Temperature and pressure dependence of quercetin-3-O-palmitate interaction with a model phospholipid membrane: film balance and scanning probe microscopy study. **Journal of Colloid and Interface Science**, Maryland Heights, p. 329 – 335, 2004.

SAJJADI, S.; JAHANZAD, F.; YIANNESKIS, M. Catastrophic phase inversion of abnormal emulsions in the vicinity of the locus of transitional inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 240, p. 149-155, 2004.

SANTOS, M. Técnica, Espaço, Tempo: globalização e meio técnico-científico-informacional. São Paulo: Hucitec, 190p, 1994.

SASSE, A. et al. Effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of cooked, frozen pork patties. **Journal of Food Science**, Hoboken, v.74, p.30-5, 2009.

SATUÉ-GARCIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Anthocyanins as antioxidants on human lowdensity lipoprotein and lecithin-liposome systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, p. 3.362-3.367, 1997.

SCHUBERT, H.; AX, K.; BENHREND, O. Product Engineering of Dispersed Systems. **Trends in Food Science and Technology**, Kidlington, v. 14, p. 9-16, 2003.

SCHWARZ, K. Phenolic diterpenes from rosemary and sage. **Functional foods: biochemical and processing aspects**, v. 2, chap 6, 2002.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, Barking, v.113, p.1202-1205, 2009.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, 39, 4067-4079, 2010.

SHEN, Z.P., UDABAGE, P., BURGAR, I., AND AUGUSTIN, M.A. Characterization of fish oil-in-water emulsions using light-scattering, nuclear magnetic resonance, and gas chromatography-headspace analyses. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Heidelberg, v. 82, p. 797–802, 2005.

SIDDHURAJU, P.; MANIAN, S. The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of dietary phenolic extracts from horse gram (*Macrotyloma uniflorum*). **Food Chemistry**, Barking, v.105, p.950-958, 2009.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, p. 1315-1321, 1995.

SILVA, M.L.C. et al. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias**, São Paulo, v.31, p.669-82, 2010.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A.; Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo. v. 22, 1999.

SIMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. Em Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis; Ho, C. T.; Osawa, T.; Huang, T. M.; Rosen, R. T., eds.; **Food Phytochemicals for Cancer Prevention**, New York, p. 20, 1994.

SIGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, Orlando, v.299, p. 152-178, 1999.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, 2002.

SOLANS, C. et al. Nanoemulsions. Current opinion in **Colloid e Interface Science**, Kidlington, v. 10, p. 102-110, 2005.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by Low Energy Methods. Current Opinion in **Colloid and Interface Science**, Kidlington, v. 17, p. 246-254, 2012.

SORATA, Y.; TAKAHAMA, U.; KIMURA, M. Protective effect of quercetin and rutin on the photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. **Biochimica et Biophysica Acta: international journal of biochemistry and biophysics**, Amsterdam, v. 799, p. 313-317, 1984.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. Advances in **Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

TAN, C. T. Beverage emulsions in food emulsions. 4nd ed. New York: Friberg, S. E. & Larsson, K., 2004.

TAN, C.P., AND NAKAJIMA, M. Beta-carotene nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 92, p.661–671, 2005.

TENG, Z.; LUO, Y. C.; WANG, Q. Nanoparticles synthesized from soy protein: preparation, characterization and application for nutraceutical encapsulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, p. 2712–2720, 2012.

TRICHES, D.; CALDART, W. L., SIMAN, R. F.; STÜLP, V. J. A cadeia produtiva da carne de frango da região da serra gaúcha: Uma análise da estrutura de produção e mercado. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, XLIII., Ribeirão Preto, USP. Ribeirão Preto: v. 1, 2004.

WALSTRA, P. Physical Chemistry of Foods. New York: Marcel Dekker, 2003.

WANG, K. G.; GLICKSMAN, M. E. Ostwald ripening in materials processing. London: LLC, 2007.

WANG, W; SUN, C; MAO, L; MA, P; LIU, F; YANG, J; GAO, Y. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. Trends in **Food Science & technology**, Kidlington, v. 56, p. 21-38, 2016.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; McCLEMENTS, D. J. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 71, p. 107-116, 2006.

WONG, M.Y.; CHIU, G.N.C. Liposome formulation of co-encapsulated vincristine and quercetin enhanced antitumor activity in a trastuzumab-insensitive breast tumor xenograft model. **Nanomedicine**, London , v. 7, p. 834-840, 2011.

WOOSTER, T. J.; GOLDING, M.; SANGUANSRI, P. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability., v. 24, p. 12758-12765, 2008.

WU, T.H. et al. Preparation, physicochemical characterization and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.346, p. 160-168, 2008.

YANG, L. et al. Characterization of quercetin/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. **Asian Journal of Chemistry**, Ghaziabad, v. 24, p. 3141-3144, 2012.

YANG, Y. et al. of ultrafine edible emulsions: comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 29, p. 398- 406, 2012.

YANISHLIEVA, N.V. et al. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.108, p.776-93, 2006.

YUAN, Z. P. et al. Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 12, p. 3193-3199, 2006.

YUAN, Y., GAO, Y., ZHAO, J., AND MAO, L. Characterization and stability evaluation of [beta]-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. **Food Research International**, Kidlington, v. 41(1), p. 61–68, 2008.

APÊNDICE A – Curva Padrão para determinação da eficiência de encapsulação de quercetina

APÊNDICE B - Curva Padrão para Quantificação de Fenólicos Totais
(Método de Folin-Ciocalteu)

APÊNDICE C - Modelo da Ficha de avaliação sensorial do patê de frango – TESTE DE COMPARAÇÃO.

NOME: _____ DATA: _____ FICHA: _____ IDADE: _____

Você está recebendo uma amostra controle e quatro amostras codificadas de patê de frango. Por favor, prove a amostra controle e em seguida prove cada uma das amostras codificadas e avalie, utilizando a escala abaixo, o quanto cada amostra difere, em termos globais (odor, cor e sabor), da amostra controle.

		AMOSTRA				
Escala 0- nenhuma diferença do controle 1 - ligeiramente diferente do controle 2 - pouco diferente do controle 3 - muito diferente do controle 4 - muitíssimo diferente do controle 5 - extremamente diferente do controle	Odor					
	Cor					
	Sabor					

Agora, avalie cada amostra e marque de acordo com a escala o quanto você gostou ou desgostou das seguintes características:

		AMOSTRA				
Escala 1- Desgostei muitíssimo 2- Desgostei muito 3- Desgostei regularmente 4- Desgostei ligeiramente 5- Indiferente 6- Gostei ligeiramente 7- Gostei regularmente 8- Gostei muito 9- Gostei muitíssimo	Odor					
	Cor					
	Sabor					

Intenção de compra:	AMOSTRA				
5 - certamente compraria o produto					
4 - possivelmente compraria o produto					
3 - talvez compraria / talvez não compraria					
2 - possivelmente não compraria o produto					
1 - certamente não compraria o produto					

Comentários:

**APÊNDICE D - Modelo da Ficha de avaliação sensorial do patê de frango –
TESTE DE ACEITAÇÃO.**

NOME: _____ DATA: _____ FICHA: _____

Você está recebendo CINCO amostras de patê de frango. Por favor, avalie o produto observando apenas o odor e a cor (SEM PROVAR), e marque de acordo com a escala o quanto você gostou ou desgostou das seguintes características:

		AMOSTRA				
Escala 1- Desgostei muitíssimo 2- Desgostei muito 3- Desgostei regularmente 4- Desgostei ligeiramente 5- Indiferente 6- Gostei ligeiramente 7- Gostei regularmente 8- Gostei muito 9- Gostei muitíssimo	Odor					
	Cor					
	Qualidade global					

Comentários:

APÊNDICE E: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Termo de consentimento livre e esclarecido

Consentimento formal de participação no projeto de pesquisa: **“Avaliação sensorial de patê de frango com adição de quercetina livre e quercetina nanoencapsulada produzidos pelo método do ponto de inversão da emulsão”**.

Nome: _____

Endereço: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Fone: _____

Justificativa: O crescimento das exigências dos consumidores por alimentos mais saudáveis faz com que a indústria alimentícia busque inovações, mudando a sua visão em relação a determinados ingredientes, como por exemplo, agentes antioxidantes. A quercetina é uma substância antioxidante e pode ser uma opção na substituição dos antioxidantes sintéticos nos alimentos. Porém, a quercetina é altamente hidrofóbica, fato que dificulta sua dispersão em matrizes alimentícias, devido a isso, a nanoencapsulação de quercetina torna-se uma ótima alternativa para proteção e estabilização e acessibilidade dessa substância na aplicação em alimentos.

Objetivos do projeto: Avaliar os parâmetros de cor, sabor, odor e aceitação sensorial de patê de frango elaborado com adição de quercetina nanoencapsulada.

Procedimentos: A análise onde seres humanos avaliam diversos atributos de qualidade de alimentos é chamada de ANÁLISE SENSORIAL. Os procedimentos para execução da análise sensorial nesta pesquisa serão os seguintes:

- Sessenta provadores farão a avaliação sensorial dos produtos.
- Serão testadas formulações de patê de frango com diferentes formulações das dispersões de quercetina
- O provador deverá avaliar (olhar, cheirar, provar) os produtos e responder às perguntas solicitadas na Ficha de Avaliação.
- A duração do teste para cada pessoa será de aproximadamente 10 minutos.

Outras informações:

- O provador pode se recusar a continuar com a avaliação sensorial a qualquer momento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- Os provadores não terão qualquer tipo de **despesas em decorrência da participação na pesquisa**.
- **Não há possibilidade de risco ou qualquer tipo de desconforto** em função da participação nesta pesquisa, uma vez que todos os ingredientes utilizados nos produtos são inteiramente seguros e serão de boa qualidade e procedência e o processo de fabricação será realizado de acordo com as normas de Boas Práticas de Fabricação. Além disso, o patê de frango será armazenado sob refrigeração (7°-10°C) até o momento da realização das análises.
- Em função do exposto no item anterior, não há **previsão de indenização em decorrência da participação neste projeto**.
- Os testes para avaliação sensorial do patê de frango, nos quais os provadores experimentarão os produtos desenvolvidos **serão acompanhados** pela aluna proponente (Cynthia De Carli).
- Quaisquer outros esclarecimentos poderão ser solicitados antes, durante e após a pesquisa.

Eu, _____, RG _____

_____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo

“Avaliação sensorial de patê de frango com adição de quercetina livre e quercetina nanoencapsulada produzidos pelo método do ponto de inversão da emulsão”. Tenho pleno conhecimento da justificativa, objetivos, benefícios esperados e dos procedimentos a serem executados, bem como da possibilidade de receber esclarecimentos sempre que considerar necessário. Será mantido sigilo quanto à identificação de minha pessoa e zelo a minha privacidade. Ao mesmo tempo assumo o compromisso de seguir as recomendações estabelecidas pelos pesquisadores. Eu li e entendi todas as informações contidas neste documento.

Aluna responsável: Cynthia De Carli – Pós-graduanda Engenharia de Alimentos.

Contato: cynthiadcarli@usp.br

Pirassununga, _____ de _____ de _____.

Assinatura: _____