UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

TAÍSE TONIAZZO

**Produção de pós alimentícios enriquecidos com quercetina encapsulada em
lipossomas liofilizados**

Pirassununga

2017

TAÍSE TONIAZZO

**Produção de pós alimentícios enriquecidos com quercetina encapsulada em
lipossomas liofilizados**

Versão corrigida

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

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof^a Dr^a Samantha Cristina de Pinho
Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo César Dacanal

Pirassununga

2017

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

TTon66 3p	<p>Toniazzo, Taíse</p> <p>Produção de pós alimentícios enriquecidos com quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados / Taíse Toniazzo; Orientadora: Profa. Dr. Samantha Cristina de Pinho; Coorientador: Prof Dr. Gustavo César Dacanal. Pirassununga, 2017. 122 f.</p> <p>Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.</p> <p>1. Liofilização. 2. Microencapsulação. 3. Amido de milho. 4. Método de alto cisalhamento. 5. Processamento a alta pressão hidrostática. I. Pinho, Samantha Cristina, orient. II. Dacanal, Gustavo César, coorient. III. Título.</p>
--------------	--

TAÍSE TONIAZZO

Produção de pós alimentícios enriquecidos com quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados

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

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de alimentos.

Orientadora: Prof. Dr^a. Samantha C. de Pinho
Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo César Dacanal

Data de aprovação: 30/05/2017

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a Samantha C. de Pinho - Presidente da Banca Examinadora
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP (Orientadora)

Prof^a Dr^a Miriam Dupas Hubinger - Membro
Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP

Dr^a Izabela Dutra Alvim- Membro
Pesquisadora - Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)

Prof. Dr. Pedro Esteves Duarte Augusto - Membro
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” /USP

Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira - Membro
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, José Valter e Anelci, ao meu noivo Fábio e a minha orientadora Samantha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre colocar pessoas boas no meu caminho.

Em especial, agradeço a Samantha, minha orientadora, por todos os seus ensinamentos e dedicação durante esses anos. Obrigada por me guiar e me ajudar a evoluir a cada dia.

Ao meu noivo Fábio, por todo seu amor, companheirismo e apoio nas minhas decisões.

À Márcia e ao Sérgio, pelo suporte, acolhimento e carinho.

Aos meus queridos pais, pelo amor e incentivo.

Ao Prof. Dr. Gustavo C. Dacanal, pela sua co-orientação e ensinamentos na etapa da aglomeração.

Aos queridos colegas do Laboratório de Coloides e Funcionalidade de Macromoléculas. Grazi, Caio, Marina, Helena, Ivana, Nayla, Cynthia, Marluci, Camila Garcia, Camila Cazado, Matheus, Marília, Guilherme e Thais. Obrigada por todos os momentos especiais que compartilhamos.

Aos meus queridos amigos e colegas de Doutorado. Obrigada pelos momentos de conversas, descontração e troca de experiências. Volnei, Talitinha, Camila, Dani, Carol, Adja, Diane, Vitor, Naty, Milla e Débora.

Ao Prof. Dr. Gustavo V. Barbosa-Cánovas, pela oportunidade de estágio em seu laboratório, na Washington State University. Obrigada pelas nossas conversas e teus ensinamentos.

Aos meus amigos, mais que especiais, que tive a oportunidade de conhecer na cidade de Pullman/WA. Todos ficarão guardados eternamente no meu coração.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da Bolsa de Doutorado (Processo: 2012/24855-2) e da Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) (Processo: 2015/15180-0).

RESUMO

Toniazzo, T. **Produção de pós alimentícios enriquecidos com quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados**. 2017. 122 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Os compostos antioxidantes naturais têm sido cada vez mais investigados devido à necessidade das indústrias alimentícias suprirem as exigências dos consumidores em relação à saudabilidade dos produtos. A quercetina é um flavonoide cujos benefícios estão relacionados principalmente à sua ação antioxidante. Entretanto, tal molécula apresenta, geralmente, baixa absorção no trato gastrointestinal, o que pode ser um obstáculo para sua efetiva ação biológica. Por este motivo, uma alternativa para melhorar a sua bioacessibilidade é a encapsulação em sistemas coloidais baseados em matrizes lipídicas, como os lipossomas. Os lipossomas possuem a capacidade de incorporar tanto bioativos hidrofílicos quanto hidrofóbicos em sua estrutura, bem como proporcionar liberação controlada e aumentar a bioacessibilidade dos ingredientes encapsulados. No entanto, há necessidade do desenvolvimento de processos de produção de lipossomas em maior escala, e dentre os processos possíveis a serem empregados com este objetivo encontra-se o método de produção de injeção de etanol. O objetivo principal da presente Tese foi a microencapsulação de quercetina em lipossomas através do método de injeção de etanol. A dispersão de lipossomas encapsulando quercetina escolhida foi liofilizada, com a intenção de aumentar a estabilidade dos lipossomas e enriquecer o amido de milho. O enriquecimento do amido de milho foi realizado por aglomeração, especificamente pelo método de alto cisalhamento, sendo que o pó alimentício aglomerado resultante foi caracterizado fisicamente e teve suas propriedades físicas melhoradas. Foi possível realizar a aplicação do amido de milho enriquecido com quercetina no antepasto de berinjela, sendo que tal incorporação não alterou significativamente as características do produto. Além disso, o

antepasto de berinjela foi processado a alta pressão hidrostática e teve sua estabilidade avaliada, sendo que a utilização do processamento não-térmico apresentou vantagens em relação ao método de processamento convencional.

Palavras-chave: Liofilização, microencapsulação, amido de milho, método de alto cisalhamento, processamento a alta pressão hidrostática, antepasto de berinjela.

ABSTRACT

Toniazzo, T. **Production of food powders enriched with quercetin-loaded lyophilized liposomes**. 2017. 122 f. PhD. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

The natural antioxidant compounds have been increasingly investigated due to the need of the food industry to provide healthier products. Quercetin is a flavonoid, whose benefits are linked mainly with its antioxidant activity. However, this bioactive generally has a low absorption rate in the gastrointestinal tract, which it can be an obstacle for its biological action effective. For this reason, an alternative to improve such bioavailability is to encapsulate quercetina in lipid-based matrices, *e.g.*, liposomes. The liposomes have the capacity to encapsulate both hydrophilic and hydrophobic bioactive, as well as to control the release of the encapsulated bioactives, and enhance their bioavailability. However, there is a need to develop liposome production methods in larger scale, and one of the processes feasible to be scaled up is the ethanol injection method. One of the main objectives of this Thesis was to microencapsulate quercetin in liposomes by ethanol injection method. The dispersion of quercetin-loaded liposomes was lyophilized aiming to increase the stability of liposomes and enrich cornstarch. The enrichment of cornstarch was performed by agglomeration, specifically by high shear method, and the agglomerated food powders were characterized and their physical properties was improved. It was possible to incorporate the enriched cornstarch with quercetin in eggplant sauce, and such application did not change the product characteristics. Also, the eggplant sauce was processed by high hydrostatic pressure and had its stability evaluated, indicating the use of nonthermal technology showed advantages if compared to the conventional thermal processing.

Keywords: Lyophilization, microencapsulation, cornstarch, high shear method, high hydrostatic pressure, eggplant sauce.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da quercetina.	22
Figura 2 – Representação da bicamada lipídica.	25
Figura 3 – Representação esquemática de um lipossoma unilamelar.	26
Figura 4 – Esquema do aparato experimental utilizado para produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol.	29
Figura 5 – Representação esquemática do mecanismo de substituição de moléculas de água pelos crioprotetores, e efeito na reidratação dos fosfolípidios.	35
Figura 6 – Estrutura básica da amilose (A) e da amilopectina (B).	38
Figura 7 – Diagrama que representa a estrutura lamelar do grânulo de amido de acordo com Donald et al. (1997). (A) Conjuntos de lamelas microcristalinas separadas pelos anéis de crescimento amorfos. (B) Vista ampliada das regiões amorfas e cristalinas. (C) Estrutura de duplas hélices formadas pelas cadeias adjacentes de amilopectina originando as lamelas cristalinas. Pontos de ramificação contituem as regiões amorfas.	40
Figura 8 – Principais fenômenos presentes no processo de aglomeração.	43
Figura 9 – Granulador vertical utilizado no processo de aglomeração de partículas.	44
Figura 10: Equipamento de alta pressão em escala comercial configuração horizontal.	47
Figura 11 – Exemplos de produtos comercializados processados por HHP.	48
Figura 12 – Exemplo do aparato experimental utilizado para produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol.	52
Figura 13 – Curvas de distribuição de tamanho dos lipossomas vazios produzidos com 12, 16 e 20 mM de fosfolípidos. (-) amostra fresca; (- -) dia 5 de armazenamento a temperatura de 4 °C.	70
Figura 14 – Isotermas obtidas pela técnica de monocamada de Langmuir da fosfatidilcolina de soja (Phospholipon 90H) em diferentes porcentagens molares da quercetina na subfase água.	74
Figura 15 – Curva de distribuição do tamanho da dispersão de lipossoma produzida com 12 mM de fosfolípido e 0,3% molar de quercetina. (-) amostra fresca; (- -) dia 21 de armazenamento a temperatura 4 °C.	75
Figura 16 – Morfologia dos lipossomas produzidos com 12 mM de fosfolípido e encapsulando 0,3% molar de quecetina. A micrografia foi obtida com uma amostra produzida no dia anterior da análise.	76

Figura 17 – Termograma dos lipossomas vazios e da dispersão de lipossoma encapsulando quercetina na razão molar de quercetina de 0,3%.	77
Figura 18 – Perfil temporal da quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados durante 100 dias de armazenamento: (●) temperatura ambiente; (○) refrigeração.	79
Figura 19 – Espectro de infravermelho dos componentes da formulação: (A) fosfolípido; (B) sacarose; (C) quercetina; (D) lipossoma liofilizado encapsulando quercetina.	80
Figura 20 – Isotermas de sorção de umidade dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina armazenados a 25 °C: (■) dados experimentais; (○) curva ajustada pelo modelo de GAB.....	82
Figura 21 – Morfologia do amido de milho aglomerado produzido com diferentes quantidades de solução de maltodextrina: (A) não-aglomerado; (B) 6%; (C) 7%; (D) 8%; (E) 10%; (F) 11% de solução ligante (w/w). Aumento: 100X.	85
Figura 22 – Curvas de distribuição de tamanho do amido aglomerado com diferentes concentrações de maltodextrina (○) 6%; (□) 7 %; (■) 8%; (Δ) 10 %; (●) 11% de maltodextrina (w/w).....	87
Figura 23 – Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das partículas de amido de milho enriquecidas aglomeradas produzidas com diferentes quantidades de lipossomas liofilizados encapsulando quercetina, (A) 8%; (B) 22%; (C) 30% (w/w).	89
Figura 24 – Perfis de viscosidade obtidos dos diferentes amidos de milho aglomerados: (—) Controle; (····) F ₈ ; (— —) F ₂₂ ; (— · —) F ₃₀	92
Figura 25 – Aspecto visual do antepasto de berinjela antes do processamento por HHP ou térmico e após 15 dias de armazenamento à 4 °C.	96
Figura 26 – Amido de milho enriquecido aglomerado contendo quercetina adicionado no antepasto de berinjela (A) Amido de milho não-aglomerado e não-processado; (B) Amido de milho aglomerado e processado por HPP a 450 MPa/3 min); (C) Amido de milho aglomerado contendo quercetina e processado por HPP 450 MPa/3 min. Aumento: 20X.....	99
Figura 27 – Perfil temporal do teste de back extrusion (N) no antepasto de berinjela durante os 21 dias de armazenamento. (○) Controle, (□) Tratamento térmico, (Δ) 400 MPa/6 min, (■) 450 MPa/3 min, (▲) 500 MPa/2 min.	101
Figura 28 – Capacidade de retenção de água (%) do antepasto de berinjela fresco, 5 e 21 dias de armazenamento, da amostra controle, tratada termicamente, 400 MPa/6 min, 450 MPa/3 min e 500 MPa/2 min.....	102

Figura 29 – Diferença na cor do antepasto de berinjela. Os resultados foram expressos a partir dos parâmetros de cor da amostra fresca e do 21º dia de armazenamento. 103

Figura 30 – Perfil temporal do total de antocianina restante no antepasto de berinjela durante 15 dias de armazenamento. (○) Controle, (□) Tratamento térmico, (Δ) 400 MPa/6 min, (■) 450 MPa/3 min, (▲) 500 MPa/2 min..... 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos lipossomas baseados nos parâmetros estruturais.	26
Tabela 2 – Vantagens e desvantagens de diferentes técnicas utilizadas na produção de SUV.	31
Tabela 3 – Exemplos de lipossomas liofilizados e os tipos de crioprotetores utilizados no processo, em estudos voltados para a área de alimentos.	34
Tabela 4 – Formulação do antepasto de berinjela.	63
Tabela 5 – Diâmetro médio hidrodinâmico dos lipossomas vazios produzidos com diferentes concentrações de fosfolípidos pela técnica de injeção de etanol. Condições operacionais: vazão da fase etanólica: 26 mL/min, intensidade de agitação: 600 rpm e temperatura de injeção: 60 °C.	68
Tabela 6 – Valores do diâmetro médio hidrodinâmico (nm) e o potencial zeta (mV) dos lipossomas produzidos encapsulando diferentes porcentagens molares de quercetina.	72
Tabela 7 – Diâmetro médio hidrodinâmico (nm) e o potencial zeta (mV) das dispersões de lipossomas encapsulando quercetina produzidos com diferentes proporção do crioprotetor.	78
Tabela 8 – Condições da vazão da solução ligante, quantidade de amido e maltodextrina utilizadas nas formulações de amido de milho aglomerado.	83
Tabela 9 – Tamanho de partícula do amido de milho aglomerado produzido com diferentes quantidades de solução ligante.	84
Tabela 10 – Condições da vazão da solução ligante, quantidades do amido de milho e dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina que foram testadas nas formulações. ...	88
Tabela 11 – Propriedades físicas do amido de milho aglomerado não-enriquecido e do enriquecido.	90
Tabela 12 – Propriedades da pasta do amido de milho enriquecido aglomerado.	95
Tabela 13 – Efeitos dos parâmetros do HHP na redução da E. coli no antepasto de berinjela a 400, 450 e 500 MPa, utilizando diferentes tempos de processamento.	97
Tabela 14 – Efeitos dos parâmetros do HHP na redução da L. innocua no antepasto de berinjela a 400, 450 e 500 MPa, utilizando diferentes tempos de processamento.	97
Tabela 15 – Valores de atividade de água, pH e o conteúdo de umidade para o antepasto de berinjela fresco e com 21 dias de armazenamento a diferentes condições do tratamento.	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>	Microscopia De Força Atômica
ATCC®	<i>American Type Culture Collection</i>	
CI	<i>Carr index</i>	Índice de Carr
DPPC	<i>1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>	1,2-Dipalmitoyl-Sn-Glycero-3-Fosfatidilcolina
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>	Calorimetria Diferencial de Varredura
FDA	<i>Food And Drugs Administration</i>	
MHF	<i>Microhydrodynamic Focusing</i>	Focalização Hidrodinâmica
FTIR	<i>Fourier-Transformed Infrared Spectroscopy</i>	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GAB	<i>Guggenheim-Anderson-De Boer</i>	
GUV	<i>Giant Unilamellar Vesicles</i>	Vesículas Unilamelares Gigantes
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>	Geralmente reconhecido como seguros
HHP	<i>High Hydrostatic Pressure</i>	Alta Pressão Hidrostática
HR	<i>Hausner Ratio</i>	Fator de Hausner
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicles</i>	Vesículas Unilamelares Grandes
SEM	<i>Scanning Electron microscopy</i>	Microscopia Eletrônica de Varredura
MLV	<i>Multilamellar Vesicle</i>	Vesículas Multilamelares
MVV	<i>Multi Vesicular Vecicle</i>	Vesículas Multivesiculares
NB	<i>Nutrient Broth</i>	Caldo Nutriente
PCA	<i>Plate Count Agar</i>	
PCS	<i>Photon correlation spectroscopy</i>	Espectroscopia de Correlação de Fótons
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>	
PME	<i>Pectinmethylesterase</i>	Pectinametilesterase
RVA	<i>Rapid Visco Analyser</i>	Analisador Rápido de viscosidade
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicle</i>	Vesículas Unilamelares Pequenas
TGI	<i>Gastrointestinal Tract</i>	Trato Gastrointestinal
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>	
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>	
WHC	<i>Water Holding Capacity</i>	Capacidade de Retenção de Água
YE	<i>Yeast Extract</i>	Extrato de Levedura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1	ESTRUTURA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA QUERCETINA	22
2.2	LIPOSSOMAS: ESTRUTURA E APLICAÇÕES EM ALIMENTOS.....	24
2.3	PRODUÇÃO DE LIPOSSOMAS PELO MÉTODO DE INJEÇÃO DE ETANOL	28
2.4	LIOFILIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS: CRIOPROTEÇÃO E PARÂMETROS OPERACIONAIS.....	32
2.5	AMIDO: COMPOSIÇÃO, ESTRUTURA E PROPRIEDADES DE PASTA	38
2.6	PROCESSOS DE AGLOMERAÇÃO ÚMIDA PELO MÉTODO DE ALTO CISALHAMENTO	42
2.7	PROCESSAMENTO A ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA EM ALIMENTOS (HHP – HIGH HYDROSTATIC PRESSURE)	45
3	OBJETIVOS	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1	MATERIAL.....	50
4.1.1	<i>Produção dos lipossomas encapsulando quercetina</i>	<i>50</i>
4.1.2	<i>Enriquecimento do amido de milho com quercetina encapsulada em lipossomas</i> <i>lioofilizados utilizando o método de aglomeração úmida por alto cisalhamento</i>	<i>50</i>
4.1.3	<i>Processamento do antepasto de berinjela por alta pressão hidrostática (HHP – high</i> <i>hydrostatic pressure)</i>	<i>50</i>
4.2	MÉTODOS	51
4.2.1	<i>Produção das dispersões de lipossomas pelo método de injeção de etanol</i>	<i>51</i>
4.2.2	<i>Caracterização físico-química dos lipossomas em dispersão e liofilizados</i>	<i>52</i>
4.2.2.1	<i>Determinação do diâmetro médio hidrodinâmico e do potencial zeta das dispersões de</i> <i>lipossomas</i>	<i>52</i>
4.2.3	<i>Liofilização das dispersões de lipossomas</i>	<i>55</i>
4.2.4	<i>Agglomeração úmida do amido de milho com quercetina encapsulada em lipossomas</i> <i>lioofilizados pelo método de alto cisalhamento.....</i>	<i>58</i>
4.2.5	<i>Determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanho do amido de milho</i> <i>aglomerado</i>	<i>58</i>

4.2.6	<i>Caracterização do amido de milho aglomerado</i>	59
4.2.7	<i>Avaliação dos efeitos do processamento não-térmico de alimentos (high hydrostatic pressure - HHP) no antepasto de berinjela</i>	62
4.2.8	<i>Produção do antepasto de berinjela</i>	62
4.2.9	<i>Processamento a alta pressão hidrostática (HHP) no antepasto de berinjela</i>	64
4.2.10	<i>Tratamento térmico do antepasto de berinjela</i>	64
4.2.11	<i>Avaliação da estabilidade do antepasto de berinjela</i>	65
4.2.12	<i>Análises Estatísticas</i>	67
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1	DETERMINAÇÃO DA FORMULAÇÃO DA DISPERSÃO DE LIPOSSOMAS ENCAPSULANDO QUERCETINA	68
5.1.1	<i>Caracterização das dispersões de lipossomas encapsulando quercetina por AFM e DSC75</i>	
5.1.2	<i>Escolha da quantidade do crioprotetor</i>	77
5.1.3	<i>Caracterização dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina</i>	78
5.2	ESCOLHA DA FORMULAÇÃO DE AMIDO DE MILHO AGLOMERADO	83
5.2.1	<i>Caracterização morfológica e física do amido de milho enriquecido aglomerado</i>	87
5.2.2	<i>Propriedades da pasta do amido de milho enriquecido aglomerado</i>	92
5.3	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO PROCESSAMENTO NÃO-TÉRMICO DE ALIMENTOS (HIGH HYDROSTATIC PRESSURE - HHP) NO ANTEPASTO DE BERINJELA	96
5.3.1	<i>Seleção das condições do (high hydrostactic pressure - HHP) no antepasto de berinjela</i>	96
5.3.2	<i>Influência do HHP no amido enriquecido aglomerado contendo quercetina</i>	98
5.3.3	<i>Estabilidade do antepasto de berinjela</i>	99
6	CONCLUSÕES	105
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	107

1 INTRODUÇÃO

A utilização de sistemas lipídicos como matrizes encapsulantes de bioativos está sendo cada vez mais investigada na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Tais sistemas possuem algumas vantagens, como a facilidade de escalonamento para produção industrial, baixa toxicidade e alta eficiência de encapsulação, bem como a capacidade de encapsular bioativos hidrofóbicos.

Dentre os sistemas coloidais lipídicos existentes destacam-se os lipossomas, que são vesículas fosfolipídicas com algumas características interessantes, como a capacidade de encapsular bioativos hidrofílicos e hidrofóbicos. Portanto, para maioria das formulações alimentícias que são constituídas principalmente de água, os lipossomas podem ser interessantes para encapsular bioativos hidrofóbicos, facilitando dessa forma a incorporação (dispersão) de tais bioativos nos alimentos. Além disso, os lipossomas podem proporcionar liberação controlada e melhorar a bioacessibilidade e eventualmente a biodisponibilidade de bioativo encapsulados.

Há diversas técnicas para produção de lipossomas, e uma que se destaca é a produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol. Esta técnica é interessante devido a sua simplicidade e fácil ampliação para escala industrial. Porém, existem variáveis operacionais que influenciam no processo, como a concentração de fosfolipídios na solução etanólica, o tipo de fosfolipídio, a vazão de injeção, temperatura de processo e tipo/intensidade de agitação. Tais parâmetros devem ser muito bem controlados, pois influenciam no rendimento e nas características dos lipossomas obtidos neste processo.

Outro processo prático e amplamente conhecido nas indústrias alimentícias é o de liofilização, que pode ser utilizado para prolongar a vida de prateleira dos lipossomas. Na área de alimentos, o uso dessa técnica proporciona algumas vantagens, como a diminuição da probabilidade de contaminação microbiológica, maior facilidade no armazenamento e

transporte. Portanto, para utilização dessa técnica faz-se necessário conhecer bem os processos tecnológicos que influenciam no processo, além de escolher a melhor formulação. Outro ponto importante, é que este processo envolve algumas etapas que podem danificar as vesículas. Uma alternativa para evitar tais danos é o uso de crioprotetores em proporções adequadas nas formulações dos lipossomas.

Por sua vez, o método de alto cisalhamento pode ser utilizado em processos de aglomeração nas indústrias alimentícias. Este processo é extremamente interessante para transformar sólidos particulados em aglomerados porosos. Estes aglomerados geralmente apresentam elevada porosidade, boa resistência mecânica ao manuseio e elevada fluidez. No âmbito industrial alimentício tais aglomerados são conhecidos como sendo os produtos instantâneos e possuem a característica de se reconstituírem rapidamente quando misturados com algum líquido, por exemplo, no leite ou na água.

Por sua vez, as tecnologias não-térmicas de processamento de alimentos tem se destacado devido às grandes vantagens na sua utilização. Em especial, o processamento a alta pressão hidrostática, ou *High Hydrostatic Pressure* (HHP), se destaca pela capacidade de processar os alimentos e mantê-los microbiologicamente seguros e com um alto valor nutricional e sensorial. Além de manter as características dos alimentos processados similares às de produtos frescos, o HHP aumenta a vida de prateleira dos produtos alimentícios. Essa tecnologia pode ser empregada para processar tanto alimentos sólidos quanto líquidos, e um dos produtos que vêm se destacando entre os consumidores são os alimentos prontos para o consumo, sendo que tal combina conveniência com o alto valor nutricional e qualidade, satisfazendo as expectativas dos consumidores modernos que buscam um estilo de alimentação mais saudável.

O presente trabalho de Doutorado teve como objetivo contribuir no âmbito da produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol encapsulando quercetina. Foi estabelecida a

melhor formulação dos lipossomas, com a maior eficiência de encapsulação e liofilizada com a proporção adequada de crioprotetor para a proteção dos lipossomas. O amido de milho foi enriquecido com a quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados através do processo de aglomeração, utilizando o método de alto cisalhamento, sendo que suas propriedades físicas foram avaliadas. Para finalizar, foi desenvolvido um alimento pronto para o consumo (antepasto de berinjela) processado por HHP, que apresentou características satisfatórias em relação ao produto processado pelo método convencional.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrutura e atividade biológica da quercetina

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona) é um flavonoide, mais especificamente um flavonol, cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 1, que está em sua forma glicosilada em diversas frutas e vegetais (maçã, pera, ameixa, uva, alface, morango, cebola e tomate) (PISKULA; MUROTA; TERAQ, 2012). Seus efeitos benéficos para a saúde são especialmente relacionados com a sua capacidade de agir como potente antioxidante (INAL; KAHRAMAN, 2000; ABDEL-WAHHAB et al., 2017). Portanto, é à esta molécula atribuída atividade biológica que pode levar a efeitos antitumorais, anti-inflamatório e neuroprotetor (ELUMALAI; LAKSHMI, 2016; SABOGAL-GUÁQUETA et al., 2015; GERIN et al., 2016; KANDASWAMI et al., 2005; LANDI-LIBRANDI et al., 2012; GHOSH et al., 2011).

Figura 1 – Estrutura química da quercetina.

Fonte: (PISKULA; MUROTA; TERAQ, 2012).

O órgão de regulamentação de alimentos dos Estados Unidos, o *Food and Drug Administration* (FDA), concedeu à quercetina o status de *Generally Recognized as Safe* (GRAS), o que facilita a sua aplicação em produtos alimentícios. No entanto, é sabido que a quercetina possui baixa absorção no trato gastrointestinal (TGI) (KHALED; EL-SAYED; AL-

HADIYA, 2003; LIU et al., 2014; BAN et al., 2015) tornando-se uma limitação em sua aplicação. Estudos mostram que a bioacessibilidade da quercetina é baixa (AYTAC et al., 2016; CHEN et al., 2016), e, também de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, a quercetina se enquadra na classe IV, sendo um composto de baixa solubilidade e permeabilidade. Estudos relacionados à área médica também verificaram que a administração da quercetina em doses altas (50 mg/kg) torna-se uma limitação devido à sua baixa bioacessibilidade (CHAKRABORTY et al., 2012). Portanto, uma estratégia para melhorar a bioacessibilidade da quercetina e, portanto, otimizar sua atividade biológica, é a encapsulação em sistemas coloidais baseados em matrizes lipídicas, como lipossomas, emulsões, nanoemulsões e partículas lipídicas sólidas (LI et al., 2009; FRENZEL; STEFFEN-HEINS, 2015; LÉVAI et al., 2015; KHALID et al., 2016; CAZADO; PINHO, 2016).

Matrizes lipídicas são conhecidas por aumentar a bioacessibilidade de bioativos, devido a mecanismos que ocorrem no trato gastrointestinal (TGI). A presença de lipídios no TGI induz o aumento de secreção de sais biliares, aumentando a formação de micelas mistas intestinais, e, conseqüentemente, aumenta a capacidade de solubilização e absorção de bioativos no TGI. Outro mecanismo que pode ocorrer é o aumento do tempo de retenção gástrica que os lipídios produzem, ou seja, os lipídios são liberados mais lentamente, conseqüentemente aumentando o tempo disponível para absorção do bioativo (PORTER, 2007; POUTON, 2006).

Dentre as técnicas de microencapsulação empregadas para tentar aumentar a solubilidade deste flavonoide no ambiente do TGI, bem como sua bioacessibilidade, em especial está a incorporação em lipossomas, que é uma técnica de microencapsulação que está em vasta expansão na área da ciência e tecnologia de alimentos.

2.2 Lipossomas: estrutura e aplicações em alimentos

Lipossomas, ou vesículas de fosfolipídios, são estruturas esféricas compostas por bicamadas lipídicas que encapsulam parte do meio em que se encontram. Podem ser constituídos por uma ou mais membranas concêntricas; seu tamanho pode variar de 20 (nm) a vários micrômetros (μm), enquanto a espessura de cada bicamada é em torno de 4 nm (LASIC, 1993).

A principal molécula que forma o lipossoma é o fosfolipídio, que é anfifílico e possui um grupo polar (cabeça polar) e dois grupos hidrofóbicos (caudas apolares) ligados por um grupo glicerol. Os fosfolipídios são insolúveis em água e quando incorporados em meio aquosos formam dispersões coloidais (LASIC, 1993).

Devido às propriedades de solubilidade, em solução aquosa as moléculas de fosfolipídios se ordenam em agregados, com as caudas hidrofóbicas em seu interior e as cabeças polares expostas à água. Este fenômeno de agregação forma primeiramente uma estrutura denominada de bicamada lipídica (ilustrada na Figura 2). Tal fenômeno ocorre devido ao aparecimento de forças atrativas e repulsivas na estrutura; as forças de atração ocorrem entre os grupos hidrofóbicos, para minimizar as interações com a água. Por sua vez, as forças de repulsão ocorrem entre os grupos polares devido às suas características iônicas e hidrofílicas (ISRAELACHVILI, 1985).

Figura 2 – Representação da bicamada lipídica.

Fonte: Adaptado de freethought forum. Disponível em: <http://www.freethought-forum.com/forum/showthread.php?t=24978&garp=6>. Acesso em: mar. 2017.

Como visto na Figura 2, na superfície da bicamada lipídica situam-se as cabeças polares, que protegem as caudas hidrofóbicas do contato com o meio aquoso. A fim de diminuir as interações desfavoráveis, as bicamadas podem fechar-se sobre si mesmas, formando as vesículas fosfolipídicas ou lipossomas. Segundo LASIC (1993), os lipossomas podem encapsular substâncias polares e apolares, sendo capazes de atravessar diferentes barreiras hidrofóbicas e liberar substâncias encapsuladas no ambiente hidrofóbico ou através de outras membranas. A estrutura clássica de um lipossoma unilamelar é apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Representação esquemática de um lipossoma unilamelar.

Fonte: Adaptado de (JUSTO; MORAES, 2010)

Dependendo da composição, concentração e o método de produção utilizado, diferentes tipos de lipossomas podem ser formados. Na Tabela 1 é apresentada a classificação dos lipossomas baseados em dois parâmetros estruturais, diâmetro médio e número de lamelas (ou bicamadas lipídicas):

Tabela 1– Classificação dos lipossomas baseados nos parâmetros estruturais.

Tipos de lipossomas	Diâmetro	Abreviatura
Vesículas unilamelares pequenas	20 - 200 nm	SUV
Vesículas unilamelares grandes	> 200 nm	LUV
Vesículas unilamelares gigantes	> 1 μm	GUV
Vesículas multivesicular	> 1 μm	MVV
Vesículas multilamelares	0,5 - 5 μm	MLV

Fonte: Adaptado de (LASIC, 1998; STORM; CROMMELIN, 1998).

As características morfológicas dos lipossomas dependem prioritamente do modo de produção utilizado. Todas estas estruturas possuem propriedades físico-químicas importantes, como atividade osmótica, permeabilidade, solubilidade, interação com solutos hidrofóbicos e

hidrofílicos, comportamento de agregação e características de superfície, as quais dependem também da composição química das vesículas (TAYLOR et al., 2005).

As propriedades peculiares dos lipossomas têm levado à descoberta e desenvolvimento de inúmeras aplicações para estes agregados anfifílicos, em diversos campos da ciência e tecnologia, desde estudos básicos sobre forma de células, mecanismos de membrana e funções de proteínas de membrana, até catálise, diagnóstico, suporte para liberação controlada de princípios ativos, entre outros. Na área de alimentos, diversas aplicações são possíveis utilizando os lipossomas, e diversos estudos nessa área têm sido realizados com sucesso, sendo o número de trabalhos com esta técnica de microencapsulação cada vez mais consideráveis na literatura. Alguns exemplos das aplicações de lipossomas em alimentos são em queijos (PICÓN et al., 1996; LALOY et al., 1998; BENECH, 2002), leite (XIA; XU, 2005; RODRIGUEZ-NOGALES; DELGADILLO-LÓPEZ, 2006; MARSANASCO et al., 2015b, MARSANASCO et al., 2015c), suco (LIU et al., 2017; MARSANASCO et al., 2015a, 2011), iogurte (TONIAZZO et al., 2014; GHORBANZADE et al., 2017) e chocolate (GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN et al., 2016).

Como visto nos exemplos de aplicações nos alimentos, a utilização de lipossomas como uma técnica de microencapsulação tem sido cada vez mais investigada e aplicada na área da ciência e tecnologia de alimentos nos últimos dez anos. Os lipossomas tem sido utilizados tanto nos segmentos de pesquisas quanto nas indústrias, e verifica-se que eles são extremamente viáveis na proteção e na liberação de componentes funcionais nos alimentos. Além disso, o aumento do interesse da utilização dos lipossomas como uma matriz encapsulante é devido à sua especial estrutura, onde nela pode ser encapsulada uma ampla faixa de biativos. Estes bioativos proporcionam efeitos desejáveis nos alimentos, tais como antimicrobianos, aromas e sabores, sendo tais efeitos de grande interesse nas indústrias alimentícias.

Até recentemente, as maiores dificuldades para o emprego de lipossomas na indústria alimentícia eram: (i) a dificuldade de produção em grande escala; (ii) o alto custo das matérias-primas; (iii) o pouco conhecimento das interações entre os lipossomas e os componentes dos alimentos (TAYLOR et al., 2005). Porém, o desenvolvimento de novos métodos de produção, e também o barateamento das matérias-primas (especialmente os fosfolipídios), fez com que a encapsulação lipossomal se mostre uma área em franca expansão (TAYLOR et al., 2005; MOZAFARI et al., 2006; THOMPSON; HAISMAN; SINGH, 2006, 2007). Dentre os métodos possíveis de serem empregados na produção em grande escala de lipossomas, estão os pró-lipossomas (SILVA et al., 2017; TONIAZZO et al., 2014; MORAES et al., 2013; KIKUCHI; YAMAUCHI; HIROTA, 1991), o método da injeção de etanol (CHARCOSSET et al., 2015; SEBAALY et al., 2016; GENTINE et al., 2012; JUSTO; MORAES, 2011; TREVISAN et al., 2011; JUSTO; MORAES, 2010; JAAFAR-MAALEJ et al., 2010; DU; DENG, 2006), focalização hidrodinâmica (JAHN et al., 2004, 2010, 2013; PHAPAL; SUNTHAR, 2013) e *membrane contactor* (JAAFAR-MAALEJ; CHARCOSSET; FESSI, 2011; LAOUINI et al., 2013).

2.3 Produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol

O método da injeção de etanol para a produção de lipossomas foi inicialmente estudada por Batzri e Korn (1973). Teoricamente, esse método pode ser considerado como sendo simples e fácil, tanto em escala em laboratório quanto em sua adaptação para a escala industrial. Uma representação esquemática do método de injeção de etanol pode ser visualizada na Figura 4:

Figura 4 – Esquema do aparato experimental utilizado para produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol.

Fonte: Adaptado de (SALA et al., 2017)

Neste método, uma solução etanólica contendo fosfolipídios é injetada em água ou em uma solução aquosa; durante este processo de injeção, os lipídios tendem a formar “precipitados”, processo seguido de auto-organização e formação dos lipossomas, normalmente unilamelares (BALBINO et al., 2013). Vale a pena ressaltar que a formação dos lipossomas é instantânea, ou seja, são formados no momento em que ocorre a injeção da fase etanólica na fase aquosa. Dentre as variáveis operacionais que mais influenciam no rendimento e nas características dos lipossomas produzidos no processo de injeção de etanol estão: concentração de fosfolipídios na solução etanólica, tipo de fosfolipídio, vazão de injeção, temperatura e tipo/intensidade de agitação (JUSTO; MORAES, 2011; WAGNER et al., 2002). Em tal processo, são produzidos lipossomas do tipo vesículas unilamelares pequenas (SUV), com o diâmetro variando de 20-200 nm e apenas uma bicamada de fosfolipídio na sua estrutura.

Trevisan et al. (2011) modificaram o método clássico de injeção de etanol, focando a formação de uma dispersão lipídica na fase alcoólica ao invés da solubilização convencional dos lipídeos em etanol. Segundo Lasic (1993) os lipídios possuem uma baixa solubilidade em etanol, por exemplo a fosfatidilcolina natural do ovo possui solubilidade de 4 mM (LASIC, 1993), utilizando dispersões de lipossomas com baixas concentrações de lipídio, provavelmente prejudicará na eficiência de encapsulação, sendo tal fator muitas vezes inviável para aplicações industriais. Por outro lado, o método modificado de injeção de etanol utiliza maiores proporções de lipídio na fase etanólica, sendo denominado de dispersão, uma vez que o lipídio não se encontra mais solúvel. No caso do método modificado de injeção de etanol, a dispersão é adicionada a um misturador contendo a fase aquosa, mantido sob condições controladas de temperatura e agitação (Figura 4). Tal modificação permite a obtenção de lipossomas em maior concentração lipídica e com menor quantidade residual de etanol na dispersão final (TREVISAN et al., 2011).

Neste método, a utilização de etanol é ideal para aplicações alimentícias, já que é um solvente orgânico considerado de grau alimentício e, dependendo da aplicação, o residual de etanol pode ser irrelevante, pois é inferior a 10 % (v/v). Se necessário, o resíduo etanólico pode ser removido por osmose reversa, diálise ou diafiltração (LA TORRE; PINHO, 2015). Em especial para as aplicações de alimentos, um processo térmico pode ser apropriado na remoção do resíduo etanol, ou até mesmo uma etapa de liofilização pode ser adicionada.

Outros métodos de produção de lipossomas têm sido estudados e o principal interesse é a formação de lipossomas do tipo SUV, como por exemplo um método utilizado na microfluídica, a focalização hidrodinâmica (MHF) (MIJAJLOVIC et al., 2013) e o método de *membrane contactor* (JAAFAR-MAALEJ; CHARCOSSET; FESSI, 2011); no entanto, ambos os métodos requerem sistemas sofisticados e o custo é consideravelmente alto (SALA et al., 2017). Na Tabela 2 estão apresentadas algumas vantagens e desvantagens de diferentes métodos de produção de lipossomas do tipo SUV.

Tabela 2 – Vantagens e desvantagens de diferentes técnicas utilizadas na produção de SUV.

Métodos		Vantagens	Desvantagens
Injeção de etanol		<p>Simples e fácil</p> <p>Condições amenas</p> <p>Possível escalonamento</p> <p>Formação de SUVs em uma única etapa</p>	<p>Heterogeneidade (30-100 nm)</p> <p>Baixa eficiência de encapsulação</p> <p>Dificuldade na remoção do resíduo de etanol</p> <p>Risco da degradação de moléculas ativas pelo etanol</p>
Hidratação de filme lipídico	Sonificação	Fácil configuração	<p>Não é reprodutivo</p> <p>Baixa eficiência de encapsulação</p> <p>Problemas de instabilidade</p> <p>Possível degradação do bioativo e do fosfolípido</p> <p>Tamanho heterogêneo</p> <p>Risco de contaminação metálica quando se utiliza um <i>probe</i></p>
	Extrusão	Distribuição do tamanho de partícula estreita	Aplicação de altas pressões
	Homogeneização à alta pressão	<p>Distribuição do tamanho de partícula estreita</p> <p>Possível escalonamento</p>	<p>Equipamento grande</p> <p>Difícil configuração</p>
<i>pH jumping method</i>		<p>Fácil formação de SUVs em uma única etapa</p> <p>Não utiliza solvente orgânico</p> <p>Distribuição do tamanho de partícula estreita</p>	Não é de fácil configuração, uma vez que depende de vários parâmetros (tipo de fosfolípido, temperatura, tempo do processo)
Focalização hidrodinâmica		<p>Simples, fácil, baixo custo</p> <p>Processo contínuo</p> <p>Possível escalonamento</p> <p>Formação de SUVs em uma única etapa</p>	<p>Uso de um solvente orgânico</p> <p>Requer configuração específica</p>
<i>Membrane contactor</i>		<p>Distribuição do tamanho de partícula estreita</p> <p>Alta eficiência de encapsulação</p> <p>Produção contínua</p> <p>Possível escalonamento</p> <p>Formação de SUVs em uma única etapa</p>	<p>Uso de um solvente orgânico</p> <p>Requer configuração específica</p>

Fonte: Adaptado de (SALA et al., 2017; PATIL; JADHAV, 2014; AKBARZADEH et al., 2013, LAOUINI et al., 2012)

Portanto, através da Tabela 2 pode-se perceber que o método de injeção de etanol para produção de lipossomas apresenta-se promissor, mostrando-se simples e fácil de ser implantado no setor industrial. Desta forma, o estudo de encapsulação de bioativos em lipossomas a partir do método modificado de injeção de etanol é viável e de fácil escalonamento na indústria alimentícia, sob o ponto de vista tecnológico.

2.4 Liofilização de lipossomas: crioproteção e parâmetros operacionais

A liofilização é um método utilizado para prolongar a vida de prateleira dos lipossomas. A utilização do processo de liofilização em lipossomas é extremamente interessante, pois o emprego das vesículas liofilizadas possui vantagens quando comparada com o uso dos lipossomas na forma de dispersão. Por exemplo, ocorre a diminuição da probabilidade de contaminação microbiológica, bem como facilita o armazenamento e o transporte.

Para produzir lipossomas liofilizados com a intenção de proteger o bioativo, primeiramente é necessário conhecer bem os processos tecnológicos, bem como escolher a melhor formulação (CHEN; HAN; TANG, 2010). A liofilização envolve etapas que podem danificar as vesículas, e para evitar tais danos é necessário o uso de crioprotetores nas formulações (CHEN; HAN; TANG, 2010; TONIAZZO; PINHO, 2016). Na Tabela 3 são apresentados alguns exemplos encontrados na literatura sobre lipossomas liofilizados e os tipos de crioprotetores utilizados para protegê-los.

Os crioprotetores atuam na proteção dos lipossomas contra os danos causados por cristais de gelo, evitando a agregação das vesículas e prevenindo a fusão dos lipossomas. A ação dos crioprotetores é, portanto, importante para evitar perdas dos compostos encapsulados, evitando o decréscimo da eficiência de encapsulação (VAN WINDEN; CROMMELIN 1999; WOLFE; BRYANT, 1999).

Os crioprotetores utilizados na proteção dos lipossomas durante o processo de liofilização geralmente são os oligassacarídeos, como a sacarose, trealose, maltose ou lactose (CROWE; LESLIE; CROWE, 1994; VAN WINDEN; CROMMELIN, 1999). Os mais eficientes, entretanto, são os dissacarídeos, especialmente a trealose e a sacarose.

Tabela 3 – Exemplos de lipossomas liofilizados e os tipos de crioprotetores utilizados no processo, em estudos voltados para a área de alimentos.

Bioativo encapsulado	Método de produção	Tipo de fosfolipídio	Crioprotetor	Referência
Eugenol	Injeção de etanol	Lecitina de soja hidrogenada purificada (Phospholipon 80 e 90)	Sacarose, trealose	SEBAALY et al., 2016
Ácidos graxos de cadeia média e vitamina C	Emulsão dupla	Fosfatidilcolina de soja	Sacarose	YANG et al., 2012
Curcumina	Sonicação	Lecitina de soja hidrogenada purificada (Phospholipon 85H)	Sacarose, manitol, lactose, dextrose e maltose	JANGLE; THORAT 2013
Caseína hidrolisada	Hidratação do filme lipídico	Lecitina de soja não-purificada (Lipoid S40)	Sacarose e trealose	YOKOTA et al., 2012
Óleo essencial de pitanga (<i>Eugenia uniflora</i> L.)	Hidratação do filme lipídico	Lecitina de soja hidrogenada purificada (Lipoid S100H).	Trealose e sacarose	YOSHIDA et al., 2010
Ácidos graxos de cadeia média	Hidratação do filme lipídico, injeção de etanol, evaporação em fase reversa	Fosfolipídios de soja	Manitol e sacarose	LIU et al., 2010
Quercetina	Hidratação do filme lipídico	Fosfatidilcolina de ovo	Sacarose	ALEXOPOULOU et al., 2006

Existem duas teorias propostas na literatura para explicar os efeitos protetores dos carboidratos na membrana dos lipossomas, e são elas: a teoria de substituição de água e a vitrificação (CHEN; HAN; TANG, 2010). A primeira é a teoria da substituição das moléculas de água, proposta por Crowe et al. (1984), essa teoria sugere que as moléculas de açúcares interagem com o grupo da cabeça polar dos fosfolipídios, o que mantém um espaçamento entre os grupos polares dos fosfolipídios em seu estado desidratado. Este espaçamento entre os grupos polares dos fosfolipídios é muito semelhante aos lipossomas quando hidratados, o que evitaria uma grande aproximação entre as cabeças polares, e o colapso da estrutura do lipossoma (CROWE et al., 1997; CHEN; HAN; TANG, 2010). Na Figura 5 está ilustrada a teoria da substituição das moléculas de água.

Figura 5 – Representação esquemática do mecanismo de substituição de moléculas de água pelos crioprotetores, e efeito na reidratação dos fosfolipídios.

Fonte: Adaptado de (CHEN; HAN; TANG, 2010)

Outro ponto importante da teoria de substituição de água é que está relacionada com a modificação da temperatura de transição de fase (T_m) dos fosfolipídios. Quando os lipossomas

são desidratados na ausência de crioprotetores, ocorre um aumento na temperatura de transição de fase do fosfolipídios. No momento da desidratação, as cabeças polares dos fosfolipídios tornam-se muito próximas uma das outras, e a forte repulsão por hidratação se opõem a remoção de água, provocando uma tensão de compressão na membrana, o que faz com que a fase gel seja energeticamente mais favorável a altas temperaturas (KOSTER et al., 2000).

A segunda teoria proposta para o efeito protetor dos dissacarídeos sobre os lipossomas é a teoria da vitrificação. Esta teoria sugere que os lipossomas desidratados são estabilizados devido à transformação da solução concentrada contendo o crioprotetor para o estado vítreo (OHTAKE et al., 2004). Em um determinado ponto do processo de liofilização, a solução de açúcar se torna supersaturada, em seguida, passa para o estado vítreo, prendendo os lipossomas nessa matriz amorfa. Quando os carboidratos estão abaixo da temperatura de transição vítrea (em seu estado amorfo) eles são caracterizados pela baixa mobilidade molecular e alta viscosidade (ROOS, 1993). Portanto, esta matriz amorfa protege as vesículas contra os danos causados pelos cristais de gelo, evitando assim, a agregação e fusão dos lipossomas (KOSTER et al., 1994; CHEN; HAN; TANG, 2010).

Vários fatores tecnológicos determinam a estabilidade dos lipossomas liofilizados, tais como, o tipo de equipamento empregado, o tipo de configuração do equipamento de liofilização, as taxas de congelamento e de nucleação de gelo. Também são importantes a temperatura de secagem, a pressão da câmara de liofilização e o tempo total do processo (CHEN; HAN; TANG, 2010). Tais parâmetros influenciam no processo de liofilização e devem ser muito bem controlados para evitar danos na integridade da membrana dos lipossomas e não afetar, consequentemente, a eficiência de encapsulação de bioativo.

O processo de liofilização consiste em três etapas: (i) congelamento da dispersão de lipossomas; (ii) secagem primária (sublimação) e (iii) secagem secundária (dessorção) (CHEN; HAN; TANG, 2010). A primeira etapa determina a velocidade do processo de nucleação do

gelo e a morfologia do lipossoma congelado. A segunda etapa remove a água livre através da sublimação, e a última etapa remove o conteúdo de água residual dos lipossomas desidratados (CHEN; HAN; TANG, 2010; ARAKAWA et al., 2001).

O primeiro passo do processo de liofilização é muito importante para determinar as características dos lipossomas liofilizados. Há duas maneiras de se congelar os lipossomas, o congelamento rápido e o congelamento lento. O congelamento rápido produz cristais de gelo finos, o que pode resultar em danos menores nas bicamadas dos lipossomas, bem como uma estrutura altamente ordenada. No entanto, este processo proporciona baixa taxa de sublimação durante a segunda etapa da secagem. Por outro lado, o congelamento lento produz cristais de gelo maiores e pode afetar a integridade da membrana, resultando em uma estrutura mais desordenada. Por sua vez, o congelamento lento proporciona uma elevada taxa de sublimação durante a segunda etapa da secagem, acelerando o processo como um todo (VAN WINDEN; ZHANG; CROMMELIN, 1997; CHEN; HAN; TANG, 2010).

A temperatura de congelamento é outro parâmetro importante e pode afetar a retenção de soluto encapsulado durante a liofilização. Sabe-se que a temperatura de congelamento primária deve ser menor do que a T_g' (temperatura de transição vítrea do soluto da solução congelada, de máxima concentração) dos carboidratos utilizados como crioprotetor (CHEN; HAN; TANG, 2010).

As condições de armazenamento também são importantes para a qualidade dos lipossomas liofilizados. Essas condições devem ser muito bem controladas durante a avaliação da estabilidade dos lipossomas. Por exemplo, a umidade relativa influencia na absorção de umidade e propriedades físico-químicas dos lipossomas liofilizados. Assim, os valores mais baixos de umidade relativa fornecem melhor estabilidade aos lipossomas liofilizados. Preferencialmente, o armazenamento dos lipossomas liofilizados deve ser abaixo da T_g

(temperatura de transição vítrea) do produto (KOSTER; SOMMERVOLD; LEI, 1996; CHEN; HAN; TANG, 2010).

2.5 Amido: composição, estrutura e propriedades de pasta

O amido é um polissacarídeo encontrado nas plantas, ele está presente naturalmente dentro das células das plantas no formato de grânulos. O amido é considerado um material semicristalino e o seu nível de cristalinidade difere dependendo da sua composição. A cristalinidade é exclusivamente associada à amilopectina, enquanto que a região amorfa contém principalmente a amilose (ZOBEL, 1988a, 1988b; SINGH et al., 2003). A amilose é um polímero linear formada por moléculas de D-glicose unidas por ligações α -(1 $\rightarrow$ 4), enquanto que a amilopectina é um polímero ramificado e as moléculas de glicose são unidas por ligações α -(1 $\rightarrow$ 4) e α -(1 $\rightarrow$ 6) (SINGH et al., 2003). A estrutura básica da amilose e da amilopectina pode ser visualizada na Figura 6.

Figura 6 – Estrutura básica da amilose (A) e da amilopectina (B).

Fonte: (KNILL; KENNEDY, 2004)

Ainda em relação à composição dos grânulos do amido, o teor de umidade é geralmente cerca de 10 %. A amilose e a amilopectina representam 98 a 99% da massa em base seca dos grânulos, sendo que o material restante são lipídios, minerais, e fósforo.

Já a estrutura do grânulo do amido, o tamanho pode variar de 1 a 100 μm de diâmetro, e o seu formato pode ser poligonal, esférico ou lenticular, sendo que pode apresentar muitas variações dependendo do conteúdo, estrutura, organização das moléculas de amilose e amilopectina, ramificação da amilopectina e o grau de cristalinidade (LINDEBOOM; CHANG; TYLER, 2004; COPELAND et al., 2009).

Em relação ao grau de cristalinidade, segundo Tester, Karkalas e Qi (2004) ambas as cadeias de amilose quanto as cadeias externas de amilopectina podem formar duplas hélices, sendo tais associadas na formação de domínios cristalino. No entanto, na maioria dos amidos, tal característica está restringida à molécula de amilopectina. Ou seja, a cristalinidade é devido ao entrelaçamento das moléculas de amilopectina na forma de dupla hélice, elas se associam entre si para formar regiões ordenadas ou lamelas cristalinas, como pode ser visto na Figura 7.

Figura 7 – Diagrama que representa a estrutura lamelar do grânulo de amido de acordo com Donald et al. (1997). (A) Conjuntos de lamelas microcristalinas separadas pelos anéis de crescimento amorfos. (B) Vista ampliada das regiões amorfas e cristalinas. (C) Estrutura de duplas hélices formadas pelas cadeias adjacentes de amilopectina originando as lamelas cristalinas. Pontos de ramificação contituem as regiões amorfas.

Fonte: Adaptado de (TESTER; KARKALAS; QI, 2004)

O comportamento de pasta do amido em sistemas aquosos depende das características físico-químicas dos grânulos do amido, tais como o tamanho médio, a distribuição de tamanho, a razão amilose/amilopectina e o teor de mineral (MADSEN; CHRISTENSEN, 1996). Em relação ao teor de amilose dos grânulos, tal característica depende do tipo botânico do amido, onde esse é afetado pelas condições climáticas, tipo do solo durante o seu crescimento. Em especial, o teor de amilose do amido de milho varia entre 22 a 32% (SINGH et al., 2003).

A maior parte do amido consumido pelos seres humanos é submetido a algum tipo de processamento, envolvendo normalmente etapas de aquecimento e resfriamento. Durante o processo de aquecimento, os grânulos de amido são gelatinizados, perdendo a sua estrutura e cristalinidade. Durante o resfriamento, as cadeias de amido desagregadas formam primeiramente um gel, e depois retrogradam gradualmente em agregados semicristalinos, diferenciando de sua forma inicial (COPELAND et al., 2009).

A gelatinização do amido ocorre na presença de dois principais fatores, o calor e a umidade. Primeiramente, os grânulos incham devido à absorção de água, e a organização cristalina do amido é rompida irreversivelmente. A teoria de Jenkins e Donald (1998) relata que primeiro a água entra nos anéis de crescimento amorfo, e a um certo grau de inchaço, o estresse de rompimento é transmitido através das conexões das moléculas das regiões amorfas às cristalinas. As moléculas de amilose começam a escoar pelos grânulos, uma vez que eles são rompidos sob cisalhamento. Nesta etapa a viscosidade da pasta aumenta ao máximo, porém os grânulos do amido ainda permanecem intactos. O pico máximo de viscosidade é seguido pela diminuição da viscosidade da pasta, quando os grânulos se rompem e as moléculas de amido são dispersas na fase aquosa. A taxa, a extensão de inchaço e a quebra dependem do tipo e quantidade de amido, do gradiente de temperatura, da força de cisalhamento e a composição da mistura, por exemplo a presença de lipídios e proteínas (DEBET; GIDLEY, 2007). A temperatura de gelatinização da maioria dos amidos é na faixa de temperatura entre 60 e 80 °C.

Uma vez que a pasta de amido resfria, a viscosidade aumenta devido à formação de um gel que é mantido pelas interações intermoleculares envolvendo as moléculas de amilose e amilopectina. Em géis que possuem aproximadamente 25% de amilose, as moléculas de amido formam uma rede resultando em um gel firme. Por outro lado, os géis de amidos cerosos não formam a rede, apenas agregados (TANG; COPELAND, 2007). Os géis de amido retrogradam e formam cristalito tipo B insolúvel devido à associação das regiões lineares de ligações de glicose α -(1→4) nos polímeros (GIDLEY, 1987). Retrogradação é um processo contínuo que ocorre ao longo de um período. A amilose retrodegrada ao longo de minutos e a horas, e a amilopectina ao longo de horas e a dias, dependendo da habilidade das cadeias ramificadas em formarem associações. Portanto, a retrogradação da amilose em alimentos processados é considerado muito importante para as propriedades relacionadas à viscosidade, à capacidade de

absorção de água e digestibilidade. Por outro lado, a amilopectina é um fator importante no endurecimento de pães e bolos (COPELAND et al., 2009).

2.6 Processos de aglomeração úmida pelo método de alto cisalhamento

A aglomeração é muito utilizada nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e agroquímicas, pois permite modificar as propriedades físicas dos sistemas particulados, melhorando e facilitando o seu manuseio. As partículas aglomeradas normalmente apresentam elevada porosidade, boa resistência mecânica ao manuseio, baixa compactidade, elevada fluidez e distribuição de tamanho de partículas com pequena amplitude (TURCHIULI et al., 2005). Em particular, na indústria de alimentos, um dos maiores propósitos da aglomeração é transformar os sólidos particulados finos em aglomerados porosos, também conhecidos como produtos instantâneos, que possuem a capacidade de se reconstituir rapidamente quando misturados em água ou leite (SCHUBERT, 1987).

De acordo com Turchiuli et al. (2005), a aglomeração de pós é obtida criando pontes sólidas entre partículas individuais. Primeiramente, a solução ligante umedece a superfície das partículas, tornando-a “pegajosa”. Tal ação permite a formação de pontes líquidas devido à interação entre as partículas. As pontes sólidas entre as partículas só são criadas efetivamente na última etapa, que é a de secagem, em que ocorre a evaporação do solvente.

Três fenômenos apresentados na Figura 8 demonstram o crescimento dos grânulos finos, os quais são: nucleação, crescimento e quebra (IVESON et al., 2001). A umidificação e a nucleação ocorrem quando a solução ligante entra em contato com as partículas secas, onde núcleos de grânulos são formados e distribuídos através do leito. A etapa de consolidação e crescimento ocorre quando há colisão entre dois grânulos, devido à movimentação contínua dentro do leito, e, também a ação das forças de ligações por capilaridade e de van der Waals. Tais fenômenos permitem a adesão e o crescimento dos grânulos (TARDOS; KHAN; MORT,

1997). A última etapa, fricção e quebra, ocorre quando os grânulos molhados ou secos quebram devido ao impacto, desgaste ou compactação no equipamento, ou durante a etapa final de manuseio do produto.

Figura 8 – Principais fenômenos presentes no processo de aglomeração.

Fonte: Adaptado de (IVESON et al., 2001)

Existem algumas formas de se realizar o processo de aglomeração úmida em partículas, tais como (i) atomização em leito fluidizado; (ii) misturadores; (iii) umidecimento em granuladores verticais; (iv) aglomeração em disco. As características físico-químicas como a solubilidade e cristalinidade, bem como o nível de compactação e a porosidade dos grânulos dependem da energia envolvida em tais processos (PALZER, 2011).

Um dos processos de aglomeração úmida bastante utilizado nas indústrias farmacêuticas desde os anos 70 é o método de alto cisalhamento (*high shear*). Este método utiliza altas

intensidades de agitação mecânica para mistura do pó e a solução ligante, através de um impelidor, sendo que este proporciona forças de cisalhamento e de compressão, permitindo a densificação e a aglomeração das partículas (HOLM, 1997). Na Figura 9 está apresentado um exemplo de um equipamento que pode ser utilizado no processo de alto cisalhamento. No caso do equipamento ilustrado na Figura 9, o impelidor gira no eixo vertical com uma velocidade rotacional de aproximadamente 5 – 15 m/s. O *chopper* gira em uma velocidade semelhante ao do impelidor, permitindo cortar os pedaços das partículas em pequenos fragmentos e, também melhora a distribuição da solução ligante.

Figura 9 – Granulador vertical utilizado no processo de aglomeração de partículas.

Fonte: Adaptado de (PALZER, 2011)

Tal método pode ser facilmente utilizado nas indústrias alimentícias, uma vez que possui muitas vantagens, tais como (i) tempo curto de processamento; (ii) menor quantidade de solução ligante é necessário, quando comparado com o leito fluidizado, reduzindo também o tempo de secagem (última etapa); (iii) pós altamente coesivos podem ser aglomerados devido o forte

impacto do impelidor; (iv) é um sistema fechado e nele pode ser incluído uma etapa de secagem por micro-ondas ou vácuo (HOLM, 1997).

2.7 Processamento a alta pressão hidrostática em alimentos (HHP – *high hydrostatic pressure*)

Processamento a alta pressão hidrostática ou *High Hydrostatic Pressure* (HHP) é uma tecnologia de processamento não-térmica utilizada na preservação de alimentos, sendo capaz de produzir alimentos microbiologicamente seguros e com alto valor nutricional, bem como sensorial. Além disso, tal tecnologia é capaz de manter as características dos alimentos processados similares às dos alimentos frescos, além de aumentar a vida de prateleira (MARTÍNEZ-MONTEAGUDO; BALASUBRAMANIAM, 2016). Uma característica única desta tecnologia é que, ao utilizar temperaturas moderadas durante o processamento, causa mínimos efeitos nas ligações covalentes dos compostos bioativos mantendo dessa forma, a qualidade, a cor, o sabor e os atributos nutricionais dos alimentos (HOGAN; KELLY; SUN, 2005; MAHADEVAN; KARWE, 2016).

Dois princípios atuam predominantemente neste método, que é o princípio isostático e o princípio de *Le Chatelier*. O princípio isostático refere-se ao equilíbrio do fluido sob a ação de uma força ou pressão. Durante o processamento a alta pressão, o alimento que já se encontra embalado é circundado por um fluido de pressão, e os efeitos que a pressão proporciona dentro do alimento são quase que instantâneos e homogêneos, não-dependentes da geometria e do tamanho do alimento. Sabe-se que o ar e a água são comprimidos diferentemente durante a aplicação da pressão, e os alimentos que possuem uma grande quantidade de ar em sua estrutura, durante o processamento com pressão, poderão ter o seu formato alterado, a menos que o alimento seja perfeitamente elástico e consista em células fechadas, sendo que o ar não consiga escapar (BALASUBRAMANIAM; FARKAS, 2008).

A pressão hidrostática reduz o volume do material pressurizado sem alterar seu formato. Já em relação ao processo mecânico, a pressão altera a distância entre as moléculas, proporcionando efeitos diretos nas interações que são extremamente dependentes da distância, sendo elas, a força de van der Waals, as ligações de hidrogênio, as interações eletrostáticas e forças hidrofóbicas (MARTÍNEZ-MONTEAGUDO; SALDAÑA, 2014). Por outro lado, como já mencionado, as ligações covalentes não são afetadas pela pressão, uma vez que a distância de tais ligações é dificilmente reduzida pela pressão. A ausência das alterações em ligações covalentes tem sido a principal hipótese na preservação das atividades dos compostos funcionais (MARTÍNEZ-MONTEAGUDO; BALASUBRAMANIAM, 2016). Já o princípio de *La Chatelier* refere-se a qualquer fenômeno (transição de fase, mudanças na conformação molecular, reações químicas) acompanhado por uma redução do volume é favorecido pelo aumento da pressão (e vice-versa) (HAMANN, 1957). Por exemplo, em uma reação, a pressão alterará o equilíbrio na direção do sistema de menor volume.

Nas indústrias, o processamento a alta pressão hidrostática é realizado em bateladas, podendo processar alimentos já em suas respectivas embalagens, tanto líquidos quanto sólidos. Na Figura 10 pode ser observado um equipamento de alta pressão em escala comercial, sendo sua configuração na forma horizontal (BALASUBRAMANIAM; BARBOSA-CÁNOVAS; LELIEVELD, 2016).

Figura 10: Equipamento de alta pressão em escala comercial configuração horizontal.

Fonte: (BALASUBRAMANIAM; BARBOSA-CÁNOVAS; LELIEVELD, 2016)

Os consumidores modernos e que buscam um estilo de vida mais saudável esperam produtos alimentícios com qualidade e valores nutricionais altos. Portanto, a tecnologia de HHP tem sido utilizada em vários tipos de alimentos, e um dos produtos promissores e que vêm se destacando são os alimentos prontos para o consumo. Tais alimentos podem combinar a conveniência com qualidade e alto valor nutricional, sendo a quantidade de conservante artificial mínima ou até mesmo inexistente. Na Figura 11 estão apresentados alguns produtos comercializados processados por HHP; alguns exemplos são guacamole, sucos, saladas, molho para saladas, frutos do mar e homus.

Em relação à literatura científica, alguns exemplos da utilização de HHP em alimentos prontos para o consumo são guacamole (PALOU et al., 2000), carnes (HAYMAN et al., 2004; RODRIGUES et al., 2016), lasanha (STRATAKOS et al., 2015) e saladas (STRATAKOS et al., 2016). Contudo, mais estudos são requeridos para explorar os efeitos do HHP em alimentos prontos para o consumo, garantindo dessa forma, produtos de alta qualidade, nutritivos e seguros microbiologicamente.

Figura 11 – Exemplos de produtos comercializados processados por HHP.

Fonte: (BALASUBRAMANIAM; BARBOSA-CÁNOVAS; LELIEVELD, 2016)

Dentro deste contexto, verifica-se a importância do presente trabalho de Doutorado, sendo que pretende ser uma contribuição à produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol, encapsulado a quercetina que é uma molécula com potente capacidade antioxidante e torná-la mais bioacessível. Além disso, enriquecer o amido de milho com quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados, através do método de aglomeração úmida de alto cisalhamento, melhorando dessa forma, as propriedades físicas do pó. Finalmente, o amido de milho enriquecido com quercetina foi adicionado no antepasto de berinjela e tal foi processado pela tecnologia de alta pressão hidrostática e o tratamento convencional, sendo suas propriedades físico-químicas, bem como as análises microbiológicas avaliadas.

3 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho de Doutorado foi a produção de um pó alimentício (amido de milho) enriquecido com quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados e a sua aplicação em uma matriz alimentícia. Para que tal objetivo principal fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

(i) Produção e caracterização das dispersões de lipossomas encapsulando quercetina pelo método de injeção de etanol;

(ii) Liofilização das dispersões de lipossomas encapsulando quercetina (determinação da melhor razão mássica crioprotetor:lipossoma), e posterior caracterização do pó obtido;

(iii) Incorporação dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina no amido de milho, através do método de aglomeração úmida de alto cisalhamento e posterior caracterização física do pó, bem como as propriedades de pasta do amido;

(iv) Desenvolvimento de antepasto de berinjela formulado com amido de milho com quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados, processado pelo método convencional e a alta pressão hidrostática, e posterior avaliação das propriedades físico-químicas, bem como as análises microbiológicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Produção dos lipossomas encapsulando quercetina

Os lipossomas foram produzidos utilizando-se lecitina de soja purificada e hidrogenada (Phospholipon 90H) obtido pela Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). A quercetina foi obtida em sua forma comercial purificada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Etanol anidro foi obtido da Merck (99,9% de pureza; Darmstadt, Alemanha). A sacarose utilizada como crioprotetor foi adquirida da Synth (Diadema, SP, Brasil). Água deionizada (sistema Direct Q3, Millipore, Billerica, MA, EUA) foi utilizada durante os experimentos.

4.1.2 Enriquecimento do amido de milho com quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados utilizando o método de aglomeração úmida por alto cisalhamento

O amido de milho foi doado pela Ingredion (ARGO CS3400®, Mogi Guaçu, SP, Brasil). Por sua vez, a maltodextrina utilizada como ligante também foi doada pela Ingredion (MOR REX 1910®, Mogi Guaçu, SP, Brasil).

4.1.3 Processamento do antepasto de berinjela por alta pressão hidrostática (HHP – *high hydrostatic pressure*)

Lecitina de soja purificada hidrogenada (Phospholipon 90H) pela Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha), quercetina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), etanol anidro (Decon Labs, 200 proof, King of Prussia, PA, EUA), sacarose (J.T. Baker, Center Valley, PA, EUA) foram utilizados nessa etapa do estudo.

O amido de milho (Memogel) e a maltodextrina foram doados pela empresa Ingredion (Bridgewater, NJ, EUA). *L. innocua* 51742 e *E. coli* 11775 foram adquiridos da ATCC®

(Manassas, VA, EUA). Os ingredientes para formulação do antepasto de berinjela foram adquiridos em um mercado local na cidade de Pullman (WA, EUA). O glicerol foi adquirido da Sigma (St. Louis, MO, EUA). *Tryptic soy broth* (TSB), extrato de levedura (YE), caldo nutriente (NB), *tryptic soy agar* (TSA) e *Mac Conkey* agar foram obtidos da Becton (Dickinson and Co., Sparks, MA, EUA).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Produção das dispersões de lipossomas pelo método de injeção de etanol

Os lipossomas foram produzidos pelo método de injeção de etanol de acordo com Zômpero et al. (2015), com modificações. Utilizou-se uma bomba peristáltica (Cole-Parmer, Masterflex, 7528-30, Vernon Hills, IL, EUA) e um agitador mecânico acoplado a um impelidor do tipo Cowles (diâmetro = 4 cm). Primeiramente, os fosfolípidos e a quercetina foram dispersos em etanol, formando a fase etanólica. Em seguida, a fase etanólica foi injetada em uma solução aquosa com sacarose, formando instantaneamente os lipossomas. Inicialmente, foram produzidos lipossomas vazios sem a adição de quercetina e sem a adição da sacarose na fase aquosa. O processo de injeção de etanol foi realizado em condições extremamente controladas, a saber:

- vazão da bomba peristáltica: 26 mL/min
- intensidade de agitação do agitador mecânico: 600 rpm
- temperatura de injeção: 60 °C (temperatura acima da transição de fase gel-líquido

cristalino do Phospholipon 90H que é de 53 °C, de acordo com YOSHIDA et al., 2010).

As dispersões de lipossomas permaneceram sob agitação mecânica durante 5 min após a injeção de etanol. Um exemplo do aparato experimental utilizado para produção das dispersões de lipossomas pelo método de injeção de etanol pode ser visualizado na Figura 12.

Figura 12 – Exemplo do aparato experimental utilizado para produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol.

Fonte: Adaptado de (SALA et al., 2017)

4.2.2 Caracterização físico-química dos lipossomas em dispersão e liofilizados

4.2.2.1 Determinação do diâmetro médio hidrodinâmico e do potencial zeta das dispersões de lipossomas

O diâmetro médio hidrodinâmico e a distribuição de tamanho das vesículas foram obtidas por espectroscopia de correlação de fótons (PCS – *photon correlation spectroscopy*) utilizando o equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, Holtsville, EUA), a 25° C, laser de He-Ne à 627 nm e com o ângulo de incidência de 90°. As amostras foram diluídas em água ultra-purificada (Millipore) para diminuir sua opalescência antes da medida

do diâmetro médio das vesículas. O potencial zeta foi medido por mobilidade eletroforética através do equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, Holtsville, EUA). As amostras foram diluídas em KCl (0,1 mM) e a condutividade ajustada para 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$, o potencial zeta foi calculado utilizando a equação de Helmholtz–Smoluchowski, através do software incluindo no sistema do equipamento.

4.2.2.2 *Quantificação da quercetina encapsulada nas dispersões de lipossomas*

Amostras de lipossomas (1 mL) foram diluídas na razão 1:10 (v/v) em etanol anidro (pureza 99,9%, Merck, Darmstadt, Alemanha). A ruptura dos lipossomas ocorreu pela ação do etanol. A absorbância dessa mistura foi determinada a 373 nm em um espectofotômetro (Libra S22, Biochrom, Cambridge, Reino Unido). A quantidade de quercetina foi calculada através da curva padrão de quercetina em etanol, com um coeficiente de correlação de 0,999, obtida na faixa de 0–10 μg quercetina/mL.

4.2.2.3 *Microscopia de força atômica (AFM) das dispersões de lipossomas*

A morfologia dos lipossomas foi visualizada por microscopia de força atômica (NT-MDT, Solver Next, Zelenograd, Rússia) de acordo com Ruozzi et al. (2005), com modificações. A análise foi operada usando o modo de contato intermitente e velocidade de varredura de 0,7 Hz. A frequência de ressonância da ponteira (Tap 150Al-G, Budget sensors) foi de 150 kHz e uma força constante de 5 N/m. Os lipossomas foram diluídos em água ultra-pura (1:100). Em seguida, 40 μL dos lipossomas diluídos foram depositados na superfície de um disco de mica. Após 2 min, o excesso de lipossomas diluídos foi removidos utilizando-se um papel filtro (Whatman nº 1). O tempo total deste experimento foi de 10 min.

4.2.2.4 Comportamento térmico das dispersões de lipossomas por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

O comportamento térmico dos lipossomas foi analisado pelo DSC (TA2010 controlado por um sistema TA5000; TA Instruments, New Castle, DE, EUA). Uma massa de 10 mg dos lipossomas foi hermeticamente selada em cadinhos de alumínio e aquecidos em um intervalo de temperatura de 0 a 100° C, utilizando-se rampa de aquecimento de 10° C/min. Um cadinho de alumínio vazio foi usado como referência. O aquecimento foi realizado sob atmosfera inerte (45 mL/min). As entalpias e as temperaturas de transição de fases foram calculadas utilizando o software do equipamento, Universal Analyses V1.7F (TA Instruments, New Castle, DE, EUA).

4.2.2.5 Determinação das interações moleculares entre fosfolípido/quercetina pela técnica de monocamada de Langmuir

Primeiramente, 30 µL de clorofórmio (99.9% de pureza, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) com 1 mM de fosfolípido foi espalhado sobre a superfície da subfase de água ultrapura, na bacia de Lagmuir (Insight, São Carlos, SP, Brasil) de 216 cm², ficando em repouso por aproximadamente 5 min, para completa evaporação do clorofórmio. Logo após foi obtida a pressão superficial inicial, através da ativação da barreira móvel, com velocidade de 1,1 mm/s a 25±0,5° C. Essa barreira percorreu vagarosamente a superfície comprimindo as substâncias contidas na interface ar/água do sistema. A seguir, o mesmo procedimento foi realizado nas razões molares quercetina/fosfolípido: 0 mM, 0,03 mM, 0,15 mM, 0,3 mM e 0,5 mM. As isotermas foram obtidas em duplicata. Esta análise foi realizada em parceria com a Prof^a Ana Paula Ramos, do Departamento de Química-FFCLRP/USP

4.2.3 Liofilização das dispersões de lipossomas

Os lipossomas foram liofilizados após serem congelados em nitrogênio líquido por 2 min (YOSHIDA et al., 2010). O processo de secagem foi realizado em um liofilizador modelo L202- Liotop (Liobras, São Carlos, SP, Brasil). O processo ocorreu durante 48 h, vácuo de 444 μ Hg e temperatura de congelamento de -53° C. A sacarose foi utilizada como crioprotetor na formulação, na proporção (sacarose: fosfolipídio) de 4:1.

4.2.3.1 *Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos lipossomas liofilizados*

Os espectros de infravermelho foram obtidos na região de número de onda de 4000 a 500 cm^{-1} , utilizando-se o equipamento Perkin Elmer FT-IR Spectrometrer (Waltham, MA, EUA), com auxílio do software Spectrum One versão 5.3.1.

4.2.3.2 *Determinação da umidade e atividade de água (aw) dos lipossomas liofilizados*

A umidade e a atividade de água (aw) dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina foram determinadas utilizando um analisador de umidade (MB35, Ohaus, New Jersey, NJ, EUA) e Aqualab (modelo Series 3 TE, Decagon Devices, Pullman, WA, EUA), respectivamente, à uma temperatura de 25°C .

4.2.3.3 *Isotermas de sorção de umidade dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina*

As isotermas de sorção de umidade foram obtidas pelo método gravimétrico (LABUZA, 1984). A umidade e a atividade de água inicial dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina foram obtidas. Uma massa de 170 mg de lipossomas liofilizados foram acondicionados em pesa filtros e armazenados em dessecadores contendo soluções salinas

saturadas, com atividade de água variando de 0,143–0,845. Os dessecadores ficaram armazenados durante 4 semanas na temperatura de 25 °C. A quantidade de água foi determinada durante intervalos de tempos iguais, através do ganho de massa. A umidade de equilíbrio foi determinada por meio da relação entre a massa total de água e a massa seca da amostra.

O modelo GAB foi ajustado aos dados de umidade de equilíbrio obtidos usando a Equação (1):

$$U_{eq} = \frac{X_m \cdot C_{GAB} \cdot K_{GAB} \cdot a_w}{(1 - K_{GAB} \cdot a_w) \cdot (1 - K_{GAB} \cdot a_w + C_{GAB} \cdot K_{GAB} \cdot a_w)} \quad (1)$$

Onde:

Ueq= é a umidade de equilíbrio (g de água/g de matéria seca); Xm=é a umidade da monocamada molecular (g de água/g de matéria seca); aw= é a atividade de água; CGAB e KGAB= são constantes.

Os parâmetros do modelo de GAB foram obtidos através da ferramenta Solver do Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA). O coeficiente de determinação (R^2) e o módulo do desvio relativo médio (DR%) foram calculados de acordo com a Equação 2:

$$DR = \frac{100}{N} \times \sum \frac{|VE - VP|}{VE} \quad (2)$$

Onde:

VE= Valor experimental; VP=Valor obtido pelo modelo; N= Número de observações.

4.2.3.4 Higroscopicidade dos lipossomas liofilizados

Este procedimento foi realizado de acordo com Cai e Corke (2000), com modificações. Uma massa de 170 mg de lipossomas liofilizados foram armazenados durante uma semana em dessecadores contendo solução saturada de NaCl (Umidade relativa, 75,3%), na temperatura de 25 °C. Os resultados foram medidos através da massa de água adsorvida pela amostra e expressa em grama de água adsorvida/100 g de matéria seca. Os valores foram obtidos em triplicata.

4.2.3.5 Quantificação da quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados

A quantificação de quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados foi realizada de acordo com Moraes et al. (2013), com modificações. Os lipossomas liofilizados foram armazenados à 7 °C e a temperatura ambiente. Uma massa de 100 mg de lipossomas liofilizados foi diluída em 10 ml de etanol anidro e a absorvância foi determinada a 373 nm (Libra S22, Biochrom, Cambridge, Reino Unido). A quantidade de quercetina foi calculada através da curva padrão de quercetina em etanol, com um coeficiente de correlação de 0,999, obtida na faixa de 0–10 µg quercetina/mL.

4.2.3.6 Determinação do diâmetro médio dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina

O diâmetro médio dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina foi determinado utilizando-se o equipamento Sonic Sifter (L3P, ATM Corporation, Milwaukee, WI, EUA). Os diâmetros das peneiras utilizadas variaram de 106 a 30 µm. (ASTM standard, ATM Corporation, Milwaukee, WI, EUA). Uma massa de 5 g de lipossomas liofilizados encapsulando quercetina foi acondicionado no conjunto de peneiras e agitado por 10 min em uma amplitude de 60% da eficiência máxima do equipamento. Depois do peneiramento, a

quantidade de cada fração restante nas peneiras foi pesada. O resultado foi expresso subtraindo a massa das peneiras depois do peneiramento, da massa das peneiras vazias.

4.2.4 Aglomeração úmida do amido de milho com quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados pelo método de alto cisalhamento

O processo de aglomeração úmida foi realizado pelo método de alto cisalhamento utilizando-se um misturador (Philips, Walita RI7625, China), acoplado a um impelidor com uma frequência de rotação de 1.300 rpm (21,7 Hz). Solução de maltodextrina 30% (p/v) foi utilizada como ligante. Primeiramente, a solução ligante foi gotejada em 100 g de amido de milho (e lipossomas liofilizados, quando presente) durante 10 min sob agitação, utilizando-se uma bomba peristáltica (Cole Parmer 7528-30, Vernon Hills, IL, EUA). Após a finalização do bombeamento da solução ligante, o pó permaneceu 10 min sob agitação. O amido de milho aglomerado foi submetido à secagem durante 24 h a 60 °C em uma estufa convectiva (MA035/2, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). O amido de milho foi produzido em porcentagens de quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados de 8% (F₈), 22% (F₂₂) e 30% (F₃₀) (g/100g), e a solução de maltodextrina 7% (g/100g) foi utilizada em todas as formulações. Amido de milho aglomerado sem a adição de quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados foi denominada como controle (amido de milho não-enriquecido).

4.2.5 Determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanho do amido de milho aglomerado

O peneiramento mecânico foi utilizado para determinar o diâmetro médio e a distribuição de tamanho do amido de milho aglomerado. Foram utilizadas peneiras (ASTM, Tyler; A Bronzinox, São Paulo, SP, Brasil) com diâmetros variando de 4750 a 20 µm. Uma massa de 50 g de amido de milho aglomerado foi colocado no conjunto de peneiras e agitado

durante 10 min. Logo após o peneiramento, a quantidade de cada fração restante nas peneiras foi pesada. Os resultados foram expressos subtraindo a massa das peneiras logo após o peneiramento, da massa das peneiras vazias.

O diâmetro médio de Brouckere (D4.3) foi calculado baseando-se na fração numérica (f_{Ni}) do diâmetro de partícula (d_{eq_i}) classificado dentro do intervalo “i” como descrito na Equação 3.

$$D4.3 = \frac{\sum_i f_{Ni} d_{eq_1}^4}{\sum_i f_{Ni} d_{eq_1}^3} \quad (3)$$

O valor de span foi definido pela Equação (4), em que d_{90} , d_{10} e d_{50} são os diâmetros equivalentes avaliados nos percentis 10%, 50% e 90% da distribuição de tamanho, respectivamente.

$$span = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (4)$$

4.2.6 Caracterização do amido de milho aglomerado

4.2.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (SEM) do amido de milho aglomerado

A morfologia foi visualizada por microscopia eletrônica de varredura (TM-3000, Hitachi, Tóquio, Japão). Para obter as micrografias, o amido de milho foi cuidadosamente acondicionado em uma fita de carbono de dupla face (Ted Pella, Inc., Redding, CA, EUA) e fixada em *stubs* de alumínio. O SEM foi operado a 15 kV.

4.2.6.2 Densidade de partícula, densidade tap e densidade bulk

Densidade da partícula (ρ_p) foi determinada por picnometria (MOHSENIN, 1970). A densidade *tap* foi determinada através do equipamento Tap Density Tester (Logan, modelo TAP-2S, EUA), utilizando-se o método USP2 (ABDULLAH; GELDART, 1999). A densidade *bulk* (ρ_b) foi calculada através da relação de massa/volume do pó acondicionado dentro de uma proveta graduada de 100 mL.

A porosidade “ ε ” foi expressa em relação entre a densidade *bulk* e a densidade da partícula, como está apresentado na Equação 5.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_b}{\rho_p} \quad (5)$$

4.2.6.3 Fluidex e coesividade das partículas

A fluidez e a coesividade dos pós foram avaliados em termos do índice de Carr (CI – *Carr index*) (CARR, 1965) e fator de Hausner (*Hausner ratio*)” (HAUSNER, 1967), respectivamente. Tais termos foram calculados a partir da densidade *bulk* (ρ_b) e da densidade *tap* (ρ_{tap}) de acordo com a Equação (6) e Equação (7).

$$CI = \frac{(\rho_{tap} - \rho_b)}{\rho_{tap}} \quad (6)$$

$$HR = \frac{\rho_{tap}}{\rho_b} \quad (7)$$

A fluidez foi obtida através do equipamento FLODEX (Hanson Research Corp., Chatsworth, CA, EUA). Uma massa de 50 g de pó foi acondicionada em um recipiente

cilíndrico. A fluidez do pó foi avaliada pela capacidade do mesmo em cair livremente através de um disco contendo um furo, sendo que o seu diâmetro é padrão e conhecido (LAVOIE; CARTILIER; THIBERT, 2002). Estes valores foram comparados com os valores do índice de Carr.

4.2.6.4 Determinação da umidade e higroscopicidade

A umidade foi determinada utilizando um analisador de umidade (MB35, Ohaus, New Jersey, NJ, EUA) e a higroscopicidade foi realizada de acordo com o item 4.2.3.4, porém, a massa de amido de milho aglomerado utilizada foi de 500 mg.

4.2.6.5 Tempo de molhabilidade

A molhabilidade do amido de milho aglomerado foi determinada utilizando um aparato experimental de acordo com Dacanal e Menegalli (2010). O tempo de molhabilidade representa o tempo necessário para umidificação e a imersão completa da amostra de pó em uma superfície líquida. Uma massa de 3 g do amido de milho aglomerado foi colocada em um dos recipientes cilíndricos do aparato experimental e, logo abaixo encontrava-se outro recipiente cilíndrico contendo 80 mL de água a temperatura ambiente. O tempo de molhabilidade começou a ser mensurado quando o pó e a água entraram em contato, através da remoção de uma barreira móvel que separava o pó do líquido, até a completa imersão da última partícula.

4.2.6.6 Propriedades da pasta

As propriedades da pasta do amido de milho foram obtidas no Viscoanalisador (RVA modelo 4, Newport Scientific Pty, Warriewood, NSW, Austrália). O procedimento foi realizado na programação Standard Analysis 2 com 23 min de perfil de aquecimento, utilizando-se uma amostra de 3 g em 25 g de água deionizada. Primeiramente, a dispersão do amido de milho foi

aquecida até 50 °C e mantida a tal temperatura por 1 min. Depois disso, a dispersão foi aquecida de 50 à 95 °C em uma taxa de 6 °C/min e mantida nessa temperatura por 5 min. A amostra foi resfriada de 95 à 50 °C na taxa de 6 °C/min e mantida nessa temperatura por 2 min. A partir dos resultados obtidos, os parâmetros avaliados foram: temperatura de pasta, viscosidade máxima, tempo de viscosidade máxima, quebra, *through*, viscosidade final e *setback* (tendência à retrogradação). Tais parâmetros foram calculados pelo software Thermocline Version 3.0 (Newport Scientific Pty, Warriewood, NSW, Austrália).

4.2.7 Avaliação dos efeitos do processamento não-térmico de alimentos (*high hydrostatic pressure* - HHP) no antepasto de berinjela

4.2.8 Produção do antepasto de berinjela

O antepasto de berinjela foi produzido de acordo com a formulação descrita na Tabela 4. Os ingredientes foram cozidos gradativamente em um tacho encamisado de vapor (DLT 40, Groen /Dover Co., Grove Village, IL, USA). O amido de milho enriquecido com quercetina foi adicionado somente no final do processo de cozimento. Após o antepasto de berinjela atingir a temperatura ambiente, amostras de 100 g foram armazenadas em embalagens flexíveis de polietileno (Ultravac Solutions, Kansas City, MO, EUA) e foram imediatamente processadas por HHP ou pelo tratamento térmico. Uma formulação sem a adição do amido de milho enriquecido com quercetina foi utilizada como controle.

Tabela 4 – Formulação do antepasto de berinjela.

Ingredientes	% final no produto (g/100g)
Berinjela	43,5
Pimentão verde	9,4
Pimentão amarelo	10,5
Pimentão vermelho	10,5
Azeitona	4,6
Cebola	16
Alho	1,2
Orégano	0,1
Pimenta	0,1
Sal	0,6
Amido de milho enriquecido	0,5
Óleo de oliva	3,0

^a pH do antepasto de berinjela: 4,98±0,23

Fonte: Própria autoria.

A escolha das condições operacionais do HHP baseou-se em atingir uma redução de 5 log de microrganismos no antepasto de berinjela. *Listeria innocua* foi utilizada para substituir a *L. monocytogenes* e a *E. coli* para substituir a *E. coli* O157:H7. As linhagens de *L. innocua* e *E. coli* cresceram em 100 mL de TSB+0.6% de YE e caldo nutriente (NB) respectivamente, a 37 °C sob agitação de 225 rpm em um banho de água com agitação (Lab-Line, model 3545, Melrose Park, IL, USA). As células foram coletadas após 6 e 17 h, respectivamente, sendo que nessa etapa a cultura alcançou a fase logarítmica com uma concentração final de 10⁶ UFC/mL ou 10⁷ UFC/mL. As culturas foram congeladas (1:1) em glicerol 20% até o uso.

Para inocular no antepasto de berinjela, 10 mL da cultura previamente descongelada foi misturada em 100 mL de seus respectivos meios de cultura e 25 g da amostra foi inoculada com 3 mL dessa mistura. A concentração final da amostra foi de 10⁶ UFC/g de amostra.

Após o processamento (HHP ou térmico), 25 g da amostra inoculada foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada esterilizada (0,1%) por 1 min, atingindo a primeira diluição. Logo após, diluições decimais foram preparadas. Na contagens das placas, 1 mL de cada diluição foram plaqueadas em triplicata utilizando TSA+0.6% YE para *L. innocua*

e ágar Mac Conkey para a *E. coli*. As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 h. A contagem dos microrganismos foi expressa através de unidade formadora de colônias UFC/g da amostra. Estes procedimentos foram realizados seguindo as recomendações do órgão do governo dos Estados Unidos, o *Food and Drugs Administration* (FDA, 2015).

4.2.9 Processamento a alta pressão hidrostática (HHP) no antepasto de berinjela

O antepasto de berinjela foi processado a alta pressão hidrostática em um equipamento (Engineered Pressure Systems, Inc., Haverhill, MA, EUA) operado com uma bomba intensificadora eletrohidráulica (Hochdruck- Systeme GmbH, AP 10-0670-1116, Sigless, Áustria), que permitiu alcançar uma pressão de operação em 0,8 min e no final do processo, a pressão foi liberada em 1 s. Estes tempos não foram incluídos no tempo de processamento do antepasto de berinjela. Uma solução de 10 % de óleo solúvel Hydrolubic 123B (Houghton Oil Valley Forge, PA, EUA) foi utilizada como o fluido de pressurização do equipamento. As amostras previamente embaladas foram acondicionadas dentro de uma câmara cilíndrica (diâmetro interno de 0,1 m e altura interna de 0,25 m) e foram processadas na pressão de 400 MPa/6 min, 450 MPa/3min ou 500 MPa/ 2 min. As amostras pressurizadas foram coletas imediatamente em um recipiente contendo gelo. As amostras foram tratadas em duplicata.

4.2.10 Tratamento térmico do antepasto de berinjela

O tratamento térmico foi realizado em um banho maria (Viscotherm VT 10 Physica, Stuttgart, Germany). As amostras embaladas foram imersas na água à temperatura constante de 70 °C, permanecendo à essa temperatura durante 6 min (tempo necessário para a amostra alcançar a letalidade desejada, redução de 5 log de microrganismos). Logo após, as amostras foram coletadas imediatamente em um recipiente contendo gelo. Nos testes preliminares, para monitorar a temperatura no centro da amostra, a temperatura do antepasto de berinjela foi

monitorada utilizando um termômetro Fluke 51 II inserido dentro do antepasto. As amostras foram tratadas em duplicata.

4.2.11 Avaliação da estabilidade do antepasto de berinjela

O antepasto de berinjela foi processado por HHP ou termicamente e a seguir armazenado a 4 °C. As propriedades físico-químicas, bem como as análises microbiológicas foram realizadas durante um período de 21 dias.

Cinco tratamentos foram utilizados nesse estudo: Controle (C): antepasto de berinjela não tratado; tratamento térmico (TT): 70 °C/6 min; alta pressão hidrostática (HHP₁): 400 MPa/ 6 min; alta pressão hidrostática (HHP₂): 450 MPa/ 3 min; alta pressão hidrostática (HHP₃): 500 MPa/ 2 min.

4.2.11.1 Determinação dos parâmetros colorimétricos do antepasto de berinjela

Os parâmetros colorimétricos do antepasto de berinjela foram determinados utilizando um colorímetro CM-5 (Konica Minolta, New Jersey, NJ, EUA) equipado com um iluminante padrão D65. Os parâmetros do sistema de cores L*, a*, b* foram obtidos utilizando a posição 10° padrão do sistema (CIE, Paris, France, 1978). Dez medidas em pontos aleatórios foram realizadas em duplicata.

4.2.11.2 Análise da textura do antepasto de berinjela

Os testes de *back extrusion* foram realizados utilizando um texturômetro Analyzer (TA-XT2, Stable Micro Systems, Scarsdale, NY, EUA). Uma massa de 30 g do antepasto foi colocada em um recipiente cilíndrico de diâmetro interno de 30 mm. Um probe cilíndrico (Φ = 20 mm) foi centralmente posicionado sobre o recipiente e introduzido na amostras através dos

seguintes parâmetros: velocidade de pré-teste de 1 mm/s, velocidade de teste 1 mm/s, velocidade de *post-test* 10,0 mm/s, distância de 35 mm e força *trigger* de 0,10 N.

4.2.11.3 Capacidade de retenção de água (WHC) do antepasto de berinjela

Uma massa de 2 g do antepasto de berinjela foi centrifugada utilizando uma centrífuga Sorvall RT 6000 B (Du Pont Co., Newtown, CT, EUA) a 6.000 rpm por 30 min. As massas das amostras foram medidas imediatamente após a centrifugação. A capacidade de retenção de água foi expressa pela razão da massa final e inicial (p/p_0) do antepasto de berinjela. A WHC indicou a perda de água do antepasto de berinjela durante o estudo da estabilidade.

4.2.11.4 Atividade de água (A_w), pH e conteúdo de umidade

A atividade de água foi determinada pelo equipamento AQUALAB (Decagon Devices, Series 3, Pullman, WA, EUA) e os valores do pH foram mensurados usando um analisador de pH (Mettler Toledo, FE20/EL20, Columbus, OH, EUA). O conteúdo de umidade foi determinado seguindo o método da A.O.A.C (1996), utilizando o método de estufa a vácuo, até a amostra alcançar massa constante.

4.2.11.5 Quantificação de antocianinas totais

Primeiro, a extração das antocianinas foi realizada através de uma solução de etanol acidificado (7:3 v/v), pH 2. Esta solução (80 mL) foi misturada em 100 g da amostra previamente triturada e armazenada a 4 °C na ausência de luz durante 24 h. Logo após, as amostras foram prensadas para remover o conteúdo sólido e centrifugada (Sorvall RT 6000 B, Du Pont Co., Newtown, CT, USA) a 2,000 rpm por 10 min. As amostras foram filtradas em filtro de papel Whatman nº 1 e o conteúdo total de antocianina foi determinado pelo método diferencial de pH (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). A absorbância foi obtida em um

espectrofotômetro (8452 A, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EUA) a 522 e 700 nm. Os resultados foram expressos através do conteúdo de antocianina monomérica (mg/kg) de cianidina-3-glicosídeo equivalentes. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de 26,900 L/cm mol, e o peso molecular de 449.2 g/mol (SCHOU, 1927).

4.2.11.6 Contagem de mesófilos, bolores e leveduras no antepasto de berinjela

Uma massa de 25 g do antepasto de berinjela foi homogeneizada em 225 mL de água peptonada esterilizada (0,1%) por 1 min, para atingir a primeira diluição. Logo após, diluições decimais foram realizadas em triplicata. Em relação a contagem de mesófilos, as amostras foram plaqueadas em *Plate Count Agar* (PCA) e incubadas a 37 °C por 2 d. Para a contagem de bolores e leveduras as amostras foram plaqueadas em ágar dextrose batata (PDA – potato dextrose agar) e incubadas a 21 °C por 7 dias.

4.2.11.7 Morfologia do amido de milho enriquecido adicionado no antepasto de berinjela

A morfologia do amido de milho enriquecido com quercetina foi observada através de microscopia de luz (Leitz Aristoplan Fluorescence Microscope, Leica, D-35578, Wetzlar, Alemanha). A visualização da morfologia do amido de milho foi realizada usando dispersões preparadas com a mesma quantidade (0,5% p/v) que foi adicionado no antepasto de berinjela.

4.2.12 Análises Estatísticas

O teste de Tukey foi realizado utilizando-se o software SAS versão 9.3 (Statistical Analysis Systems, Cary, NC, EUA). O nível de significância utilizado para todos os testes foi a 5% ($\alpha = 0.05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da formulação da dispersão de lipossomas encapsulando quercetina

Primeiramente, lipossomas vazios com concentrações diferentes de fosfolípidos foram produzidos com o objetivo de se obter uma formulação estável e de tamanho médio hidrodinâmico típico de lipossomas produzidos pelo método de injeção de etanol (do tipo SUV). A faixa de concentração de fosfolípido utilizado nesse estudo foi de 12 a 20 mM, e tais valores foram escolhidos baseando-se no trabalho de Zômpero et al. (2015), que utilizaram fosfolípidos semelhantes e utilizaram a técnica de injeção de etanol para produção dos lipossomas. Os diâmetros médios hidrodinâmicos dos lipossomas vazios nas amostras recém-produzidas e após 5 dias de armazenamento podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5 – Diâmetro médio hidrodinâmico dos lipossomas vazios produzidos com diferentes concentrações de fosfolípidos pela técnica de injeção de etanol. Condições operacionais: vazão da fase etanólica: 26 mL/min, intensidade de agitação: 600 rpm e temperatura de injeção: 60 °C.

Concentração de fosfolípido nas dispersões finais de lipossomas	Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	
	Amostras frescas	Dia 5
12mM	203 ^a ± 2,0	210 ^a ± 1,6
16mM	196 ^a ± 7,5	186 ^a ± 1,8
20mM	437 ^b ± 5,0	458 ^b ± 7,0

Médias seguidas pelas mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si a 5 % de significância pelo teste de Tukey. Os valores apresentados são médias calculadas a partir de medidas de duas amostras diferentes de dispersões de lipossomas.

Fonte: Própria autoria.

Nota-se que os lipossomas vazios produzidos com 12 e 16 mM de fosfolípido apresentaram tamanhos típicos de lipossomas obtidos pela técnica de injeção de etanol. Por outro lado, os lipossomas produzidos na concentração de 20 mM apresentaram um aumento no

diâmetro médio hidrodinâmico. A formação de vesículas com valores grandes de diâmetro médio hidrodinâmico, provavelmente se deve ao aumento da concentração de fosfolípidos na fase etanólica (JAAFAR-MAALEJ et al., 2010; GENTINE et al., 2012; SEBAALY et al., 2016). Na Figura 13 estão apresentadas as curvas de distribuição de tamanho dos lipossomas vazios produzidos com 12, 16 e 20 mM de fosfolípido. Considerando-se os dados da Tabela 5 e da Figura 13, as concentrações finais de fosfolípidios de 12 e 16 mM foram escolhidas para encapsular a quercetina, uma vez que a concentração final de 20 mM resultou em lipossomas com tamanho na faixa submicrométrica, não sendo típica de lipossomas do tipo SUV.

Figura 13 – Curvas de distribuição de tamanho dos lipossomas vazios produzidos com 12, 16 e 20 mM de fosfolípidos. (—) amostra fresca; (---) dia 5 de armazenamento a temperatura de 4 °C.

Fonte: Própria autoria.

Diferentes porcentagens molares de quercetina encapsulada em lipossomas foram testadas com o objetivo de obter a melhor eficiência de encapsulação, bem como uma boa estabilidade das dispersões ao longo do tempo de armazenamento. A Tabela 6 apresenta o diâmetro médio hidrodinâmico (nm) e o potencial zeta (mV) das dispersões de lipossomas encapsulando quercetina produzidas com 12 e 16 mM de fosfolípido, incorporados com diferentes porcentagens molares de quercetina, relativo à quantidade total de fosfolípido.

Pode-se visualizar na Tabela 6 que os diâmetro médios hidrodinâmicos foram semelhantes em quase todas as dispersões frescas, porém quase nenhuma permaneceu estável após 1 semana de armazenamento. O mesmo comportamento ocorreu com os valores de potencial zeta, indicando que a liofilização foi uma etapa necessária para preservar os lipossomas encapsulando quercetina, considerando futuras aplicações nos alimentos. Os lipossomas produzidos com 16 mM pareceram desenvolver um comportamento errático, tornando tais não confiáveis para continuar na próxima etapa de liofilização.

No entanto, apesar da instabilidade aparente dos sistemas, foi necessário escolher uma das formulações para liofilizar. Foi considerado o diâmetro médio hidrodinâmico e o potencial zeta, bem como os resultados dos experimentos de monocamadas de Langmuir que estão descritos a seguir, sendo esse o critério mais importante para esta decisão.

Tabela 6 – Valores do diâmetro médio hidrodinâmico (nm) e o potencial zeta (mV) dos lipossomas produzidos encapsulando diferentes porcentagens molares de quercetina.

Quercetina (% molar)	12 mM				16 mM			
	Dispersão fresca	Dia 8	Dia 15	Dia 21	Dispersão fresca	Dia 8	Dia 15	Dia 21
0,1%								
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	308 ^{ab} ± 6,7	365 ^b ± 9,4	430 ^b ± 5,1	-	315 ^c ± 8,7	226 ^a ± 5,8	-	219 ^a ± 3
Potencial zeta (mV)	-11 ^b ± 3,2	-26 ^a ± 2,6	-38 ^a ± 2	-	-14 ^b ± 1,3	-10 ^a ± 1,4	-11 ^{ac} ± 0,6	8 ^b ± 0,5
0,2%								
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	350 ^b ± 8	441 ^a ± 11,2	506 ^a ± 20,4	-	-	228 ^a ± 5,6	245 ^b ± 8,5	214 ^a ± 6
Potencial zeta (mV)	-20 ^{ab} ± 1,4	-19 ^{ab} ± 2	-21 ^b ± 2	-	-18 ^a ± 1,5	-8 ^a ± 1,1	-7 ^b ± 1,3	12 ^a ± 1
0,3%								
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	264 ^{bc} ± 7	347 ^b ± 8,9	392 ^b ± 8	398 ^a ± 7	208 ^b ± 4,2	245 ^a ± 5,1	314 ^a ± 15,4	239 ^a ± 4
Potencial zeta (mV)	-17 ^b ± 2,4	-16 ^{ab} ± 1,9	-18 ^b ± 1,7	-18 ^b ± 3	-17 ^{ab} ± 1,5	-9 ^a ± 0,65	-7 ^b ± 2	-9 ^{ab} ± 0,7
0,4%								
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	224 ^c ± 6,8	263 ^c ± 5	297 ^c ± 6,9	276 ^b ± 5	1105 ^a ± 70	242 ^a ± 8,3	240 ^b ± 4,4	225 ^a ± 4
Potencial zeta (mV)	-31 ^a ± 2,6	-13 ^b ± 1,4	-18 ^b ± 3,3	-33 ^a ± 17	-14 ^b ± 2,6	-8 ^a ± 0,7	-9 ^c ± 1,1	-10 ^{ab} ± 4
0,5%								
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	379 ^a ± 18	259 ^c ± 12,6	242 ^c ± 4,7	241 ^b ± 5	227 ^b ± 3,7	-	256 ^b ± 5,4	-
Potencial zeta (mV)	-37 ^a ± 2,26	-13 ^{ab} ± 1,1	-10 ^b ± 3,1	10 ^b ± 2	-	-	-6 ^b ± 0,44	-

Médias seguidas pelas mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si a 5 % de significância pelo teste de Tukey. Os valores apresentados são médias calculadas a partir de medidas de duas amostras diferentes de dispersões de lipossomas.

^a (-) Não determinado

Fonte: Própria autoria.

Através dos resultados dos experimentos de monocamada de Langmuir, foi possível obter uma indicação de que há, aparentemente, um limite de incorporação de quercetina nos lipossomas. As isotermas de Langmuir estão apresentadas na Figura 14 e pode-se visualizar que houve a formação de uma monocamada de fosfolípido na superfície da subfase (água) na ausência de quercetina. Nesta técnica, os fosfolípidos se auto-arranjam na superfície da subfase, ficando o grupo da cabeça polar em contato com a água e a cauda hidrofóbica em contato com o ar. Na Figura 14 pode-se perceber também que ocorreram interações moleculares entre as moléculas de fosfatidilcolina e a quercetina na subfase, pois a pressão superficial máxima diminuiu significativamente à medida que a concentração do flavonoide aumentou. Uma hipótese sugerida é que, com o aumento da porcentagem molar de quercetina na subfase, houve a formação de complexos entre a quercetina e os fosfolípidos. Tais complexos formados foram provavelmente solubilizados totalmente na subfase, por não apresentarem atividade superficial, resultando na destruição da monocamada, como pode ser observado através da isoterma obtida com a adição de 0,5% de quercetina. Nota-se que na porcentagem molar de quercetina a 0,5%, a pressão superficial permaneceu nula, indicando que não houve formação da monocamada, ou seja, a interação entre a quercetina e os fosfolípidos foram suficientemente fortes e provavelmente levaram à formação de complexos que se solubilizaram completamente na subfase aquosa. Portanto, a presença de quercetina, acima de uma determinada porcentagem molar, eliminou a atividade superficial dos fosfolípidos. Estas interações entre moléculas de quercetina e do fosfolípido podem ter impedido a formação dos grupos de fosfolípidos (fragmentos de bicamadas) responsáveis pela formação de lipossomas durante o método de injeção de etanol (BALBINO et al., 2013).

O resultado de instabilidade dos lipossomas produzidos com razão molares maiores que 0,3% de quercetina foram influenciados pelo fato de que os grupos hidroxilas

provavelmente não estavam inseridos totalmente nas bicamadas lipídicas dos lipossomas, influenciando na estabilidade das dispersões dos lipossomas. Pawlikowska-Pawlęga et al. (2007) investigaram as interações de quercetina com lipossomas produzidos com DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina) e verificaram que o cromóforo da quercetina incorporado nos lipossomas estava situado na região do grupo de cabeça polar, ao invés, do núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica.

Figura 14 – Isotermas obtidas pela técnica de monocamada de Langmuir da fosfatidilcolina de soja (Phospholipon 90H) em diferentes porcentagens molares da quercetina na subfase água.

Fonte: Própria autoria.

Portanto, a dispersão de lipossomas produzidos com 12 mM de fosfolípido e encapsulando 0,3% molar de quercetina foi a formulação escolhida para continuar com as etapas de liofilização e caracterização dos lipossomas liofilizados. Na Figura 15 pode ser visualizada a curva de distribuição do tamanho da dispersão de lipossoma encapsulando

quercetina produzida com 12 mM de fosfolípido e 0,3% de quercetina. Pode-se observar que a dispersão não apresentou nenhuma instabilidade durante os 21 dias de armazenamento.

Figura 15 – Curva de distribuição do tamanho da dispersão de lipossoma produzida com 12 mM de fosfolípido e 0,3% molar de quercetina. (-) amostra fresca; (- -) dia 21 de armazenamento a temperatura 4 °C.

Fonte: Própria autoria.

5.1.1 Caracterização das dispersões de lipossomas encapsulando quercetina por AFM e DSC

A micrografia obtida por microscopia de força atômica pode ser visualizada na Figura 16. Através da micrografia, pode-se visualizar a morfologia dos lipossomas, que apresentaram formato esférico e com tamanho médio em torno de 300 nm, corroborando os valores do tamanho médio hidrodinâmico médio obtido pela técnica de espalhamento de luz quasi-elástico.

Em relação ao comportamento térmico, os termogramas dos lipossomas vazios e dos lipossomas encapsulando quercetina estão apresentados na Figura 17. Os lipossomas apresentam um comportamento endotérmico representado por um único pico estreito; tal pico é atribuído à transição de fases gel-líquido cristalino das vesículas de fosfolípidos. A temperatura de transição (T_m) foi aproximadamente 53 °C para ambas as formulações, indicando que a presença de quercetina não modificou a estrutura da bicamada lipídica. Assim, a presença de 0,3% molar de quercetina, aparentemente, não alterou a fluidez da bicamada lipídica, sugerindo que a quercetina nessa razão molar foi provavelmente inserida totalmente na bicamada dos lipossomas. Os mesmos resultados são relatados por Toniazzi et al. (2014) e Carvalho et al. (2015) que estudaram o mesmo tipo de fosfolípido.

Figura 16 – Morfologia dos lipossomas produzidos com 12 mM de fosfolípido e encapsulando 0,3% molar de quercetina. A micrografia foi obtida com uma amostra produzida no dia anterior da análise.

Fonte: Própria autoria.

Figura 17 – Termograma dos lipossomas vazios e da dispersão de lipossoma encapsulando quercetina na razão molar de quercetina de 0,3%.

Fonte: Própria autoria.

5.1.2 Escolha da quantidade do crioprotetor

As proporções de crioprotetores testadas foram 2:1, 3:1 e 4:1 de (sacarose: fosfolípido), pois são proporções tipicamente utilizadas na proteção da bicamada dos lipossomas contra os efeitos da secagem a frio (YOSHIDA et al., 2010 e CABRAL; ZOLLNER; SANTANA, 2004). A Tabela 7 apresenta o diâmetro médio hidrodinâmico (nm) e o potencial zeta (mV) das dispersões de lipossomas encapsulando quercetina formuladas com diferentes proporções do crioprotetor. A escolha da proporção do crioprotetor baseou-se na obtenção da mesma estabilidade ao longo do tempo de armazenamento do que as dispersões de lipossomas encapsulando quercetina produzidas na ausência de sacarose. A proporção de sacarose (4:1) apresentou um diâmetro médio

hidrodinâmico típico de SUV, e além disso, uma boa estabilidade dos valores do potencial zeta. Portanto, esta formulação foi a escolhida para ser liofilizada.

Tabela 7 – Diâmetro médio hidrodinâmico (nm) e o potencial zeta (mV) das dispersões de lipossomas encapsulando quercetina produzidos com diferentes proporção do crioprotetor.

Proporção do crioprotetor	Tempo de armazenamento	
	Dispersão fresca	Dia 30
(2:1)		
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	$243^a \pm 5$	$249^a \pm 2$
Potencial zeta (mV)	$-22^c \pm 0,7$	$-10^a \pm 0,7$
(3:1)		
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	$367^b \pm 17$	$413^c \pm 2$
Potencial zeta (mV)	$-8^d \pm 0,8$	$-11^a \pm 1,5$
(4:1)		
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	$232^a \pm 6$	$236^a \pm 1$
Potencial zeta (mV)	$-18^e \pm 1,4$	$-14^b \pm 0,7$

Médias seguidas pelas mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si a 5 % de significância pelo teste de Tukey.

Os valores apresentados são médias calculadas a partir de medidas de duas amostras diferentes de dispersões de lipossomas.

Fonte: Própria autoria.

5.1.3 Caracterização dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina

5.1.3.1 Estabilidade da quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados

A estabilidade da quercetina encapsulada nos lipossomas liofilizados armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração foi avaliada durante 100 dias. Em ambos os casos, a quercetina não foi degradada após 100 dias de armazenamento, como pode ser visualizado na Figura 18.

Figura 18 – Perfil temporal da quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados durante 100 dias de armazenamento: (●) temperatura ambiente; (○) refrigeração.

Fonte: Própria autoria.

5.1.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina

Na Figura 19 podem ser visualizados os espectros de infravermelho dos componentes puros da formulação de lipossomas (fosfolípido, sacarose e quercetina) e dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina.

Figura 19 – Espectro de infravermelho dos componentes da formulação: (A)

fosfolípido; (B) sacarose; (C) quercetina; (D) lipossoma liofilizado encapsulando quercetina.

Fonte: Própria autoria.

Uma característica importante do espectro de infravermelho dos lipossomas liofilizados está relacionada com o pico 1231 cm^{-1} , que representa o estiramento da ligação $\text{P} = \text{O}$ e o pico 1733 cm^{-1} , que representa o estiramento $\text{C} = \text{O}$ do grupo éster. Ambas as ligações estão presentes na parte polar dos fosfolipídios e apresentaram uma frequência menor do que os mesmos picos presentes no fosfolipídio puro. Ricker et al. (2003) afirmam que após a secagem essa diminuição na frequência ocorre devido à interação entre esses grupos e os grupos de $-\text{OH}$ da sacarose, restringindo a movimentação das moléculas de fosfolipídio.

Outra diminuição significativa na frequência pode ser visualizada no pico a 1464 cm^{-1} . Lewis e Mcelhaney (1996) sugeriram que este pico está relacionado com as vibrações de flexão, de modo rotativo e desordenado da cadeia de polimetileno $-(\text{CH}_2)_n$, que está presente na cadeia de hidrocarboneto do fosfolípido. A incorporação de quercetina na parte hidrofóbica do lipossoma diminuiu a vibração de flexão destas cadeias, resultando em uma baixa frequência do pico.

Em relação ao espectro de infravermelho da quercetina pura, ela apresentou um pico a 2918 cm^{-1} , correspondendo ao estiramento da parte fenólica $-\text{OH}$. A presença do mesmo pico em lipossomas liofilizados (Figura 19 D), no entanto, com uma menor frequência, sugere que a quercetina foi encapsulada nos lipossomas liofilizados.

5.1.3.3 Isoterma de sorção de umidade e higroscopicidade

As isotermas de sorção são extremamente importantes para prever a estabilidade físico-química dos alimentos quando submetidos a diferentes condições de umidade (LABUZA; ALTUNAKAR, 2007). A isoterma de sorção de umidade dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina pode ser visualizada na Figura 20. O modelo GAB foi ajustado aos dados de umidade de equilíbrio obtidos.

O modelo de GAB apresentou um valor de coeficiente de correlação (R^2) de 0,999 e o desvio médio relativo $<10\%$, indicando que o modelo se ajustou adequadamente aos dados de umidade de equilíbrio obtidos experimentalmente. O valor da umidade da monocamada molecular (X_m) foi de 4,23%, o que é considerado um valor baixo de quantidade de água adsorvida. O teor de umidade na monocamada é um parâmetro importante, uma vez que representa a quantidade de água adsorvida nos locais específicos da superfície dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina. A estabilidade dos alimentos durante o tempo de armazenamento pode ser reduzida quando as reações de

degradação aumentam, por esse motivo valores elevados de X_m devem ser evitados. Outro ponto importante, foi que a umidade da monocamada molecular foi favorável mesmo com a presença de sacarose na formulação de lipossomas liofilizados encapsulando quercetina.

A constante K foi de 1,094, essa constante corrige as propriedades das moléculas nas multicamadas em relação ao líquido “*bulk*”. A constante C_{GAB} foi de 0,015, sendo que tal grandeza representa a interação entre os sítios ativos da substância e as moléculas de água, esses valores estão dentro dos intervalos encontrados na literatura (TIMMERMAN; CHIRIFE; IGLESIAS, 2001; LOMAURO; BAKSHI; LABUZA, 1985).

Figura 20 – Isotermas de sorção de umidade dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina armazenados a 25 °C: (■) dados experimentais; (○) curva ajustada pelo modelo de GAB.

Fonte: Própria autoria.

Quanto à higroscopicidade dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina, o valor foi de $2,37 \text{ g} \pm 0,97$ da água/100 g de matéria seca, indicando que os lipossomas liofilizados encapsulando quercetina não são higroscópicos, mesmo quando submetidos a

altas condições de umidade relativa (75%). Tal comportamento é excelente para a conservação e estabilidade de alimentos secos. Além disso, o manuseio do produto como embalagem, armazenamento e transporte, certamente será simplificado.

5.2 Escolha da formulação de amido de milho aglomerado

Primeiramente foi necessário escolher a quantidade de solução ligante adequada no processo de aglomeração. Na Tabela 8 está apresentada a quantidade de amido de milho e maltodextrina testadas, bem como a vazão de solução ligante. As escolhas das condições das vazões da solução ligante e suas concentrações foram selecionadas baseando-se em Dacanal e Menegalli (2010), que determinaram que a concentração da solução ligante 30% (p/v) maltodextrina resultou em um maior rendimento no processo de aglomeração em leiteo fluidizado pulsado.

Tabela 8 – Condições da vazão da solução ligante, quantidade de amido e maltodextrina utilizadas nas formulações de amido de milho aglomerado.

Formulação do amido de milho aglomerado	*Vazão da solução ligante (mL/min)	Amido de milho % (g/100g)	Ligante % (g/100g)	*Lipossomas liofilizados encapsulando quercetina % (g/100g)
Não-aglomerado	-	100	-	-
6% de solução ligante (w/w)	1,9	90	6	4
7% de solução ligante (w/w)	2,3	89	7	4
8% de solução ligante (w/w)	2,6	88	8	4
10% de solução ligante (w/w)	3,3	86	10	4
11% de solução ligante (w/w)	3,7	85	11	4

^a Umidade do amido de milho: 13 %

^b A vazão da solução ligante foi obtida pela ferramenta Solver do Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA).

^c Lipossomas liofilizados encapsulando quercetina não foram adicionados nesta etapa do estudo. Este valor foi simulado para escolher apenas a quantidade de solução ligante adequada para cada formulação.

Fonte: Própria autoria.

Na Figura 21 está apresentada a morfologia do amido de milho não-aglomerado e o aglomerado, com quantidades diferentes de solução de maltodextrina. As quantidades de solução ligante utilizadas nas formulações foram adequadas e permitiram o processo de aglomeração do amido de milho. A solução ligante umedeceu a superfície das partículas fazendo com que se tornassem “pegajosas”, permitindo a formação de pontes líquidas devido à interação entre as partículas através da agitação mecânica. Na última etapa, (secagem) as pontes sólidas foram criadas devido à evaporação completa da água.

Na Tabela 9 está apresentado o tamanho de partícula do amido de milho aglomerado produzido com diferentes quantidades de solução ligante. O amido de milho não-aglomerado apresentou diâmetro médio de $30 \pm 2,7 \mu\text{m}$ (DACANAL et al., 2016). O uso do método de alto cisalhamento permitiu um aumento do diâmetro médio das partículas para a faixa de 500-600 μm , indicando que o método foi eficiente na aglomeração das partículas de amido.

Tabela 9 – Tamanho de partícula do amido de milho aglomerado produzido com diferentes quantidades de solução ligante.

Formulação	6% de solução ligante (w/w)	7% de solução ligante (w/w)	8% de solução ligante (w/w)	10% de solução ligante (w/w)	11% de solução ligante (w/w)
Tamanho de partícula					
Diâmetro médio (D4.3) μm	$447^a \pm 32$	$490^a \pm 48$	$545^a \pm 5$	$575^a \pm 104$	$589^a \pm 84$
D10 (μm)	$156^a \pm 27$	$146^a \pm 30$	$162^a \pm 32$	$162^a \pm 74$	$178^a \pm 48$
D50 (μm)	$327^a \pm 62$	$413^a \pm 87$	$413^a \pm 87$	$463^a \pm 87$	$363^a \pm 0$
D90 (μm)	$725^a \pm 0$	$725^a \pm 0$	$1015^{a,b} \pm 0$	$1298^b \pm 245$	$1156^b \pm 245$
Span (-)	$1,80^a \pm 0,5$	$1,40^a \pm 0,3$	$1,70^a \pm 0,4$	$2,10^a \pm 0,6$	$2,70^a \pm 0,8$

As médias das amostras seguidas pelas mesma letras na mesma linha não difere a 5% no nível de significância pelo teste de Tukey. Os valores apresentados são médias calculadas a partir de medidas de três diferentes amostras do amido de milho aglomerado.

Fonte: Própria autoria.

Figura 21 – Morfologia do amido de milho aglomerado produzido com diferentes quantidades de solução de maltodextrina: (A) não-aglomerado; (B) 6%; (C) 7%; (D) 8%; (E) 10%; (F) 11% de solução ligante (w/w). Aumento: 100X.

Fonte: Própria autoria.

Como pode ser visto na Tabela 9 e na Figura 21, o aumento da concentração da solução ligante levou à produção de partículas maiores, uma vez que o diâmetro médio aumentou. Este fato provavelmente ocorreu devido ao aumento da quantidade de ligante e, também pela utilização do mesmo tempo de processamento (10 min para todas as formulações). Provavelmente nas formulações com 10 e 11% de solução ligante o tempo utilizado (10 min) não foi suficiente para o líquido se espalhar e se adsorver nos poros das partículas, resultando em um crescimento excessivo dos grânulos (TARDOS, KHAN E MORT, 1997).

Considerando os dados da Tabela 9, as formulações com porcentagem de solução ligante acima de 7% (p/v) apresentaram o percentil de 90% (d_{90}) maior que 1 mm. Tal valor se encontra em uma faixa de tamanho de partícula maior do que se pretendia utilizar nesse estudo (na faixa micrométrica). Levando em consideração o principal objetivo que foi enriquecer o amido de milho com lipossomas liofilizados encapsulando quercetina, sendo que 62% de tais partículas tiveram o diâmetro médio $<106 \mu\text{m} \pm 1,8$, e, também considerando os resultados obtidos até esta etapa do estudo, o amido de milho aglomerado com 7% de solução ligante foi o escolhido para ser enriquecido com quercetina e ser caracterizado fisicamente. Esta formulação também apresentou um baixo valor para o span ($1,4 \pm 0,3$), reforçando tal escolha.

A Figura 22 apresenta as curvas de distribuição de tamanho do amido de milho aglomerado produzido com diferentes quantidades de solução de maltodextrina. Como pode ser visto, o amido aglomerado contendo 7% de solução ligante apresentou uma curva estreita, que é também importante, uma vez que para atingir maiores rendimentos com maiores taxas de crescimento, é essencial que a colisão entre as partículas seja entre partículas de tamanho semelhantes (TARDOS, KHAN E MORT, 1997).

Figura 22 – Curvas de distribuição de tamanho do amido aglomerado com diferentes concentrações de maltodextrina (○) 6%; (□) 7 %; (■) 8%; (Δ) 10 %; (●) 11% de maltodextrina (w/w).

Fonte: Própria autoria.

5.2.1 Caracterização morfológica e física do amido de milho enriquecido aglomerado

Uma vez definida a quantidade de ligante para ser utilizado no processo de aglomeração, foi necessário avaliar a influência de diferentes quantidades de lipossomas liofilizados encapsulando quercetina nas características do pó aglomerado obtido. Na Tabela 10 apresentam-se as condições de vazão da solução ligante, quantidades de amido de milho e de lipossomas liofilizados encapsulando quercetina que foram testadas nas formulações.

Tabela 10 – Condições da vazão da solução ligante, quantidades do amido de milho e dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina que foram testadas nas formulações.

Formulação do amido de milho enriquecido aglomerado	* Vazão de solução ligante (mL/min)	Amido % (g/100g)	Ligante % (g/100g)	Lipossomas liofilizados encapsulando quercetina % (g/100g)
F ₈	2,4	85	7	8
F ₂₂	2,9	71	7	22
F ₃₀	3,2	63	7	30

*A vazão da solução ligante foi obtida pela ferramenta Solver do Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA).

Fonte: Própria autoria.

Em relação à morfologia, na Figura 23 pode ser observada as partículas de amido de milho enriquecido aglomeradas, visualizadas por microscopia eletrônica de varredura. Como pode ser visto, com o aumento da quantidade dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina na formulação, ocorreu o aumento do tamanho da partícula. Com o aumento da quantidade de lipossomas liofilizados encapsulando quercetina adicionado na formulação, a quantidade do ligante também aumentou, provavelmente tal aumento da solução ligante beneficiou as ligações entre as partículas, permitindo o aumento do tamanho de partícula da formulação F₂₂ e F₃₀.

Figura 23 – Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das partículas de amido de milho enriquecidas aglomeradas produzidas com diferentes quantidades de lipossomas liofilizados encapsulando quercetina, (A) 8%; (B) 22%; (C) 30% (w/w).

Fonte: Própria autoria.

As propriedades físicas dos pós alimentícios são essenciais para a otimização de processos, funcionalidade, redução de custos, bem como a determinação de formas de manuseio e armazenamento (BARBOSA-CÁNOVAS; JULIANO, 2005). Na Tabela 11 estão apresentadas as propriedades físicas do amido de milho aglomerado não-enriquecido e do enriquecido. A adição dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina não afetou a umidade do amido de milho aglomerado, mas eles tiveram os valores de higroscopicidade reduzidos. Uma baixa higroscopicidade nos pós é uma característica desejável, uma vez

que a conservação e estabilidade dos produtos alimentícios em pó pode ser aumentada, bem como simplificar a forma de embalagem, armazenamento e transporte.

Tabela 11 – Propriedades físicas do amido de milho aglomerado não-enriquecido e do enriquecido.

Amido aglomerado	Não-enriquecido	F ₈	F ₂₂	F ₃₀
Propriedades físicas				
Diâmetro médio (D4.3)	490 ^b ± 48	332 ^c ± 20	545 ^b ± 3,5	2617 ^a ± 5
Umidade d.b. (-)	4,6 ^a ± 0,6	4,4 ^a ± 0,2	4,5 ^a ± 0,8	4,5 ^a ± 0,1
Densidade da partícula (kg/m ³)	1534 ^a ± 274	1345 ^a ± 310	1300 ^a ± 2,6	1198 ^a ± 242
Densidade <i>bulk</i> (kg/m ³)	455 ^a ± 3,5	628 ^b ± 2,2	638 ^b ± 67	583 ^{a,b} ± 36
Densidade <i>tap</i> (kg/m ³)	563 ^a ± 5,6	710 ^a ± 8,5	705 ^a ± 68	641 ^a ± 40
Índice de Carr (%)	19 ^a ± 1,4	12 ^b ± 1	9 ^b ± 1	9 ^b ± 0
Fator de Hausner (-)	1,23 ^a ± 0,02	1,14 ^b ± 0,01	1,10 ^b ± 0,01	1,01 ^b ± 0
Índice FLODEX (mm)	16 ^a ± 0	14 ^a ± 2	4 ^b ± 0	7 ^c ± 0
Porosidade <i>bulk</i> (-)	0,78 ^a ± 0,1	0,74 ^a ± 0,2	0,57 ^a ± 0,1	0,58 ^a ± 0,1
Tempo de molhabilidade (min)	0,5 ^b ± 1,4	14 ^a ± 3,3	1,1 ^b ± 0,1	2,2 ^b ± 0,1
Higroscopicidade (%)	15 ^a ± 1,8	9 ± 0,8 ^b	11 ^{a,b} ± 0,3	11 ^{a,b} ± 1,1

As médias das amostras seguidas pelas mesma letras na mesma linha não difere a 5% no nível de significância

significância pelo teste de Tukey. Os valores apresentados são médias calculadas a partir de medidas de três diferentes amostras do amido de milho aglomerado.

Fonte: Própria autoria.

A porosidade *bulk* do amido de milho enriquecido aglomerado foi menor se comparado com o amido de milho não-enriquecido. Contudo, faixas de porosidade *bulk* entre 40–80% são considerados valores altos, de acordo com Barbosa-Cánovas e Juliano (2005).

O tempo de molhabilidade é caracterizado pela penetração do líquido nos poros da partícula por capilaridade, e isso avalia a capacidade das partículas em absorver água em sua superfície (PIETSCH, 1999; BARBOSA-CÁNOVAS; JULIANO, 2005). A adição dos lipossomas liofilizados encapsulando a quercetina na formulação do amido de milho

aglomerado prejudicou o tempo de molhabilidade, e o amido de milho enriquecido aglomerado F₈, apresentou o tempo de molhabilidade mais longo se comparado com as formulações F₂₂ e F₃₀. Tal aumento no tempo de molhabilidade do amido de milho enriquecido, é devido à presença das moléculas de fosfolipídios, no qual contituem os lipossomas.

O fator de Hausner representa a coesividade dos pós. Todos os amidos enriquecidos aglomerados apresentaram o fator de Hausner menor que 1,2, o que significa que eles podem ser classificados como pós de baixa coesividade. Por outro lado, o amido de milho não-enriquecido aglomerado apresentou o fator de Hausner maior que 1,2, sendo classificado como pó coesivo intermediário. Como pode ser visto na Figura 23, a estrutura do amido de milho enriquecido aglomerado tendeu ser na forma esférica. Tal tendência foi maior do que o amido de milho não-enriquecido aglomerado (Figura 21 (C)). O pó aglomerado contendo estrutura esférica é provavelmente menos coesivo, devido a diminuição do emaranhamento físico entre as partículas (TEUNOU; VASSEUR; KRAWCZYK, 1995; RASTOGI et al., 1993).

Em relação a fluidez, o amido de milho enriquecido aglomerado apresentou o índice de Carr ≤ 12 , que é classificado como uma fluidez muito boa. Por outro lado, o amido de milho não-enriquecido aglomerado apresentou o índice de Carr de 19, ou uma fluidez boa. Em outras palavras, a adição de lipossomas liofilizados encapsulando quercetina melhorou a fluidez do pó aglomerado, e o índice Flodex corroborou com estas observações. A diminuição dos valores do FLODEX, também apresentaram um aumento da fluidez do pó. Relacionando o amido de milho enriquecido aglomerado, o pó com maior tamanho de partícula apresentou maior fluidez. A adição de lipossomas liofilizados encapsulando quercetina melhorou a fluidez e fez o pó menos coeso, o que são características muito

interessantes para aplicação em alimentos, uma vez que a substituição de pó finos é sempre um interesse na indústria alimentícia.

5.2.2 Propriedades da pasta do amido de milho enriquecido aglomerado

As propriedades da pasta do amido de milho enriquecido aglomerado foram obtidas para verificar possíveis mudanças nas propriedades do amido de milho devido à adição de lipossomas liofilizados encapsulando quercetina. Na Figura 24 pode se visualizar os viscogramas de RVA do amido de milho aglomerado não-enriquecido e o enriquecido. A adição dos lipossomas liofilizados encapsulando quercetina alterou as propriedades do amido de milho, como pode ser visualizado na Tabela 12.

Figura 24 – Perfis de viscosidade obtidos dos diferentes amidos de milho aglomerados:

(—) Controle; (····) F₈; (— —) F₂₂; (— · —) F₃₀.

Fonte: Própria autoria

O enriquecimento do amido aglomerado com lipossomas diminuiu em 10 °C a temperatura de pasta. O tamanho do amido de milho enriquecido aglomerado é maior do que o tamanho do amido de milho não-enriquecido aglomerado (Figura 21). Sugere-se que o amido de milho enriquecido aglomerado que possui um tamanho de partícula maior, possui uma taxa de inchamento maior, levando ao aumento do volume ocupado, e consequentemente, à diminuição da temperatura de pasta.

As formulações F₂₂ e F₃₀ apresentaram uma diminuição na viscosidade máxima. Contudo, o amido de milho F₈ não apresentou diferença estatística significativa quando comparado com o amido de milho não-enriquecido. O amido de milho F₈ tinha em sua formulação apenas 4% menos amido de milho (g/100g) comparado com o amido de milho não-enriquecido, permitindo dessa forma, uma viscosidade muito semelhante. Por outro lado, as formulações com F₂₂ e F₃₀, provavelmente, os lipossomas atuaram como um plastificante, reduzindo a viscosidade de tais formulações quando submetidas as condições de gelatinização. Na viscosidade final, que significa a viscosidade máxima durante o tempo de retenção a 50 °C depois do resfriamento, o comportamento foi similar, as formulações F₂₂ e F₃₀ apresentaram uma diminuição na viscosidade final. Contudo, o amido de milho F₈ atingiu um valor de viscosidade final muito semelhante ao do amido de milho não-enriquecido aglomerado.

O parâmetro *through* que significa a diferença entre a viscosidade mínima entre a viscosidade máxima e a viscosidade final, diminui para as formulações F₂₂ e F₃₀. Comportamento semelhante foi verificado para o *setback*, que indica a tendência à retrogradação. Os valores de *setback* mostraram que com o aumento da quantidade de lipossomas liofilizados encapsulando quercetina diminui o *setback*. Tal fato pode ser muito interessante na aplicação em alimentos, nas quais se deseja uma baixa viscosidade e retrogradação dos grânulos do amido, para maior estabilidade do produto.

Finalmente, a quebra, que caracteriza a diferença entre a viscosidade máxima e o *through*. Tal parâmetro apresentou diferença estatística significativa para as formulações F₂₂ e F₃₀. Em altas quantidades de lipossomas liofilizados encapsulando quercetina, portanto, a capacidade do amido de milho resistir à quebra diminuiu.

Tabela 12 – Propriedades da pasta do amido de milho enriquecido aglomerado.

Formulação	Temperatura da pasta (°C)	Viscosidade máxima (cP)	<i>Through</i> (cP)	Quebra (cP)	Viscosidade final (cP)	<i>Setback</i> (cP)	Tempo de pico (min)
Controle	80 ± 2 ^a	2215 ± 33 ^a	1340 ± 31 ^a	875 ± 2 ^a	2366 ± 83 ^a	1026 ± 52 ^a	9 ± 0 ^a
F ₈	71 ± 0,7 ^b	2318 ± 18 ^a	1144 ± 1,4 ^b	1174 ± 20 ^b	2077 ± 11 ^b	933 ± 12 ^a	7 ± 0,05 ^b
F ₂₂	70 ± 0,1 ^b	1334 ± 47 ^b	777 ± 24 ^c	557 ± 23 ^c	1277 ± 42 ^c	500 ± 18 ^b	7 ± 0,1 ^c
F ₃₀	71 ± 0,2 ^b	920 ± 38 ^c	564 ± 14 ^d	355 ± 24 ^d	889 ± 27 ^d	324 ± 13 ^c	8 ± 0,05 ^d

Fonte: Própria autoria.

5.3 Avaliação dos efeitos do processamento não-térmico de alimentos (*high hydrostatic pressure* - HHP) no antepasto de berinjela

5.3.1 Seleção das condições do (*high hydrostatic pressure* - HHP) no antepasto de berinjela

Na Figura 25 pode ser visualizado os antepastos de berinjela produzidos com o amido de milho enriquecido com quercetina. Na Figura 25 (A) está apresentado o antepasto fresco antes de ser processado por HHP ou térmico e na Figura 25 (B) pode ser visualizado o antepasto após 15 dias de armazenamento à 4 °C.

Figura 25 – Aspecto visual do antepasto de berinjela antes do processamento por HHP ou térmico e após 15 dias de armazenamento à 4 °C.

Fonte: Própria autoria.

As condições para o processamento do antepasto de berinjela por HHP foram escolhidas baseando-se em Matser e Timmermans (2016), que apresentam algumas faixas das condições de HHP comumente aplicável em vegetais. Tais condições levam à redução do número de microrganismos vegetativos, bem como mantêm as características de frescor do alimento.

Análises microbiológicas foram realizadas para validar as condições do processamento de HHP, sendo que dois microrganismos foram selecionados: *Listeria innocua* para substituir

a *L. monocytogenes*, sendo um importante microrganismo responsável por ocorrências de surtos alimentares devido à ingestão de saladas (SAHU et al., 2017; SÖDERQVIST et al., 2017; SHI et al., 2015; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007) e *E. coli* como substituto para *E. coli* O157:H7.

Na Tabela 13 estão apresentados os efeitos dos parâmetros do HHP na redução da *E. coli* e na Tabela 14, podem ser visualizados os efeitos dos parâmetros do HHP na redução da *L. innocua* a 400, 450 e 500 MPa, em tempos de processamento variando de 1 a 6 min.

Tabela 13 – Efeitos dos parâmetros do HHP na redução da *E. coli* no antepasto de berinjela a 400, 450 e 500 MPa, utilizando diferentes tempos de processamento.

Tempo (min)		1	2	3	4	5	6
Pressão (MPa)							
400	Redução log UFC/g	2±0,2	3±0,3	3±0,7	4±0,4	4±0,4	>6±1,4
450		3±0,7	5±1,8	>6±0,1	>6±0,1	>6±0,1	>6±0,1
500		5,4±2	>7±0	>7±0	>7±0	>7±0	>7±0

Fonte: Própria autoria.

Tabela 14 – Efeitos dos parâmetros do HHP na redução da *L. innocua* no antepasto de berinjela a 400, 450 e 500 MPa, utilizando diferentes tempos de processamento.

Tempo (min)		1	2	3	4	5	6
Pressão (MPa)							
400	Redução log UFC/g	2±0,2	5±0,4	>6±0,2	>6±0,2	>6±0,2	>6±0,2
450		6±0,1	>6±0,1	>6±0,1	-	-	-
500		>6±0,1	>6±0,1	>6±0,1	>6±0,1	>6±0,1	-

^a(-) Condições não obtidas. As condições de HPP utilizadas anteriormente já tinham alcançado redução de 5 log.

Fonte: Própria autoria.

Atingir a redução de 5 ciclos log para ambos os microrganismos foi o requerimento mínimo na escolha das condições de HHP. Esse valor está associado a um padrão de performance que o processo deve atingir, requerido pelo FDA (FDA, 2015). Condições de pressão abaixo de 400 MPa, também foram testadas (dados não apresentados) e não se alcançou redução de 5 ciclos log para ambos os microrganismos em tempos de processamento menor que

6 min. Portanto, pressões abaixo de 400 MPa não foram utilizadas nesse estudo. Por outro lado, o processo a 600 MPa levou à redução necessária para ambos os microrganismos. Entretanto, a operação a tal pressão foi excluída, uma vez que as características do antepasto de berinjela poderiam sofrer modificações significativas em sua estrutura.

Portanto, baseando-se nestes resultados preliminares, 400 MPa/6 min, 450 MPa/3 min e 500 MPa/2 min foram selecionadas para processar o antepasto de berinjela e realizar o estudo de estabilidade microbiológica e caracterização físico-química do produto obtido. Vale a pena ressaltar que os resultados preliminares mostraram que a *Listeria innocua* e a *E. coli* não foram capazes de se recuperar e crescer durante 15 dias do tempo de armazenamento quando processadas nas condições de HHP escolhidas para o teste de estabilidade.

5.3.2 Influência do HHP no amido enriquecido aglomerado contendo quercetina

Para visualizar a morfologia do amido de milho, foi preparado uma dispersão de amido de milho com a mesma quantidade (0,5% p/v) que foi adicionada ao antepasto de berinjela. Na Figura 26 podem ser visualizadas as micrografias óticas do amido de milho enriquecido com quercetina. Pode ser visualizado na Figura 26 (B) e (C) que o amido de milho processado por HHP apresentou modificações visuais em seu formato.

Figura 26 – Amido de milho enriquecido aglomerado contendo quercetina adicionado no antepasto de berinjela (A) Amido de milho não-aglomerado e não-processado; (B) Amido de milho aglomerado e processado por HPP a 450 MPa/3 min); (C) Amido de milho aglomerado contendo quercetina e processado por HPP 450 MPa/3 min. Aumento: 20X.

Fonte: Própria autoria.

5.3.3 Estabilidade do antepasto de berinjela

Na Tabela 15 pode ser visualizado os valores de atividade de água, pH e o conteúdo de umidade do antepasto de berinjela (controle, processado por HHP e termicamente processado). O antepasto de berinjela apresentou altos valores para atividade de água e pH, o que provavelmente resultaria em um curto período de vida de prateleira. Por essa razão, é extremamente importante aplicar uma tecnologia de pasteurização para aumentar o tempo de comercialização, além disso, garantir um produto seguro microbiologicamente, bem como

manter as características de qualidade e nutricionais. Em todas as condições de processamento, o antepasto de berinjela não apresentou diferença estatística significativa nos valores de atividade de água, pH e o conteúdo de umidade, o que é certamente interessante para evitar a variabilidade, mantendo um bom aspecto visual do produto.

Tabela 15 – Valores de atividade de água, pH e o conteúdo de umidade para o antepasto de berinjela fresco e com 21 dias de armazenamento a diferentes condições do tratamento.

	A _w		pH		Umidade (% g/100g)	
	Amostra fresca	Dia 21	Amostra fresca	Dia 21	Amostra fresca	Dia 21
Controle	0,98 ^a ±0,01	0,98 ^a ±0	4,98 ^a ±0,2	4,59 ^a ±0,02	83 ^a ± 3	84 ^a ± 0
Tratamento térmico	0,99 ^a ±0	0,98 ^a ±0	4,93 ^a ±0,02	4,56 ^a ±0,1	84 ^a ±1	84 ^a ±2
400 MPa/6 min	0,98 ^a ±0	0,98 ^a ±0	4,83 ^a ±0,1	4,57 ^a ±0,02	84 ^a ±1	83 ^a ± 2
450 MPa/3 min	0,98 ^a ±0	0,98 ^a ±0	4,82 ^a ±0,2	4,53 ^a ±0,05	83 ^a ±1	85 ^a ±1
500 MPa/2 min	0,98 ^a ±0	0,98 ^a ±0	4,84 ^a ±0,1	4,51 ^a ±0,05	84 ^a ±1	84 ^a ±3

± Médias com as mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p< 0.05).

Fonte: Própria autoria.

5.3.3.1 *Influência do HHP na textura e na perda de água no antepasto de berinjela*

Para garantir uma boa aceitabilidade do produto alimentício, a textura é uma das principais características que deve ser avaliada. Na Figura 27 está apresentada a influência do HHP e do tratamento térmico na textura do antepasto de berinjela. Primeiramente, é essencial mencionar que o HHP não modificou a estrutura da berinjela, o principal ingrediente do antepasto. A estrutura da berinjela permaneceu intacta durante o processamento do HHP, provavelmente devido ao fato da matriz da berinjela consistir principalmente de água e sólidos. Na Figura 27, pode-se visualizar uma variação na textura dos antepastos processados durante o tempo de armazenamento, provavelmente isso se deve à matriz heterogênea do antepasto de berinjela.

Figura 27 – Perfil temporal do teste de back extrusion (N) no antepasto de berinjela durante os 21 dias de armazenamento. (○) Controle, (□) Tratamento térmico, (△) 400 MPa/6 min, (■) 450 MPa/3 min, (▲) 500 MPa/2 min.

Fonte: Própria autoria.

A capacidade de retenção de água quantifica a perda de água a partir das fibras dos vegetais. Este fato sugere que a capacidade de retenção de água é mais em função da estrutura das fibras do que a composição química (ROBERTSON; EASTWOOD, 1981). Na Figura 28 pode ser visualizado a capacidade de retenção de água (%) do antepasto de berinjela fresco e armazenado, e pode ser verificado que não houve mudanças significativas na capacidade de retenção de água quando comparado com o antepasto de berinjela controle e os processados, provavelmente porque a berinjela foi submetida ao cozimento antes de ser processada, perdendo uma grande quantidade de água nessa etapa.

Figura 28 – Capacidade de retenção de água (%) do antepasto de berinjela fresco, 5 e 21 dias de armazenamento, da amostra controle, tratada termicamente, 400 MPa/6 min, 450 MPa/3 min e 500 MPa/2 min.

Fonte: Própria autoria.

5.3.3.2 *Influência do HHP nos parâmetros colorimétricos do antepasto de berinjela*

Na Figura 29 está apresentado a diferença de cor do antepasto de berinjela processado em diferentes condições. Os resultados foram expressos a partir dos parâmetros de cor da amostra fresca e do 21º dia de armazenamento.

Como pode ser visualizado, o antepasto de berinjela processado por HHP a baixa pressão, mas por um período longo de processamento (400 MPa/ 6 min) apresentou no 21º dia de armazenamento diferença na cor menor quando comparado com o antepasto processado nas demais condições. Processar o antepasto com HHP na condição de temperatura ambiente ou a temperaturas amenas, resulta em efeitos mínimos nos pigmentos responsáveis pela cor dos vegetais (OEY et al., 2008; MATSER; TIMMERMANS, 2016).

Figura 29 – Diferença na cor do antepasto de berinjela. Os resultados foram expressos a partir dos parâmetros de cor da amostra fresca e do 21º dia de armazenamento.

Fonte: Própria autoria.

O antepasto de berinjela não-tratado apresentou o maior valor na diferença de cor entre as amostras depois do armazenamento, sugerindo que as enzimas e os microrganismos continuaram agindo na matriz do antepasto, permitindo as reações químicas e mudanças na cor. Por outro lado, o HHP provavelmente permitiu a inativação das enzimas no antepasto de berinjela, evitando as grandes mudanças na cor durante o armazenamento.

5.3.3.3 Influência do HHP na conservação das antocianinas totais do antepasto de berinjela

Na Figura 30 pode ser visualizado a influência do HHP e do tratamento térmico no conteúdo de antocianina durante 15 dias de armazenamento. Todos os antepastos resultaram em uma diminuição em seu conteúdo de antocianina depois de 15 dias de armazenamento. No antepasto de berinjela tratado na condição 500 MPa/2 min, 49% do total de antocianina permaneceram e foi menos afetada que a amostra tratada termicamente, que permaneceu com 35% do total de antocianina. O antepasto de berinjela processado por HHP a baixa pressão,

contudo por um período longo (400 MPa/6 min) apresentou no dia 15 de armazenamento um baixo conteúdo de antocianina quando comparado com os antepastos processados nas outras condições. Esse possível mecanismo que envolveu a degradação da antocianina nos antepastos pode ser devido às reações de condensação entre as antocianinas e outros flavonóis ou ácido orgânicos por associações covalente, resultando na formação de compostos de anéis pirano (TIWARI et al., 2010; RIVAS-GONZALO; BRAVO-HARO; SANTOS-BUELGA, 1995).

Figura 30 – Perfil temporal do total de antocianina restante no antepasto de berinjela durante 15 dias de armazenamento. (○) Controle, (□) Tratamento térmico, (△) 400 MPa/6 min, (■) 450 MPa/3 min, (▲) 500 MPa/2 min.

Fonte: Própria autoria.

5.3.3.4 Contagem de mesófilos, bolores e leveduras no antepasto de berinjela

Em relação à contagem de microrganismos nos antepastos de berinjela durante o tempo de armazenamento, o antepasto de berinjela tratado por HHP teve uma estabilidade de seis dias

maior do que o antepasto processado pelo tratamento convencional. As contagens de mesófilos, bolores e leveduras resultaram em valores < 3 UFC/g para o antepasto de berinjela controle e tratado termicamente no dia 15 de armazenamento. Por outro lado, o antepasto de berinjela tratado com HHP não apresentou nenhum crescimento até o dia 21 de armazenamento.

6 CONCLUSÕES

Através dos dados obtidos nesta Tese, foi possível obter dispersões de lipossomas encapsulando quercetina produzidas pelo método de injeção de etanol, bem como liofilizar e utilizar sacarose como crioprotetor. Contudo, a técnica de monocamadas de Langmuir mostrou que há uma limitação na quantidade de quercetina que pode ser encapsulada nos lipossomas.

Os lipossomas liofilizados apresentaram baixa adsorção de umidade, sendo um excelente resultado relacionado à alimentos na forma de pó. Com esta baixa tendência em adsorver água, pode ser atribuído ao produto uma maior vida de prateleira, além da embalagem e as condições de armazenamento serem simplificadas e com um menor custo.

Foi possível enriquecer o amido de milho com quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados através do processo de alto cisalhamento, aumentando o valor agregado do amido de milho, que é um ingrediente frequentemente utilizado na indústria alimentícia, bem como melhorar as suas propriedades físicas de coesividade e fluidez. Em relação às propriedades de pasta, o amido de milho enriquecido com 8% (g/100g) de quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados não apresentou diferença significativa na viscosidade máxima, quando comparado com o amido de milho não-enriquecido.

Foi possível produzir um alimento pronto para o consumo enriquecido com o amido de milho contendo a quercetina. A adição do amido de milho enriquecido com quercetina encapsulada em lipossomas liofilizados não alterou o aspecto visual do antepasto de berinjela. O processo de HHP foi capaz de reduzir a carga microbiana do antepasto conforme exigido pela

agência de regulamentação, no qual permaneceu microbiologicamente estável até o 21º dia de armazenamento. Foi possível comparar o processamento por HHP e o tratamento convencional, o antepasto de berinjela processado por HHP apresentou algumas vantagens em relação ao tratamento convencional, tal como a quantidade total de antocianina, a cor e microbiologicamente estável, sendo que estendeu em seis dias a sua estabilidade. Portanto, as duas tecnologias, HHP e microencapsulação podem ser utilizadas em conjunto para desenvolver um alimento pronto para o consumo e satisfazer as expectativas dos consumidores modernos e que buscam uma alimentação mais saudável.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar outro método de produção de lipossomas, visando atingir uma maior eficiência de encapsulação, tal como o método de prolipossomas;
- Enriquecer o amido de milho utilizando outro bioativo encapsulado nos lipossomas liofilizados;
- Utilizar uma quantidade intermediária de lipossomas liofilizados encapsulando quercetina para enriquecer o amido de milho, por exemplo, 15% (g/100g);
- Realizar testes de análise sensorial do produto desenvolvido com o amido de milho enriquecido com o bioativo e verificar a sua aceitação pelos consumidores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. **Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Arlington: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS; 1996.
- ABDEL-WAHHAB, M. A. et al. Chitosan nanoparticles plus quercetin suppress the oxidative stress, modulate DNA fragmentation and gene expression in the kidney of rats fed ochratoxin A-contaminated diet. **Food and Chemical Toxicology**, v. 99, p. 209–221, 2017.
- ABDULLAH, E. C.; GELDART, D. The use of bulk density measurements as flowability indicators. **Powder Technology**, v. 102(2), p. 151–165, 1999.
- AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale research letters**, v. 8, n. 1, p. 102, 2013.
- ALEXOPOULOU, E. et al. Preparation and characterization of lyophilized liposomes with incorporated quercetin. **Journal of Liposome Research**, v.16, p. 17–25, 2006.
- ARAKAWA, T. et al. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 307–326, 2001.
- AYTAC, Z. et al. Quercetin/ β -cyclodextrin inclusion complex embedded nanofibres: Slow release and high solubility. **Food chemistry**, v. 197, p. 864–871, 2016.
- BALASUBRAMANIAM, V. M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; LELIEVELD, H. L. **High Pressure Processing of Food**. Springer, 2016.
- BALASUBRAMANIAM, V. M.; FARKAS, D. High-pressure food processing. **Food Science technology International**, v. 14, p. 413–418, 2008.
- BALBINO, T. A. et al. Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 226, p. 423–433, 2013.
- BAN, C. et al. Improving flavonoid bioaccessibility using an edible oil-based lipid nanoparticle for oral delivery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63(21), p. 5266–5272, 2015.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; JULIANO, P. Physical and chemical properties of food powders. In **Encapsulated and powdered foods**, p. 39–71. CRC Press, 2005.
- BATZRI, S.; KORN, E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 298, p. 1015–1019, 1973.
- BENECH, R.O. et al. Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin in liposomes or by in situ production in mixed culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68(8), p. 3683–3690, 2002.

CABRAL, E.C.M.; ZOLLNER, R.L.; SANTANA, M.H.A. Preparation and characterization of liposomes entrapping allergenic proteins. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, p. 137–146, 2004.

CAI, Y.Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried. *Amaranthus* bethacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 1248–1252, 2000.

CARR, R. L. Evaluating flow properties of solids. **Chemical Engineering Journal**, p. 163–168, 1965.

CARVALHO, J.M.P. et al. Physico-chemical stability and structural characterization of thickened multilamellar beta-carotene-loaded liposome dispersions produced using a proliposome method. **Colloid and Polymer Science**, v. 293, p. 2171–2179, 2015.

CAZADO, C.P.S.; PINHO, S.C. Effect of different stress conditions on the stability of quercetin-loaded lipid microparticles produced with babacu (*Orbignya speciosa*) oil: evaluation of their potential use in food applications. **Food Science and Technology**, v. 36 (1), p. 9–17, 2016.

CHAKRABORTY, S. et al. The use of nano-quercetin to arrest mitochondrial damage and MMP-9 upregulation during prevention of gastric inflammation induced by ethanol in rat. **Biomaterials**, v. 33, n. 10, p. 2991–3001, 2012.

CHARCOSSET, C. et al. Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: effect of scale-up and injection device. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 94, p. 508–515, 2015.

CHEN, C.; HAN, D.; TANG, X. An overview of liposome lyophilization and its future potential. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 299–311, 2010.

CHEN, X. et al. Potential of Excipient Emulsions for Improving Quercetin Bioaccessibility and Antioxidant Activity: An in Vitro Study. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 18, p. 3653–3660, 2016.

COPELAND, L. et al. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1527–1534, 2009.

CROWE, J.H. et al. Interactions of phospholipids monolayers with carbohydrates. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 769, p. 151–159, 1984.

CROWE, J.H. et al. Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification. **Cryobiology**, v. 35, p. 20–30, 1997.

CROWE, J.H.; LESLIE, S.B.; CROWE, L.M. Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying? **Cryobiology**, v. 31, p. 355–366, 1994.

DACANAL, G. C. et al. Effects of pulsating air flow in fluid bed agglomeration of starch particles. **Journal of Food Engineering**, v. 181, p. 67–83, 2016.

DACANAL, G. C.; MENEGALLI, F. C. Selection of operational parameters for the production of instant soy protein isolate by pulsed fluid bed agglomeration. **Powder Technology**, v. 203(3), p. 565–573, 2010.

DEBET, M. R.; GIDLEY, M. J. Why do gelatinized starch granules not dissolve completely? Roles for amylose, protein, and lipid in granule “ghost” integrity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4752–4760, 2007.

DONALD, A.M. et al. Internal structure of starch granules revealed by scattering studies. In: P.J. Frazier, A.M. Donald, P. Richmond (Eds.), **Starch: Structure and Functionality**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 172–179, 1997.

DU, S.; DENG, Y. Studies on the encapsulation of oxymatrine into liposomes by ethanol injection and pH gradient method. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 32, p. 791–797, 2006.

ELUMALAI, P.; LAKSHMI, S. Role of quercetin benefits in neurodegeneration. In E. M. Mohamed, A. Mohammed; G. Gilles. **The Benefits of Natural Products for neurodegenerative Diseases**. Springer International Publishing, p. 229–245, 2016.

FDA- Food and Drugs Administration. Safe Practices for Food Processes: Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods Chapter 6. **Microbiological Challenge Testing**, 2015. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094154.htm>. Acesso em maio de 2016.

Freethought-forum. Disponível em: <http://www.freethought-forum.com/forum/showthread.php?t=24978&garp=6>. Acesso em: março de 2017.

FRENZEL, M.; STEFFEN-HEINS, A. Impact of quercetin and fish oil encapsulation on bilayer membrane and oxidation stability of liposomes. **Food Chemistry**, p.185, v. 48–57, 2015.

GENTINE, P. et al. Manufacture of liposomes by isopropanol injection: characterization of the method. **Journal of Liposome Research**, v. 22(1), p. 18–30, 2012.

GERIN, F. et al. The effects of quercetin on acute lung injury and biomarkers of inflammation and oxidative stress in the rat model of sepsis. **Inflammation**, v. 39, n. 2, p. 700–705, 2016.

GHORBANZADE, T. et al. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. **Food Chemistry**, v. 216, p. 146–152, 2017.

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**, v. 18, p. 451–459, 2011.

GIDLEY, M. J. Factors affecting the crystalline type (A–C) of native starches and model compounds: a rationalisation of observed effects in terms of polymorphic structures. **Carbohydrate Research**, v. 161, n. 2, p. 301–304, 1987.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, 2001.

GÜLTEKİN-ÖZGÜVEN, M. et al. Fortification of Dark Chocolate with spray dried black Mulberry (*Morus nigra*) waste extract encapsulated in chitosan-coated liposomes and bioaccessability studies. **Food Chemistry**, v. 201, p. 205–212, 2016.

HAMANN, S. D. **Physico-chemical: Effects of Pressure**. Butterworth Heinemann Publishers, 1957.

HAUSNER, H. H. **Friction conditions in a mass of metal powder**. Polytechnic Institute of Brooklyn. University of California, Los Angeles, 1967.

HAYMAN, M. M. et al. Effects of high-pressure processing on the safety, quality, and shelf life of ready-to-eat meats. **Journal of Food Protection**, v. 67(8), p. 1709–1718, 2004.

HOGAN, E.; KELLY, A. L.; SUN, D. High pressure processing of foods: an overview. In Sun, D. (ed.), **Emerging technologies for food processing**. Elsevier Academic Press, San Diego, p. 3–27, 2005.

HOLM, P. High shear mixer granulators. **Drugs and the pharmaceutical sciences**, v. 81, p. 151–204, 1997.

INAL, M. E.; KAHRAMAN, A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. **Toxicology**, v. 154, n. 1, p. 21–29, 2000.

ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and Surface Forces**. Academic Press, San Diego, USA, 1985.

IVESON, S. M.; et al. Nucleation, growth and breakage phenomena in agitated wet granulation processes: a review. **Powder technology**, v. 117, n. 1, p. 3–39, 2001.

JAAFAR-MAALEJ, C. et al. Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. **Journal of Liposome Research**, v. 20(3), p. 228–243, 2010.

JAAFAR-MAALEJ, C; CHARCOSSET, C; FESSI, H. A new method for liposome preparation using a membrane contactor. **Journal of liposome research**, v. 21, n. 3, p. 213–220, 2011.

JAHN, A. et al. Controlled vesicle self-assembly in microfluidic channels with hydrodynamic focusing. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 9, p. 2674–2675, 2004.

JAHN, A. et al. Freezing continuous-flow self-assembly in a microfluidic device: toward imaging of liposome formation. **Langmuir**, v. 29, n. 5, p. 1717–1723, 2013.

JAHN, A. et al. Microfluidic mixing and the formation of nanoscale lipid vesicles. **Acs Nano**, v. 4, n. 4, p. 2077–2087, 2010.

JANGLE, R.D.; THORAT, B.N. Effect of freeze-thawing study on curcumin liposome for obtaining better freeze dried product. **Drying Technology**, v. 31, p. 966–974, 2013.

JENKINS, P. J.; DONALD, A. M. Gelatinisation of starch: a combined SAXS/WAXS/DSC and SANS study. **Carbohydrate research**, v. 308, n. 1, p. 133–147, 1998.

JUSTO, O. R.; MORAES, A.M. Economical feasibility evaluation of an ethanol injection liposome production plant. **Chemical Engineering and Technology**, v. 33, p. 15–20, 2010.

JUSTO, O.R.; MORAES, A.M. Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of temperature and batch volume. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 785–792, 2011.

KANDASWAMI, C. et al. The antitumor activities of flavonoids. **In Vivo (Athens, Greece)**, v. 19(5), p. 895–909. PMID:16097445, 2005.

KHALED, K. A.; EL-SAYED, Y. M.; AL-HADIYA, B. M. Disposition of the flavonoid quercetin in rats after single intravenous and oral doses. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 29, n. 4, p. 397–403, 2003.

KHALID, N. et al. Microchannel emulsification study on formulation and stability characterization of monodisperse oil-in-water emulsions encapsulating quercetin. **Food Chemistry**, v. 212, p. 27–34, 2016.

KIKUCHI, H.; YAMAUCHI, H.; HIROTA, S. A spray drying method for the mass production of liposomes. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, p. 1522–1527, 1991.

KNILL, C. J.; KENNEDY, J. F. Starch: Commercial sources and derived products. In: S. DUMITRIU. **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**, CRC Press, p. 605-624, 2004.

KOSTER, K.L. et al. Effects of vitrified and nonvitrified sugars on phosphatidylcholine fluid-to-gel phase transitions. **Biophysical Journal**, v. 78, p. 1932–1946, 2000.

KOSTER, K.L. et al. Interactions between soluble sugars and POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) during dehydration: vitrification of sugars alters the phase behavior of the phospholipid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1193, p. 143–150, 1994.

KOSTER, K.L.; SOMMERVOLD, C.L.; LEI, Y.P. The effect of storage temperature on interactions between dehydration sugars and phosphatidylcholine. **Journal Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 47, p. 1581–1596, 1996.

LA TORRE, L.G.; PINHO, S. C. Lipid Matrices for Nanoencapsulation in Food: Liposomes and Lipid Nanoparticles. In H. HERNANDEZ-SANCHEZ, G. F. GUTIERREZ-LOPEZ (Org.), **Food Nanoscience and Nanotechnology**. Springer International Publishing, p. 99–143, 2015.

LABUZA, T. Moisture Sorption: Practical Aspects of Isotherm Measurement and Use. St. Paul, MN: **American Association of Cereal Chemists**, 1984.

LABUZA, T. P.; ALTUNAKAR, B. Water activity prediction and moisture sorption isotherms. In G. V., Barbosa-Cànovas, A. J., Fontana, & S., Schmidt, T., Labuza (Eds.), **Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications**. Blackwell Publishing Ltd. Iowa, p. 09–154, 2007.

LALOY, E. et al. Release of enzymes from liposomes during cheese ripening. **Journal of Controlled Release**, v. 54(2), p. 213–222, 1998.

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**, v. 19, p. 177–187, 2012.

LAOUINI, A. et al. Preparation of liposomes: A novel application of microengineered membranes—From laboratory scale to large scale. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 272–278, 2013.

LAOUINI, A. et al. Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. **Journal of colloid Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 147–168, 2012.

LASIC, D.D. **Liposomes: from physics to applications**. 1^a ed. Amsterdam: Elsevier, 1993.

LASIC, D.D. Novel applications of liposomes. **Trends in Biotechnology**, 16, 307–321, 1998.

LAVOIE, F.; CARTILIER, L.; THIBERT, R. New methods characterizing avalanche behavior to determine powder flow. **Pharmaceutical research**, v. 19, n. 6, p. 887–893, 2002.

LÉVAI, G. et al. Production of stabilized quercetin aqueous suspensions by supercritical fluid extraction of emulsions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.100, p 34–45, 2015.

LEWIS, R. N. A. H.; MCELHANEY, R. N. Fourier transform infrared spectroscopy in the study of hydrated lipids and lipid bilayer membranes. In H. H., Mantsch, & D., Chapman (Eds.). **Infrared spectroscopy of biomolecules**. New York: Wiley Liss. p. 150–202, 1996.

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

LINDEBOOM, N.; CHANG, P. R.; TYLER, R. T. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. **Starch-Stärke**, v. 56, n. 3-4, p. 89–99, 2004.

LIU, C. et al. Preparation and characterization of medium-chain fatty acid liposomes by lyophilization. **Journal of Liposome Research**, v. 20, p. 183–190, 2010.

LIU, L. et al. Characterization and biodistribution in vivo of quercetin-loaded cationic nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 115, p. 125–131, 2014.

LIU, W. et al. Multilayered vitamin C nanoliposomes by self-assembly of alginate and chitosan: Long-term stability and feasibility application in mandarin juice. **LWT-Food Science and Technology**, v. 75, p. 608–615, 2017.

LOMAURO, C.J.; BAKSHI, A.S.; LABUZA, T.P. Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part I: Fruit, vegetable and meat products. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 18(2), p. 111–117, 1985.

MADSEN, M. H.; CHRISTENSEN, D. H. Changes in viscosity properties of potato starch during growth. **Starch-Stärke**, v. 48, n. 7-8, p. 245–249, 1996.

MAHADEVAN, S.; KARWE, M. V. Effect of High-Pressure Processing on Bioactive Compounds. In V. M. Balasubramaniam, G. V. Barbosa-Cánovas, & H. L. M. Lelieveld (eds.), **High Pressure Processing of Food**, p. 479–507. Springer New York, 2016.

MARSANASCO, M. et al. Bioactive compounds as functional food ingredients: characterization in model system and sensory evaluation in chocolate milk. **Journal of Food Engineering**, v. 166, p. 55–63, 2015c.

MARSANASCO, M. et al. Bioactive constituents in liposomes incorporated in orange juice as new functional food: thermal stability, rheological and organoleptic properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52(12), p. 7828–7838, 2015a.

MARSANASCO, M. et al. Fortification of chocolate milk with omega-3, omega-6, and vitamins E and C by using liposomes. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, p. 1271–1281, 2015 b.

MARSANASCO, M. et al. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. **Food Research International**, v. 44(9), p. 3039–3046, 2011.

MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, S. I.; BALASUBRAMANIAM, V. M. Fundamentals and Applications of High-Pressure Processing Technology. In V. M. Balasubramaniam, G. V. Barbosa-Cánovas, & H. L. M. Lelieveld (eds.), **High Pressure Processing of Food**. Springer New York, p. 3-17, 2016.

MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, S. I.; SALDAÑA, M. D. A. Chemical reactions in food systems at high hydrostatic pressure. **Food Engineering Reviews**, v. 6, n. 4, p. 105–127, 2014.

MATSER, A.; TIMMERMANS, R. High-Pressure Effects on Fruits and Vegetables. In V. M. Balasubramaniam, G. V. Barbosa-Cánovas, & H. L. M. Lelieveld (eds.), **High Pressure Processing of Food**, p. 541–551. Springer New York, 2016.

MIJAJLOVIC, M. et al. Microfluidic hydrodynamic focusing based synthesis of POPC liposomes for model biological systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 276–281, 2013.

MOHSENIN, N.N. **Physical properties of plant and animal material**. New York: Gordon and Breach science publishes, v. 1, p. 73–75, 1970.

MORAES, M. et al. Liposomes encapsulating beta-carotene produced by the proliposomes method: characterisation and shelf life of powders and phospholipid vesicles. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48(2), p. 274–282, 2013.

- MOZAFARI, M. R. et al. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. **Journal of Science in Food and Agriculture**, v. 86, p. 2038–2045, 2006.
- OEY, I. et al. Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit-and vegetable-based food products: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9(6), p. 320–328, 2008.
- OHTAKE, S. et al. Effect of sugar–phosphate mixtures on the stability of DPPC membranes in dehydrated systems. **Cryobiology**, v. 48, p. 81–89, 2004.
- PALOU, E. et al. High pressure-processed guacamole. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 1(1), p. 69–75, 2000.
- PALZER, S. Agglomeration of pharmaceutical, detergent, chemical and food powders—similarities and differences of materials and processes. **Powder technology**, v. 206, n. 1, p. 2–17, 2011.
- PATIL, Y. P.; JADHAV, S. Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and physics of lipids**, v. 177, p. 8–18, 2014.
- PAWLIKOWSKA-PAWŁĘGA, B. et al. Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 9, p. 2195–2204, 2007.
- PHAPAL, S. M.; SUNTHAR, P. Influence of micro-mixing on the size of liposomes self-assembled from miscible liquid phases. **Chemistry and physics of lipids**, v. 172, p. 20–30, 2013.
- PICÓN, A. et al. The effect of liposome-encapsulated cryoprosins on manchego cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1699–1705, 1996.
- PIETSCH, W. Readily engineer agglomerates with special properties from micro-and nanosized particles. **Chemical engineering progress**, v. 95(8), p. 67–81, 1999.
- PISKULA, M. K.; MUROTA, K.; TERAOKA, J. Bioavailability of flavonols and flavones. In A., Crozier (Ed.) **Flavonoids and related compounds: bioavailability and function**. CRC Press: Boca Raton, p. 93–107, 2012.
- PORTER, C.J. H.; TREVASKIS, N.L.; CHARMAN, W.N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. **Nature Reviews**, v. 6, p. 231–248, 2007.
- POUTON, C.W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 29, p. 278–287, 2006.
- RASTOGI, S. et al. Survey of characterization techniques of dry ultrafine coals and their relationships to transport. Handling and storage, **Powder Technology**, v. 74, p. 47–93, 1993.

RICKER, J.V. et al. Trehalose maintains phase separation in an air-dried binary lipid mixture. **Biophysical Journal**, v. 84, p. 3045–3051, 2003.

RIVAS-GONZALO, J. C.; BRAVO-HARO, S.; SANTOS-BUELGA, C. Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43(6), p. 1444–1449, 1995.

ROBERTSON, J. A.; EASTWOOD, M. A. An examination of factors which may affect the water holding capacity of dietary fibre. **British Journal of Nutrition**, v. 45(01), p. 83–88, 1981.

RODRIGUES, I. et al. Effect of high pressure processing on physicochemical and microbiological properties of marinated beef with reduced sodium content. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 38, 328–333, 2016.

RODRIGUEZ-NOGALES, J.M.; DELGADILLO-LÓPEZ, A. A novel approach to develop β -galactosidase entrapped in liposomes in order to prevent an immediate hydrolysis of lactose in milk. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 354–360, 2006.

ROOS, Y. Melting and glass transitions of low molecular weight carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 238, p. 39–48, 1993.

RUOZI, B. et al. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 81–89, 2005.

SABOGAL-GUÁQUETA, A. M. et al. The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. **Neuropharmacology**, v. 93, p. 134–145, 2015.

SAHU, S. N. et al. Growth potential of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated celery and chicken salad. **Food Control**, v. 73, p. 1229–1236, 2017.

SALA, M. et al. Preparation of liposomes: A comparative study between the double solvent displacement and the conventional ethanol injection—From laboratory scale to large scale. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.02.084>.

SCHOU, S.A. Light absorption of several anthocyanins. **Helvetica Chimica Acta**, v. 10, p. 907–915, 1927.

SCHUBERT, H. Food Particle Technology. Part I: Properties of Particles and Particulate Food Systems. **Journal of Food Engineering**, v. 6, p. 1–32, 1987.

SEBAALY, C. et al. Effect of composition, hydrogenation of phospholipids and lyophilization on the characteristics of eugenol-loaded liposomes prepared by ethanol injection method. **Food Bioscience**, v. 15, p. 1–10, 2016.

SHI, W. et al. Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat foods in China. **Food Control**, v. 47, p. 340–347, 2015.

SILVA, G. S. et al. Characterisation of curcumin-loaded proliposomes produced by coating of micronised sucrose and hydration of phospholipid powders to obtain multilamellar liposomes. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 3, p. 772–780, 2017.

SINGH, N. et al. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219–231, 2003.

SÖDERQVIST, K. et al. Fate of *Listeria monocytogenes*, Pathogenic *Yersinia enterocolitica*, and *Escherichia coli* O157: H7 gfp+ in Ready-to-Eat Salad during Cold Storage: What Is the Risk to Consumers?. **Journal of Food Protection**, v. 80(2), p. 204–212, 2017.

STORM, G.; CROMMELIN, D. J.A. "Liposomes: quo vadis?." **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v.1.1, p. 19–31, 1998.

STRATAKOS, A. C. et al. Effect of high pressure processing in combination with *Weissella viridescens* as a protective culture against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat salads of different pH. **Food Control**, v. 61, p. 6 –12, 2016.

STRATAKOS, A. C. et al. Effect of high-pressure processing on the shelf life, safety and organoleptic characteristics of lasagne ready meals during storage at refrigeration and abuse temperature. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 30, 1–7, 2015.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v. 9(10), p. 1236–1243, 2007.

TANG, M. C.; COPELAND, L. Investigation of starch retrogradation using atomic force microscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 1, p. 1–7, 2007.

TARDOS, G. I.; KHAN, M. I.; MORT, P. R. Critical parameters and limiting conditions in binder granulation of fine powders. **Powder Technology**, v. 94(3), p. 245–258, 1997.

TAYLOR, T.M. et al. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. **Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 587–605, 2005.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch—composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151–165, 2004.

TEUNOU, E.; VASSEUR, J.; KRAWCZYK, M. Measurement and interpretation of bulk solids angle of repose for industrial process design. **Powder Handling and Processing**, p. 7(3), v. 219–228, 1995.

THOMPSON, A. K.; HAISMAN, D.; SINGH, H. The properties of liposomes produced from milk fat globule membrane material using different techniques. **Lait**, v. 87, p. 349–360, 2007.

THOMPSON, A.K.; HAISMAN, D.; SINGH, H. Physical Stability of Liposomes Prepared from Milk Fat Globule Membrane and Soya Phospholipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6390–6397, 2006.

TIMMERMAN, E.O.; CHIRIFE, J.; IGLESIAS, H.A. Water sorption isotherms of foods and foodstuffs: BET or GAB parameters? **Journal of Food Engineering**, v. 48(1), p. 19–31, 2001.

TIWARI, B. K. et al. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17(3), p. 598–60, 2010.

TONIAZZO, T. et al. β -carotene-loaded liposome dispersions stabilized with xanthan and guar gums: Physico-chemical stability and feasibility of application in yogurt. **LWT- Food Science and Technology**, v. 59(2), p. 1265–1273, 2014.

TONIAZZO, T.; PINHO, S. C. Lyophilized liposomes for food applications: Fundamentals, processes, and potential applications. In J. M., Lakkis (ed.), **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**, Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK. p 78, 2016.

TREVISAN, J.E. et al. Technological Aspects of Scalable Processes for the Production of Functional Liposomes for Gene Therapy. In: YUAN, X. **Non-viral gene therapy. In Tech**, 2011.

TURCHIULI, C. et al. Fluidised bed agglomeration: Agglomerates shape and end-use properties. **Powder Technology**, v. 157, p. 168–175, 2005.

VAN WINDEN, E.C.; CROMMELIN, D.J. Short term stability of freeze-dried, lyoprotected liposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 58, p. 69–86, 1999.

VAN WINDEN, E.C.; ZHANG, W.; CROMMELIN, D.J. Effect of freezing rate on the stability of liposomes during freeze-drying and rehydration. **Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 1151–1160, 1997.

WAGNER, A. et al. The crossflow injection technique: an improvement of the ethanol injection method. **Journal of Liposome Research**, v. 12, p. 259–270, 2002.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane – solute- water systems. **Cryobiology**, v. 39, p. 103–129, 1999.

XIA, S.; XU, S. Ferrous sulphate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. **Food Research International**, v. 38, p. 289–296, 2005.

YANG, L. et al. Characterization of Quercetin/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex. **Asian Journal of Chemistry**, 24, 3141–3144, 2012.

YOKOTA, D.; MORAES, M.; PINHO, S.C. Characterization of lyophilized liposomes produced with non-purified soy lecithin: a case study of casein hydrolysate microencapsulation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 325–335, 2012.

YOSHIDA, P.A. et al. Liposomes incorporating essential oil of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): characterization of aqueous dispersions and lyophilized formulations. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, p. 416–425, 2010.

ZOBEL, H. F. Molecules to granules: a comprehensive starch review. **Starch-Stärke**, v. 40, n. 2, p. 44–50, 1988b.

ZOBEL, H. F. Starch crystal transformations and their industrial importance. **Starch-Stärke**, v. 40, n. 1, p. 1-7, 1988a.

ZÔMPERO, R.H. et al. Hybrid encapsulation structures based on β -carotene-loaded nanoliposomes within electrospun fibers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 134, p. 475–482, 2015.

APÊNDICE A: PUBLICAÇÕES ORIGINADAS DESTA TESE DE DOUTORADO

Capítulo de livro publicado:

TONIAZZO, T.; PINHO, S.C. Lyophilized liposomes for food applications: Fundamentals, processes, and potential applications. In J. M., Lakkis (ed.), **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**, 2nd Ed., John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, pp. 78-96, 2016.

Manuscrito publicado no periódico Food Bioscience:

TONIAZZO, T.; PERES, M.S.; RAMOS, A.P.; PINHO, S.C. Encapsulation of quercetin in liposomes by ethanol injection and physico-chemical characterization of dispersions and lyophilized vesicles, **Food Bioscience**, v. 19. p. 17-25, 2017.

Manuscritos enviados para os periódicos indexados:

TONIAZZO, T.; GALESKAS, H.; DACANAL, G. C.; PINHO, S. C. Enrichment of cornstarch with quercetin by high shear agglomeration with lyophilized liposomes. Artigo enviado para o periódico *Journal of Food Science*.

TONIAZZO, T.; POKHREL, P. R.; PINHO, S. C.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Effect of high pressure processing (HPP) on eggplant sauce produced with quercetin-enriched cornstarch. Artigo enviado para o periódico *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.

Trabalhos publicados em anais de eventos:

TONIAZZO, T.; PERES, M.S.; RAMOS, A.P.; PINHO, S.C. Feasibility of producing stable dispersions of quercetin-loaded-liposomes by ethanol injection method. Apresentado na forma de pôster moderado- 5 min de apresentação oral no “*17th World Congress of Food Science and Technology*” que ocorreu no Canadá em agosto de 2014.

PERES, M.S.; TONIAZZO, T.; PINHO, S.C. Estudo do processo de produção de lipossomas pelo método da injeção de etanol: estudo de caso com encapsulação de quercetina. Apresentado no “*22º Simpósio de Iniciação Científica da USP*” no ano de 2014.

TONIAZZO, T.; GALESKAS, H.; DACANAL, G. C.; PINHO, S. C. Produção e caracterização de lipossomas liofilizados encapsulando quercetina. Aceito na forma de pôster no “*XXXVII Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados*” na cidade de São Carlos em outubro de 2015.

TONIAZZO, T.; GALESKAS, H.; DACANAL, G. C.; PINHO, S. C. Enriquecimento de amido de milho com quercetina através de aglomeração com lipossomas liofilizados. Apresentado no “*II Simpósio da Pós Graduação e I Encontro da Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da FZEA/USP*” em setembro de 2015.

TONIAZZO, T.; GALESKAS, H.; DACANAL, G. C.; PINHO, S. C. Enrichment of corn starch with quercetin-loaded lyophilized liposomes by agglomeration. Apresentado na forma de pôster

na “*Conference of Food Engineering-CoFE 2016*” na cidade de Columbus/Ohio- EUA em setembro de 2016.

TONIAZZO, T.; POKHREL, P.R.; PINHO, S.C.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Effect of high pressure processing on eggplant sauce enriched with cornstarch containing quercetin. Apresentado na forma de pôster no “*IFT’17 – Annual Meeting of the Institute of Food Technologists 2017*” realizado na cidade de Las Vegas/NV-EUA em junho de 2017.