

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GABRIELA MARQUES BITTENCOURT

**Estudo da formação de micropartículas fitoterápicas contendo extrato de
folhas de *Cynara cardunculus* L. por tecnologia supercrítica e por
gelificação iônica para emprego no desenvolvimento de *sorbet* funcional**

Pirassununga

2022

GABRIELA MARQUES BITTENCOURT

Estudo da formação de micropartículas fitoterápicas contendo extrato de folhas de *Cynara cardunculus* L. por tecnologia supercrítica e por gelificação iônica para emprego no desenvolvimento de *sorbet* funcional

VERSÃO CORRIGIDA

Trabalho apresentado à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo como texto de defesa de tese, cumprindo parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Lopes de Oliveira

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Milena Martelli Tosi

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

B624e Bittencourt, Gabriela Marques
Estudo da formação de micropartículas
fitoterápicas contendo extrato de folhas de *Cynara
cardunculus* L. por tecnologia supercrítica e por
gelificação / Gabriela Marques Bittencourt ;
orientador Alessandra Lopes de Oliveira ;
coorientador Milena Martelli Tosi. --
Pirassununga, 2022.
267 f.

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

1. partículas lipídicas sólidas. 2. TPP-
quitossomas. 3. PGSS. 4. Pressurized liquid
extraction. 5. análise sensorial. I. Oliveira,
Alessandra Lopes de , orient. II. Tosi, Milena
Martelli , coorient. III. Título.



*Dedico este trabalho ao meu companheiro de vida,
aquele que me deu todo apoio e incentivo para que
este doutorado fosse possível.*

*Aquele que está comigo em todos os momentos,
tanto os alegres quanto nos difíceis
me incentivando a seguir em frente.*

Felipe, saiba que você me inspira todos os dias.

AGRADECIMENTO

Este trabalho encerra um longo ciclo da minha vida, ciclo esse teve início em 09 de março de 2010 com a minha primeira matrícula na FZEA/USP em Engenharia de Alimentos, em busca do sonho do diploma de engenheira, cheia de alegria, determinação e com um futuro profissional perfeitamente traçado (que obviamente não fez mais nenhum sentido com o passar dos anos). Ao longo destes mais de doze anos muita coisa aconteceu tanto no âmbito pessoal quanto acadêmico, me tornei Engenheira, me casei, me tornei Mestre, perdi muitos entes queridos, concluí uma licenciatura em matemática, fiz viagens incríveis, conheci pessoas mais incríveis ainda e agora estou me tornando Doutora. Posso afirmar que esses doze anos foram intensos, de muitas vivências, aprendizados e transformação, que a Gabriela que está encerrando esse ciclo hoje talvez tenha mais incertezas do que aquela de 2010 e também pouco se parece com aquela menina caloura. Isso é bom? Isso é ruim? Não sei afirmar, só sei a vida é assim, cheia de surpresas e que no fim das contas eu gosto de estar em constante transformação. Por isso quero agradecer do fundo do meu coração a todos que fizeram parte da minha caminhada ao longo de todos esses anos. Vou pontuar aqui pessoas relativas ao meu período de doutorado que eu gostaria de agradecer.

Agradeço a Deus por estar sempre presente me guiando e por colocar pessoas maravilhosas na minha vida...

... começando por minha família que é minha base, refúgio, fortaleza e fonte de inspiração. Mãe, Pai, Isabela e Felipe, obrigada por tudo e por tanto sempre.

... minha família estendida, os quais me incentivam mesmo sem se darem conta disso, simplesmente pelo fato de eu saber que posso contar com eles sempre que precisar, seja para algo sério ou simplesmente para descontração e momentos agradáveis. Aqui incluo todas minhas tias, tios, primos (as), sogros, cunhados e sobrinhos.

... minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Alessandra, mulher forte, guerreira e batalhadora que muito me ensina e que teve muita paciência e respeito comigo nos momentos que mais precisei. Foram 10 anos de parceria que eu espero que não terminem por aqui.

... minha co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Milena, mulher determinada e gentil que me inspira por seu jeito de ser, apesar de termos tido menos contato do que gostaríamos.

... meus amigos e colegas de laboratórios (no plural pois neste trabalho usei muitos laboratórios e encontrei pessoas incríveis neles), em especial Carol, Paulo, Victor e Natália pelas trocas científicas e pelo ombro amigo.

... os alunos de iniciação científica que trazem alegria ao laboratório e que muito me ajudaram neste e em outros trabalhos. Marina, Mariana, Isabella, Marcela, Victor Hugo, Gabriella e Giovana, tenho muito orgulho de ter feito parte da trajetória de vocês e de vocês terem feito da minha.

... o Nilson, técnico do LTAPPN que está sempre pronto a ajudar a todos na solução dos infinitos problemas que aparecem no dia a dia do laboratório e fazer inúmeros revezamentos de horários de almoço.

... todos os professores, técnicos de laboratório e demais funcionários da FZEA que muito me ajudaram ao longo de todos estes anos, em especial à Fabiana (secretária), Kefilin (auxiliar administrativa), Camila, Marcelo, Marina e Rodrigo (técnicos de laboratório) e professoras Izabel, Judite e Samantha.

Agradeço também à CAPES pela concessão da bolsa de estudos e à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo por ter propiciado meios, recursos e estrutura para toda a minha formação de nível superior.

A todos vocês, meu muito obrigada, sem vocês eu não teria conseguido.

Assim encerro esse ciclo, levando em meu coração um pedacinho de cada uma dessas pessoas e também de muitas outras, a saudade do *campus* mais lindo e florido da USP e de tudo que vivi por lá, mas com sensação de dever cumprido e pronta para os novos desafios que surgirão em minha jornada.

DÁDIVA

É tão bonito quando a gente perde o brilho, então a vida
nos faz o favor de entregar pro coração
pedaços de estrelas do céu pra outra vez nos iluminar
com um sorriso ou dois, ou um segredo que se expôs tão
gentilmente que nem deu pra perceber

Com um abraço apertado ou uma voz do outro lado
de uma ligação, só pra acalmar o coração

E eu só quero agradecer por ter vocês

Pra acompanhar minhas loucuras

Me deixar bem mais segura

Daquilo que eu posso ser se eu somente acreditar

...

Por dar risada de tudo e sempre colorir meu mundo
com as cores mais bonitas que eu já vi alguém pintar
por me amarem com a mesma intensidade

*E por serem, de verdade, a melhor família que eu pudesse
ganhar*

É engraçado como a gente ganha as coisas que precisa
mesmo sem saber que vai precisar
e o coração sorri sem nem mesmo notar
que é feliz por compartilhar

De um sorriso ou dois, ou de um minuto que se foi pelo
relógio

Mas é eterno em nós

De um abraço apertado

ou de um conselho que é dado sem a intenção
e ainda assim acalma o coração

E eu só quero agradecer mais uma vez

Por me aguentarem insegura, me tornarem mais madura

E me mostrarem que os sonhos não se devem adiar

...

Para a minha Tadinha...

SÁBIA MULHER

Eu sou uma pessoa de sorte!
Tenho uma avó sensível
e, ao mesmo tempo, muito forte.

Ela é matriarca
de uma família cheia de amor.
Plantou uma semente em nós
e a levamos para onde for.

O sorriso,
sempre presente em seu rosto,
ofusca qualquer marca da idade em seu pescoço.

Os braços abertos,
prontos para oferecer
um abraço apertado
para quem aparecer.

Seu maior ensinamento
é que o amor supera qualquer tormento.
Falo e repito para quem quiser:
Minha avó é uma sábia mulher.

Talita, 2017

... minha inspiração e saudade de todos os dias.

Ai do céu, saiba que sempre vou te amar ♥

"Esta vida é breve, mas em sua brevidade nos oferece alguns momentos esplêndidos, algumas aventuras significativas.

Na segunda estrela, vire à direita e siga em frente até o amanhecer.

Viver é a coisa mais rara do mundo, a maioria das pessoas apenas existe"

Destaque do livro "Sem ar" de Jenifer Niven



"Deus nos dá a parte feia para que possamos dar valor à parte bonita da vida"

Destaque do livro "O lado feio do amor" de Colleen Hoover

RESUMO

BITTENCOURT, G. M. **Estudo da formação de micropartículas fitoterápicas contendo extrato de folhas de *Cynara cardunculus* L. por tecnologia supercrítica e por gelificação iônica para emprego no desenvolvimento de sorbet funcional.** 2022. 267 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

As folhas de alcachofra são, geralmente, consideradas resíduos da produção de inflorescências de alcachofra para alimentação. No entanto, o extrato obtido a partir destas folhas é reportado como fitoterápico e fonte de inulina (prebiótico), estando seu consumo associado a diversos benefícios à saúde, embora seu forte amargor impossibilite sua aplicação direta em alimentos por torná-los impalatáveis. A microencapsulação e a impregnação deste extrato poderiam tornar essa aplicação possível, pois são estratégias que visam três objetivos principais: (1) proteger o material bioativo de condições adversas e torná-lo estável após aplicação em alimentos, (2) promover sua liberação controlada e (3) mascarar sabor e/ou cor indesejados. Neste trabalho, estudou-se a obtenção de extratos etanólicos de folhas de alcachofra por extração com líquido pressurado (PLE), um processo ambientalmente amigável, seguindo um delineamento 2^{4-1} e por métodos tradicionais de extração (maceração, percolação por Soxhlet, agitação magnética e ultrassom), para comparação dos resultados. Todas as condições e técnicas de extração estudadas foram capazes de extrair inulina das folhas de alcachofra e o PLE se mostrou bastante promissor, pois foi o método de extração que deu origem aos extratos com maior atividade antioxidante e maior teor de compostos fenólicos. A formação de partículas por tecnologia de alta pressão e por gelificação iônica para encapsulação/impregnação destes extratos visando aplicação em alimentos promotores de saúde também foi estudada. Micropartículas lipídicas sólidas de cera de abelha e óleo de abacate (materiais de baixo valor agregado) foram desenvolvidas via PGSS (*Particles from Gas-Saturated Solutions*). Para isso, primeiramente estudou-se o comportamento dos lipídios em contato com o CO₂ supercrítico sob diferentes condições de processo e a formação e caracterização de partículas sem adição do extrato fitoterápico para, então, estudar a formação e caracterização de partículas lipídicas sólidas impregnadas com extrato de folhas de alcachofra. Micropartículas de quitosana e tripolifosfato de sódio (TPP) foram desenvolvidas comparando dois métodos de formação: a dispersão direta do extrato na solução de quitosana

e a formação prévia de lipossomas entre o extrato e fosfolipídio para posterior dispersão na solução de quitosana (TPP-quitossomas). O segundo método originou partículas mais regulares e com maior retenção de extrato. Para avaliar a eficiência das técnicas de encapsulação/impregnação estudadas em mascarar sabor e cor característicos dos extratos de folhas de alcachofra, desenvolveu-se também *sorbet* de morango adoçado com xilitol. O *sorbet* desenvolvido com e sem adição de partículas foi avaliado físico-química, reológica e sensorialmente. O *sorbet* enriquecido com partículas funcionais não teve boa aceitação sensorial em análise realizada com 125 provadores voluntários, demonstrando que as partículas, apesar de terem sido físico-quimicamente viáveis, estáveis e terem mascarado a coloração verde intensa do extrato, não foram eficientes em mascarar o gosto amargo das folhas de alcachofra.

Palavras-chave: partículas lipídicas sólidas, PGSS, TPP-quitossomas, PLE, folhas de alcachofra, prebiótico, cera de abelha, óleo de abacate, análise sensorial.

ABSTRACT

BITTENCOURT, G. M. **Study of the formation of phytotherapeutic microparticles containing extract *Cynara cardunculus* L. leaves by supercritical technology and by ionic gelation for use in the development of functional *sorbet*.** 2022. 267 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Artichoke leaves are generally considered waste from the production of artichoke inflorescences for food. However, the extract obtained from these leaves is reported as a phytotherapeutic and a source of inulin (prebiotic), and its consumption is associated with several health benefits, although its strong bitterness makes its direct application in foods impossible, as it makes them unpalatable. The microencapsulation and the impregnation of this extract could make this application possible, as they are strategies that aim at three main objectives: (1) to protect the bioactive material from adverse conditions and to make it stable after application in food, (2) to promote its controlled release and (3) mask unwanted taste and/or color. In this work, we studied the production of ethanolic extracts from artichoke leaves by pressurized liquid extraction (PLE), an environmentally friendly process, following a 2^{4-1} design and by traditional extraction methods (maceration, Soxhlet percolation, magnetic stirring and ultrasound) for comparison of results. All the conditions and extraction techniques studied were able to extract inulin from artichoke leaves and PLE showed to be very promising, as it was the extraction method that gave rise to extracts with higher antioxidant activity and higher content of phenolic compounds. The formation of particles by high pressure technology and by ionic gelation for encapsulation/impregnation of these extracts for application in health-promoting foods was also studied. Solid lipid microparticles of beeswax and avocado oil (low value-added materials) were developed by PGSS (Particles from Gas-Saturated Solutions). For this, firstly, the behavior of lipids in contact with supercritical CO₂ was studied under different process conditions and the formation and characterization of particles without addition of phytotherapeutic extract to, then, the formation and characterization of solid lipid particles impregnated with artichoke leaves extract was studied. Chitosan and sodium tripolyphosphate (TPP) microparticles were developed comparing two formation methods: the direct dispersion of the extract in the chitosan solution and the previous formation of liposomes between the extract and phospholipid for later dispersion in the

chitosan solution (TPP-chitosomes). The second method resulted in more regular particles with greater extract retention. To evaluate the efficiency of the encapsulation/impregnation techniques studied in masking the characteristic flavor and color of artichoke leaves extracts, strawberry sorbet sweetened with xylitol was also developed. The sorbet developed with and without the addition of particles was evaluated physicochemically, rheologically and sensorially. The sorbet enriched with functional particles did not have good sensory acceptance in an analysis performed with 125 volunteer tasters, demonstrating that the particles, despite being physicochemically viable, stable and masking the bright green color of the extract, were not efficient in masking the bitter taste of artichoke leaves.

Keywords: solid lipid particles, PGSS, TPP-chitosomes, PLE, artichoke leaves, prebiotic, beeswax, avocado oil, sensory analysis.

Lista de Figuras

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA32

FIGURA 1. DIAGRAMA DE FASES PARA O DIÓXIDO DE CARBONO.....34

FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO DE UM LIPOSSOMA REVESTIDO POR NANOPARTÍCULAS RETICULADAS DE TPP-QUITOSANA.....36

CAPÍTULO 1 ALIMENTOS PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS: CARACTERÍSTICAS, APLICAÇÕES E PROTEÇÃO POR ENCAPSULAÇÃO – REVISÃO 42

FIGURA 1. DISTINGUIR O QUE É CONSIDERADO UM PREBIÓTICO DE ACORDO COM A DEFINIÇÃO PROPOSTA PELA ASSOCIAÇÃO CIENTÍFICA INTERNACIONAL PARA PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS (ISAPP).....47

CAPÍTULO 2 EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA RICO EM COMPOSTOS BIOATIVOS – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO ETANOL PRESSURIZADO E COMPARAÇÃO COM OUTRAS TÉCNICAS72

FIGURA 1. PROCESSAMENTO DAS FOLHAS DE ALCACHOFRA NO LABORATÓRIO. (A) FOLHAS INTEIRAS *IN NATURA*, (B) FOLHAS SENDO PICADAS PARA FACILITAR A SECAGEM, (C) FOLHAS DE ALCACHOFRAS SECAS E TRITURADAS, (D) EXTRATO SECO DE FOLHA DE ALCACHOFRA OBTIDO POR EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO UTILIZANDO ETANOL COMO SOLVENTE.....77

FIGURA 2. ESQUEMA DO EXTRATOR PLE UTILIZADO NESTE TRABALHO.....79

FIGURA 3. GRÁFICO DE CONTOURNO DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO, EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DA TEMPERATURA E DO VOLUME DE SOLVENTE (A), DA TEMPERATURA E DO TEMPO ESTÁTICO (B) E DA TEMPERATURA E DO NÚMERO DE CICLOS (C).90

FIGURA 4. (A) CROMATOGRAMA CONTENDO OS EXTRATOS OBTIDOS PELOS MÉTODOS TRADICIONAIS (MACERAÇÃO - MAC, SOXHLET - SOX, AGITAÇÃO MAGNÉTICA - MAG E EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM - ULT); (B) CROMATOGRAMA CONTENDO OS EXTRATOS OBTIDOS POR PLE NAS CONDIÇÕES 1, 2, 3, 4, 5 E 6; (C) CROMATOGRAMA CONTENDO OS EXTRATOS OBTIDOS POR PLE NAS CONDIÇÕES 7, 8 E QUATRUPLICATA DE PONTO CENTRAL. TODOS OS CROMATOGRAMAS CONTÊM INULINA COMERCIAL COMO PADRÃO (IN/INU). UTILIZOU-SE CROMATOPLACAS DE ALUMÍNIO TLC SÍLICA GEL 60 F₂₅₄ (MERCK, DARMSTADT, ALEMANHA), COMO FASE MÓVEL UTILIZOU-SE PROPANOL: BUTANOL: ÁGUA (12:4:3) (PROPANOL: 99,9%, DINÂMICA, INDAIATUBA, BRASIL; BUTANOL: 99,9%, DINÂMICA, INDAIATUBA, BRASIL) E

REVELADOR COMPOSTO POR ANILINA:DIFENILAMINA:ÁCIDO FOSFÓRICO:ACETONA (1:1:5:5) (ANILINA: DINÂMICA, INDAIATUBA, BRASIL; DIFENILAMINA: DINÂMICA, INDAIATUBA, BRASIL; ÁCIDO FOSFÓRICO: EXODO CIENTIFICA, SUMARÉ, BRASIL; ACETONA: EXODO CIENTIFICA, SUMARÉ, BRASIL). AS CROMATOPLACAS FORAM AQUECIDAS A 105 °C POR 5 MINUTOS PARA REVELAÇÃO.	92
FIGURA 1. ESQUEMA DOS SISTEMAS ENVOLVENDO FLUIDO SUPERCRÍTICO UTILIZADOS NESTE TRABALHO.	104
FIGURA 2. MONITOR DE FASE CRIADO NO LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA DE ALTA PRESSÃO E PRODUTOS NATURAIS (LTAPPN/FZEA/USP) POR MEIO DE FIXAÇÃO DE UMA ESCALA E DE UM TUBO DE VIDRO NO INTERIOR DA AUTOCLAVE SFC/RESS, THAR INSTRUMENTS CO./WATERS, PITTSBURGH, EUA PRÓXIMO AO VISOR DE SAFIRA.....	105
FIGURA 3. EMPACOTAMENTO DO LEITO FIXO DE EXTRAÇÃO PARA OS ENSAIOS DE SOLUBILIDADE	107
FIGURA 4. TEMPERATURA DE FUSÃO (T_f) E TEMPERATURA DE SOLIDIFICAÇÃO (T_s) DA CERA DE ABELHA (CA), MISTURA BINÁRIA DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE (OA:CA) SOB DIFERENTES PRESSÕES.	113
FIGURA 5. REDUÇÃO PERCENTAL DO PONTO DE FUSÃO (A) E REDUÇÃO PERCENTUAL DO PONTO DE SOLIDIFICAÇÃO (B) DA CERA DE ABELHA (CA) E MISTURA BINÁRIA DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE (OA:CA) SOB DIFERENTES PRESSÕES.	114
FIGURA 6. EXPANSÃO VOLUMÉTRICA A 60 °C DE ÓLEO DE ABACATE (OA), MISTURA BINÁRIA DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE (OA:CA) E CERA DE ABELHA (CA) SOB DIFERENTES PRESSÕES, EXPRESSAS COMO PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO VOLUME INICIAL.....	116
FIGURA 7. INTUMESCIMENTO DEVIDO À ABSORÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO_2) EM CERA DE ABELHA (CA), ÓLEO DE ABACATE (OA) E MISTURA BINÁRIA DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE (OA:CA) SOB DIFERENTES PRESSÕES, EXPRESSAS EM G CO_2 /KG LIPÍDIO.	117
FIGURA 8. SOLUBILIDADE DA MISTURA BINÁRIA DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE EM CO_2 SUPERCRÍTICO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES.	119
FIGURA 9. CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS PARA ÁCIDOS GRAXOS EM ÓLEO DE ABACATE E CERA DE ABELHA.....	120
FIGURA 10. APARÊNCIA FÍSICA DA CERA DE ABELHA SÓLIDA, DO ÓLEO DE ABACATE PURA E DAS PARTÍCULAS FORMADAS PELA MISTURA BINÁRIA DE OLEO DE ABACATE DE CERA DE ABELHA POR PGSS COM CO_2 SUPERCRÍTICO A 300 BAR E 60°C.	122
FIGURA 11. MICROSCOPIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DAS PARTÍCULAS OBTIDAS À PARTIR DA MISTURA BINÁRIA DE ÓLEO DE ABACATE E CERA DE ABELHA POR PGSS COM CO_2 SUPERCRÍTICO A 60°C E (A) 150 BAR, (B) 200 BAR, (C) 250 BAR E (D) 300 BAR.	123

FIGURA 12. DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS FORMADAS PELA MISTURA BINÁRIA DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE EM CO ₂ SUPERCRÍTICO À 60 °C SOB DIFERENTES PRESSÕES.	124
FIGURA 13. DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DA CERA DE ABELHA, DA MISTURA FÍSICA BINÁRIA ENTRE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE E DAS PARTÍCULAS DE CERA DE ABELHA CARREGADAS COM ÓLEO DE ABACATE PRODUZIDAS POR PGSS A 60 °C, AGITAÇÃO DE 1250 RPM POR 1 HORA E PRESSÕES DE 150, 200, 250 E 300 BAR.....	127
FIGURA 14. TERMOGRAMA CONTENDO OS PICOS TÉRMICOS MENSURADOS PARA (CA) CERA DE ABELHA, (OA) ÓLEO DE ABACATE, (CA:OA), MISTURA FÍSICA BINÁRIA DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE, PARTÍCULAS DE CERA DE ABELHA CARREGADAS COM ÓLEO DE ABACATE PRODUZIDAS POR PGSS A 60 °C, AGITAÇÃO DE 1250 RPM POR 1 HORA E PRESSÕES DE 150, 200, 250 E 300 BAR.	128
FIGURA 15. ESPECTRO INFRAVERMELHO DE TRANSFORMADA DE FOURIER TERMOGRAMA PARA (OA) ÓLEO DE ABACATE, (CA:OA), MISTURA FÍSICA BINÁRIA DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE, PARTÍCULAS DE CERA DE ABELHA CARREGADAS COM ÓLEO DE ABACATE PRODUZIDAS POR PGSS A 60 °C, AGITAÇÃO DE 1250 RPM POR 1 HORA E PRESSÕES DE 150, 200, 250 E 300 BAR.	129

CAPÍTULO 4 MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS CARREGADAS COM EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA FORMADAS POR RÁPIDA EXPANSÃO DE SOLUÇÃO SUPERCRÍTICA134

FIGURA 1. SISTEMA DE FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS A ALTA PRESSÃO.....	139
FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS FORMADAS COM CO ₂ SUPERCRÍTICO (60 °C, 200 BAR, 3 HORAS) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.	142
FIGURA 3. MICROSCOPIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DAS PARTÍCULAS DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE COM EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA OBTIDAS POR PGSS COM CO ₂ SUPERCRÍTICO A 60 °C NAS PROPORÇÕES (A, B E C) 1:2:3 E (D, E E F) 1:2:6, RESPECTIVAMENTE.	143
FIGURA 4. DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DAS PARTÍCULAS DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE COM EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA OBTIDAS POR PGSS COM CO ₂ SUPERCRÍTICO A 200 BAR, 60 °C E AGITAÇÃO DE 1250 RPM POR 3 HORAS, NAS PROPORÇÕES 1:2:3 E 1:2:6, RESPECTIVAMENTE.	144
FIGURA 5. TERMOGRAMA CONTENDO O PERFIL TÉRMICO DAS PARTÍCULAS DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE COM EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA OBTIDAS POR PGSS COM CO ₂ SUPERCRÍTICO A 200 BAR, 60°C E AGITAÇÃO DE 1250 RPM POR 3 HORA, NAS PROPORÇÕES 1:2:3 E 1:2:6, RESPECTIVAMENTE.	145

FIGURA 7. IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓTICA DAS PARTÍCULAS LIPÍDICAS COM EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA OBTIDAS POR PGSS DISPERSOS EM DIFERENTES SOLUÇÕES.....	146
FIGURA 8. EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA UTILIZADO NA FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS.	149

CAPÍTULO 5 MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E TPP CARREGADAS COM EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA FORMADAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA

152

FIGURA 1. ESQUEMA DE PRODUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POR (A) ADIÇÃO DIRETA DO EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA À SOLUÇÃO DE QUITOSANA E (B) PELA FORMAÇÃO PRÉVIA DE LIPOSSOMAS ENTRE O EXTRATO DE FOSFOLIPÍDIO.....	158
FIGURA 2. SUSPENSÕES DE EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA EM SOLUÇÃO DE QUITOSANA, COM E SEM ADIÇÃO DE FOSFOLIPÍDIO, APÓS ETAPA DE SONICAÇÃO E ANTES DA GELIFICAÇÃO IÔNICA.....	162
FIGURA 3. SUSPENSÕES DE EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA EM SOLUÇÃO DE QUITOSANA, COM E SEM ADIÇÃO DE FOSFOLIPÍDIO, APÓS GELIFICAÇÃO IÔNICA PELA ADIÇÃO DE TRIPOLIFOSFATO DE SÓDIO.....	163
FIGURA 4. MICROGRAFIAS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) DE (A) MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E (B) TPP-QUITOSSOMAS: (1) SEM EXTRATO E CARREGADO COM (2) 11% E (3) 100% DE EXTRATO. BARRA DE ESCALA = 200 NM.	164
FIGURA 5. DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO DE (BQL) TPP-QUITOSSOMA VAZIA, (QL11)(QL100), TPP-QUITOSSOMAS COM 11% E 100% DE EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA, RESPECTIVAMENTE, (BQ) MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E TPP VAZIAS, (Q11) MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E TPP CARREGADAS COM 11% DE EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA.	166
FIGURA 6. DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DAS TPP-QUITOSSOMAS COM 11% E 100% DE EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA (QL11 E QL100, RESPECTIVAMENTE) E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E TPP CARREGADAS COM 11% DE EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA (Q11)...	168
FIGURA 7. DECAIMENTO DE MASSA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DETERMINADA POR ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA PARA TPP-QUITOSSOMA VAZIA (BQL), TPP-QUITOSSOMAS COM 11% E 100% DE EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA (QL11 E QL100, RESPECTIVAMENTE), MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E TPP VAZIAS (BQ), MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E TPP CARREGADAS COM 11% DE EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA (Q11) E PARA FOSFOLIPÍDIO E QUITOSANA LIVRES.	169
FIGURA 8. TERMOGRAMA CONTENDO O PERFIL TÉRMICO DAS (QL100) TPP-QUITOSSOMAS COM 100% DE EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA E DO EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA LIVRE.	170

FIGURA 9. ESPECTRO INFRAVERMELHO DE TRANSFORMADA DE FOURIER TERMOGRAMA PARA (BQL) TPP-QUITOSSOMA VAZIA, (QL11)(QL100), TPP-CHITOSSOMAS COM 11% E 100% DE EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA, RESPECTIVAMENTE, (BQ) MICROPARTÍCULAS DE QUITSANA E TPP VAZIAS, (Q11) MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E TPP CARREGADAS COM 11% DE EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA.	171
FIGURA 10. PERFIS DE TRANSMISSÃO PARA (BQ) MICROPARTÍCULAS DE QUITSANA E TPP VAZIAS, (Q11) MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E TPP CARREGADAS COM 11% DE EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA.....	173
FIGURA 11. ESPECTRO INFRAVERMELHO DE TRANSFORMADA DE FOURIER TERMOGRAMA PARA (BQL) TPP-QUITOSSOMA VAZIA, (QL11)(QL100), TPP-CHITOSSOMAS COM 11% E 100% DE EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA, RESPECTIVAMENTE.....	174

CAPÍTULO 6 PESQUISA DE MERCADO DE SORBET FUNCIONAL COM EFEITO SIMBIÓTICO ACRESCIDO DE XILITOL, *L. GASSERI* E INULINA.....181

FIGURA 1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS VOLUNTÁRIOS PARTICIPANTES DA PESQUISA ONLINE	189
FIGURA 2. NUVEM DE PALAVRAS CITADAS PELOS VOLUNTÁRIOS QUANDO PERGUNTADOS SOBRE QUAIS ALIMENTOS SE LEMBRAVAM TER COMPRADO SÓ PELO FATO DE O RÓTULO ALEGAR BENEFÍCIOS A SAÚDE.....	191
FIGURA 3. NUVEM DE PALAVRAS CONTENDO AS PALAVRAS CITADAS PELOS VOLUNTÁRIOS QUANDO QUESTIONADOS SOBRE QUAIS ALIMENTOS PROBIÓTICOS JÁ HAVIAM CONSUMIDO.	192
FIGURA 4. NUVEM DE PALAVRAS CONTENDO AS PALAVRAS CITADAS PELOS VOLUNTÁRIOS QUANDO QUESTIONADOS SOBRE QUAIS ALIMENTOS PREBIÓTICOS JÁ HAVIAM CONSUMIDO.....	192
FIGURA 5. NUVEM DE PALAVRAS CONTENDO AS PALAVRAS CITADAS PELOS VOLUNTÁRIOS QUANDO QUESTIONADOS SOBRE QUAIS ALIMENTOS GASTARIAM DE ENCONTRAR EM UMA VERSÃO MAIS SAUDÁVEL.	194

CAPÍTULO 7 DESENVOLVIMENTO E ACEITAÇÃO SENSORIAL DE SORBET FUNCIONAL CONTENDO MICROPARTÍCULAS FITOTERÁPICAS.....200

FIGURA 1. TESTE DE DIGESTIBILIDADE IN VITRO NA FORMULAÇÃO SEM PARTÍCULAS.....	208
FIGURA 2. COMPARAÇÃO DE COLORAÇÃO ENTRE AS FORMULAÇÕES DE <i>SORBET</i>	211
FIGURA 3. CURVA DE FLUXO PARA AS FORMULAÇÕES X, LP E S DE <i>SORBET</i> OBTIDAS A 20 °C. ...	213
FIGURA 4. CURVAS DE VISCOSIDADE APARENTE EM FUNÇÃO DA TAXA DE DEFORMAÇÃO PARA AS DIFERENTES AMOSTRAS DE <i>SORBET</i>	215

FIGURA 5. HISTOGRAMA GERADO PELA AVALIAÇÃO DE MODO GERAL DOS <i>SORBETS</i>, DE ACORDO COM A NOTA DADA PELOS 125 PROVADORES VOLUNTÁRIOS	219
FIGURA 6. HISTOGRAMA GERADO PELA AVALIAÇÃO DE SABOR, COR, TEXTURA E SABOR RESIDUAL DOS <i>SORBETS</i>, DE ACORDO COM A NOTA DADA PELOS 125 PROVADORES VOLUNTÁRIOS.....	220
FIGURA 7. HISTOGRAMA GERADO PELA INTENÇÃO DE COMPRA DOS 125 PROVADORES VOLUNTÁRIOS, (1) ANTES DE CONHECER OS BENEFÍCIOS DO CONSUMO DE EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA E (2) APÓS SER INFORMADO SOBRE TAIS BENEFÍCIOS.	221
FIGURA 10. ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS DA AMOSTRA	222
FIGURA 11. NUVEM DE PALAVRAS CONTENDO TERMOS-CHAVE QUE RESUMEM AQUELES UTILIZADOS PELOS PROVADORES NA ANÁLISE SENSORIAL PARA SE REFERIR AO QUE MAIS GOSTARAM NAS AMOSTRAS DE <i>SORBET</i>.	223
FIGURA 12. NUVEM DE PALAVRAS CONTENDO TERMOS-CHAVE QUE RESUMEM AQUELES UTILIZADOS PELOS PROVADORES NA ANÁLISE SENSORIAL PARA SE REFERIR AO QUE MENOS GOSTARAM NAS AMOSTRAS DE <i>SORBET</i>.	224
<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	<u>229</u>
<u>APÊNDICE.....</u>	<u>233</u>

FIGURA 1. PLACA DE PETRI CONTENDO COLÔNIAS DE <i>LACTOBACILLUS GASSERI</i> (A), LÂMINA DE COLORAÇÃO GRAM OBSERVADA EM MICROSCÓPIO (B) EXEMPLO DE CÉLULAS TÍPICAS DE <i>LACTOBACILLUS GASSERI</i> (C).....	243
FIGURA 2. MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE CONTENDO <i>LACTOBACILLUS GASSERI</i> OBTIDAS POR PGSS COM DIFERENTES TEMPOS DE HOMOGENEIZAÇÃO (1, 2 E 3 HORAS, RESPECTIVAMENTE) A 200 BAR E 60 °C.	244
FIGURA 3. DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS FORMADAS POR PGSS COM CO₂ SUPERCRÍTICO (60°C, 200 BAR) COM DIFERENTES TEMPOS DE HOMOGENEIZAÇÃO.....	245

Lista de Tabelas

<u>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</u>	<u>32</u>
<u>CAPÍTULO 1 ALIMENTOS PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS: CARACTERÍSTICAS, APLICAÇÕES E PROTEÇÃO POR ENCAPSULAÇÃO – REVISÃO</u>	<u>42</u>
<u>CAPÍTULO 2 EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA RICO EM COMPOSTOS BIOATIVOS – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO ETANOL PRESSURIZADO E COMPARAÇÃO COM OUTRAS TÉCNICAS</u>	<u>72</u>
TABELA 1. DELINEAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2⁴⁺¹ PARA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM SOLVENTE PRESSURIZADO (VARIÁVEIS CODIFICADAS).....	78
TABELA 2. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE FOLHAS SECAS DE ALCACHOFRA TRITURADAS EXPRESSAS EM BASE SECA	83
TABELA 3. ANÁLISE DE EXTRATOS DE FOLHAS DE ALCACHOFRA OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS USANDO ETANOL COMO SOLVENTE. RESULTADOS EXPRESSOS POR G DE EXTRATO.	85
TABELA 4. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA MODELOS DE PRIMEIRA ORDEM PARA RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO, TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS, TEOR DE TANINOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE FOLHAS DE ALCACHOFRA (ERRO RESIDUAL).....	89
TABELA 5. FATOR DE RETENÇÃO DE BANDA DE INULINA OBSERVADO EM CROMATOPLACAS DE SÍLICA GEL APÓS CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA.	93
TABELA 1. SOLUBILIDADE DA MISTURA BINÁRIA DE ÓLEO DE ABACATE E CERA DE ABELHA EM CO₂ SUPERCRÍTICO (G/KG CO₂) SOB DIFERENTES PRESSÕES, TEMPERATURA E TEMPOS DE CONTATO ESTÁTICO.....	118
TABELA 2. ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NO ÓLEO DE ABACATE E NA CERA DE ABELHA, DETERMINADO POR ANÁLISE DE GC-MS.	121
TABELA 3. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULAS FORMADAS PELA MISTURA BINÁRIA DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE EM CO₂ SUPERCRÍTICO À 60 °C SOB DIFERENTES PRESSÕES.	124
TABELA 4. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULAS FORMADAS PELA MISTURA BINÁRIA DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE EM CO₂ SUPERCRÍTICO À 60 °C SOB DIFERENTES PRESSÕES.	125
TABELA 5. ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE A PRESSÃO UTILIZADA E A SOLUBILIDADE EM CO₂ SUPERCRÍTICO, EXPANSÃO VOLUMÉTRICA E TEMPERATURAS DE FUSÃO E SOLIDIFICAÇÃO DA MISTURA LIPÍDICA DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE (1:1) E TAMANHO E A DENSIDADE	

APARENTE DAS PARTÍCULAS OBTIDAS POR PGSS À PARTIR DA MISTURA LIPÍDICA A 60 °C COM AGITAÇÃO DE 1250 RPM POR 1H.	126
---	-----

CAPÍTULO 4 MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS CARREGADAS COM EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA FORMADAS POR RÁPIDA EXPANSÃO DE SOLUÇÃO SUPERCRÍTICA134

TABELA 1. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS DE CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE COM EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA FORMADAS COM CO ₂ SUPERCRÍTICO (60 °C, 200 BAR, 3 HORAS) COM DIFERENTES PROPORÇÕES LIPÍDIOS/EXTRATO..	142
--	-----

TABELA 2. PORCENTAGEM DE INULINA DISPERSA NAS DIFERENTES SOLUÇÕES PREPARADAS APÓS AGITAÇÃO MAGNÉTICA POR 5 MINUTOS.	148
--	-----

CAPÍTULO 5 MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E TPP CARREGADAS COM EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA FORMADAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA 152

TABELA 1. PARTÍCULAS DE QUITOSANA E TRIPOLIFOSFATO DE SÓDIO OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA COM E SEM PRÉ SOLUBILIZAÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA EM FOSFOLIPÍDIO.	158
---	-----

TABELA 2. ANÁLISE DO DIÂMETRO DAS PARTÍCULAS EM SUSPENSÃO E POTENCIAL ZETA	165
--	-----

CAPÍTULO 6 PESQUISA DE MERCADO DE SORBET FUNCIONAL COM EFEITO SIMBIÓTICO ACRESCIDO DE XILITOL, *L. GASSERI* E INULINA.....181

CAPÍTULO 7 DESENVOLVIMENTO E ACEITAÇÃO SENSORIAL DE SORBET FUNCIONAL CONTENDO MICROPARTÍCULAS FITOTERÁPICAS.....200

TABELA 1. RESULTADOS DE ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	211
---	-----

TABELA 2. ANOVA PARA OS RESULTADOS DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	212
--	-----

TABELA 3. PROPRIEDADES REOLÓGICAS DAS FORMULAÇÕES DE <i>SORBET</i> , UTILIZANDO SACAROSE (S), XILITOL (X), XILITOL E MICROPARTÍCULAS DE ALCACHOFRA (LP).	214
---	-----

TABELA 4. RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE INULINA.....	216
---	-----

TABELA 5. ANOVA PARA OS RESULTADOS DA ANÁLISE SENSORIAL.	218
---	-----

TABELA 6. TESTE DE ACEITAÇÃO DO CONSUMIDOR DOS <i>SORBETS</i> DE MORANGO ELABORADOS COM XILITOL, SEM E COM PARTÍCULAS DE EXTRATO DE ALCACHOFRA.	218
--	-----

CONSIDERAÇÕES FINAIS229

APÊNDICE.....233

TABELA 1. DILUIÇÃO SERIADA DE *LACTOBACILLUS GASSERI* EM ÁGUA PEPTONADA 0,2%.238

TABELA 2. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS FORMADAS COM CO₂ SUPERCRÍTICO (60 °C, 200 BAR) COM DIFERENTES TEMPOS DE HOMOGENEIZAÇÃO.245

TABELA 3. VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE *LACTOBACILLUS GASSERI* APÓS LIOFILIZAÇÃO, MISTURA COM CERA DE ABELHA E ÓLEO DE ABACATE E PROCESSAMENTO COM CO₂ SUPERCRÍTICO A 60 °C E 200 BAR.246

Lista de Abreviações

AA	→ Atividade Antioxidante
ABTS	→ Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico)
ANOVA	→ Análise de Variância
ANVISA	→ Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	→ Associação Oficial de Químicos Analíticos (<i>Association of Official Analytical Chemists</i>)
BIOSAS	→ Precipitação Antissolvente Supercrítica de Biomoléculas em Matriz Oleosa
B.O.D.	→ Demanda Bioquímica de Oxigênio (<i>Biochemical Oxygen Demand</i>)
BQ	→ Micropartículas de Quitosana e TPP sem adição de extrato
BQL	→ TPP-quitossomas sem adição de extrato
C	→ Número de Ciclos
CA	→ Cera de Abelha
CaCl ₂	→ Cloreto de Cálcio
CAS	→ Serviço de Resumo Químico (<i>Chemical Abstract Service</i>),
CCD	→ Cromatografia em Camada Delgada
CEPH	→ Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos
CLA	→ Ácido Linoleico Conjugado
CO ₂	→ Dióxido de Carbono
D [4,3]	→ Diâmetro médio ponderado em volume
D ₁₀	→ Maior diâmetro dentre as 10% menores partículas
D ₅₀	→ Maior diâmetro dentre as 50% menores partículas
D ₉₀	→ Maior diâmetro dentre as 90% menores partículas
DRX	→ Difratoograma de raios X.
EAG	→ Equivalente em Ácido Gálico
E _v	→ Expansão Volumétrica
FOS	→ Frutooligossacarídeos
F _r	→ Fator de Retenção
FTIR	→ Espectros Infravermelhos com Transformada de Fourier
GC	→ Cromatografia Gasosa
GC/MS	→ Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas
GOS	→ Galactooligossacarídeos

GRAS	→ Geralmente Reconhecidos como Seguros à Saúde (<i>Generally Recognized As Safe</i>)
HCl	→ Ácido Clorídrico
ISAPP	→ Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (<i>International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics</i>)
K	→ Índice de Consistência
LP	→ Sorbet adoçado com Xilitol com adição de partículas lipídicas sólidas
MAC	→ Maceração
MAG	→ Agitação Magnética
MET	→ Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	→ Microscopia Eletrônica de Varredura
MOS	→ Mananligossacarídeo
MRS	→ Caldo De Man, Rogosa e Sharpe
n	→ Parâmetro do modelo de Rosin-Rammler
NaCl	→ Cloreto de Sódio
NaOH	→ Hidróxido de Sódio
Na ₂ POH ₄	→ Hidrogenofosfato dissódico
OA	→ Óleo de Abacate
p	→ p valor obtido pela ANOVA
PCA	→ Análise de Componente Principal
PGSS	→ Partículas de Solução Saturada de Gás (<i>Particles from Gas Saturated Solution</i>)
PLE	→ Extração com Líquido Pressurizado
Q11	→ Micropartículas de Quitosana e TPP carregadas com 11% de extrato de folhas de alcachofra
Q16	→ Micropartículas de Quitosana e TPP carregadas com 16% de extrato de folhas de alcachofra
Q44	→ Micropartículas de Quitosana e TPP carregadas com 44% de extrato de folhas de alcachofra
Q100	→ Micropartículas de Quitosana e TPP carregadas com 100% de extrato de folhas de alcachofra
QL	→ Sorbet adoçado com Xilitol com adição de TPP-quitossomas carregadas com 100% de extrato de folhas de alcachofra liofilizada

QL11	→ TPP-quitossomas carregadas com 11% de extrato de folhas de alcachofra
QL16	→ TPP-quitossomas carregadas com 16% de extrato de folhas de alcachofra
QL44	→ TPP-quitossomas carregadas com 44% de extrato de folhas de alcachofra
QL100	→ TPP-quitossomas carregadas com 100% de extrato de folhas de alcachofra
QS	→ Sorbet adoçado com Xilitol com adição de TPP-quitossomas carregadas com 100% de extrato de folhas de alcachofra em solução
r	→ Coeficiente de correlação de Pearson
R	→ Rendimento
R ²	→ Coeficiente de Regressão
S	→ Sorbet adoçado com Sacarose sem adição de partículas
SOX	→ Extração com Soxhlet
T	→ Temperatura
TCF	→ Teor de Compostos Fenólicos Totais
TCLE	→ Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	→ Tempo Estático
T _f	→ Temperatura de Fusão
TI	→ Teor de Inulina
TPP	→ Tripolifosfato de Sódio
T _s	→ Temperatura de Solidificação
TT	→ Teor de Taninos
UFC	→ Unidades Formadoras de Colônias
ULT	→ Extração Assistida por Ultrassom
V	→ Volume do solvente utilizado no enxague da célula do PLE
X	→ Sorbet adoçado com Xilitol sem adição de partículas
XOS	→ Xilooligossacarídeo
X _R	→ Parâmetro do modelo de Rosin-Rammler
$\dot{\gamma}$	→ Taxa de Deformação
σ	→ Tensão de Cisalhamento
σ_0	→ Tensão de Cisalhamento Inicial
ζ	→ Potencial Zeta

ÍNDICE

<u>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</u>	<u>32</u>
1 REFERÊNCIAS.....	38
<u>CAPÍTULO 1 ALIMENTOS PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS: CARACTERÍSTICAS, APLICAÇÕES E PROTEÇÃO POR ENCAPSULAÇÃO – REVISÃO</u>	<u>42</u>
1 INTRODUÇÃO.....	44
2 DESENVOLVIMENTO	45
2.1 PREBIÓTICOS	45
2.2 PROBIÓTICOS.....	49
2.3 INTERAÇÃO ENTRE PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS - SIMBIÓTICOS	55
2.4 MICROENCAPSULAÇÃO	57
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
4 REFERÊNCIAS.....	62
<u>CAPÍTULO 2 EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA RICO EM COMPOSTOS BIOATIVOS – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO ETANOL PRESSURIZADO E COMPARAÇÃO COM OUTRAS TÉCNICAS</u>	<u>72</u>
1 INTRODUÇÃO.....	74
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
2.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATERIA-PRIMA.....	76
2.2 OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE FOLHA DE ALCACHOFRA.....	77
2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE ALCACHOFRA.....	79
2.3.1 Atividade antioxidante pelo método do radical ABTS	79
2.3.2 Compostos Fenólicos Totais (reativos ao Folin-Ciocalteu)	80
2.3.3 Quantificação de taninos condensados	81
2.3.4 Cromatografia em Camada Delgada	81
2.3.5 Quantificação do teor de inulina.....	82
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	82
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA E DO LEITO FIXO DE EXTRAÇÃO	83
3.2 ESTUDO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA.....	84

3.2.1	Métodos Tradicionais.....	84
3.2.2	Extração com Líquido Pressurizado	87
3.2.3	Cromatografia em Camada Delgada	91
4	CONCLUSÃO	94
5	AGRADECIMENTOS	94
6	REFERÊNCIAS.....	95
1	INTRODUÇÃO.....	101
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	103
2.1	MATERIAL	103
2.2	COMPORTAMENTO LIPÍDICO EM CO ₂ SUPERCRÍTICO OBSERVADO NO MONITOR DE FASE	104
2.2.1	Temperaturas de fusão e solidificação em CO ₂ supercrítico	105
2.2.2	Expansão volumétrica em CO ₂ supercrítico	106
2.2.3	Intumescimento por absorção de CO ₂	106
2.2.4	Solubilidade em CO ₂ supercrítico.....	107
2.3	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS	108
2.4	ATIVIDADE DE ELIMINAÇÃO DE RADICAIS ABTS	108
2.5	FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS.....	109
2.6	CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS	110
2.6.1	Morfologia.....	110
2.6.2	Distribuição de tamanho e densidade aparente.....	110
2.6.3	Polimorfismo	111
2.6.4	Propriedades térmicas	111
2.6.5	Estrutura química	111
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	111
3	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	112
3.1	COMPORTAMENTO LIPÍDICO EM CO ₂ SUPERCRÍTICO OBSERVADO NO MONITOR DE FASE	113
3.1.1	Temperaturas de fusão e solidificação em CO ₂ supercrítico	113
3.1.2	Expansão volumétrica em CO ₂ supercrítico	115
3.1.3	Intumescimento por absorção de CO ₂	117
3.1.4	Solubilidade de lipídios em CO ₂ supercrítico	118
3.2	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS	120
3.3	ATIVIDADE DE ELIMINAÇÃO DE RADICAIS ABTS	122
3.4	ESTUDO DAS PARTÍCULAS FORMADAS POR PGSS.....	122
3.4.1	Características macroscópicas e morfologia.....	122
3.4.2	Distribuição de tamanho, densidade aparente e análise de correlação.....	124

3.4.3 Polimorfismo e propriedades térmicas.....	126
3.4.4 Estruturas químicas.....	128
4 CONCLUSÃO	129
5 REFERENCIAS.....	130

CAPÍTULO 4 MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS CARREGADAS COM EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA FORMADAS POR RÁPIDA EXPANSÃO DE SOLUÇÃO SUPERCRÍTICA

1 INTRODUÇÃO.....	136
2 METODOLOGIA	138
2.1 OBTENÇÃO DE EXTRATO DE FOLHA DE ALCACHOFRA	138
2.2 IMPREGNAÇÃO EM MEIO SUPERCRÍTICO.....	138
2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS CARREGADAS COM EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA	140
2.4 ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS MICROPARTÍCULAS SOB CONDIÇÕES DESFAVORÁVEIS	140
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	141
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	141
3.1 ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS DAS MICROPARTÍCULAS.....	141
3.1.1 Tamanho médio e distribuição do tamanho das partículas.....	141
3.1.2 Morfologia.....	143
3.1.3 Polimorfismo e propriedades térmicas.....	143
3.2 ANÁLISE DA ESTABILIDADE DAS MICROPARTÍCULAS SOB CONDIÇÕES DESFAVORÁVEIS	145
3.2.1 Microscopia ótica	145
3.2.2 Quantificação do teor de inulina disperso nas soluções.....	147
4 CONCLUSÃO	149
5 REFERÊNCIAS.....	150

CAPÍTULO 5 MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E TPP CARREGADAS COM EXTRATO DE FOLHAS DE ALCACHOFRA FORMADAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA

152

1 INTRODUÇÃO.....	154
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	157
2.1 PRODUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA.....	157
2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES.....	159

2.2.1	Morfologia.....	159
2.2.2	Determinação do diâmetro médio por espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta	159
2.2.3	Determinação do diâmetro médio por difração à laser	159
2.2.4	Polimorfismo	160
2.2.5	Perfil térmico.....	160
2.2.6	Análise termogravimétrica.....	160
2.2.7	Estrutura química.....	160
2.2.8	Estabilidade Física	161
2.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	161
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	161
3.1	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	162
3.2	CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES	163
3.2.1	Morfologia.....	163
3.2.2	Tamanho de partículas e potencial Zeta.....	164
3.2.3	Polimorfismo	167
3.2.4	Análises térmicas.....	168
3.2.5	Estrutura química.....	170
3.2.6	Estabilidade Física	172
4	CONCLUSÃO	175
5	REFERÊNCIAS.....	175

CAPÍTULO 6 PESQUISA DE MERCADO DE SORBET FUNCIONAL COM EFEITO

SIMBIÓTICO ACRESCIDO DE XILITOL, *L. GASSERI* E INULINA.....181

1	INTRODUÇÃO.....	183
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	186
2.1	REALIZAÇÃO DA PESQUISA	186
2.2	ANÁLISE DOS DADOS	188
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	188
3.1	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	188
3.2	HÁBITOS DE CONSUMO.....	190
3.3	INTENÇÃO DE COMPRA	193
3.4	CORRELAÇÕES.....	194
4	CONCLUSÃO	195
5	REFERÊNCIAS.....	196

**CAPÍTULO 7 DESENVOLVIMENTO E ACEITAÇÃO SENSORIAL DE SORBET
FUNCIONAL CONTENDO MICROPARTÍCULAS FITOTERÁPICAS.....200**

1	INTRODUÇÃO.....	202
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	204
2.1	PROCESSAMENTO DO SORBET	204
2.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, REOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA	206
2.2.1	Composição centesimal	206
2.2.2	Caracterização reológica	206
2.2.3	Teste de coloração	207
2.2.4	Análise microbiológica	207
2.3	DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> E QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE INULINA	207
2.4	ANÁLISE SENSORIAL.....	208
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	209
2.5.1	Análise das notas das amostras através de ANOVA.	209
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	210
3.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SORBET	210
3.1.1	Características visíveis.....	210
3.1.2	Composição centesimal	211
3.1.3	Caracterização reológica	213
3.2	DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> E QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE INULINA	215
3.3	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	217
3.4	ANÁLISE SENSORIAL.....	217
4	CONCLUSÃO	224
5	REFERÊNCIAS.....	225

CONSIDERAÇÕES FINAIS229

APÊNDICE.....233

APÊNDICE A MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS CARREGADAS *LACTOBACILLUS GASSERI*234

1	INTRODUÇÃO.....	235
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	237
2.1	MATERIAL	237
2.2	PRODUÇÃO DE <i>LACTOBACILLUS GASSERI</i>	237
2.2.1	Diluição Seriada.....	237
2.2.2	Cultura de bactérias lácticas em ágar MRS.....	238

2.2.3	Isolamento das colônias típicas de <i>Lactobacillus gasseri</i>	239
2.2.4	Cultura de bactérias lácticas em caldo MRS	239
2.2.5	Coloração Gram	240
2.3	LIOFILIZAÇÃO DE <i>LACTOBACILLUS GASSERI</i>	240
2.3.1	Preparação do crioprotetor	240
2.3.2	Preparo do microrganismo para o congelamento	240
2.3.3	Liofilização.....	241
2.4	MICROENCAPSULAÇÃO EM MEIO SUPERCRÍTICO.	241
2.5	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	242
2.6	TAMANHO MÉDIO E DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS	242
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	243
3.1	PRODUÇÃO DE <i>LACTOBACILLUS GASSERI</i>	243
3.2	LIOFILIZAÇÃO.....	244
3.3	PARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREGADAS COM <i>L. GASSERI</i>	244
3.3.1	Características macroscópicas	244
3.3.2	Análise do tamanho de partículas.....	245
3.3.3	Viabilidade celular pós-processamento supercrítico	246
4	CONCLUSÃO	247
5	REFERÊNCIAS	247
	APÊNDICE B ATIVIDADES GERAIS E DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS.....	250
	APÊNDICE C FORMULÁRIO E TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DA	
	PESQUISA DE INTENÇÃO DE COMPRA ONLINE.....	254
1	FORMULÁRIO APLICADO AOS VALUNTÁRIOS POR MEIO DA PLATAFORMA <i>GOOGLE FORMS</i>...	254
1.1	PARTE 1	254
1.2	PARTE 2	256
1.3	PARTE 3	258
2	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	260
1	FICHA 1 DA ANÁLISE SENSORIAL DE SORBET DE MORANGO FUNCIONAL.....	261
2	FICHA 2 DA ANÁLISE SENSORIAL DE SORBET DE MORANGO FUNCIONAL.....	262
3	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DA ANÁLISE SENSORIAL	263
4	CONVITE ENVIADO VIA E-MAIL PARA ANÁLISE SENSORIAL	265
5	ORIENTAÇÕES FIXADAS NA ENTRADA DO LABORATÓRIO DE ANÁLISE SENSORIAL.....	266
6	AVISO UTILIZADO PARA DEMARCAR CABINES NA ANÁLISE SENSORIAL	267



INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA



Microencapsulação é uma técnica na qual um ou mais compostos são cercados ou imobilizados por um ou mais materiais a fim de serem protegidos de fatores externos tais como luz, alta concentração de oxigênio, calor, umidade, mascarando sabores e odores desagradáveis, impedindo a evaporação de compostos voláteis, e também para o desenvolvimento de produtos de alto valor agregado (Comunian, 2017). Esta tecnologia tem sido usada na indústria de alimentos, uma vez que facilita a incorporação de ingredientes instáveis na formulação de alimentos. As técnicas de microencapsulação podem ser classificadas de acordo com seu princípio de ação em métodos de ação física, química ou físico-química (Comunian, Favaro-Trindade, 2016). Para a escolha da técnica a ser utilizada, é necessário analisar o produto final no qual as microcápsulas serão aplicadas, o tamanho de partícula desejado, os mecanismos de liberação e as propriedades físico-químicas do material utilizado como agente encapsulante e núcleo (Favaro-Trindade, Pinho, Rocha, 2008). Além disso, no caso de ingrediente alimentício, o custo e a segurança do método e do material de parede também devem ser considerados na seleção.

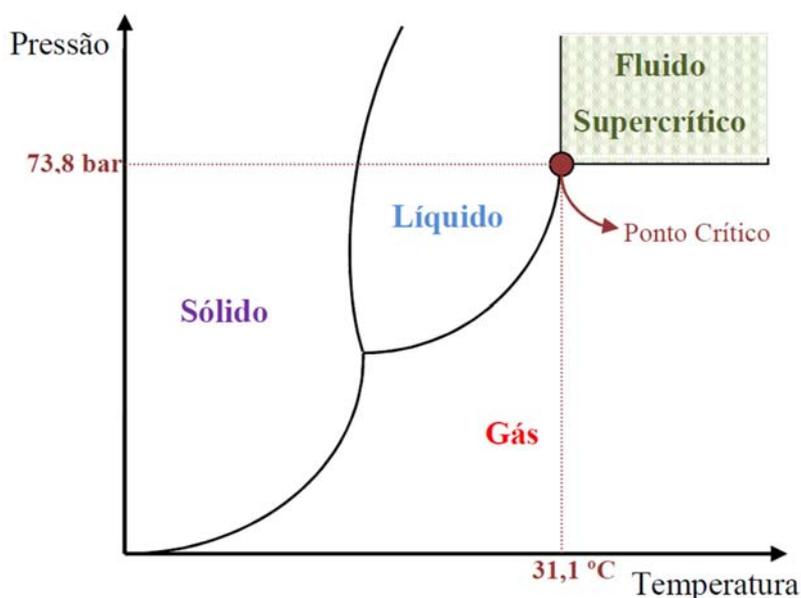
Os fluidos supercríticos, especialmente o dióxido de carbono supercrítico (fluido mais amplamente utilizado devido à sua baixa temperatura crítica, por apresentar-se no estado gasoso em condições ambientes e pelo baixo custo), são meios atraentes para separações e reações, dentre elas a formação de partículas, uma vez que são caracterizados por densidades semelhantes a líquidos e por viscosidades e difusividades situadas entre as de gases e líquidos. Como a densidade do fluido é uma medida de seu poder solvente, os fluidos supercríticos são capazes de dissolver substâncias que são insolúveis em condições ambientais e precipitá-las pela expansão da mistura supercrítica (Türk, 2022; Türk, 2014).

Um fluido supercrítico é um fluido com pressão e temperatura acima do seu ponto crítico, apresentando características intermediárias entre líquidos e gases tais como altas viscosidade e difusividade e baixa densidade. O dióxido de carbono (CO₂) possui várias propriedades que o tornam um fluido supercrítico atrativo, tais como sua inércia química e as baixas condições de operação necessárias para atingir o ponto crítico, conforme pode ser observado na Figura 1 (O'Sullivan, Ryan, Padrela, 2022; Padrela et al., 2018).

O PGSS (*Particle from Gas Saturated Solutions*), um processo projetado para formar partículas a partir de materiais que absorvem fluidos supercríticos em altas concentrações, foi criado e patentado na Europa, em 1994, por Weidner, Steiner e Knez. Hoje, o PGSS é um dos sistemas mais utilizados para produzir e encapsular materiais particulados que podem melhorar a entrega e/ou liberação controlada de drogas e compostos bioativos. Normalmente

os materiais utilizados como encapsulantes são à base de polímeros e lipídios. Nesta técnica, o fluido supercrítico é dissolvido em um substrato seguido por uma rápida expansão da solução saturada através de um bico aspersor causando a formação de partículas sólidas ou líquidas de acordo com o sistema devido ao intenso efeito de resfriamento causado pela expansão do CO₂ após passagem pelo aspersor (da Fonseca Machado et al., 2022; Cocero et al., 2009).

Figura 1. Diagrama de fases para o dióxido de carbono.



Fonte: Bittencourt, G. M. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de araçá (*Psidium Grandifolium Mart. Ex DC.*) obtidos por líquido pressurizado (PLE) e por fluido supercrítico (SFE). 2018. 116 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

A utilização do método PGSS para encapsular compostos fitoterápicos foi descrita principalmente para melhorar as características dos materiais como sabor e cor e também para liberação controlada e/ou favorecimento da bioacessibilidade/biodisponibilidade de compostos testados *in vitro* ou *in vivo* (Honjo et al., 2020; Hrnčič et al., 2018; Kankala et al., 2017).

Lipídios são considerados bons agentes encapsulantes para PGSS devido a sua alta afinidade com o dióxido de carbono supercrítico (fluido mais amplamente utilizado nesta tecnologia) (Cocero et al., 2009). Diversos estudos envolvendo formação de partículas em meio supercrítico foram desenvolvidos nos últimos anos, alguns dos lipídios utilizados foram óleos de canola, colza e soja hidrogenados, gordura de palma, cera de abelha, monoesterato de glicerol, entre outros, visando encapsular/impregnar compostos que promovem benefícios à

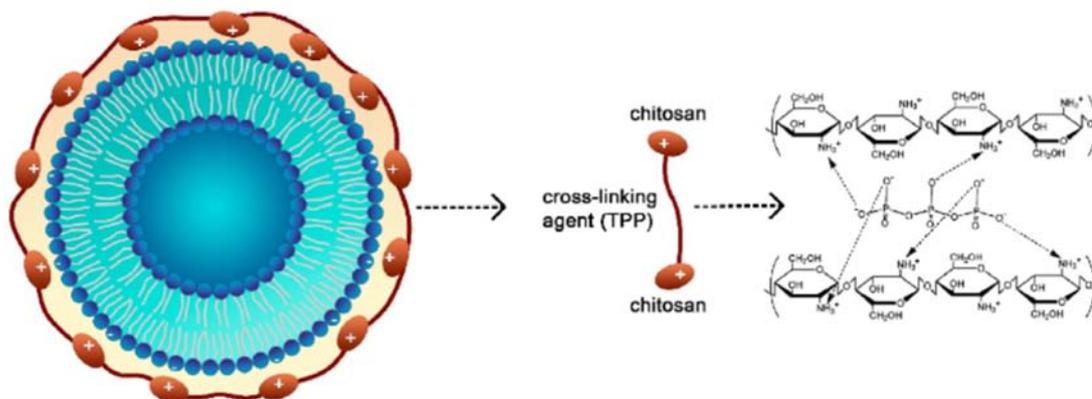
saúde tais como Vitamina B2, óleos essenciais de hortelã, hortelã pimenta e *Atractylodes macrocephala*, suco de sabugueiro, ácido α -lipóico, mentol, entre outros. Ressaltando o promissor uso desta tecnologia para a produção de partículas carregadas com compostos de interesse tanto para a indústria alimentícia como farmacêutica. As condições experimentais empregadas nestes estudos foram base para os experimentos desenvolvidos nesta tese (Honjo et al., 2020; Roda et al., 2020; Couto, Alvarez, Temelli, 2017; Ciftci, Temelli, 2016; Yang, Ciftci, 2016; Bánvölgyi et al., 2016; Zhu et al., 2010; Wen et al., 2010).

Outro material estudado como agente encapsulante neste trabalho foi a quitosana, um polissacarídeo natural linear derivado da quitina que apresenta características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, efeitos imunoestimulantes, força mucoadesiva e efeito antimicrobiano que o classificam como um dos biomateriais mais promissores para diferentes empregos tanto em indústrias farmacêuticas quanto alimentícias (Algharib et al., 2022; Algharib et al., 2020; Kahya, 2018). A natureza mucoadesiva torna a quitosana uma boa alternativa para prolongar o tempo de permanência e aumentar o tempo de liberação de compostos ativos no trato gastrointestinal (Janes et al., 2001). Micropartículas de quitosana podem ser obtidas por gelificação iônica, onde uma rede tridimensional estável é criada com base na interação eletrostática entre os grupos amino protonados da quitosana e os grupos aniônicos do agente de reticulação, sendo o Tripolifosfato de sódio (TPP) o agente de reticulação mais amplamente utilizado (Algharib et al., 2022; Esposto, 2021). Tais interações podem ser reversíveis e fornecerem propriedades interessantes para a entrega de ingredientes ativos (Janes, Alonso, 2003).

A quitosana possui muitos grupos amina livres que carregam uma carga positiva e em pH baixo, inferior a 6,5, são protonadas formando polímero policatiônico. Devido ao comportamento policatiônico das moléculas de quitosana, esta pode ser aplicada como revestimento de lipossomas baseado na atração eletrostática entre os grupos amino protonados da quitosana e os grupos carregados negativamente presentes na superfície dos lipossomas, formando sistemas híbridos denominados quitossomas conforme representado na Figura 2 (Esposto, 2021; Sreekumar, et al., 2018).

O tamanho das partículas obtidas por gelificação iônica de quitosana e TPP, é afetado por parâmetros de processo como concentração de quitosana, concentração de TPP, razão de volume de quitosana/TPP, vazão, pH da solução, adição de sais à solução, potência e tempo dos processos de sonicação e agitação e possível adição de fosfolipídios e/ou crioprotetores (Algharib et al., 2022).

Figura 2. Representação de um lipossoma revestido por nanopartículas reticuladas de TPP-quitosana.



Fonte: Esposito, B. S. et al. Liposomes vs. chitosomes: Encapsulating food bioactives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 40-48, 2021.

Os medicamentos fitoterápicos são usados há muito tempo em todo o mundo e são conhecidos por seu melhor valor terapêutico, incluindo menos efeitos adversos do que os medicamentos modernos (Wahab, et al., 2022). São definidos como uma preparação derivada exclusivamente de uma planta inteira ou partes (flor, folhas, casca, caule, rizoma, raiz) ou seus exsudatos (resinas, látex, gomas) (Mehta, et al., 2015). A ação farmacológica das formulações ou medicamentos fitoterápicos deve-se aos seus constituintes fitoquímicos ativos, como alcalóides, flavonóides, terpenóides, fenóis, polifenóis, taninos, saponinas, polissacarídeos, proteínas, lipídios e peptídeos. Os medicamentos fitoterápicos têm sido estudados e utilizados nos últimos anos inclusive como tratamentos complementares do COVID-19, pois alguns fitoativos já foram relatados como potenciais inibidores das proteases SARS-CoV-2 (Kumar et al., 2022; Khanna, et al., 2021; Rao et al., 2021; Mirzaie, et al., 2020).

Alcachofra (*Cynara cardunculus* L.) é uma planta pertencente à família *Asteraceae*, nativa da bacia mediterrânea, que tem sido utilizada desde a antiguidade como alimento e como fitoterápico (Pérez-Esteve et al., 2018; Dias et al., 2018). Suas inflorescências imaturas são consumidas frescas, enlatadas ou congeladas e suas folhas e caule são descartados (Pandino et al., 2011). Estudos revelam que 1/3 das partes comestíveis de alimentos produzidos para consumo humano são desperdiçados em todo o mundo totalizando cerca de 1,3 bilhões de toneladas por ano (FAO, 2011), sendo assim de extrema importância tanto do ponto de vista sustentável quanto econômico, o aproveitamento das plantas alimentícias como um todo.

Neste sentido, as folhas da alcachofra podem ser aproveitadas como, por exemplo, excelente fonte de antioxidantes naturais o que acarretaria em melhor aproveitamento da planta e também em benefícios econômicos (Pandino et al., 2011). O formulário de fitoterápicos brasileiro (Brasil, 2011) recomenda a ingestão diária de tintura das folhas de alcachofra para ação antidispéptica, antiflatulenta, antiemética, diurética e antiaterosclerótica e também como coadjuvante no tratamento de hipercolesterolemia leve a moderada e da síndrome do intestino irritável. Na literatura também se reporta ação hepatoprotetora, antidiabética, efeito colerético e colagogo (Lattanzio et al., 2009; Rodriguez, Giménez e Vázquez, 2002).

Ambos os métodos apresentados foram estudados na formação de micropartículas contendo extrato de folhas de alcachofra com o intuito de mascarar o sabor deste fitoterápico para que não interfira no sabor e cor do alimento final e também para que este possa ser liberado e absorvido diretamente no órgão do corpo humano sobre o qual exerce efeito fitoterápico. As partículas obtidas por ambos os métodos, uma técnica com princípio de ação físico-químico e outra com princípio de ação físico, foram aplicadas em *sorbet* de morango e comparadas entre si em relação à percepção sensorial no produto final.

Na formulação do *sorbet* para teste das funções das microcápsulas formadas, o xilitol foi empregado em substituição à sacarose. Xilitol é um edulcorante de origem natural que vem se destacando por apresentar seu metabolismo independente da insulina, valor calórico reduzido, efeito anticariogênico (Maia et al., 2008) e baixo índice glicêmico (Elamin et al., 2012), sendo, portanto, indicado do tratamento de obesos, diabéticos e até mesmo na nutrição parenteral (O'doneel e Kearsley, 2012). Além dos benefícios conferidos à saúde, o xilitol também apresenta propriedades tecnológicas atuando como agente antioxidante, umectante, estabilizante, crioprotetor e redutor do ponto de congelamento (Ding, Yang, 2021; Zhang et al., 2020; Cândido e Campos, 1996). Nabors (2002) relata ainda que, quando aplicado em gelados comestíveis, este substituto do açúcar pode agir como agente encorpante e inibidor da cristalização.

1 Referências

- AL KASSAA, I. Antiviral probiotics: a new concept in medical sciences. In: **New Insights on Antiviral Probiotics**. Springer, Cham, 2017. p. 1-46.
- ALGHARIB, S. A. et al. Preparation of chitosan nanoparticles by ionotropic gelation technique: Effects of formulation parameters and in vitro characterization. **Journal of Molecular Structure**, v. 1252, p. 132129, 2022.
- ALGHARIB, S. A. et al. Designing, structural determination and biological effects of rifaximin loaded chitosan-carboxymethyl chitosan nanogel. **Carbohydrate polymers**, v. 248, p. 116782, 2020.
- BÁNVÖLGYI, S. et al. Integrated Process to Obtain Anthocyanin Enriched Palm-Fat Particles from Elderberry Juice. **Acta alimentaria**, v. 45, n. 2, p. 206-214, 2016.
- BITTENCOURT, G. M. **Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de araçá (Psidium Grandifolium Mart. Ex DC.) obtidos por líquido pressurizado (PLE) e por fluido supercrítico (SFE)**. 2018. 116 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 126p., 2011.
- CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. **Alimentos para fins especiais: dietéticos: legislação, mercado, adoçantes e edulcorantes, substitutos de gordura, sucedâneos do sal**. Livraria Varela, 1996.
- CHEN, Y. et al. Six-month follow-up of gut microbiota richness in patients with COVID-19. **Gut**, v. 71, n. 1, p. 222-225, 2022.
- CIFTCI, O. N.; TEMELLI, F. Formation of solid lipid microparticles from fully hydrogenated canola oil using supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 178, p. 137-144, 2016.
- COCERO, M. J. et al. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: fundamentals and applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 3, p. 546-555, 2009.
- COMUNIAN, T. A. **Simultaneous encapsulation of echium (Echium Plantagineum L.) seed oil, phytosterols and phenolic compounds: characterization and application of microcapsules**. 2017. 353 f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.
- COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C .S. Microencapsulation using biopolymers as na alternative to produce food enhanced with phytosterols and ômega-3 fatty acids: A review. **Food Hydrocoloids**. v. 61, p. 442-457, jun. 2016.

- COUTO, R.; ALVAREZ, V.; TEMELLI, F. Encapsulation of Vitamin B2 in solid lipid nanoparticles using supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 120, p. 432-442, 2017.
- DA FONSECA MACHADO, A. P. et al. Development of natural bioactive delivery systems through pressurized fluids-modern techniques. In: **Herbal Bioactive-Based Drug Delivery Systems**. Academic Press, 2022. p. 331-369.
- DIAS, M. I. et al. Phenolic profile and bioactivity of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) inflorescence parts: selecting the best genotype for food applications. **Food Chemistry**, 2018.
- DING, S.; YANG, J. The effects of sugar alcohols on rheological properties, functionalities, and texture in baked products—A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 111, p. 670-679, 2021.
- ELAMIN, K. et al. Calorimetric and relaxation properties of xylitol-water mixtures. **The Journal of Chemical Physics**. v. 136, n. 10, p. 104508, 2012.
- ESPOSTO, B. S. et al. Liposomes vs. chitosomes: Encapsulating food bioactives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 40-48, 2021.
- FAO. **Global Food Losses and Food Waste - extent, causes and prevention**. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011.
- FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C. D.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.
- HONJO, M. et al. Characterization and pharmacokinetic evaluation of microcomposite particles of alpha lipoic acid/hydrogenated colza oil obtained in supercritical carbon dioxide. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 25, n. 3, p. 359-365, 2020.
- HRNČIČ, M. K. et al. Application of supercritical and subcritical fluids in food processing. **Food Quality and Safety**, v. 2, n. 2, p. 59-67, 2018.
- JANES, K. A.; ALONSO, M. J. Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: preparation and characterization. **Journal of applied polymer science**, v. 88, n. 12, p. 2769-2776, 2003.
- JANES, K. A. et al. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. **Journal of controlled Release**, v. 73, n. 2-3, p. 255-267, 2001.
- KAHYA, N. Water soluble chitosan derivatives and their biological activities: a review. **Polymer Science**, v. 4, n. 2, p. 1-16, 2018.
- KANKALA, R. K. et al. Supercritical fluid technology: an emphasis on drug delivery and related biomedical applications. **Advanced healthcare materials**, v. 6, n. 16, p. 1700433, 2017.

- KHANNA, K. et al. Herbal immune-boosters: Substantial warriors of pandemic Covid-19 battle. **Phytomedicine**, v. 85, 2021
- KUMAR, A. et al. Role of herbal medicines in the management of patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of traditional and complementary medicine**, 2022.
- LATTANZIO, V. et al. Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 131-144, 2009.
- MAIA, M. C. et al. Sensory evaluation of ice creams prepared with xylitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 146-151, jan-mar. 2008.
- MIRZAIIE, A. et al. A narrative literature review on traditional medicine options for treatment of corona virus disease 2019 (COVID-19). **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 40, 2020
- MEHTA, P. et al. Pharmacokinetic profile of phytoconstituent(s) isolated from medicinal plants—A comprehensive review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, n. 4, 2015
- NABORS, L. Sweet choices: sugar replacements for foods and beverages. **Food Technology**, v. 56, n. 7, p. 28-34, 2002.
- NGUYEN, Q. V. et al. Role of probiotics in the management of COVID-19: A computational perspective. **Nutrients**, v. 14, n. 2, p. 274, 2022.
- O'DONNELL, K.; KEARSLEY, M. (Ed.). **Sweeteners and sugar alternatives in food technology**. John Wiley & Sons, 2012.
- O'SULLIVAN, A.; RYAN, K. M.; PADRELA, L. Production of Biopharmaceutical Dried-Powders using Supercritical CO₂ Technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, p. 105645, 2022.
- PADRELA, L. et al. Supercritical carbon dioxide-based technologies for the production of drug nanoparticles/nanocrystals—a comprehensive review. **Advanced drug delivery reviews**, v. 131, p. 22-78, 2018.
- PANDINO, G. et al. Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 417-422, 2011.
- PÉREZ-ESTEVE, É. et al. Polyphenolic composition of Spanish cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). **Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus**, v. 17, n. 2, p. 177-184, 2018.
- PLAZA-DÍAZ, J. et al. Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 555, 2017.
- RAO, M. V. V. et al. Emerging trends from COVID-19 research registered in the Clinical Trials Registry – India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 153, n. 1-2, p. 26-63, 2021

- RODA, A. et al. Design and processing of drug delivery formulations of therapeutic deep eutectic systems for tuberculosis. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 161, p. 104826, 2020.
- RODRIGUEZ, T. S.; GIMÉNEZ, D. G.; VÁZQUEZ, R. P. Choleric activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 687-693, 2002.
- SREEKUMAR, S. et al. Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano-and microparticles. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.
- TÜRK, M. Particle synthesis by rapid expansion of supercritical solutions (RESS): Current state, further perspectives and needs. **Journal of Aerosol Science**, p. 105950, 2022.
- TÜRK, M. **Particle formation with supercritical fluids: challenges and limitations**. Elsevier, 2014.
- YAHFOUFI, N. et al. Role of probiotics and prebiotics in immunomodulation. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p. 82-91, 2018.
- YANG, J.; CIFTCI, O. N. Development of free-flowing peppermint essential oil-loaded hollow solid lipid micro-and nanoparticles via atomization with carbon dioxide. **Food Research International**, v. 87, p. 83-91, 2016.
- WAHAB, S. et al. Nanomaterials for the delivery of Herbal Bioactive Compounds. **Current Nanoscience**, v. 18, n. 4, p. 425-441, 2022.
- WANG, Y. et al. Antioxidant properties of probiotic bacteria. **Nutrients**, v. 9, n. 5, p. 521, 2017.
- WEN, Z. et al. Application of an improved RESS process for *Atractylodes macrocephala* Koidz volatile oil liposomes production. In: *Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE)*, 2010 **4th International Conference on. IEEE**, 2010. p. 1-4.
- ZHANG, B. et al. Cryoprotective characteristics of different sugar alcohols on peeled Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during frozen storage and their possible mechanisms of action. **International Journal of Food Properties**, v. 23, n. 1, p. 95-107, 2020.
- ZHU, L. et al. Encapsulation of menthol in beeswax by a supercritical fluid technique. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2010, 2010.



**CAPÍTULO 1 Alimentos probióticos,
prebióticos e simbióticos:
características, aplicações e
proteção por encapsulação –
Revisão**



Resumo

Esta revisão visa denominar pré- e probióticos e demonstrar as finalidades de suas aplicações com destaque à simbiose destes compostos e benefícios acarretados à saúde. Visando o enriquecimento de alimentos, o que muitas vezes configura com o desenvolvimento de um alimento funcional, os pré- e probióticos devem ser protegidos de vários fatores que podem reduzir sua viabilidade durante o processamento dos alimentos, durante o período de armazenamento e também durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Para isso a microencapsulação é uma excelente alternativa. Neste sentido, pesquisadores de todo o mundo vêm desenvolvendo e aprimorando diferentes técnicas de formação de partículas bem como diferentes materiais de parede. Esta revisão apresenta os principais meios de encapsulação ou impregnação direcionados a este fim e alguns exemplos de aplicação.

Palavras-chave: alimento funcional; microencapsulação; impregnação; promoção de saúde

1 Introdução

Nas últimas décadas houveram consequências adversas à saúde humana e ao meio ambiente devido ao uso indiscriminado de drogas sintéticas, conservantes químicos e fertilizantes (Yadav et al., 2022), se tornando necessário a busca por produtos advindos da natureza que sejam biosseguros tanto para a saúde humana quanto para a do planeta de forma geral, não com o intuito de substituir completamente o uso do produtos químicos que muitas vezes são indispensáveis, mas para apresentar-se como uma alternativa em alguns casos, como coadjuvante em outros e principalmente como forma de prevenção (Bernardini et al. 2018; Trasande et al. 2018; Prestinaci, Pezzotti, Pantosti, 2015). Este cenário induz a indústria alimentícia e a comunidade científica a investigarem e criarem novos produtos, estudando a atividade e a ação de compostos com diferentes funções nutricionais e as tecnologias envolvidas na produção. Os alimentos a serem desenvolvidos deverão nutrir e promover benefícios à saúde daqueles que o consomem. Tais benefícios podem até estar relacionados com a redução do risco de certas doenças, tais como doenças crônicas degenerativas não transmissíveis (Araújo, 2007; Brasil, 2011; Nitzke, 2012). Nesse campo, são incluídos os alimentos intitulados alimentos funcionais, que são aqueles que contêm ingredientes que proporcionam benefícios à saúde, além dos componentes nutricionais básicos do próprio alimento, devendo ser seguros ao consumo sem recomendações médicas. Esta categoria de alimentos vem ganhando espaço no mercado, por se apresentar como uma alternativa nutritiva aos alimentos tradicionais, sendo necessário que o produto final apresente benefícios e não somente os seus ingredientes (Damián et al., 2022; Lemus-Mondaca, 2019).

Os componentes ativos ligados a estes benefícios incluem prebióticos, probióticos, fibras e vitaminas, dentre outros. Dietas com consumo limitado de nutrientes bioativos podem levar ao início ou progresso de diversas doenças, no entanto, sabe-se que frutas e hortaliças, em geral, são alimentos que possuem grandes quantidades de compostos funcionais e possuem baixa densidade energética sendo, portanto, seu consumo associado à proteção contra diversas doenças crônicas não transmissíveis como obesidade, diabetes, doenças coronarianas, hipertensão arterial e a alguns tipos de câncer. Neste sentido, a Organização Mundial da Saúde recomenda o consumo 400 g ou cinco porções ao dia de frutas e hortaliças como um dos fatores essenciais na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (Couri, Matta, 2019).

A conceituação de alimentos funcionais ganhou impulso no início dos anos 80, no Japão, em campanha que visava a redução de custos com medicamentos e para isso foi implantado um programa denominado FOSHU (Alimentos para Uso Específico para Saúde, do inglês *Foods for Specified Health Use*), por meio do qual os alimentos baseados em ingredientes naturais deveriam ser consumidos como parte da dieta alimentar e deveriam cumprir funções específicas no organismo, como, por exemplo, a melhoria dos mecanismos de defesa biológica como a imunidade ou prevenir algum tipo de doença (Roberfroid, 2000).

2 Desenvolvimento

2.1 Prebióticos

A primeira definição de prebióticos, realizada em 1995 por Gibson e Roberfroid, descrevia-os como oligossacarídeos não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou um número limitado de espécies bacterianas (Liu, Vincken, de Bruijn, 2022). Mais recentemente a Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ISAPP) atualizou a definição de prebiótico como sendo “um substrato que é utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros conferindo benefício à saúde” (Gibson et al., 2017). Portanto, prebióticos podem ser entendidos como substâncias não digeríveis, mas fermentáveis, que afetam benéficamente o hospedeiro pelo estímulo seletivo da proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon, podendo adicionalmente inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios à saúde do hospedeiro. Os prebióticos podem incluir féculas, fibras dietéticas, carboidratos não-absorvíveis, polióis e oligossacarídeos, sendo o último encontrado como componente natural de vários alimentos, como frutas, vegetais, leite e mel (Zimmer, 2017, Brasil, 2011, Quigley, 2010).

Os prebióticos interagem principalmente com a microbiota do cólon, mas também são conhecidos por modularem a função imune em outros sistemas como na cavidade oral, trato urogenital e intestino delgado (Patel, Goyal, 2012; Wang, 2009). É importante ressaltar que possuir uma microbiota variada e mecanismos de transporte apropriados para capturar e entregar esses substratos no citoplasma microbiano é um requisito fundamental e contribui para a seletividade de prebióticos nos locais alvo, substratos que afetam a composição da microbiota por meio de mecanismos que não envolvem a utilização seletiva por

microrganismos hospedeiros não são prebióticos (Gibson et al., 2017; Goh, Klaenhammer, 2015).

Os efeitos benéficos atribuídos aos prebióticos incluem o efeito bifidogênico, o aumento de absorção de cálcio, diminuição da translocação bacteriana, diminuição do risco de câncer de cólon, estimulação do sistema imune, produção de vitaminas do complexo B, inibição de patógenos, redução dos níveis de colesterol sanguíneo e restauração da microbiota intestinal além da redução do risco de arteriosclerose, através da diminuição na síntese de triacilgliceróis e ácidos graxos no fígado e diminuição do nível desses compostos no sangue (Patel, Goyal, 2012; Wang, 2009, Kaur, Gupta, 2002).

Do ponto de vista tecnológico, prebióticos podem ser adicionados a alimentos fermentados como leites, para diminuir o tempo de incubação do produto ou ser acrescentado com o intuito de transformar o produto final em um alimento funcional (Zimmer, 2017).

O prebiótico como ingrediente alimentar deve cumprir características como: não ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do trato gastrointestinal, possuir fermentação seletiva por bactérias potencialmente benéficas no cólon, alterando a microbiota intestinal em favor de uma composição mais saudável, servindo como substrato para bactérias benéficas normalmente presentes na microbiota do intestino grosso tais como bifidobactérias e lactobacillus, induzindo assim efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (Panesar; Kumari, 2011; Teshima, 2003). No entanto alguns autores alegam ser difícil assegurar que um prebiótico será fermentado apenas por bactérias benéficas ao hospedeiro e que os produtos da fermentação não servirão como substrato para patógenos.

Os prebióticos estão associados à redução do risco de diabetes mellitus, obesidade, síndrome metabólica, dislipidemia, alguns tipos de inflamações ligadas a alterações na microbiota intestinal, osteoporose, doenças cardiovasculares, esteatose hepática e câncer (Gibson et al., 2017; Everard et al., 2014; Oliveira, 2002). Em relação à osteoporose, numerosos estudos empregando modelos animais têm mostrado que a inulina e as oligofrutoses estimulam a absorção de minerais como cálcio e magnésio, provavelmente por efeitos como produção de ácidos graxos de cadeia curta, redução do pH intestinal, solubilização destes minerais e aumento de proteínas relacionadas com a absorção, há relatos também de que os prebióticos podem ser usados para aumentar a proliferação saudável de bactérias intestinais comensais que são usadas para melhorar o processo de construção óssea, aliviando sua degradação durante os estágios de renovação óssea, podendo ser usado tanto

para tratamento quanto para prevenção da osteoporose (Zhang et al., 2022; Wu et al., 2021; Ybarra et al., 2003).

Segundo Kolida e Gibson (2011), somente quatro ingredientes alimentares são reconhecidos como prebióticos pela União Européia, sendo estes os frutooligossacarídeos (FOS), inulina, lactulose e galactooligossacarídeos. No entanto, atualmente vários carboidratos fermentáveis e algumas fibras solúveis foram relatados como tendo efeito prebiótico (Rastall, Gibson, 2015; Licht et al., 2012; Hernández-Hernández et. al., 2012; Patel, Goyal, 2012; Souza et al., 2010). Além disso, um substrato que se qualifica como prebiótico também pode depender do local alvo. Por exemplo, o xilitol pode ser considerado um prebiótico na cavidade oral, mas não demonstrou ser prebiótico no intestino (Roberfroid et al., 2010; Gibson et al., 2004). A Figura 1 apresenta um diagrama para identificação de prebióticos de acordo com a declaração de consenso da Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ISAPP) sobre a definição e o escopo dos prebióticos apresentada por Gibson e colaboradores (2017).

Figura 1. Distinguir o que é considerado um prebiótico de acordo com a definição proposta pela Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ISAPP).



* CLA: ácido linoleico conjugado, PUFA: ácido graxo poliinsaturado, FOS: frutooligossacarídeos, GOS: galactooligossacarídeos, MOS: mananoligossacarídeo, XOS: xilooligossacarídeo.

** A figura foi modificada para alteração de linguagem, do inglês para português.

Fonte: GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. Nature reviews Gastroenterology & Hepatology, v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017.

Os prebióticos já são incorporados industrialmente, de forma direta ou protegidos por micro ou nano cápsulas em alimentos como bebidas lácteas, leites fermentados, e produtos cárneos tal como o presunto. Em produtos cárneos são empregados prebióticos derivados da proteína de soro de leite, para contribuir nos aspectos de textura, coloração e também para o ganho de apelo nutricional para produtos que são considerados pouco saudáveis pela sociedade. Além disso, a mesma qualidade sensorial e físico-química destes produtos deve ser mantida (Illipangama et al., 2022; Panesar, Kumari, 2011).

Inulina e oligossacarídeos destacam-se entre os prebióticos que têm recebido maiores atenções nos estudos científicos (Saad, 2006) e também são os mais amplamente utilizados nas indústrias alimentícias para substituírem gorduras e açúcares, reduzindo assim o teor calórico, pois apresentam baixo valor calórico em função de ligações β (1-2) entre as moléculas de frutose o que as tornam não digeríveis por enzimas intestinais humanas. Estudos indicam que a inulina e FOS são completamente fermentados no cólon e produzem ácidos graxos de cadeias curtas e lactatos que são metabolizados e contribuem com o valor calórico de somente 1,5 kcal/g (Niness, 1999).

Em virtude de possuírem cadeias de diferentes tamanhos, a inulina e a frutoligofrutose conferem propriedades distintas aos produtos alimentícios aos quais são adicionadas. FOS, possuem propriedades similares às da sacarose e de xaropes de glicose, apresentando cerca de um terço do poder adoçante destes carboidratos, sendo desta forma utilizado industrialmente em conjunto com edulcorantes de alto poder adoçante, para substituir o açúcar (Kaur, Gupta, 2002; de Oliveira Hauly, Moscatto, 2002; Franck, 2002). A inulina por sua vez é menos solúvel que a oligofrutose e, quando dispersa na água ou no leite, forma microcristais que interagem para dar origem a uma textura cremosa, sendo, conseqüentemente, empregada como substituto de gordura em produtos lácteos, sobremesas congeladas e produtos de panificação (Illipangama et al., 2022; Niness, 1999).

Em altas concentrações a inulina tem propriedade de formação de gel quando misturada à água ou leite, resultando em estrutura cremosa e uma sensação na boca semelhante àquela conferida pela gordura, podendo ser incorporada em alimentos com o intuito de substituir até 100% da gordura (Shoaib et al., 2016; Karimi et al., 2015). O gel formado apresenta fácil espalhabilidade, sensação táctil oral homogênea, típica da presença de gordura, aspecto brilhante e liberação equilibrada de compostos de sabor na boca. Estes micro-cristais não são percebidos na boca (Pimentel, Garcia, Prudencio, 2012; Bosi, 2008). Em produtos lácteos com baixo teor de gordura, como queijos frescos, cremosos ou

processados ou até mesmo manteiga com substituição parcial da gordura por inulina, a adição deste prebiótico resulta em textura mais cremosa e sabor mais balanceado além de melhorar a qualidade nutricional do alimento (Hughes et al., 2022; Pimentel, Garcia, Prudencio, 2012). Outra aplicação interessante para a indústria alimentícia se relaciona com a capacidade da inulina reduzir o ponto de congelamento e aumentar o ponto de fusão da água (de Oliveira Hauly, Moscatto, 2002).

Outro prebiótico também amplamente utilizado e estudado é a lactulose que é tradicionalmente obtida a partir de catálise ou métodos enzimáticos envolvendo a isomerização de galactose, sendo mais uma abordagem atraente para a valorização do soro de leite (Karim, Aider, 2022; Olano, Corzo, 2009). Podendo ser utilizado pela indústria alimentícia em produtos de confeitaria, panificação, bebidas, iogurtes, leite em pó infantil, sobremesas lácteas e em muitas preparações de alimentos líquidos ou secos conferindo, além de benefícios à saúde do consumidor, melhorias de sabor e aumento da solubilidade em água. Sendo reportado também como agente favorável à sobrevivência de cepas probióticas presentes em iogurte (Panesar, Kumari, 2011; Tabatabaie, Mortazavi, 2008).

2.2 Probióticos

Dentre os alimentos considerados como funcionais, pode-se destacar aqueles contendo probióticos, que são micro-organismos vivos que são capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, restaurando uma microbiota estável, regulando a imunidade inata e adaptativa dentro do intestino (Nguyen et al., 2022). Com isso, a ingestão de probióticos pode promover diversos benefícios à saúde tais como significativa redução dos níveis de colesterol total com diminuição do LDL (Lipoproteínas de Baixa Densidade), melhora da digestão de proteínas, aumento da absorção de vitaminas e minerais (Couri, Matta, 2019; Varavallo, Thomé, Teshima, 2008; Brasil, 2002), prevenção da diarreia associada ao uso de antibióticos, imunomodulação, redução da intolerância à lactose, potencial atividade anti-obesidade, efeitos anticarcinogênicos, antivirais, antiinflamatórios e antioxidantes (Yahfoufi et al., 2018; Plaza-Díaz et al., 2017; Parker et al., 2017; Wang et al., 2017; Al Kassaa, 2017; Finamore et al., 2014; Roselli et al., 2009; Ouwehand, Salminen, Isolauri, 2002). Atualmente probióticos têm sido relatados como promissores coadjuvantes no tratamento de pacientes infectados por SARS-COV-2 devido aos seus comprovados efeitos antivirais, pois pesquisas mostram que

esta infecção acarreta em disbiose nos pacientes mesmo após seis meses da ausência de detecção do vírus, podendo dificultar sua total recuperação, sugerindo que o ajuste fino do equilíbrio da microbiota pode ser útil na luta contra o COVID-19 (Nguyen et al., 2022; Chen et al., 2022).

Os principais pré-requisitos para um microrganismo ser considerado probiótico são o número de células viáveis atender às concentrações mínimas exigidas até o momento do consumo e manterem-se viáveis após passarem pelo trato gastrointestinal, sendo resistentes ao pH do suco gástrico, à presença de sais biliares e de enzimas digestivas, condição indispensável para a sua atuação, bem como conferir propriedades tecnológicas adequadas ao produto em que será adicionado (Macedo et al., 2008; Araújo, 2007; Komatsu, Buriti, Saad, 2008).

O consumo de alimentos probióticos tem por objetivo o estabelecimento de uma microbiota que contribui para a atividade saudável do intestino (Hungria, Longo, 2009). Os probióticos facilitam a formação da chamada barreira probiótica no intestino, impedindo, assim, a colonização da microbiota por bactérias patogênicas. Alguns dos mecanismos descritos para esse impedimento é a competição que ocorre no intestino favorecendo as bactérias probióticas (Varavallo, Thomé, Teshima, 2008). Os probióticos podem também afetar patógenos através da síntese de bacteriocinas, ácidos orgânicos voláteis e peróxido de hidrogênio (Rastall et al., 2005). Quanto aos seus efeitos anticarcinogênicos, estes podem ser atribuídos à inibição de enzimas pró-carcinogênicas ou à estimulação do sistema imune do hospedeiro (Ouweland, Salimen, Isolauri, 2002).

Para a legislação brasileira, um alimento pode apresentar alegação de conter uma propriedade funcional se ele tiver um papel metabólico ou fisiológico, pelo nutriente ou não nutriente, no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano (Couri, Matta, 2019).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária brasileira) determina a quantidade mínima viável para os probióticos entre 10^8 e 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) na recomendação diária do produto, entretanto, valores menores podem ser aceitos desde que a sua eficiência seja comprovada. Essa informação deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação. O fabricante também deve declarar a eficácia do probiótico adicionado a seu produto comprovando quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade e teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares (Brasil, 2008). Para a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a

Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization*) para que uma cultura de probióticos tenha efeitos notáveis na saúde, há um limite mínimo de inclusão destes microrganismos variando em uma faixa de 10^6 a 10^7 UFC/mL (FAO, 2002).

O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais deve ser seguro para consumo sem a supervisão médica. Para tanto devem, obrigatoriamente, ser registrados junto ao órgão competente (Stringheta et al., 2007).

Algumas cepas são utilizadas já há muitos anos como culturas iniciadoras para fermentar iogurtes e leites, sendo difundidos devido a seus benefícios para a saúde e por conferir sabor característico no produto final, tais como *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophiles*, dentre outras bactérias sejam lácticas ou bifidobactérias. (Pahumunto et al., 2020).

Nos alimentos os probióticos se multiplicam utilizando os carboidratos presentes naturalmente ou adicionados aos produtos e como efeito acaba reduzindo o pH do meio pois metaboliza carboidratos em ácido lático, no caso as bactérias lácticas. Diferentes espécies de microrganismos têm a capacidades de metabolizar (fermentar) diferentes tipos de açúcar, sendo o mais comum a sacarose. Porém, na busca por alimentos que promovam benefícios à saúde e que possuam baixo teor calórico, têm-se pesquisado o emprego de substitutos tais como maltitol, manitol, xilitol e stevia, que além de diminuir o valor calórico do alimento também reduzem o potencial cariogênico relacionado à sacarose (Pahumunto et al., 2020).

Os principais benefícios dos probióticos estão relacionados ao bom funcionamento do intestino, no entanto, também podem ser utilizados para auxiliar na microbiota da cavidade oral, mantendo o microssistema uma vez que se alimentando de saliva, inibem a adesão de microrganismos patogênicos e produzindo uma reposta do aumento do sistema imunológico e produzindo compostos antimicrobianos (Agah, 2020).

A obesidade, por exemplo, é uma doença inflamatória que altera a composição da microbiota intestinal podendo causar disfunção da barreira intestinal, levando ao aumento da passagem de endotoxinas, como lipopolissacarídeos, uma condição conhecida como endotoxemia, que promove distúrbios inflamatórios e metabólicos de baixo grau; estudos encontraram diferenças na composição bacteriana entre indivíduos magros e obesos, sugerindo que bactérias específicas ou seus metabólitos podem ser benéficos para os pacientes obesos (Delzenne et al., 2011; Turnbaugh et al., 2006; Cani, Delzenne, 2009). Há evidências de que a administração de probióticos pode melhorar a obesidade, como por exemplo *L. gasseri* que se mostrou capaz de reduzir a adiposidade em indivíduos obesos adultos

(Kadooka et al., 2010). Estudos em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica relataram uma redução no peso corporal, no acúmulo de gordura visceral, na infiltração de macrófagos, na inflamação, na esteatose hepática e na resistência à insulina por suplementação com diferentes cepas de lactobacilos e bifidobactérias (Alard et al., 2016; Kim et al., 2016; Wang et al., 2015; Chen et al., 2011).

O alimento escolhido para a incorporação das cepas probióticas deve ser estudado com critério, particularmente nos produtos fermentados, para os quais a multiplicação de probióticos pode resultar em características organolépticas indesejáveis. Deve-se ressaltar ainda que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição ao oxigênio, calor e ácidos (Komatsu, Buriti, Saad, 2008).

Contínuos estudos visam agregar benefícios aos produtos que fazem parte da rotina alimentar do consumidor. O desenvolvimento de novos produtos também é considerado de grande importância visto que a relação dieta-saúde representa um desafio para a ciência e a tecnologia de alimentos, principalmente quando se trata de alimentos funcionais.

Produtos lácteos fermentados são geralmente boas matrizes alimentares para os probióticos (Rivera-Espinoza, Gallardo-Navarro, 2010), mas o consumo destes fica limitado com a crescente onda de veganismo e do grande número de pessoas intolerantes à lactose, alérgicas à proteína do leite ou que fazem dieta restritivas. O desenvolvimento de produtos não lácteos probióticos, incluindo matrizes alimentares à base de frutas, legumes e cereais, tem sido amplamente estudado como uma alternativa para estes indivíduos (Martins et al., 2013) e verificou-se que os alimentos fermentados tradicionais podem conter microrganismos probióticos viáveis (Rivera-Espinoza, Gallardo-Navarro, 2010).

Como, por exemplo, o kefir que vem sendo, cada vez mais, consumido devido à suas propriedades nutricionais por meio de bebidas produzidas pela fermentação de leite, chás ou sucos ou outras bebidas à base de água por “grãos-de-kefir”. Estes grãos são compostos por bactérias e leveduras probióticas que produzem bebidas similares aos iogurtes e queijos, quando produzidas a partir da fermentação de leite e quando produzidas a partir de bebidas à base de água da origem a bebidas parecidas com refrigerantes, apresentando gostos ácido e gaseificado (Açik, 2020).

Com isso se pode notar o crescente desenvolvimento de alimentos funcionais adicionados de probióticos podendo estes novos alimentos serem divididos em três grandes categorias: à base de laticínios, à base de plantas e à base de carne.

Os alimentos probióticos à base de laticínios incluem leite fresco e fermentado, iogurtes, sorvetes e queijos, dentre outros. As propriedades probióticas de produtos lácteos, como o leite, foram exploradas estudando as bactérias que esses produtos contêm. Hurtado-Romero e colaboradores (2021), identificaram cepas de bactérias pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacilli*, *Leuconostoc* e *Kluyveromyces* no leite. Cada cepa probiótica oferece benefícios diferentes e específicos para a saúde. Mani-Lopez, Palou e López-Malo (2014) estudaram a viabilidade probiótica e a estabilidade de armazenamento de diferentes tipos de iogurtes e leites fermentados preparados com diversas misturas de bactérias ácido lácticas, principalmente do gênero *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Falfán-Cortés e colaboradores (2022) analisaram a adição de *Lacticaseibacillus paracasei* em queijo e sugeriram que esta cepa além de ser probiótica possui alto potencial antagônico contra possíveis patógenos no alimento. Alguns autores também relataram que algumas cepas como *Lacticaseibacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus maltaramicus* *Pediococcus acidilactici* quando adicionadas à manteiga, impactam na redução do teor de colesterol e ácidos graxos saturados, diminuindo os danos cardiovasculares causados pelo consumo contínuo deste alimento (Kim et al., 2021; Aloğlu, Öner, 2006).

À base de plantas podemos encontrar diversos alimentos probióticos, tais como sucos néctares, *sorbets*, produtos de panificação, picles e geléias. A adição de probióticos como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* em sucos e néctares produz compostos bioativos através da fermentação de sacarose e carboidratos na fruta, isso os classifica como alimentos funcionais, aumentando as capacidades antioxidantes tanto da fruta quanto do trato intestinal do indivíduo que os consome, além de favorecer a absorção intestinal de cálcio, ferro e magnésio (Žuntar et al., 2020, Fenster et al., 2019). Em estudos realizados com várias frutas e hortaliças verificando sua relação com a fermentação láctica, analisando as fontes de compostos nutricionais contendo moléculas bioativas, como compostos fenólicos, flavonóides, peptídeos bioativos e conteúdo fitoquímico, concluíram que bactérias probióticas, ao interagirem com frutas ricas em β - e α -carotenos como cenoura, abóbora, tangerina e manga (alimentos naturalmente alaranjados), atuam como simbiontes promovendo alterações nos compostos bioativos gerando ácidos graxos de cadeia curta, polissacarídeos de alto valor nutricional e bioativos (Septembre-Malaterre, Remize, Poucheret, 2018; Bohn et al., 2015).

A indústria frigorífica está constantemente pesquisando novas alternativas para a produção de carnes de alto valor nutricional, principalmente em bovinos, um dos recursos que

podem ser utilizados atualmente é a associação probióticos como algumas cepas de lactobacilos e *S. cerevisiae* na formulação de ração para o gado (Damián et al., 2022; da Silva-Marques, 2019). Outra opção é a adição de probióticos diretamente nas indústrias de cortes bovinos ou em outros alimentos processados. Trabelsi e colaboradores (2019) adicionaram *L. plantarum* em carne bovina moída melhorando a qualidade nutricional desta; Blaiotta e colaboradores (2017) estudaram a adição de diferentes probióticos comerciais em salame e reportaram que as contagens microbiológicas foram diferentes de acordo com o tipo de cepa iniciadora utilizada e que algumas como *L. plantarum* manteve uma concentração superior a 10^6 UFC/g até o momento do consumo para exercer um efeito benéfico em humanos, os autores concluíram que o salame experimental mostrou-se seguro, pois não foram detectados coliformes coagulase-positivos e estafilococos no salame no momento do consumo e após mais de um mês de armazenamento em temperatura de resfriamento. Diversos estudos foram realizados em relação à adição de diferentes probióticos em salsichas fermentadas relatando que muitas bactérias produtoras de ácido láctico, foram encontradas durante todas as etapas do processamento da carne, os probióticos adicionados inibiram a oxidação lipídica, *L. rhamnosus* permaneceu viável em níveis elevados mesmo após passagem pelo trato gastro-intestinal (Mafra et al., 2021; Roselino et al., 2020; Neffe-Skocínska et al., 2020; Ruiz et al., 2014).

Novas aplicações, em alimentos diferenciados, vêm sendo inseridas no mercado e incluem a adição de probióticos em gomas de mascar e em alimentos infantis, causando resposta imunológica positiva no tratamento de alergias. Para isso a agregação de probióticos aos alimentos deve se dar de forma a não alterar suas características sensoriais, o que pode ser realizada pela adição de probióticos microencapsulados (Açik, 2020).

A microencapsulação é uma técnica emergente para o acondicionamento de nutrientes biologicamente ativos por proporcionar liberação no local desejado e por constituir uma barreira física contra condições ambientais adversas (Chitprasert, Sudsai, Rodklongtan, 2012). Tendo sido muito utilizada na indústria de alimentos com o intuito de proteger compostos bioativos, como o controle da reação oxidante, mascarar sabores, odores e cores e prolongar a vida de prateleira. Dentre os compostos bioativos mais encapsulados estão probióticos (Burgain et al., 2011).

Várias tecnologias podem ser aplicadas para a encapsulação de probióticos e cada uma resulta em microcápsulas com características. Portanto, a escolha do método de encapsulação e do material de parede das micropartículas adequados para a aplicação desejada é importante

pois influi em fatores como tamanho de partícula, propriedades físicas e químicas, aplicação do produto final, mecanismos de liberação e custo (Burgain et al., 2011).

2.3 Interação entre probióticos e prebióticos - Simbióticos

Embora os probióticos e os prebióticos possuam mecanismos comuns de atuação, especialmente quanto à modulação da microbiota endógena, eles diferem em sua composição e em seu metabolismo (Quigley, 2010; Brasil, 2011).

A associação entre probióticos e prebióticos dá origem a produtos denominados simbióticos, pois suas ações no organismo humano são complementares, uma vez que os prebióticos atuam como substrato para os microrganismos probióticos (Oliveira, 2014). Alimentos simbióticos podem manter a homeostase na microbiota intestinal prevenindo o aparecimento de algumas doenças, além de serem considerados uma alternativa ao uso de antibióticos para tratar algumas infecções. Compreender os mecanismos de ação desses ingredientes é importante para o entendimento de diversas doenças e para a formulação de produtos eficazes na manutenção do equilíbrio da microbiota (Figueiredo, Oliva-Neto, 2022).

São descritos principalmente dois mecanismos pelos quais os simbióticos podem melhorar os efeitos de seus constituintes, simbióticos complementares e simbióticos sinérgicos. Os simbióticos complementares são suplementos em que os componentes são escolhidos de forma independente, sendo cada um responsável pelo seu efeito particular, caso em que o prebiótico não é necessariamente metabolizado preferencialmente pela estirpe probiótica e pode ser fermentado pela microbiota do hospedeiro. Os simbióticos sinérgicos são aqueles nos quais os prebióticos são especificamente selecionados como substrato para as cepas probióticas e destinam-se a apoiar seu crescimento (Swanson et al., 2020; Kolida e Gibson, 2011). O desenvolvimento de simbióticos é fundamentado em torno da sensibilidade dos probióticos em relação às flutuações das necessidades de crescimento, como pH, oxigênio e temperatura, sendo incapazes de sobreviver no sistema digestivo humano sem a presença de prebióticos (Markowiak, Śliżewska, 2017). Os prebióticos são conhecidos por aumentar o crescimento e as atividades metabólicas dos probióticos, pois atuam como um agente conservante para as culturas vivas (Pandey, Naik, Vakil, 2015; Topping, Fukushima, Bird, 2003).

Na aplicação de simbióticos em alimentos, o ideal é que o ingrediente selecionado seja um substrato metabolizável pelo microrganismo probiótico no intestino, possibilitando o aumento na capacidade de sua sobrevivência (Brasil, 2011). Vários efeitos são propostos em consequência do consumo de alimentos simbióticos tais como a redução de citocinas pró-inflamatórias, a melhora do sistema imunológico, a redução das infecções intestinais, o aumento da massa magra e consequente redução da massa gorda, entre outros (Raizel et al., 2011).

Os probióticos também trabalham de forma a aumentar a biodisponibilidade de alguns nutrientes assim como a sua digestão em todo o trato digestório, sendo um grande aliado para a nutrição adequada (Schrezenmeir, de Vrese, 2001; Açik, 2020). Em síntese, os probióticos combinados com os prebióticos atravessam todo o trato gastrointestinal até chegar ao intestino onde há a fermentação, alterando a atividade da microbiota ali existente assim como sua composição, atuando no metabólito de carboidratos como ácidos graxos e a formação de gases, causando efeitos locais e sistêmicos fisiológicos, garantindo um efeito positivo sobre a saúde quando utilizado em doses adequadas (Pahumunto et al., 2020). Muitos estudos clínicos, que pesquisaram os efeitos benéficos de diferentes simbióticos para pacientes que sofrem de síndrome do intestino irritável revela melhorias significativas dos marcadores desta síndrome tais como: diminuição da intensidade dos hábitos intestinais e do inchaço abdominal (Simon et al., 2021).

Um dos desafios de uso dos simbióticos é sua adição em bebidas de base vegetal, uma tendência que apresenta um grande crescimento devido ao aumento da população que adota dietas veganas ou que possuem intolerância à lactose, a fim de manter a viabilidade das células em um meio não lácteo, uma vez que são muito mais suscetíveis a uma desestabilização pela presença das bactérias, ocasionando perdas físico-químicas nos parâmetros originais do produto (Bruno, 2019).

Estudos têm demonstrado que a ingestão de vegetais, que contêm altos teores de celulose, pode atuar como fonte de nutrientes para as bactérias ácido lácticas, cumprindo a função de simbiótico e aumentando seu potencial como probióticos dentro do microambiente intestinal. É o caso do kimchi, alimento tradicional da Coreia, cuja elaboração se dá por meio da fermentação de vegetais com bactérias probióticas como *Latilactobacillus sakei*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum* e *Levilactobacillus brevis* que realizam a fermentação do ácido láctico. Além disso, foi comprovado que ao adicionar vegetais como repolho, os parâmetros de fermentação aumentam, produzindo ácido

lático em maior quantidade levando a uma mudança mais significativa do pH do meio. Isso leva a propor um possível simbiótico baseado em vegetais e bactérias ácido lácticas em alimentos funcionais (Park et al., 2014).

Pesquisas com dieta baseada no consumo de produtos lácteos que incluía iogurte, leite fermentado e queijo, adicionado de potenciais cepas probióticas e prebióticos, apontam que esta dieta melhorou os sintomas do diabetes mellitus tipo 2, reduzindo o estresse oxidativo, inibindo marcadores pró-inflamatórios e reduzindo a disbiose intestinal (Zepeda-Hernández, 2021).

Liao, Su e Zhang (2022) desenvolveram um produto alimentar fermentado simbiótico contendo *L. plantarum* e inulina e avaliaram seus efeitos na saúde intestinal humana após o consumo. O efeito deste alimento na saúde gastrointestinal humana foi avaliado através de ensaios clínicos. Os resultados obtidos pelos pesquisadores indicam que o consumo do iogurte simbiótico aumenta a população de bactérias benéficas (*Bifidobacteria* e *Lactobacillus*) e reduz a população de bactérias nocivas como *C. perfringens* e *E. coli* indicando que este consumo pode melhorar a saúde gastrointestinal humana em termos de constipação funcional, diarreia funcional, sistema imunológico e microbiota do trato gastrointestinal, e pode ser potencialmente usado como um alimentos funcional para a saúde intestinal.

2.4 Microencapsulação

Microencapsulação é uma técnica na qual um ou mais compostos são cercados ou imobilizados por um ou mais materiais a fim de serem protegidos de fatores externos tais como luz, alta concentração de oxigênio, calor, umidade, mascarando sabores e odores desagradáveis impedindo a evaporação de compostos voláteis, e também para o desenvolvimento de produtos de alto valor agregado. Por este motivo, esta tecnologia tem sido usada na indústria de alimentos, uma vez que facilita a incorporação de ingredientes instáveis na formulação de alimentos. As técnicas de microencapsulação podem ser classificadas de acordo com seu princípio de ação em métodos de ação física, química ou físico-química (Comunian, Favaro-Trindade, 2016). Na microencapsulação as partículas com dimensões muito reduzidas de um sólido ou líquido, conhecido como núcleo, é envolto por uma camada que constitui a barreira de proteção e é conhecida como cobertura, concha ou material de parede (Colom, 2017).

Para a escolha da técnica a ser utilizada, é necessário analisar o produto final no qual as microcápsulas serão aplicadas, o tamanho de partícula desejado, os mecanismos de liberação e as propriedades físico-químicas do material utilizado como agente encapsulante e núcleo (Favaro-Trindade, Pinho, Rocha, 2008). Além disso, no caso de ingrediente alimentício, o custo e a segurança do método e do material de parede também devem ser considerados na seleção.

Os materiais mais utilizados para a microencapsulação são os polímeros solúveis e insolúveis em água, sendo uma alta aplicação relacionada aos alginatos, por possuírem ácidos do tipo D-manurônico e ácido glicurônico e as poli-L-lisinas para a produção das cápsulas de alta estabilidade. As cápsulas devem ser formadas a partir de reticulação de íons presentes nas substâncias das matérias-primas e resistirem a interações com outros agentes quelantes em especial lactatos e citratos que são comumente utilizados em produtos alimentícios (Colom, 2017).

A extrusão é uma técnica de microencapsulação que utiliza polímeros solúveis e insolúveis, consistindo inicialmente da preparação dos materiais e soluções necessárias para realizar o revestimento, dispersão e agregação dos materiais à serem aglomerados e apresenta como maior benefício, poder ser utilizada com materiais que não podem sofrer tratamento térmico (Jankovic et al., 2010) além de ser uma técnica simples, eficiente e de baixo custo (Đorđević et al., 2015; Cavalheiro et al., 2015). Da Silva e colaboradores (2021) estudaram a encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* por extrusão/gelificação e sua aplicação em manteiga obtendo resultados satisfatórios para armazenamento por 45 dias, além de boa aceitação sensorial. Em estudo realizado por Ansari e colaboradores (2020) *L. acidophilus* encapsulado em amido resistente ao alginato e nanopartículas de Eudragit S100 por extrusão, quando adicionadas em bebida à base de soro de leite, apresentou maior viabilidade e mais estabilidade ao armazenamento quando comparada à bactéria em sua forma livre. A tecnologia aplicada no estudo de Siang (2019), apresenta uma alternativa para aumentar a sobrevivência do probiótico a partir de sua encapsulação com um prebiótico selecionado, utilizando a co-extrusão com uma camada de poli-L-lisina sendo testado em condições gástricas simuladas. A técnica consistiu na preparação e incubação de uma cultura de *Lactobacillus rhamnosus*, posteriormente foi concentrada uma solução contendo os prebióticos inulina. Utilizou-se então como núcleo o fluido contendo os simbióticos e como concha, alginato de sódio bombeados simultaneamente no encapsulador com posterior dispersão das cápsulas em cloreto de cálcio para aumentar a sua dureza. Para concluir o

processo, cobriu-se as cápsulas com uma solução de poli-l-lisina, e este processo se mostrou altamente eficiente na viabilidade das células após o processo de digestão, além de apresentar uma alta eficiência na microencapsulação (Siang, 2019).

As atomizações são técnicas de microencapsulação que envolvem *spray-drying*, *spray-congealing* e há estudos recentes estudando também a atomização por eletropulverização (Librán, Castro, Lagaron, 2017). Em relação à atomização a quente, sua principal desvantagem em relação às outras técnicas é o uso de temperaturas que dificultam a viabilidade dos microrganismos, porém apresenta um custo baixo e rapidez no processo (Jankovic et al., 2010). Dos Santos e colaboradores (2019) estudaram o processo de *spray-drying* para microencapsulação de *L. acidophilus* utilizando inulina como agente de revestimento e sua sobrevivência ao atravessar o trato gastrointestinal, constatando maior taxa de sobrevivência do microrganismo microencapsulado quando comparado ao mesmo microrganismo na forma livre e esta taxa de sobrevivência foi ainda maior quando as microcápsulas foram adicionadas ao um alimento. Estudo envolvendo encapsulação de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* por eletropulverização utilizando três diferentes materiais de parede (concentrado de soro de leite, maltodextrina resistente, zeína e polivinilpirrolidona), obtendo, em todos os casos, pós de fácil manuseio e com distribuição uniforme de tamanho de partículas e viabilidade celular do probiótico acima de 6 log UFC/g após 600 dias a 23°C e umidade relativa de 23% enquanto as amostras de controle morreram durante o mesmo período de tempo (Librán, Castro, Lagaron, 2017).

A emulsificação consiste na encapsulação com o uso de hidrocolóides com um emulsificador e um surfactante, além de um endurecimento por adição de cloreto de cálcio. Nessa técnica, são muito utilizados os alginatos, pectinas e carragenas como material encapsulante, sendo seu principal benefício a simplicidade do processo comparado a outros métodos (Jankovic et al., 2010). Nourmohammadi, Soleimani-Zad e Shekarchizadeh (2020) estudaram a encapsulação por emulsificação de espirulina (prebiótico) em alginato e concentrado de proteína do soro de leite e a adição destas microcápsulas em iogurte desnatado. Em comparação com o iogurte contendo espirulina na forma livre, o iogurte contendo as microcápsulas de espirulina apresentou menor pós-acidificação durante o armazenamento, a capacidade de armazenamento de água e a susceptibilidade à sinérese foram melhoradas, aumentando assim a aceitação sensorial do produto.

A coacervação apresenta alguns benefícios exclusivos frente a outras técnicas de encapsulação, em especial pelo uso de temperaturas mais brandas, possibilidade de uso de

biopolímeros e um custo mais baixo por não utilizar solventes orgânicos. Este processo consiste na associação irreversível de dois polímeros solúveis em água como materiais encapsulantes. Um novo tipo de processamento que pode ser citado é a produção de probióticos microencapsulados com gomas e gelatinas que passam por um processo posterior de liofilização. Este processo é interessante devido a um ganho na proteção do microrganismo ao processo de digestão (Poletto et al., 2019). Holkem e Favaro-Trindade (2020) estudaram a formação de micropartículas lipídicas sólidas produzidas por coacervação complexa para proteção de *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e extrato de canela rico em proantocianidina obtendo partículas com grande eficiência de encapsulação e, após armazenamento por 120 à 7°C estas micropartículas ainda apresentavam grande quantidade dos materiais bioativos, mostrando ser possível a co-encapsulação de dois materiais bioativos com potencial aplicação em alimentos armazenados sob refrigeração tais como sucos, iogurtes e mousses.

A técnica de gelificação iônica é a mais popularmente utilizada, por não utilizar altas temperaturas ou solventes, apresenta um custo reduzido e condições de processo acessíveis. É importante considerar a secagem das microcápsulas a fim de aumentar sua resistência e dureza, além de permitir a remoção de água e distribuição ao longo do produto (Poletto et al., 2019). Poletto e colaboradores (2019) investigaram a influência da adição dos prebióticos farelo de arroz, inulina e milho na sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* em micropartículas de alginato obtidas por gelificação iônica externa seguida de liofilização. Obtendo micropartículas que apresentaram viabilidade do probiótico em simulação gastrointestinal e viabilidade após 30 dias de armazenamento a 25 °C e quando armazenadas a -18°C ou a 7°C os microrganismos permaneceram viáveis por 60 dias. Sendo o farelo de arroz o prebiótico que demonstrou maior correlação positiva com a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus*.

Na tecnologia que envolve fluido supercrítico na formação de partículas, existem diferentes técnicas aplicadas a diferentes finalidades, dentre elas destaca-se precipitação de gás antisolvente (GAS), partículas de solução saturada de gás (PGSS) e expansão rápida de solução supercrítica (RESS) e mais recentemente tem sido estudada a injeção assistida supercrítica em um antissolvente líquido (SAILA) e precipitação antissolvente supercrítica de biomoléculas em matriz oleosa (BIOSAS) (Quintana et al., 2022; Trucillo, Campardelli, 2019). Na formação de partículas via RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solutions*) um sólido é disperso em um fluido supercrítico e posteriormente expandido de forma rápida

através de um dispositivo de estrangulamento e, durante a expansão, pequenas partículas são formadas devido à diminuição abrupta do poder de solvatação do solvente (Helfgen, Türk, Schaber, 2003). Esta técnica apresenta diversas vantagens tais como o emprego de solvente com baixa toxicidade (CO₂), operação em temperaturas moderadas e em atmosfera livre de oxigênio que evita a degradação por oxidação da substância bioativa, além de alta seletividade do solvente mediante alterações de pressão e temperatura (Cocero et al., 2009; Tomasko et al., 2003). O tamanho das partículas formadas pode ser controlado, pois este varia de acordo com as condições de processo e com o comprimento e geometria dispositivo de estrangulamento (aspersores) (Debenedetti et al., 1993). Moolman e colaboradores (2006) estudaram a encapsulação indometacina e *Bifidobacterium longum* em um complexo de interpolímero poli (vinilpirrolidona) -poli (acetato de vinila-ácido co-crotônico), obtendo partículas estáveis em pH baixo, mas que se desintegram em pH elevado, desencadeando a liberação do material encapsulado o que torna o processo de encapsulamento adequado para consumo via oral. Não houve danos causados às bactérias pela exposição à alta pressão (300 bar).

No PGSS (*Particles from Gas Saturated Solutions*), dióxido de carbono supercrítico se dissolve em um líquido fundido ou polímero plastificado e em seguida sofre rápida expansão através de um bico resultando em partículas precipitadas. Nesta técnica, geralmente usa-se materiais com temperaturas de fusão relativamente baixas (Akbari et al., 2020). Esta tecnologia, bem como RESS, além de não envolver o uso de solventes orgânicos, dá origem a partículas prontas para aplicação que não requerem posterior etapa de secagem (Bittencourt, Aredo, Oliveira, 2021). Thantsha, Labuschagns e Mamvura (2014) estudaram a encapsulação de *Bifidobacterium lactis* e *Bifidobacterium longum* em um complexo interpolímero por meio de PGSS incrementando a viabilidade destas bactérias à 30 °C em até 7 semanas a mais do que as bactérias não encapsuladas. Potencialmente permitindo o fornecimento de uma formulação probiótica estável para comunidades empobrecidas sem instalações de armazenamento adequadas, pois estas ficam estáveis por um longo período de tempo em temperatura ambiente.

No processo GAS (*Gas Antisolvent*) ocorre a supersaturação de uma solução líquida por meio da dissolução do CO₂ supercrítico. Para isso, um soluto (imiscível em CO₂ supercrítico) é solubilizado em um solvente orgânico que deve ser completamente miscível com o fluido supercrítico. Por causa da miscibilidade gás-líquido, a solução se expande e o poder do solvente diminui. Além de um certo ponto, a solução torna-se supersaturada e segue-

se a precipitação. A solução é então expelida e o precipitado lavado com CO₂ para remover qualquer solvente residual (Arora et al., 2020).

3 Considerações finais

A suplementação ou a inclusão à dieta de alimentos enriquecidos em probióticos e/ou prebióticos auxiliam na prevenção de diversas doenças, inclusive doenças crônicas levando a população a alcançar maiores níveis de bem-estar. Esta inclusão pode ser feita de forma a não alterar sensorialmente os alimentos, pois estes bioativos podem ser microencapsulados por diferentes técnicas que promovem uma proteção satisfatória dos mesmos durante a passagem pelo trato gastro intestinal e possuem grande aceitação sensorial.

4 Referências

- ACIK, M. et al. Alternative source of probiotics for lactose intolerance and vegan individuals: sugary kefir. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 523-531, 2020.
- AGAH, S. et al. Systematic review with meta-analysis: Effects of probiotic supplementation on symptoms in functional dyspepsia. **Journal of Functional Foods**, v. 68, p. 103902, 2020.
- AKBARI, Z. et al. Application of supercritical fluid technology for preparation of drug loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 1, p. 13-33, 2020.
- ALARD, J. et al. Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1484-1497, 2016.
- ALOĞLU, H.; ÖNER, Z.. Assimilation of cholesterol in broth, cream, and butter by probiotic bacteria. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 9, p. 709-713, 2006.
- ANSARI, F. et al. Effect of microencapsulation on the development of antioxidant activity and viability of lactobacillus acidophilus la5 in whey drink during fermentation. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 9762-9771, 2021.
- ARAÚJO, E. A. **Desenvolvimento e Caracterização de Queijo tipo Cottage Adicionado de Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20 e de Inulina**. 2007. 54 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

- ARORA, D. et al. Precipitation of drug particles using a gas antisolvent process on a high-pressure microfluidic platform. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 59, n. 25, p. 11905-11913, 2020.
- BERNARDINI, S. et al. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural product research**, v. 32, n. 16, p. 1926-1950, 2018.
- BITTENCOURT, G.; AREDO, V.; DE OLIVEIRA, A. L. Behavior of beeswax and edible oils mixtures in supercritical carbon dioxide at moderate temperature. **Authorea Preprints**, 2021.
- BLAIOTTA, G. et al. Production of probiotic bovine salami using *Lactobacillus plantarum* 299v as adjunct. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 6, p. 2285-2294, 2018.
- BOHN, T. et al. Mind the gap—deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites—a position paper focusing on carotenoids and polyphenols. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 7, p. 1307-1323, 2015.
- BOSI, M. G. (2008). **Desenvolvimento de processo de fabricação de requeijão light e de requeijão sem adição de gordura com fibra alimentar**. 2008. 256 p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- BRASIL. Probióticos. Prebióticos e Simbióticos. **Revista Food Ingredients Brasil**, n. 17, p. 58-65, 2011.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília, DF, 2008.
- Brasil. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF, de 09 de janeiro de 2002.
<https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjIIMw%2C%2C>. Acesso em 08 de ago. de 2020.
- BRUNO, L. M. et al. Non-dairy cashew nut milk as a matrix to deliver probiotic bacteria. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 604-607, 2019.
- BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of food engineering**, v. 104, n. 4, p. 467-483, 2011.
- CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 13, p. 1546-1558, 2009.
- CAVALHEIRO, C. P. et al. Encapsulação: Alternativa para a aplicação de microrganismos probióticos em alimentos termicamente processados. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 5, p. 65-74, 2015.

- CHEN, J. J. et al. Bifidobacterium longum supplementation improved high-fat-fed-induced metabolic syndrome and promoted intestinal Reg I gene expression. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, n. 7, p. 823-831, 2011.
- CHITPRASERT, P.; SUDSAI, P.; RODKLONGTAN, A. Aluminum carboxymethyl cellulose–rice bran microcapsules: Enhancing survival of Lactobacillus reuteri KUB-AC5. **Carbohydrate polymers**, v. 90, n. 1, p. 78-86, 2012.
- COCERO, M. J. et al. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: fundamentals and applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 3, p. 546-555, 2009.
- COLOM, J. et al. Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.
- COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 442-457, 2016.
- COURI, S.; MATTA, V. M. (2020). Alimentos funcionais. Agência Embrapa de Informação Tecnológica.
https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid46tch02wyiv80z4s4735rgamba.html. Acesso em 08 ago. 2020.
- DA SILVA, M. N.; TAGLIAPIETRA, B. L.; DOS SANTOS RICHARDS, N. S. P. Encapsulation, storage viability, and consumer acceptance of probiotic butter. **LWT**, v. 139, p. 110536, 2021.
- DA SILVA-MARQUES, R. P. et al. Ruminal microbial populations and fermentation characteristics in beef cattle grazing tropical forage in dry season and supplemented with different protein levels. **Current microbiology**, v. 76, n. 3, p. 270-278, 2019.
- DAMIÁN, M. et al. Functional Foods, Nutraceuticals and Probiotics: A Focus on Human Health. **Microorganisms**, v. 10, n. 5, p. 1065, 2022.
- DE OLIVEIRA HAULY M. C., MOSCATTO J. A. Inulina e Oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, 23(1), 99-112, 2002.
- DEBENEDETTI, P. G. et al. Rapid expansion of supercritical solutions (RESS): fundamentals and applications. **Fluid Phase Equilibria**, v. 82, p. 311-321, 1993.
- DELZENNE, N. M. et al. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 11, p. 639-646, 2011.
- DORĐEVIĆ, V. et al. Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 4, p. 452-490, 2015.
- DOS SANTOS, D. X. et al. Improved probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in a mousse containing Lactobacillus acidophilus La-5 microencapsulated with inulin by spray drying. **LWT**, v. 99, p. 404-410, 2019.

- EVERARD, A. et al. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. *The ISME journal*, v. 8, n. 10, p. 2116-2130, 2014.
- FALFÁN-CORTES, R. N. et al. Characterization and Evaluation of the Probiotic Potential In Vitro and In Situ of *Lactobacillus paracasei* Isolated from Tenate Cheese. **Journal of Food Protection**, v. 85, n. 1, p. 112-121, 2022.
- FENSTER, K. et al. The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. **Microorganisms**, v. 7, n. 3, p. 83, 2019.
- FAO-Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. 2001. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>
- FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.
- FIGUEIREDO, F. C.; OLIVA-NETO, P. Advances and New Perspectives in Prebiotic, Probiotic and Symbiotic Products for Food Nutrition and Feed. **Hemicellulose Biorefinery: A Sustainable Solution for Value Addition to Bio-Based Products and Bioenergy**, p. 311-336, 2022.
- FINAMORE, A. et al. *Lactobacillus amylovorus* inhibits the TLR4 inflammatory signaling triggered by enterotoxigenic *Escherichia coli* via modulation of the negative regulators and involvement of TLR2 in intestinal Caco-2 cells and pig explants. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94891, 2014.
- FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British journal of Nutrition**, v. 87, n. S2, p. S287-S291, 2002.
- GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition research reviews**, v. 17, n. 2, p. 259-275, 2004.
- GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017.
- GOH, Y. J.; KLAENHAMMER, T. R. Genetic mechanisms of prebiotic oligosaccharide metabolism in probiotic microbes. **Annual review of food science and technology**, v. 6, p. 137-156, 2015.
- HELFGEN, B.; TÜRK, M.; SCHABER, K. Hydrodynamic and aerosol modelling of the rapid expansion of supercritical solutions (RESS-process). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 26, n. 3, p. 225-242, 2003.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, O. et al. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. **Food microbiology**, v. 30, n. 2, p. 355-361, 2012.

- HOLKEM, A. T.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Potential of solid lipid microparticles covered by the protein-polysaccharide complex for protection of probiotics and proanthocyanidin-rich cinnamon extract. **Food Research International**, v. 136, p. 109520, 2020.
- HUGHES, R. L. et al. The prebiotic potential of inulin-type fructans: a systematic review. **Advances in Nutrition**, v. 13, n. 2, p. 492-529, 2022.
- HUNGRIA, T. D.; LONGO, P. L.. Viabilidade de lactobacillus casei em alimento probiótico Infantil relacionada a vida-de-prateleira. **Revista Saúde-UNG-Ser**, v. 3, n. 3, p. 10-15, 2009.
- HURTADO-ROMERO, A. et al. Probiotic properties, prebiotic fermentability, and GABA-producing capacity of microorganisms isolated from Mexican milk kefir grains: a clustering evaluation for functional dairy food applications. **Foods**, v. 10, n. 10, p. 2275, 2021.
- ILLIPPANGAMA, A. U. et al. Inulin as a functional ingredient and their applications in meat products. **Carbohydrate Polymers**, v. 275, p. 118706, 2022.
- JANKOVIC, I. et al. Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 175-181, 2010.
- KADOOKA, Y. et al. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. **European journal of clinical nutrition**, v. 64, n. 6, p. 636-643, 2010.
- KARIM, Ahasanul; AIDER, Mohammed. Production of prebiotic lactulose through isomerisation of lactose as a part of integrated approach through whey and whey permeate complete valorisation: A review. **International Dairy Journal**, v. 126, p. 105249, 2022.
- KARIMI, R. et al. Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 119, p. 85-100, 2015.
- KAUR, N.; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of biosciences**, v. 27, n. 7, p. 703-714, 2002.
- KIM, B. et al. Protective effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG against dyslipidemia in high-fat diet-induced obese mice. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 473, n. 2, p. 530-536, 2016.
- KIM, Y. et al. Isolation of the cholesterol-assimilating strain *Pediococcus acidilactici* LRCC5307 and production of low-cholesterol butter. **Food Science of Animal Resources**, v. 41, n. 2, p. 300, 2021.
- KOLIDA, S; GIBSON, G. R. Synbiotics in health and disease. **Annual review of food science and technology**, v. 2, p. 373-393, 2011.

- KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 329-347, 2008.
- LEMUS-MONDACA, R. et al. Semillas de calabaza (Cucurbita máxima). Una revisión de sus propiedades funcionales y sub-productos. **Revista chilena de nutrición**, v. 46, n. 6, p. 783-791, 2019.
- LIAO, W.; SU, M.; ZHANG, D. A study on the effect of symbiotic fermented milk products on human gastrointestinal health: Double-blind randomized controlled clinical trial. **Food Science & Nutrition**, 2022.
- LIBRÁN, C. M.; CASTRO, S.; LAGARON, J. M. Encapsulation by electrospray coating atomization of probiotic strains. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 39, p. 216-222, 2017.
- LIBRÁN, C. M.; CASTRO, S.; LAGARON, J. M. Encapsulation by electrospray coating atomization of probiotic strains. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 39, p. 216-222, 2017.
- LICHT, T. R.; EBERSBACH, T.; FRØKIÆR, H.. Prebiotics for prevention of gut infections. **Trends in food science & technology**, v. 23, n. 2, p. 70-82, 2012.
- LIU, Z.; VINCKEN, J. P.; De BRUIJN, W. J. C. Tea phenolics as prebiotics. **Trends in Food Science & Technology**, 2022.
- MACEDO, L. N. et al. Efeito probiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 935-942, 2008.
- MAFRA, J. F. et al. Probiotic characterization of a commercial starter culture used in the fermentation of sausages. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 240-246, 2020.
- MARKOWIAK, P.; ŚLIŻEWSKA, K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1021, 2017.
- MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 5, p. 2578-2590, 2014.
- MARTINS, E. M. F. et al. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 764-770, 2013.
- MOOLMAN, F. S. et al. Encapsulating probiotics with an interpolymer complex in supercritical carbon dioxide: the CSIR at 60. **South African journal of science**, v. 102, n. 7, p. 349-354, 2006.
- NEFFE-SKOCIŃSKA, K. et al. The possibility of using the probiotic starter culture *Lactocaseibacillus rhamnosus* LOCK900 in dry fermented pork loins and sausages produced under industrial conditions. **Applied Sciences**, v. 10, n. 12, p. 4311, 2020.

- NINESS, Kathy R. Inulin and oligofructose: what are they?. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1402S-1406S, 1999.
- NITZKE, J. A. Alimentos funcionais: uma análise histórica e conceitual. **Curitiba: Appris**, p. 11-23, 2012.
- NOURMOHAMMADI, N.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; SHEKARCHIZADEH, H. Effect of Spirulina (*Arthrospira platensis*) microencapsulated in alginate and whey protein concentrate addition on physicochemical and organoleptic properties of functional stirred yogurt. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 14, p. 5260-5268, 2020.
- OLANO, A.; CORZO, N. Lactulose as a food ingredient. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 12, p. 1987-1990, 2009.
- OLIVEIRA, S. P. Alimentos funcionais: aspectos relacionados ao consumo. **Food Ingredients**, v. 19, 2002.
- OLIVEIRA, L.. Probióticos, prebióticos e simbióticos: definição, benefícios e aplicabilidade industrial. **Fundação do Centro Tecnológico de Minas Gerais**, 2014.
- OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications**, p. 279-289, 2002.
- PAHUMUNTO, N. et al. Fermented milk containing a potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* SD11 with maltitol reduces *Streptococcus mutans*: A double-blind, randomized, controlled study. **Journal of Dental Sciences**, v. 15, n. 4, p. 403-410, 2020.
- PANDEY, K. et al. Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 12, p. 7577-7587, 2015.
- PANESAR, P. S.; KUMARI, S. Lactulose: production, purification and potential applications. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 940-948, 2011.
- PARK, K.Y. et al. Health benefits of kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. **Journal of medicinal food**, v. 17, n. 1, p. 6-20, 2014.
- PARKER, E. A. et al. Probiotics and gastrointestinal conditions: An overview of evidence from the Cochrane Collaboration. **Nutrition**, v. 45, p. 125-134. e11, 2018.
- PATEL, S; GOYAL, A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. **3 Biotech**, v. 2, n. 2, p. 115-125, 2012.
- PIMENTEL, T. C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Aspectos funcionais, de saúde e tecnológicos de frutanos tipo inulina. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 30, n. 1, 2012.
- POLETTI, G. et al. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and different prebiotic agents by external ionic gelation followed by freeze-drying. **Ciência Rural**, v. 49, 2019.
- PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and global health**, v. 109, n. 7, p. 309-318, 2015.

- QUIGLEY, E. M. M. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. **Pharmacological research**, v. 61, n. 3, p. 213-218, 2010.
- QUINTANA, S. E. et al. Dispersion of bioactive substances in oils by supercritical antisolvent technology (BIOSAS process). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 77, p. 102972, 2022.
- RAIZEL, R. et al. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Ciência & Saúde**, v. 4, n. 2, p. 66-74, 2011.
- RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 42-46, 2015.
- RASTALL, R. A. et al. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. **FEMS microbiology ecology**, v. 52, n. 2, p. 145-152, 2005.
- RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food microbiology**, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2010.
- ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S2, p. S1-S63, 2010.
- ROBERFROID M. B. **Defining functional foods**. In: Gibson, G.R., Willians, C.M. (Ed.) *Functional foods: Concept to product*. England: Woodhead Publishing Limited, 1, 09-27. 2000.
- ROSELINO, M. N. et al. Effect of fermented sausages with probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 on gut microbiota using dynamic colonic model. **LWT**, v. 132, p. 109876, 2020.
- ROSELLI, M. et al. Prevention of TNBS-induced colitis by different *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains is associated with an expansion of $\gamma\delta$ T and regulatory T cells of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Inflammatory bowel diseases**, v. 15, n. 10, p. 1526-1536, 2009.
- RUIZ, J. N. et al. Physicochemical, microbiological and sensory assessments of Italian salami sausages with probiotic potential. **Scientia Agricola**, v. 71, p. 204-211, 2014.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-16, 2006.
- SCHREZENMEIR, J; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 2, p. 361s-364s, 2001.
- SHOAIB, M. et al. Inulin: Properties, health benefits and food applications. **Carbohydrate polymers**, v. 147, p. 444-454, 2016.

- SIANG, S. C. et al. Effect of added prebiotic (Isomalto-oligosaccharide) and coating of beads on the survival of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 601-609, 2019.
- SIMON, E. et al. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Implications and beneficial effects against irritable bowel syndrome. **Nutrients**, v. 13, n. 6, p. 2112, 2021.
- SOUZA, F. S. et al. Prebiotics, probiotics and symbiotics on prevention and treatment of allergic diseases. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, p. 86-97, 2010.
- STRINGHETA, P. C. et al. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 181-194, 2007.
- SWANSON, K. S. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 11, p. 687-701, 2020.
- TABATABAIE, F.; MORTAZAVI, A. Influence of Lactulose on the survival of probiotic strains in yoghurt. **World Applied Sciences Journal**, v. 3, n. 1, p. 88-90, 2008.
- TESHIMA E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 1, 35-60, 2003.
- THANTSHA, M. S.; LABUSCHAGNE, P. W.; MAMVURA, C. I. Supercritical CO₂ interpolymer complex encapsulation improves heat stability of probiotic bifidobacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 479-486, 2014.
- TOMASKO, D. L. et al. A review of CO₂ applications in the processing of polymers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 42, n. 25, p. 6431-6456, 2003.
- TOPPING, D. L.; FUKUSHIMA, M.; BIRD, A. R. Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 1, p. 171-176, 2003.
- TRABELSI, I. et al. Incorporation of probiotic strain in raw minced beef meat: Study of textural modification, lipid and protein oxidation and color parameters during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 154, p. 29-36, 2019.
- TRASANDE, L. et al. Food additives and child health. **Pediatrics**, v. 142, n. 2, 2018.
- TRUCILLO, P.; CAMPARDELLI, R. Production of solid lipid nanoparticles with a supercritical fluid assisted process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 143, p. 16-23, 2019.
- TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027-1031, 2006.
- VARAVALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; TESHIMA, E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. **Semina: Ciências biológicas e da saúde**, v. 29, n. 1, p. 83-104, 2008.

- WANG, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. **Food Research International**, v. 42, n. 1, p. 8-12, 2009.
- WANG, J. et al. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. **The ISME journal**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2015.
- WU, A. et al. Risk Factors and Therapeutic Interventions for Osteoporosis. **Canadian Journal of Medicine**, v. 3, p. 99-104, 2021.
- YADAV, M. K. et al. Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-17, 2022.
- YBARRA L. M, et al. Influência de probióticos e prebióticos na absorção de minerais. **Ferreira CLLF. Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa: Suprema, 79-102, 2003.
- ZEPEDA-HERNÁNDEZ, A. et al. Probiotics, prebiotics, and synbiotics added to dairy products: Uses and applications to manage type 2 diabetes. **Food Research International**, v. 142, p. 110208, 2021.
- ZHANG, Y. W. et al. The regulative effect and repercussion of probiotics and prebiotics on osteoporosis: involvement of brain-gut-bone axis. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-19, 2022.
- ZIMMER, F. C. et al. Obtainment, quantification and use of lactulose as a functional food—a review. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 515-521, 2017.
- ŽUNTAR, I. et al. Safety of probiotics: functional fruit beverages and nutraceuticals. **Foods**, v. 9, n. 7, p. 947, 2020.



**CAPÍTULO 2 Extrato de folhas de
alcachofra rico em
compostos bioativos –
Otimização do processo de
extração utilizando etanol
pressurizado e comparação
com outras técnicas**



Resumo

O coração e as flores imaturas da alcachofra são consumidos há centenas de anos para fins alimentares e fitoterápicos, por outro lado, suas folhas embora possuam diversos componentes que promovem benefícios à saúde, geralmente são consideradas resíduos da produção. Mas este cenário tende a mudar visto à crescente busca da indústria farmacêutica por princípios ativos naturais com efeitos colaterais reduzidos. Pesquisas vêm sendo realizadas com extratos de folhas de alcachofra, relatada como tendo ações benéficas ao fígado, sistema gastrointestinal, ação contra doenças crônicas como diabetes e anti-HIV, além de ser prebiótico. Este estudo teve como objetivo estudar o rendimento de extração e a composição dos extratos de folhas de alcachofra obtidos por quatro técnicas tradicionais de extração (maceração, Soxhlet, extração assistida por ultrassom e agitação magnética) e por extração com líquido pressurizado (PLE) em um processo intermitente com purga de solvente. Em todas as extrações utilizou-se o etanol como solvente e otimizou-se a extração PLE usando um planejamento experimental 2^{4-1} . Considerando o delineamento para PLE, os maiores resultados para rendimento de extrato seco (9,3%), teor de tanino (32,40mg/g) e atividade antioxidante (222,72 μ M Trolox/g) foram obtidos quando a extração foi realizada a 60 °C, enxague com 80 % do volume do extrator que equivale a aproximadamente 200 mL, tempo estático de 10 min e 5 ciclos. O maior teor de compostos fenólicos totais (54,88 mg EAG/g) e maior teor de inulina (107,07 mg inulina/g) foi obtido a 60 °C, tempo estático de 6 min, 5 ciclos e enxague com volume de solvente equivalente a 60 % do volume do extrator (~178 mL). Apenas a temperatura teve um efeito significativo no rendimento da extração e nenhuma das variáveis independentes teve efeito significativo nos outros parâmetros medidos. Todas as condições de extração e técnicas estudadas foram capazes de extrair inulina das folhas de alcachofra.

Keywords: *Cynara cardunculus* L., extração com líquido pressurizado, ABTS, planejamento experimental 2^{4-1} , métodos tradicionais de extração, inulina.

1 Introdução

A alcachofra (*Cynara cardunculus* L.) é uma planta herbácea perene, nativa da bacia do Mediterrâneo, pertencente à família Asteraceae e que tem sido utilizada desde a antiguidade como alimento e fitoterápico (Pandino, Mauromicale, 2019; Pérez-Esteve et al., 2018; Dias et al., 2018). Suas inflorescências imaturas são consumidas frescas, enlatadas ou congeladas, e suas folhas, caules e raízes são geralmente descartadas (Pandino et al., 2011). A produção mundial de alcachofra atinge aproximadamente 1678 Kton/ano (FAO, 2018), embora sua porção comestível represente apenas 15 % a 30 % da planta (essa variação ocorre dependendo do genótipo, clima, solo e condições de cultivo) (Gominho et al., 2018). Assim, 70% a 85% da biomassa da alcachofra é composta por folhas, caules e raízes, que geralmente são descartados como resíduos sólidos ou deixados no campo sem nenhum uso posterior (Francavilla et al., 2021). No entanto, essas partes da planta podem ser utilizadas como, por exemplo, uma excelente fonte de antioxidantes naturais, o que levaria a um melhor aproveitamento da planta e também benefícios econômicos (Pandino et al., 2011). As folhas de alcachofra são ricas em fibras, minerais, vitaminas, polifenóis e frutooligosacarídeos, como a inulina, que apresenta diversos benefícios nutricionais (Rodríguez et al., 2020; El Sayed et al., 2018). A inulina é um polissacarídeo de armazenamento natural que consiste em moléculas de frutose ligadas por ligações β -glicosídicas (2 \rightarrow 1) (Saleh et al., 2020; Causey et al., 2000), que não são digeridas por humanos, mas estimulam o crescimento e a atividade de microrganismos específicos, incluindo Lactobacillos e Bifidobactérias no cólon e, portanto, são considerados prebióticos (Singh, Singh, Larroche, 2019; Singh, Singh, Kennedy, 2016; Mabeau et al., 2006; Franck, 2002). Este polissacarídeo tem aplicações nas indústrias nutracêutica e farmacêutica também devido a outras propriedades benéficas à saúde, como digestibilidade, absorção de gordura e capacidade de ligação de água e minerais (Ruiz-Cano et al., 2014; Lattanzio et al., 2009; López -Molina et al., 2005).

O Formulário Brasileiro de Fitoterápicos (Brasil, 2011) recomenda a ingestão diária de tintura de folha de alcachofra devido à sua atividade antidispéptica, antifatulenta, antiemética, diurética e antiaterosclerótica, e também como agente coadjuvante no tratamento de hipercolesterolemia leve a moderada e síndrome do intestino irritável. De acordo com a literatura, essa tintura também apresenta propriedades hepatoprotetoras, antibióticas, antifúngicas, antioxidantes, anticancerígenas, anti-inflamatórias e antidiabéticas além de efeitos coleréticos e colagogos (Aguilera, Martin-Cabrejas, González de Mejia, 2016; Soto et

al., 2014; Zuorro, Maffei, Lavecchia, 2014; Pereira et al., 2013; Pandino et al., 2012; Shukla e Gupta, 2010; Lattanzio et al., 2009; Mabeau et al., 2006; Rodriguez et al., 2002).

Pesquisadores do Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN) da Universidade de São Paulo vêm buscando otimizar o processo de extração de produtos que podem ser obtidos industrialmente. Em 2014, foi realizado o primeiro estudo de otimização do processo de extração de polifenóis das sementes de Pitanga, produto residual da indústria alimentícia (Santos et al., 2015). Desde então, diversos estudos envolvendo a obtenção de extratos vegetais ricos em atividade antioxidante e antimicrobiana e compostos fenólicos têm sido realizados utilizando a técnica de extração com líquido pressurizado (PLE), como, por exemplo, pesquisas com Araçá (*Psidium grandifolium* Mart. ex DC.) (Bittencourt et al., 2019) e com Cambuci (*Campomanesia phaea*) (Firmiano, Bittencourt, Oliveira, 2019).

O PLE consiste em extração sólido-líquido com e sem purga intermitente de solvente. Quando o PLE ocorre em um processo contínuo, a vazão do solvente normalmente varia de 0,33 a 2,5 mL/min em equipamentos de escala laboratorial. Neste processo de extração, utiliza-se alta temperatura (até 200°C) com altas pressões (de 4 a 20 MPa) e tempos geralmente reduzidos (de 2 a 30 min) quando o processo ocorre com purga intermitente do solvente (Alvarez-Rivera, 2020; Andreu, Picó, 2019; Osorio-Tobón, Meireles, 2013).

O princípio de funcionamento do PLE se concentra no controle da viscosidade e difusividade do solvente utilizado a partir de variáveis como temperatura. Extrações com solventes acima de sua temperatura de ebulição (à pressão atmosférica) são possíveis através do uso de altas pressões. Nessas condições, o solvente apresenta maior difusividade e menor viscosidade, o que facilita a difusão do solvente na matriz, tornando as extrações mais rápidas (Alvarez-Rivera, 2020; Mustafa, Turner, 2011).

Quando desenvolvido como técnica de preparação analítica, o PLE foi amplamente utilizado para extração de poluentes orgânicos e herbicidas de amostras sólidas, bem como para análise e extração de agrotóxicos em tubérculos e alimentos. Por ser uma técnica de extração muito eficiente, o PLE possibilita a extração de analitos em quantidades muito pequenas em amostras, como toxinas presentes em cafés, peixes e cacau (Andreu, Picó, 2019; Conte et al, 2016; Khan et al, 2018; Pallaroni, Von Holst , 2004, Richter et al., 1996).

Além do uso para identificar pequenas quantidades de herbicidas e contaminantes em solos e alimentos, a técnica de extração com líquido pressurizado passou a ser utilizada para obter extratos de plantas, de sementes e grãos, dentre outros (Alvarez-Rivera, 2020).

Devido à sua eficiência na extração, o PLE começou a ser estudado como uma técnica de produção de extratos de plantas com propriedades fitoterápicas. O apelo ambiental por tecnologias menos agressivas ao meio ambiente, somado ao fato de o etanol ser considerado um solvente seguro e sustentável, fez com que o estudo de sua aplicação para futuras substituições industriais recebesse reconhecimento (Rajakaruna et al., 2022; Hirondart et al., 2020).

Desta forma, buscando utilizar recursos seguros e de baixo custo para a produção de substâncias biologicamente ativas, este estudo visou otimizar um processo de extração de inulina (prebiótico natural) de folhas de alcachofra, subproduto residual da produção de alcachofra para fins alimentares. Nesse sentido, estudou-se uma tecnologia inovadora (PLE) e os extratos obtidos foram comparados com aqueles extraídos por metodologias tradicionais, como agitação magnética, extração assistida por ultrassom, maceração e soxhlet. Pois estudos mostram que a eficiência de extração, e consequentemente a propriedades dos extratos, é afetada por fatores como: técnica de extração, temperatura empregada, tempo de contato entre o solvente e a matriz e número de ciclos (Guemghar et al., 2020; Brás et al., 2015).

2 Material e Métodos

2.1 Caracterização da matéria-prima

Folhas de alcachofra (*Cynara cardunculus* L.) foram coletadas manualmente em uma fazenda localizada no município de Piedade, região centro-leste do estado de São Paulo, na latitude 23° 42' 41" Sul, longitude 47° 25' 8" Oeste, e altitude de 776 m (Cidade-Brasil, 2020). Após a coleta, as folhas foram picadas, colocadas em bandejas, secas em estufa de circulação forçada de ar a 45°C até peso constante, trituradas em liquidificador (WALITA, Ri 1710, Varginha, Brasil), acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas a -22°C (Figura 1).

A composição centesimal da amostra foi calculada pela determinação da matéria seca, proteína bruta, fibra bruta, cinzas e extrato etéreo de acordo com as metodologias descritas pela *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC, 2005).

Para caracterizar o leito fixo de extração, foram determinadas as densidades real e aparente e a porosidade do leito. A densidade real ou massa específica da amostra foi estabelecida usando um picnômetro de gás hélio (Quantachrome Ultrapyc 1200e, FL, EUA) e uma balança analítica (Quimis, modelo QI-AS, EUA) no Centro Analítico do Instituto de

Química da Universidade Estadual de Campinas - IQ/UNICAMP. A porosidade do leito foi calculada pela razão entre a densidade aparente e a densidade real.

Figura 1. Processamento das folhas de alcachofra no laboratório. (A) folhas inteiras *in natura*, (B) folhas sendo picadas para facilitar a secagem, (C) folhas de alcachofras secas e trituradas, (D) extrato seco de folha de alcachofra obtido por extração com líquido pressurizado utilizando etanol como solvente.



2.2 Obtenção de extratos de folha de alcachofra

De acordo com o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, uma tintura é definida como uma preparação alcoólica ou hidroalcoólica resultante da extração de drogas vegetais ou animais. A tintura de *Cynara cardunculus* L. é obtida de folhas secas e é prescrita como antidiarréico, antiflatulento, diurético e antiaterosclerótico, com dosagem indicada para adultos de 2,5 a 5 mL diluídos em 75 mL de água três vezes ao dia (Brasil, 2011). O uso de tinturas vegetais como medicamento pode ser considerado um método natural e de baixo custo para o tratamento de doenças crônicas na população brasileira.

Para comparar uma tecnologia emergente com as tradicionalmente utilizadas, foram obtidas tinturas de folhas de alcachofra por extração com líquido pressurizado (PLE), Soxhlet (SOX), maceração (MAC), extração assistida por ultrassom (ULT) e agitação magnética (MAG), sempre utilizando etanol (99,5%, Êxodo Científica, Sumaré, Brasil) como solvente por ser considerado seguro para a saúde e para evitar interferências no resultado causadas pela variação do solvente.

Quatro variáveis de controle foram utilizadas no PLE (temperatura - T, volume do solvente utilizado no enxágue da célula de extração - V, tempo de contato entre o solvente e a matriz em cada ciclo, denominado tempo estático - TE e o número de ciclos, ou número de bateladas - C). Um planejamento fatorial 2^{4-1} foi adotado para avaliar o efeito de cada variável

de processo nos rendimentos de extrato e na composição de seus compostos bioativos primários (Rodrigues e Iemma, 2005). A Tabela 1 mostra o planejamento fatorial fracionário com as variáveis codificadas, seguidas de seus valores reais entre parênteses.

Tabela 1. Delineamento fatorial fracionário 2^{4-1} para otimização do processo de extração com solvente pressurizado (variáveis codificadas).

Ensaio	T (°C)	V (%)	TE (min)	C (n°)
1	-1 (40)	-1 (60)	-1 (6)	-1 (3)
2	+1 (60)	-1 (60)	-1 (6)	+1 (5)
3	-1 (40)	+1 (80)	-1 (6)	+1 (5)
4	+1 (60)	+1 (80)	-1 (6)	-1 (3)
5	-1 (40)	-1 (60)	+1 (10)	+1 (5)
6	+1 (60)	-1 (60)	+1 (10)	-1 (3)
7	-1 (40)	+1 (80)	+1 (10)	-1 (3)
8	+1 (60)	+1 (80)	+1 (10)	+1 (5)
9	0 (50)	0 (70)	0 (8)	0 (4)
10	0 (50)	0 (70)	0 (8)	0 (4)
11	0 (50)	0 (70)	0 (8)	0 (4)
12	0 (50)	0 (70)	0 (8)	0 (4)

T = temperatura, V = volume de solvente, TE = tempo estático, C = número de ciclos

A tecnologia de extração com líquido pressurizado acelera o processo de extração convencional usando um baixo volume de solvente a pressão e temperatura controladas, a fim de manter o solvente em estado líquido durante a extração, mesmo quando são aplicadas altas temperaturas. A manutenção do solvente no estado líquido só é possível devido à alta pressão (10,3 MPa) exercida pelo equipamento.

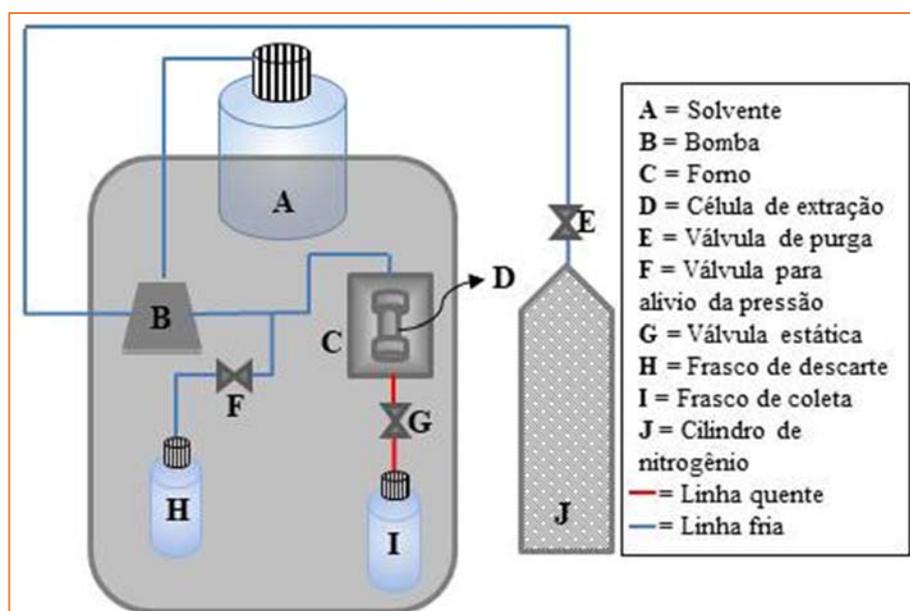
Este equipamento, representado na Figura 2, opera em bateladas, intercalando extração dinâmica e tempo de contato estático entre a matriz vegetal e o solvente; ao final de cada ciclo, o extrato é direcionado para um recipiente de coleta. O tempo de contato estático entre o solvente e a amostra é importante para que ocorra o equilíbrio osmótico entre a matriz e o solvente e para que a extração seja mais eficiente.

A extração Soxhlet (SOX) foi realizada com 5 g de amostra por um período de 6 horas, com cada ciclo de retorno do solvente com duração média de 6 min e 25 s. A extração por maceração foi realizada adicionando 20 g de folhas de alcachofra moídas desidratadas a 100 mL de etanol (99,5%, Êxodo Científica, Sumaré, Brasil), que foi agitado diariamente com bastão de vidro por 7 dias; durante o período de extração, a mistura foi armazenada ao abrigo da luz. As extrações ULT e MAG foram realizadas usando 20 g de amostra e 100 mL de etanol (99,5%, Êxodo Científica, Sumaré, Brasil) e agitação por 20 min. Utilizou-se

equipamento de ultrassom Ultronique Q 3.0–40 (Tecnal, Indaiatuba, Brasil) e um agitador magnético microcontrolado TE080 (Tecnal, Indaiatuba, BR) para ULT e MAG, respectivamente. Com exceção da extração Soxhlet, a relação massa da amostra/volume de solvente (20 g/100 mL) foi mantida a mesma em todos os métodos.

Todas as tinturas de folhas de alcachofra obtidas pelos diferentes métodos foram rotoevaporadas para remoção do etanol. A partir de então, passaram a ser denominados extratos de folhas de alcachofra.

Figura 2. Esquema do extrator PLE utilizado neste trabalho.



Fonte: Bittencourt, G. M. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de araçá (*Psidium Grandifolium Mart. Ex DC.*) obtidos por líquido pressurizado (PLE) e por fluido supercrítico (SFE). 2018. 116 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

2.3 Caracterização dos extratos de folhas de alcachofra

2.3.1 Atividade antioxidante pelo método do radical ABTS

A atividade antioxidante (AA) dos extratos foi determinada pelo método de captura do radical livre ABTS descrito por Rufino e colaboradores (2007), na qual a partir da solução padrão de Trolox (Aldrich Chemistry, Steinheim, GE) (2.000 M) foram preparadas soluções variando a concentração de 100 mg/L a 1.500 mg/L com etanol (99.5%, Exodo Científica, Sumaré, Brasil). Em seguida, as leituras foram feitas em espectrofotômetro (Genesys 10s UV-Vis, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), no comprimento de onda de 734 nm, em

alíquotas de 30 µL de cada concentração de solução de Trolox preparada, gerando assim uma curva padrão que originou um modelo de primeira ordem ajustado aos valores experimentais, que foi utilizado para calcular a atividade antioxidante das tinturas de folhas de alcachofra obtidas pelos diferentes métodos/condições de extração.

Cinco diferentes diluições foram preparadas em triplicata para cada um dos extratos etanólicos de folhas de alcachofra (1.000, 2.000, 3.000, 4.000 e 5.000 mg/L). Em ambiente escuro, uma alíquota de 30 µL de cada diluição do extrato foi transferida para tubos de ensaio contendo 3,0 mL de radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (Sigma Life Science, Steinheim, GE), que foram homogeneizados em um agitador de tubos. As leituras (734 nm) foram realizadas após 6 min de mistura, e o álcool etílico foi usado como branco para calibrar o espectrofotômetro.

Após a obtenção dos dados de absorvância para as diferentes diluições do extrato, foi traçado um gráfico com a absorvância no eixo das ordenadas e a diluição (mg/L) no eixo das abcissas. Em seguida, foi gerado o modelo de primeira ordem que melhor se ajustava aos valores experimentais.

2.3.2 Compostos Fenólicos Totais (reativos ao Folin-Ciocalteu)

As concentrações dos compostos fenólicos reativos ao Folin-Ciocalteu presentes nos extratos foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965), na qual adicionou-se 1 mL do extrato diluído em metanol (1,0 mg/mL) a 5 mL de solução reagente de Folin-Ciocalteu (Êxodo Científica, Hortolândia, Brasil) diluído em água destilada (10%). Após 10 min de contato, 4 mL de uma solução aquosa contendo 7,5% de carbonato de sódio anidro (Synth, Diadema, Brasil) foi adicionado à mistura.

Após permanecerem no escuro por 2 h, as amostras foram colocadas em cubetas paralelepípedicas de quartzo medindo 1 cm × 1 cm de área de base e 4,3 cm de altura, e as medidas de absorvância foram realizadas usando um espectrofotômetro (Genesys 10s UV-Vis, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) sob comprimentos de onda de 760 nm. A amostra controle foi preparada e analisada de forma idêntica às demais amostras, embora tenha sido aplicado 1 mL de metanol em vez de 1 mL da solução de extrato.

Para expressar as absorvâncias medidas nas análises de forma equivalente em ácido gálico (EAG), foi construída uma curva padrão utilizando soluções desse ácido (Êxodo Científica, Sumaré, Brasil) em diferentes concentrações, que foram analisadas da mesma

forma que as amostras, diferindo apenas pelo uso de 1 mL de solução de ácido gálico na reação com o reagente de Folin-Ciocalteu ao invés do extrato diluído. Todas as reações, tanto com amostras quanto na construção da curva padrão, foram realizadas em triplicata.

2.3.3 Quantificação de taninos condensados

O teor de taninos (TT) nas amostras foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Lhuillier (2007) na qual 0,05 g de extrato de folha de alcachofra foi adicionado a uma mistura contendo 16,25 mL de clorofórmio (Sigma/Aldrich, Duque de Caxias, Brasil) e 1,3 mL de metanol (AppliChem/PanReac, Barcelona, Espanha), a solução resultante foi homogeneizada com auxílio de um agitador de tubos. Após homogeneização, a solução foi armazenada em geladeira por um período de 3 a 4 horas. Posteriormente, foi centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos e filtrado a vácuo com filtro de PTFE com poros de 0,45 µm (Sartorius, Goettingen, GE). A massa retida no filtro foi pesada e o teor de taninos foi determinado pela razão entre a massa retida e a massa da amostra utilizada.

2.3.4 Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada para avaliar a presença de inulina nos extratos de folhas de alcachofra obtidas pelos diferentes métodos e condições de extração. Para isso, cromatoplasmas de alumínio TLC sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram usadas como fase estacionária. Os extratos foram diluídos em água destilada na concentração de 200 mg/mL e a inulina comercial (Homeopatia Ouro Preto, Pirassununga, Brasil) foi utilizada como controle no ensaio, porém na concentração de 2,5 mg/mL.

Uma solução de Propanol:Butanol:Água (12:4:3) (Propanol: 99,9%, Dinâmica, Indaiatuba, Brasil; Butanol: 99,9%, Dinâmica, Indaiatuba, Brasil) foi utilizada como fase móvel. Após a eluição das cromatoplasmas, preparou-se um revelador com Anilina:Difenilamina:Ácido Fosfórico:Acetona (1:1:5:5) (Anilina: Dinâmica, Indaiatuba, Brasil; Difenilamina: Dinâmica, Indaiatuba, Brasil; Ácido Fosfórico: Êxodo Científica, Sumaré, Brasil; Acetona: Êxodo Científica, Sumaré, Brasil) e as placas foram colocadas em estufa a 105 °C por 5 min para que ocorresse a reação entre o revelador e a amostra eluída.

O fator de retenção (F_r), que relaciona a distância percorrida pelas bandas com a distância percorrida pela fase móvel (equação A), foi calculado para cada extrato e para o controle de inulina aplicado a cada cromatoplaça e os valores foram comparados entre si.

$$F_r = \frac{\text{distância percorrida pela substância (cm)}}{\text{distância percorrida pela fase móvel (cm)}} \quad (A)$$

2.3.5 Quantificação do teor de inulina

A quantificação do teor de inulina (TI) foi realizada por espectrofotometria. Inicialmente, uma solução contendo 1 mL de extrato diluído em água ultrapura na concentração de 100 mg/mL, 2 mL de solução de Sulfato de Zinco 10% (Êxodo Científica, Sumaré, Brasil), 5 mL de água ultrapura e 2 mL de solução de NaOH 0,5 M (Êxodo Científica, Sumaré, Brasil) foi filtrada a vácuo com um filtro de PTFE com poros de 0,45 μm (Sartorius, Goettingen, Alemanha) para gerar uma solução cristalina. À parte, foi preparada uma solução contendo 0,5 g de vanilina (Êxodo Científica, Sumaré, Brasil) e 50 mL de água ultrapura em temperatura de ebulição, protegida da luz.

Na segunda etapa, 2 mL da solução filtrada foram adicionados a 0,8 mL de solução de vanilina e agitados em agitador de tubos por 15 s, adicionou-se então 2,2 mL de ácido sulfúrico, com densidade de 1,84 g/mL, a 25 °C (Química Moderna, Barueri, Brasil) e agitou-se novamente por 15 s. A solução formada foi fervida por 2 min e rapidamente resfriada em banho de gelo por mais 2 min. Por fim, a solução foi armazenada por 15 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz e a leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Genesys 10s UV-Vis, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) com comprimento de onda de 520 nm.

Uma curva padrão de 8 pontos foi construída utilizando inulina comercial (Homeopatia Ouro Preto, Pirassununga, Brasil).

2.4 **Análise Estatística**

Os resultados obtidos no presente estudo estão expressos como média \pm desvio padrão para as análises realizadas em triplicata. Os dados do delineamento experimental foram avaliados estatisticamente por ANOVA, e os modelos significativos ajustados aos dados

experimentais geraram os gráficos de contorno para o delineamento 2⁴⁻¹ no software Statistica 13.5[®].

3 Resultados e Discussão

3.1 Caracterização da matéria-prima e do leite fixo de extração

Os teores de matéria seca, material mineral, proteína bruta, fibra bruta, extrato etéreo e extrato não nitrogenado das folhas de alcachofra estão apresentados na Tabela 2 e são expressos em g/100 g de base seca.

Tabela 2. Composição centesimal de folhas secas de alcachofra trituradas expressas em base seca

Análise	Média (g/100g folhas secas)
Umidade	9,14 ± 0,08
Cinzas	15,08 ± 0,08
Proteína	18,00 ± 0,58
Fibra bruta	17,77 ± 0,18
Extrato etéreo	3,00 ± 0,01
Extrato não-nitrogenado	46,16 ± 0,08

A caracterização de extratores de leite fixo é importante, pois leitos com propriedades distintas promovem diferentes condições de extração, pois alteram a forma como o solvente permeia a matéria-prima. A densidade aparente das folhas de alcachofra secas e moídas, determinada pela realização de 10 repetições, foi de 1,84 ± 0,05 g/cm³; a densidade real, medida em quintuplicata por picnometria de gás hélio, foi de 1,27 ± 0,01 g/cm³, e a porosidade do leite calculada foi de 0,69. A porosidade do leite, também conhecida como fração de vazios, é influenciada por diversos fatores, como tamanho, forma e rugosidade das partículas que o compõem, bem como a relação entre o diâmetro das partículas e o tamanho e forma do leite fixo do extrator (Tadini, Telis, de Almeida Meirelles, 2016). A porosidade fornece informações para outros estudos ou para futuros escalonamentos, pois é um parâmetro que caracteriza o leite fixo. Valores de porosidade menores que 1 permitem um bom contato entre a superfície das partículas e o solvente, o que favorece a migração do soluto da matriz para o solvente (Bittencourt et al., 2019; de Oliveira et al., 2019).

3.2 Estudo de obtenção de extrato de folhas de alcachofra

O rendimento (R) de todas as técnicas de extração estudadas foi calculado pela razão entre a massa do extrato seco (sem solvente) e a massa seca das folhas de alcachofra utilizadas. O teor de compostos fenólicos totais (TCF) foi determinado para compostos reativos ao reagente de Folin-Ciocalteu seguindo a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965), o teor de tanino (TT) foi definido de acordo com o método utilizado por Lhuillier (2007), a atividade antioxidante (AA) foi determinada pela metodologia de captura de radical ABTS descrita pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) (Rufino et al., 2007).

3.2.1 Métodos Tradicionais

As tinturas das folhas de alcachofra foram extraídas por quatro métodos tradicionais, sendo três extrações a frio (agitação magnética, extração assistida por ultrassom e maceração) e uma com emprego de calor (Soxhlet).

Todas as análises realizadas nos extratos foram em triplicata e as médias dos resultados para rendimento, TCF, TT, AA e TI, bem como seus desvios padrão, estão apresentados na Tabela 3.

O teor de compostos fenólicos totais nos extratos foi calculado usando a seguinte equação: $y = 10,915x + 0,004$, onde y representa a absorvância medida e x é o equivalente em concentração de ácido gálico. Essa equação foi obtida pela construção de uma curva padrão de 5 pontos com coeficiente de regressão de 0,99. Para o cálculo da atividade antioxidante dos extratos, foi criada uma curva padrão de Trolox de 5 pontos, que gerou o modelo de primeira ordem $y = -3466,7x + 2462,8$, com coeficiente de regressão de 0,99, onde x é a absorvância medida e y é a atividade antioxidante expressa em μM de Trolox. O modelo de primeira ordem $y = 0,1486x + 0,142$, baseado em 8 pontos, com coeficiente de regressão de 0,99, representa a curva padrão para inulina e foi utilizado para calcular o teor de inulina nos extratos, onde y é a absorvância medida e x é a concentração de inulina expressa em mg/g de solução. Os resultados obtidos foram convertidos em mg de inulina/ g de extrato para favorecer futuras comparações.

Tabela 3. Análise de extratos de folhas de alcachofra obtidos por diferentes métodos usando etanol como solvente. Resultados expressos por g de extrato.

Ensaio	T (°C)	V (%)	TE (min)	C (n°)	Rendimento (%)	TCF (mg EAG/g)	TT (mg/g)	AA (µM trolox/g)	TI (mg inulina/g)
MAC	-	-	7 days*	-	8,02 ± 0,18	30,84 ± 3,30	48,82 ± 7,46	74,37 ± 0,98	124,30 ± 2,62
SOX	-	-	6 hours*	-	14,71 ± 0,45	38,99 ± 4,33	206,20 ± 36,24	107,19 ± 1,22	173,46 ± 1,27
MAG	-	-	20	-	3,80 ± 0,28	30,42 ± 2,80	49,65 ± 4,17	72,60 ± 0,11	103,03 ± 3,55
ULT	-	-	20	-	3,83 ± 0,34	32,86 ± 2,68	23,97 ± 5,52	68,70 ± 1,43	134,21 ± 4,13
PLE 1	40	60 (~178 mL)	6	3	6,12	98,01	5,20	161,46	38,29 ± 2,83
PLE 2	60	60 (~178 mL)	6	5	7,58	104,30	8,32	208,44	120,10 ± 0,57
PLE 3	40	80 (~200 mL)	6	5	5,87	92,23	2,40	171,62	65,19 ± 5,39
PLE 4	60	80 (~200 mL)	6	3	8,31	102,46	5,34	177,20	94,22 ± 8,69
PLE 5	40	60 (~178 mL)	10	5	7,28	102,13	6,56	180,72	46,11 ± 3,33
PLE 6	60	60 (~178 mL)	10	3	7,02	103,46	7,51	196,37	46,65 ± 2,99
PLE 7	40	80 (~200 mL)	10	3	5,78	101,63	5,85	155,36	66,33 ± 9,69
PLE 8	60	80 (~200 mL)	10	5	9,37	103,13	7,78	222,72	69,11 ± 4,71
PC*	50	70 (~189 mL)	8	4	6,83 ± 0,37	102,10 ± 5,38	4,90 ± 1,30	208,86 ± 28,35	83,66 ± 2,79

MAC = Maceração, SOX = Soxhlet, MAG = Agitação Magnética, ULT = Extração Assistida por Ultrassom, T = Temperatura, V = Volume de solvente, TE = Tempo Estático, C = Número de ciclos, TCF = Teor de Compostos Fenólicos, TT = Teor de Taninos, AA = Atividade Antioxidante, TI = Teor de Inulina, EAG = Equivalente em Ácido Gálico.

A metodologia de extração tradicional que apresentou os melhores resultados em todos os parâmetros analisados foi Soxhlet, apresentando um rendimento 287% superior ao obtido por agitação magnética (menor rendimento) e 87% superior ao obtido por maceração (segundo maior rendimento). O teor de compostos fenólicos quantificados no extrato obtido por extração Soxhlet das folhas de alcachofra foi, em média, 24% superior ao encontrado nas demais técnicas tradicionais. Além disso, TT e AA foram, em média, 400% e 49% maiores, respectivamente, do que os medidos nas tinturas de folhas de alcachofra obtidas por maceração, agitação magnética e extração assistida por ultrassom. Em relação ao teor de inulina (TI) dos extratos, a quantidade obtida pela extração Soxhlet também foi superior aos demais métodos, com TI 30% maior do que o encontrado nos extratos obtidos por extração assistida por ultrassom, 40% superior aos teores mensurados nos extratos obtidos por maceração e 70% superiores aos teores dos extratos por agitação magnética. Os maiores valores de todas as variáveis analisadas podem ter ocorrido devido à maior relação massa/solvente utilizada neste processo de extração. Além disso, altas temperaturas foram aplicadas e, devido às particularidades da técnica, o solvente não ficou saturado como nas outras técnicas, pois o solvente que entra em contato com a matriz vegetal em cada ciclo é sempre o solvente destilado. No entanto, esta tecnologia envolve custos de processo significativos devido ao alto gasto energético necessário para manutenção da temperatura e longos períodos de extração, além de possivelmente favorecer a extração de compostos indesejáveis ou mesmo antinutricionais.

Estudo realizado por Boffo e colaboradores (2022) com obtenção de extratos de folhas de alcachofra com etanol comparando técnicas de extração por soxhlet, maceração e infusão também apresentou rendimentos em extrações SOX consideravelmente superiores aos mensurados pelas demais técnicas. Guemghar e colaboradores (2020) estudaram a otimização da extração de compostos fenólicos de folhas de alcachofra utilizando extração assistida por micro-ondas e etanol como solvente, obtendo TCF de $37,43 \pm 1,26$ mg EAG/g na condição otimizada. Stumpf e colaboradores (2020) avaliaram TCF de extratos de folhas de alcachofra obtidos por 3 métodos distintos, extração de acordo com a farmacopeia europeia, extração assistida por ultrassom e extração com água quente, os resultados obtidos para os extratos moídos em moedor de café foram, respectivamente, $27,7 \pm 1,4$ mg EAG/g, $28,6 \pm 1,6$ mg EAG/g e $25,0 \pm 1,4$ mg EAG/g. O que mostra que os resultados obtidos no presente trabalho estão dentro do esperado de acordo com a literatura.

3.2.2 Extração com Líquido Pressurizado

A extração com líquido pressurizado (PLE) foi realizada utilizando etanol 99,5% (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil) como solvente e quatro variáveis de controle foram analisadas: temperatura (T), volume de solvente de enxágue (V), tempo estático (TE) e número de ciclos (C). Uma sequência de planejamento fatorial (2^{4-1}) foi adotada para avaliar o efeito de cada variável de processo no rendimento dos extratos e na composição de seus principais bioativos.

Os resultados obtidos em relação ao rendimento, teor de compostos fenólicos totais, teor de tanino e atividade antioxidante para os extratos de folhas de alcachofra obtidos por PLE são apresentados na Tabela 3.

O teor de compostos fenólicos reativos a Folin-Ciocalteu nos extratos foi calculado usando a equação ajustada à curva padrão $y = 8,988x - 0,048$, onde y representa a absorbância medida e x é o equivalente em concentração de ácido gálico. Essa equação foi obtida construindo uma curva padrão de 10 pontos com coeficiente de regressão de 0,99. Para calcular a atividade antioxidante dos extratos, foi construída uma curva padrão de Trolox de 5 pontos, que gerou o modelo de primeira ordem $y = -4159,5x + 2607,2$, com coeficiente de regressão de 0,99, em que x representa a absorbância medida e y é a atividade antioxidante em μM de Trolox.

Comparando os resultados apresentados na Tabela 3 tanto para os extratos obtidos por PLE quanto para aqueles extraídos por métodos tradicionais, nota-se que os rendimentos de extração dos extratos obtidos por PLE foram, em média, similares aos obtidos por maceração. Em relação ao TCF, os valores medidos nos extratos obtidos por PLE foram de 151% a 243% superiores aos medidos nos extratos de folha de alcachofra obtidos pelos quatro métodos tradicionais analisados. O TT nos extratos de PLE foi, em média, uma ordem de magnitude menor que o TT dos extratos obtidos por MAC, MAG e ULT, e duas ordens de magnitude menor que o TT dos extratos obtidos por SOX. Embora os taninos sejam uma classe de compostos fenólicos, o TT foi superior nos extratos obtidos por métodos tradicionais. Em contrapartida, o TCF reativo a Folin-Ciocalteu foi maior nos extratos obtidos por PLE, fato que provavelmente está relacionado ao alto peso molecular dos taninos quando comparados a outros compostos fenólicos.

A AA dos extratos obtidos por PLE foi superior à mensurada nos extratos obtidos por todas as técnicas tradicionais estudadas, sendo o extrato obtidos por SOX o que apresentou AA mais próxima da observada nos extratos obtidos por PLE. Em relação ao TI, os valores

das variáveis independentes utilizadas no delineamento experimental do PLE não foram eficazes na extração de inulina das folhas de alcachofra, sendo que apenas uma condição de extração (60°C, 60% volume de solvente, TE de 6 min e 5 ciclos) foi capaz de extrair TI semelhante aos obtidos pelas técnicas tradicionais.

De acordo com Zeaiter et al. (2019), as folhas de alcachofra possuem $4,70 \pm 1,21$ g de inulina para cada 100 g de matéria seca da planta. No presente estudo, o teor de inulina extraída por SOX foi de $2,55 \pm 0,02$ g de inulina por 100 g de folhas secas e, por PLE, $0,91 \pm 0,01$ g para a mesma massa de matéria-prima. Sihem et al. (2015), analisando os cultivares Violet d'Hyères e Blac d'Oran de alcachofra encontrou nos extratos das folhas $10.51 \pm 2,07$ mg EAG/g matéria vegetal seca e 8.45 ± 1.26 mg EAG/g matéria vegetal seca, respectivamente, resultados próximos ao obtido neste trabalho no extrato obtido pela condição 8 do delineamento experimental 2^{4-1} utilizado para o PLE que foi de 9.66 mg EAG/g matéria vegetal seca.

Para verificar se as variáveis de processo estudadas (T, TE, V e C) influenciaram nas variáveis dependentes rendimento, TCF, TT, AA e TI, os principais efeitos foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA). Com base na ANOVA para modelos de primeira ordem, apresentada na Tabela 4, pode-se concluir que, em relação ao rendimento, pelo menos uma das variáveis independentes influenciou significativamente a resposta analisada, uma vez que o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} . Além disso, não houve evidência estatística de que as variáveis independentes no intervalo estudado tenham efeito significativo sobre TCF, TT, AA e TI (intervalo de confiança de 95%), pois, nesses casos, o $F_{\text{calculado}}$ foi menor que o F_{tabelado} .

O modelo de primeira ordem com variáveis significativas que descrevem o rendimento (R) é mostrado na equação B. Observe que a única variável significativa foi a temperatura.

$$\text{Modelo de primeira ordem para rendimento de extração} \quad R = 7.05 + 1.80 T \quad (\text{B})$$

A influência da temperatura e sua interação com as demais variáveis do processo no rendimento (R) (Figura 3) pode ser verificada analisando as curvas de contorno geradas pelo software Statistica[®].

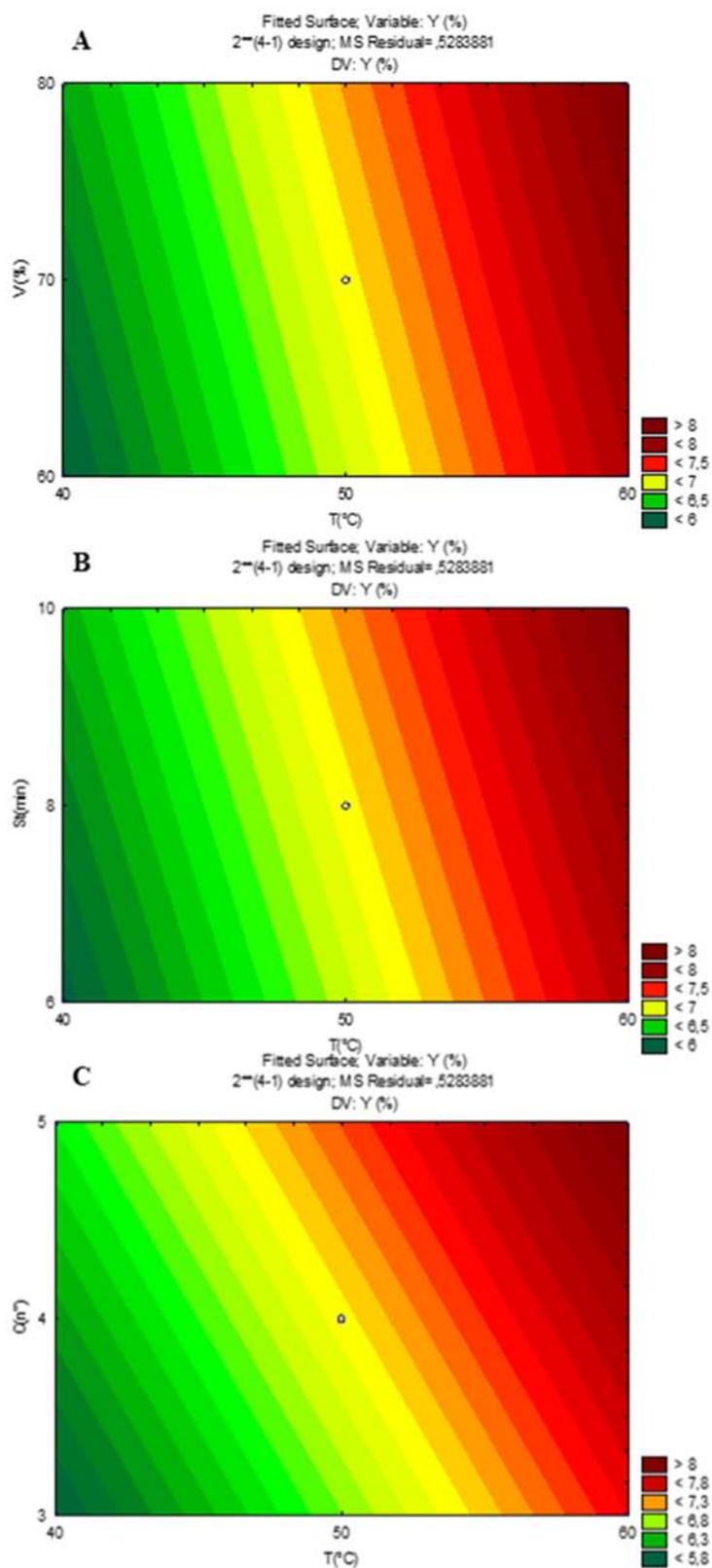
Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para modelos de primeira ordem para rendimento de extração, teor de compostos fenólicos, teor de taninos e atividade antioxidante de extratos de folhas de alcachofra (Erro residual).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	F _{tabelado}
Rendimento de Extração					
Regressão	8,08	4	2,02		
Resíduo	3,70	7	0,53	3,81	> 3,36
Total	11,78	11	-		
Teor de Compostos Fenólicos					
Regressão	79,78	4	19,94		
Resíduo	122,07	7	17,44	1,14	< 3,36
Total	201,85	11	-		
Teor de Taninos					
Regressão	20,18	4	5,04		
Resíduo	15,56	7	2,22	2,27	< 3,36
Total	35,74	11	-		
Atividade Antioxidante					
Regressão	3597,13	4	899,28		
Resíduo	4219,24	7	602,75	1,49	< 3,36
Total	7816,36	11	-		
Teor de Inulina					
Regressão	3249,69	4	812,42		
Resíduo	2699,42	7	385,63	2,10	< 3,36
Total	5949,11	11	-		

F_{calculado} maior que o F_{tabelado} ao nível de 95% de confiança.

Ao analisar as curvas de contorno, pode-se inferir que a temperatura apresentou correlação positiva, ou seja, quanto maior a temperatura aplicada, maior o R. No entanto, o fenômeno observado é válido apenas para o intervalo estudado. Sua extrapolação para valores maiores ou menores, em relação ao aplicado neste delineamento experimental, não é necessariamente precisa, pois altas temperaturas podem degradar compostos biologicamente ativos presentes nos extratos de folhas de alcachofra, como a inulina, ou ainda favorecer a extração de compostos antinutricionais.

Figura 3. Gráfico de contorno do rendimento da extração, em função da variação da temperatura e do volume de solvente (A), da temperatura e do tempo estático (B) e da temperatura e do número de ciclos (C).



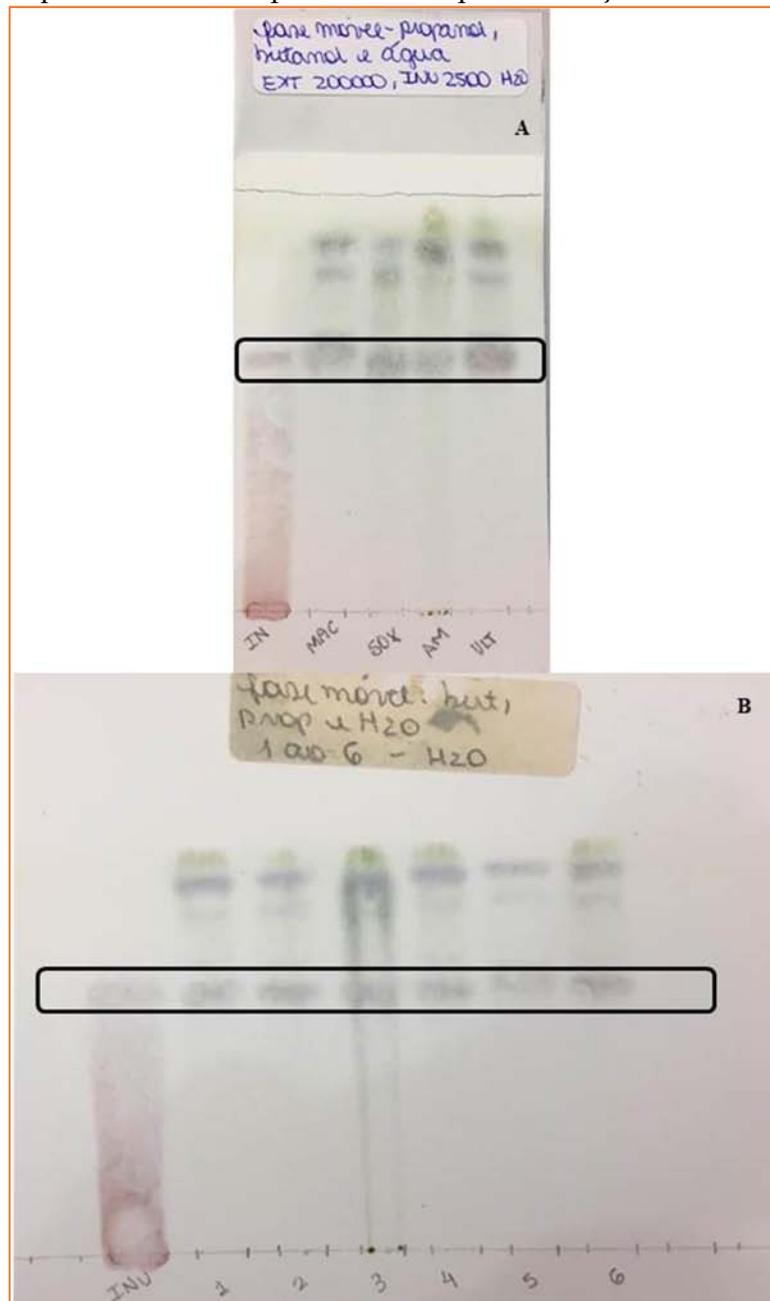
O delineamento experimental 2^{4-1} é usado para se fazer uma varredura das variáveis que podem influenciar o rendimento e a composição dos extratos. Ao analisar todas as variáveis do processo, verificou-se que apenas a temperatura (T) influenciou positivamente no rendimento dos extratos. As demais respostas não foram influenciadas. Os resultados da varredura nos permitem otimizar o processo com base em variáveis significativas, embora, neste caso, a única tenha sido a temperatura.

Em geral, o aumento da temperatura contribui para maiores rendimentos de extrato bruto, que carregam compostos fenólicos. Esses compostos atuam interrompendo a cadeia de reação doando elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autooxidação (Angelo, Jorge, 2007; Sepahpour et al., 2018). Apesar de não ter sido estatisticamente estabelecida correlação entre temperatura (T) e atividade antioxidante (AA), pode-se notar que, em geral, as amostras com maior TCF também apresentaram maior atividade antioxidante (Tabela 3).

3.2.3 Cromatografia em Camada Delgada

Nas imagens apresentadas na Figura 4 pode-se observar as cromatoplasmas reveladas contendo as bandas cromatográficas dos extratos de folhas de alcachofra obtidos pelos diferentes métodos e inulina comercial diluída em água destilada eluídas pela fase móvel e arrastadas pela cromatoplasma; a primeira coluna de cada cromatoplasma contém o padrão de inulina como controle. O fator de retenção (F_r) foi calculado para cada banda visualizada nas cromatoplasmas. O F_r calculado para cada extrato de folha de alcachofra bem como o F_r para o controle de inulina em cada cromatoplasma estão apresentados na Tabela 5. Como pode ser observado, os F_r foram semelhantes entre si, indicando que eles correspondem ao mesmo composto, pois as mesmas fases móvel e estacionária foram usadas em cada extração. Assim, pode-se inferir que todos os métodos de extração estudados foram capazes de extrair inulina das folhas de alcachofra, que constituem um resíduo da produção de flores de alcachofra para consumo, fato confirmado pela quantificação do teor de inulina por espectrofotometria.

Figura 4. (A) Cromatograma contendo os extratos obtidos pelos métodos tradicionais (Maceração - MAC, Soxhlet - SOX, Agitação Magnética - MAG e Extração Assistida por Ultrassom - ULT); (B) cromatograma contendo os extratos obtidos por PLE nas condições 1, 2, 3, 4, 5 e 6; (C) Cromatograma contendo os extratos obtidos por PLE nas condições 7, 8 e quadruplicata de ponto central. Todos os cromatogramas contêm inulina comercial como padrão (IN/INU). Utilizou-se cromatoplaças de alumínio TLC sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Alemanha), como fase móvel utilizou-se propanol:butanol:água (12:4:3) (Propanol: 99,9%, Dinâmica, Indaiatuba, Brasil; Butanol: 99,9%, Dinâmica, Indaiatuba, Brasil) e revelador composto por Anilina:Difenilamina:Ácido Fosfórico:Acetona (1:1:5:5) (Anilina: Dinâmica, Indaiatuba, Brasil; Difenilamina: Dinâmica, Indaiatuba, Brasil; Ácido Fosfórico: Exodo Científica, Sumaré, Brasil; Acetona: Exodo Científica, Sumaré, Brasil). As cromatoplaças foram aquecidas a 105 °C por 5 minutos para revelação.



(continua...)

(...continuação)

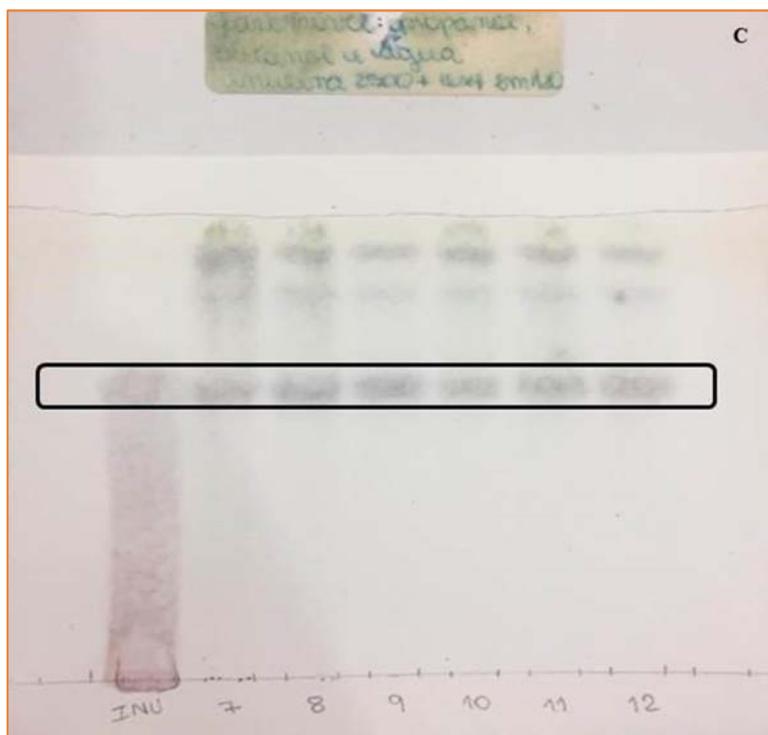


Tabela 5. Fator de retenção de banda de inulina observado em cromatoplaças de sílica gel após cromatografia em camada delgada.

Cromatoplaca	Amostra	Fator de retenção
1	Inulina comercial	0,591
	MAC	0,621
	SOX	0,597
	MAG	0,576
	ULT	0,606
2	Inulina comercial	0,636
	PLE 1	0,636
	PLE 2	0,607
	PLE 3	0,607
	PLE 4	0,625
	PLE 5	0,631
	PLE 6	0,631
3	Inulina comercial	0,627
	PLE 7	0,626
	PLE 8	0,621
	PLE 9*	0,626
	PLE 10*	0,621
	PLE 11*	0,621
	PLE 12*	0,621

MAC = Maceração, SOX = Soxhlet, MAG = Agotação Magnética, ULT = Extração Assistida por Ultrassom, PLE 9, PLE 10, PLE 11 e PLE 12 são repetições do ponto central.

4 Conclusão

Considerando o rápido tempo de extração e o emprego de baixas temperaturas de processo, a obtenção de extrato de folha de alcachofra via PLE é bastante promissora. Embora os extratos obtidos por SOX tenham apresentado maior rendimento, o tempo de extração e o emprego de temperatura elevada neste processo são desfavoráveis em relação ao PLE. As extrações realizadas em temperatura ambiente, potencializadas por agitação magnética e ultrassom, apresentaram baixos rendimentos. No entanto, o extrato obtido por maceração apresentou rendimentos semelhantes aos obtidos por PLE, embora o tempo de extração tenha sido de 7 dias no MAC e apenas alguns minutos no PLE. O teor de compostos fenólicos nos extratos obtidos por PLE e sua atividade antioxidante foram maiores. Como não há interesse em trabalhar em condições de alta temperatura, os presentes dados mostraram que, dentre todas as condições de extração testadas no PLE, a que manteve o maior TCF e AA foi o 8º ensaio do delineamento experimental 2^{4-1} . Neste ensaio, a extração foi realizada a 60 °C, com volume de enxágue de 80 % do volume do extrator, volume total de 200 mL, com cinco ciclos de 10 min, ou seja, menos de 1 h de extração. Esperava-se que o teor de inulina nos extratos obtidos por PLE não diferisse dos demais. No entanto, foi menor, necessitando de mais estudos utilizando outras faixas de variáveis independentes e outros solventes para obter extratos com maior teor de inulina. Inicialmente, pode-se inferir que a faixa de temperatura utilizada no PLE, juntamente com a pressão aplicada nesta técnica, pode ter modificado alguma propriedade, seja do solvente ou da interação entre a inulina e a matriz vegetal, fazendo com que a afinidade entre o solvente e este prebiótico fosse reduzido.

Por outro lado, o PLE é uma técnica ecologicamente amigável, pois utiliza menor volume de solvente e temperaturas mais baixas quando comparado a SOX. Além disso, proporcionou maiores níveis de TCF e AA.

5 Agradecimentos

Agradecemos à Sra. Neide por ter cultivado e nos doado as folhas de alcachofra usadas como matéria-prima.

6 Referências

- AGUILERA, Y.; MARTIN-CABREJAS, M. A.; GONZÁLEZ DE MEJIA, E.. Phenolic compounds in fruits and beverages consumed as part of the mediterranean diet: their role in prevention of chronic diseases. **Phytochemistry reviews**, v. 15, n. 3, p. 405-423, 2016.
- ALVAREZ-RIVERA, G. et al. Pressurized liquid extraction. **In: Liquid-phase extraction**. Elsevier, 2020. p. 375-398.
- ANDREU, V.; PICÓ, Y. Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 709-721, 2019.
- ANGELO, P.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos—Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- AOAC, 2005, Official methods of analysis of AOAC International (18 ed.) Gaithersburg: AOAC International.
- BITTENCOURT, G. M. et al. Application of green technology for the acquisition of extracts of araçá (*Psidium grandifolium* Mart. ex DC.) using supercritical CO₂ and pressurized ethanol: Characterization and analysis of activity. **Journal of food science**, v. 84, n. 6, p. 1297-1307, 2019.
- BITTENCOURT, G. M. **Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de araçá (*Psidium Grandifolium* Mart. Ex DC.) obtidos por líquido pressurizado (PLE) e por fluido supercrítico (SFE)**. 2018. 116 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.
- BOFFO, E. F. et al. Chemometrics applied to 1H NMR and UV–Vis spectroscopy as a way to evaluate solid-liquid extraction of leaves of artichoke. **Food chemistry**, v. 377, p. 131979, 2022.
- BRÁS, T. et al. Impact of extraction parameters and concentration by nanofiltration on the recovery of phenolic compounds from *Cynara cardunculus* var. *altilis*: Assessment of antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 137-142, 2015.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011, **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 126p.
- CAUSEY, J. L. et al. Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. **Nutrition Research**, v. 20, n. 2, p. 191-201, 2000.
- CIDADE-BRASIL, 2020, Município de Piedade. Retrieved from <https://www.cidade-brasil.com.br/municipio-piedade.html>. Acesso em 20 ago. 2020.

- DE OLIVEIRA, N. A. et al. Babassu almonds oil extracted with alternative pressurized green solvents, its triacylglycerol prediction and β -sitosterol composition. **Journal of Food Process Engineering**, v. 42, n. 5, p. e13139, 2019.
- DIAS, M. I. et al. Phenolic profile and bioactivity of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) inflorescence parts: Selecting the best genotype for food applications. **Food Chemistry**, v. 268, p. 196-202, 2018.
- EL SAYED, A. M. et al. Artichoke edible parts are hepatoprotective as commercial leaf preparation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 165-178, 2018.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. Available online: <http://faostat.fao.org>. Acesso em 27 mar. 2021.
- FIRMIANO, D. M.; BITTENCOURT, G. M.; OLIVEIRA, A. L. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Extracts Obtained by Pressurized Liquid Extraction. **The Open Food Science Journal**, v. 11, n. 1, 2019.
- FRANCAVILLA, M. et al. Artichoke biorefinery: From food to advanced technological applications. **Foods**, v. 10, n. 1, p. 112, 2021.
- FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British journal of Nutrition**, v. 87, n. S2, p. S287-S291, 2002.
- GOMINHO, J. et al. *Cynara cardunculus* L. as a biomass and multi-purpose crop: A review of 30 years of research. **Biomass and Bioenergy**, v. 109, p. 257-275, 2018.
- GUEMGHAR, M. et al. Phenolic compounds from artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts: optimization of microwave assisted extraction and enrichment of table oil. **The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI-Food Technology**, v. 44, n. 1, p. 193-211, 2020.
- HIRONDART, M. et al. Comparison between pressurized liquid extraction and conventional soxhlet extraction for rosemary antioxidants, yield, composition, and environmental footprint. **Foods**, v. 9, n. 5, p. 584, 2020.
- LATTANZIO, V. et al. Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. **Journal of functional foods**, v. 1, n. 2, p. 131-144, 2009.
- LÓPEZ-MOLINA, D. et al. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). **Phytochemistry**, v. 66, n. 12, p. 1476-1484, 2005.
- LHUILIER, A. **Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: Agauria salicifolia Hook. f ex Oliver, Agauria polyphylla Baker (Ericaceae), Tambourissa trichophylla Baker (Monimiaceae) et Embelia concinna Baker (Myrsinaceae)**. 2007. 200 p. Tese (Doutorado) – Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, 2007.
- MABEAU, S. et al. Antioxidant activity of artichoke extracts and by-products. In: **VI International Symposium on Artichoke, Cardoon and Their Wild Relatives 730**. 2006. p. 491-496.

- MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica chimica acta**, v. 703, n. 1, p. 8-18, 2011.
- OSORIO-TOBÓN, J. F. et al. Recent applications of pressurized fluid extraction: curcuminoids extraction with pressurized liquids. **Food and Public Health**, v. 3, n. 6, p. 289-303, 2013.
- PANDINO, G. et al. Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. **Food chemistry**, v. 126, n. 2, p. 417-422, 2011.
- PANDINO, G. et al. Polyphenol profile and content in wild and cultivated *Cynara cardunculus* L. **Italian Journal of Agronomy**, v. 7, n. 3, p. e35-e35, 2012.
- PANDINO, G.; MAUROMICALE, G. Globe artichoke and cardoon forms between traditional and modern uses. In: **X International Symposium on Artichoke, Cardoon and Their Wild Relatives**. 1284. 2019. p. 1-18.
- PEREIRA, C. et al. Antioxidant properties, anti-hepatocellular carcinoma activity and hepatotoxicity of artichoke, milk thistle and borututu. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 61-65, 2013.
- PÉREZ-ESTEVE, É. et al. Polyphenolic composition of Spanish cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 17, n. 2, p. 177-184, 2018.
- RAJAKARUNA, A. et al. Application of solvent pH under pressurized conditions using accelerated solvent extraction and green solvents to extract phytonutrients from wild berries. **Food Bioscience**, v. 47, p. 101471, 2022.
- RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Casa do Pão Editora. 2005
- RODRIGUEZ, T. S.; GIMÉNEZ, D. G.; VÁZQUEZ, R. P. Choleric activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 687-693, 2002.
- RODRÍGUEZ, D. et al. Valorization of Globe Artichoke (*Cynara scolymus*) agro-industrial discards, obtaining an extract with a selective effect on viability of cancer cell lines. **Processes**, v. 8, n. 6, p. 715, 2020.
- RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.
- RUIZ-CANO, D. et al. Chemical and functional properties of the different by-products of artichoke (*Cynara scolymus* L.) from industrial canning processing. **Food chemistry**, v. 160, p. 134-140, 2014.
- SALEH, S. A. A. et al. Physiochemical, kinetic and thermodynamic studies on *Aspergillus wewitschiae* MN056175 inulinase with extraction of prebiotic and antioxidant *Cynara*

- scolymus* leaves fructo-oligosaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1026-1036, 2020.
- SANTOS, D. N. et al. Study of supercritical extraction from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.) with bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 365-374, 2015.
- SEPAHPOUR, S. et al. Comparative analysis of chemical composition, antioxidant activity and quantitative characterization of some phenolic compounds in selected herbs and spices in different solvent extraction systems. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 402, 2018.
- SIHEM, D. et al. In vitro antioxidant activities and phenolic content in crop residues of Tunisian globe artichoke. **Scientia Horticulturae**, v. 190, p. 128-136, 2015.
- SINGH, R. S.; SINGH, T.; LARROCHE, C. Biotechnological applications of inulin-rich feedstocks. **Bioresource technology**, v. 273, p. 641-653, 2019.
- SINGH, R.; SINGH, R. P.; KENNEDY, J. F. Endoinulinase production by a new endoinulinase producer *Aspergillus tritici* BGPUP6 using a low cost substrate. **International journal of biological macromolecules**, v. 92, p. 1113-1122, 2016.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. **Pharmaceutical research**, v. 27, n. 6, p. 962-978, 2010.
- SOTO, C. et al. Effect of extraction conditions on total phenolic content and antioxidant capacity of pretreated wild *Peumus boldus* leaves from Chile. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 3, p. 328-333, 2014.
- STUMPF, B. et al. Optimization of the extraction procedure for the determination of phenolic acids and flavonoids in the leaves of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 177, p. 112879, 2020.
- TADINI, C. C., TELIS, V. R. N., DE ALMEIDA MEIRELLES, A. J., 2016, **Operações unitárias na indústria de alimentos**. Grupo Gen-LTC.
- ZEAITER, Z. et al. Extraction and characterization of inulin-type fructans from artichoke wastes and their effect on the growth of intestinal bacteria associated with health. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.
- ZUORRO, A.; MAFFEI, G.; LAVECCHIA, R. Effect of solvent type and extraction conditions on the recovery of phenolic compounds from artichoke waste. **Chemical Engineering**, v. 39, 2014.



**CAPÍTULO 3 Caracterização de
micropartículas lipídicas e
comportamento de cera de
abelha e óleo de abacate em
dióxido de carbono
supercrítico em temperaturas
moderadas**



Resumo

Esta pesquisa teve como objetivo estudar o comportamento de misturas lipídicas de cera de abelha e óleo de abacate no processamento com CO₂ supercrítico bem como a formação de partículas de soluções saturadas com sás (*Particles from Gas-Saturated Solutions* - PGSS) de cera de abelha carregadas com óleo de abacate. Para avaliar o comportamento da mistura lipídica sob alta pressão, foram realizadas medições da temperatura de fusão (T_f), temperatura de solidificação (T_s), expansão volumétrica (E_v), inchaço das misturas lipídicas por absorção de CO₂ e solubilidade dessas misturas lipídicas em CO₂ supercrítico a pressões fixas. O T_f e o T_s das misturas de lipídios diminuíram progressivamente com o aumento da pressão, sendo possível observar os menores valores para pressão próxima a 150 bar e com pressões superiores observou-se aumento desses parâmetros. A expansão volumétrica, inchaço por absorção de CO₂ e solubilidade da mistura em CO₂ supercrítico aumentaram com o aumento da pressão. O processo de PGSS consistiu no contato da mistura binária (1:1) dos lipídios com CO₂ supercrítico em uma autoclave com pressões variando entre 150 e 300 bar a 60 °C com agitação mecânica a 1250 rpm por 1 h, seguida de expansão da solução (lipídios + CO₂) através de um bocal de 203,2 µm. As micropartículas apresentaram morfologia semelhantes à esponja com tamanhos variando entre 162-180 µm. A cristalinidade e a estrutura física interna das partículas sugeriram incorporação uniforme do óleo de abacate na rede cristalina da cera de abelha. Com base nos resultados, a formação destas partículas pode ser viável com CO₂ supercrítico a uma temperatura de 60 °C e pressões entre 150 e 300 bar. A temperatura moderada do processo poderia permitir sua aplicação com compostos bioativos termolábeis.

Palavras-chave: CO₂ supercrítico, PGSS, partículas lipídicas sólidas, solubilidade, ponto de fusão, expansão volumétrica.

1 Introdução

O consumo de compostos bioativos é considerado muito importante nas facetas da assistência à saúde; entretanto, a maioria dos compostos bioativos isolados de fontes naturais são facilmente degradáveis (Santos, Ribeiro, Santana, 2019; Katouzian et al., 2017). A formação de partículas é utilizada como estratégia para estabilizar e facilitar a incorporação de compostos bioativos em alimentos (Santos, Ribeiro, Santana, 2019), cosméticos (Jose, Netto, 2019) e produtos farmacêuticos (Ganesan et al., 2018). A formação de partículas é alcançada utilizando diferentes tecnologias e materiais carreadores dependendo do tipo de composto bioativo e aplicação desejável (Katouzian et al., 2017; Đor–dević et al., 2015). Partículas lipídicas sólidas são sistemas transportadores promissores para compostos bioativos lipofílicos devido à sua alta compatibilidade com os lipídeos sólidos usados como material transportador (Santos, Ribeiro, Santana, 2019). Essas partículas são necessárias para o desenvolvimento de produtos cosméticos, alimentícios e farmacêuticos inovadores (Panigrahi et al., 2019); portanto, é necessário superar suas desvantagens potenciais, como capacidade de carga insuficiente e transições polimórficas durante o armazenamento que levam à expulsão do composto bioativo (Poovi et al., 2019).

Uma estratégia para evitar as desvantagens das partículas lipídicas sólidas é o uso de misturas lipídicas sólido-líquido como material carreador para alterar a rede cristalina (Santos, Ribeiro, Santana, 2019). Para esse propósito, a cera de abelha (um lipídio sólido), que é um material à base de lipídios complexos, usado como um material carreador na formação de partículas, pode ser misturada com óleos comestíveis (lipídios líquidos). Alguns desses óleos comestíveis são ricos em compostos bioativos que podem melhorar a bioatividade das partículas formadas. Por exemplo, o óleo de abacate é usado na indústria de cosméticos devido ao seu poder antiinflamatório e de hidratação da pele (Tan, 2019; Rydlewski et al., 2020).

Existem diferentes tecnologias para formar partículas lipídicas sólidas, como homogeneização em alta pressão, evaporação da emulsificação do solvente, coacervação, resfriamento por microemulsão, ultrassonificação, entre outras (Ganesan, Narayanasamy, 2017).

A tecnologia supercrítica apresenta como vantagens a operação em temperatura moderada e a utilização do CO₂ como solvente “verde”, ambientalmente amigável, pois pode ser recuperado em sua totalidade não deixando resíduos nas partículas, além de operar em

temperaturas moderadas, em atmosfera livre de oxigênio e de permitir o controle das características das partículas, como morfologia e tamanho (Knez et al., 2019, Matos et al., 2019). Esta tecnologia envolve algumas técnicas como precipitação de gás antissolvente (GAS), partículas de solução saturada de gás (PGSS) e expansão rápida de solução supercrítica (RESS) (Spilimbergo et al., 2006). A técnica GAS foi o método pioneiro de utilização de fluido supercrítico como antissolvente, nesta técnica, o soluto deve ter alta solubilidade em um solvente orgânico e ser insolúvel ou pouco solúvel no antissolvente, e o solvente orgânico precisa ter uma afinidade maior com o antissolvente do que com o soluto. Desta forma, quando a solução entra em contato com o antissolvente, a solubilidade do soluto no solvente é drasticamente reduzida resultando na precipitação do soluto na forma particulada (dos Santos et al., 2022). PGSS é usado para materiais com temperaturas de fusão relativamente baixas, como polímeros e lipídios. Esta técnica consiste na saturação do material de interesse com CO₂ supercrítico, seguida por expansão através de um bico aspersor (Akbari et al., 2020; Münüklü, Jansens, 2007). No processo RESS, o CO₂ supercrítico é usado como meio de extrair o material alvo em alta pressão; posteriormente, a solução supercrítica é despressurizada para atingir alta supersaturação para a geração de partículas finas (Yang et al., 2020). A tecnologia com fluido supercrítico apresenta várias vantagens, por exemplo, ao usar RESS e PGSS, existe a possibilidade de impregnar as partículas sem o uso de água ou solventes orgânicos, além do potencial para aplicação de uma ampla gama de produtos devido à variação da densidade do fluido supercrítico em função da pressão. Além disso, a separação e recuperação de solvente podem ser realizadas em uma única etapa de despressurização (Akbari et al., 2020).

O processo de formação de partículas requer o conhecimento do comportamento do material carreador no CO₂ supercrítico para definir os parâmetros do processo e para verificar sua viabilidade econômica e prática (Spilimbergo et al., 2006). Consequentemente, as medições da temperatura de fusão (T_f) e da temperatura de solidificação (T_s) da mistura de lipídios em pressões fixas são necessárias na definição da temperatura do processo que é um parâmetro importante, pois deve ser alta o suficiente para manter a mistura de lipídios no estado líquido durante o processamento, mas baixa o suficiente para permitir o uso de compostos bioativos termolábeis (Ciftci e Temelli, 2014). Além disso, as medições de expansão volumétrica, inchaço das misturas de lipídios por absorção de CO₂ e solubilidade de misturas de lipídios em CO₂ supercrítico na temperatura do processo são importantes para explicar as características das partículas, como morfologia e tamanho, quando formadas em

diferentes pressões. Existem estudos comportamentais em CO₂ supercrítico para muitos lipídios sólidos e líquidos. No entanto, não há dados experimentais disponíveis na literatura sobre a mistura de cera de abelha com óleo de abacate.

As ceras são ésteres formados a partir de ácidos graxos superiores e de álcoois graxos superiores, ambos de alto peso molecular, o que justifica o alto ponto de fusão desses materiais, bem como o fato de não digerirmos (Sarkisyan et al., 2021). A cera de abelha já foi estudada na formação de partículas sólidas de lipídios carregadas com mentol por PGSS (Zhu et al., 2010) e vitamina E por fusão da solidificação da emulsão quando misturada com triglicerídeos de cadeia média (Souza et al., 2020).

O óleo de abacate é um óleo comestível de alto valor comercial cuja composição sugere benefícios à saúde humana (Cicero et al., 2018) pois é rico em ácidos graxos insaturados, vitaminas lipossolúveis tais como as vitavinas E, B, C e pró-vitamina A e possuir constituintes minerais como fósforo, magnésio e potássio (Bruno, Almeida, 2021).

Assim, nesta investigação foi realizado um estudo que abrangeu a medição de T_f , T_s , expansão volumétrica, inchaço por absorção de CO₂ e solubilidade de misturas lipídicas de cera de abelha com óleo de abacate em CO₂ supercrítico em pressões fixas, bem como a formação de partículas lipídicas sólidas carregadas com óleo de abacate a partir de cera de abelha usando o processo PGSS em diferentes pressões.

2 Material e Métodos

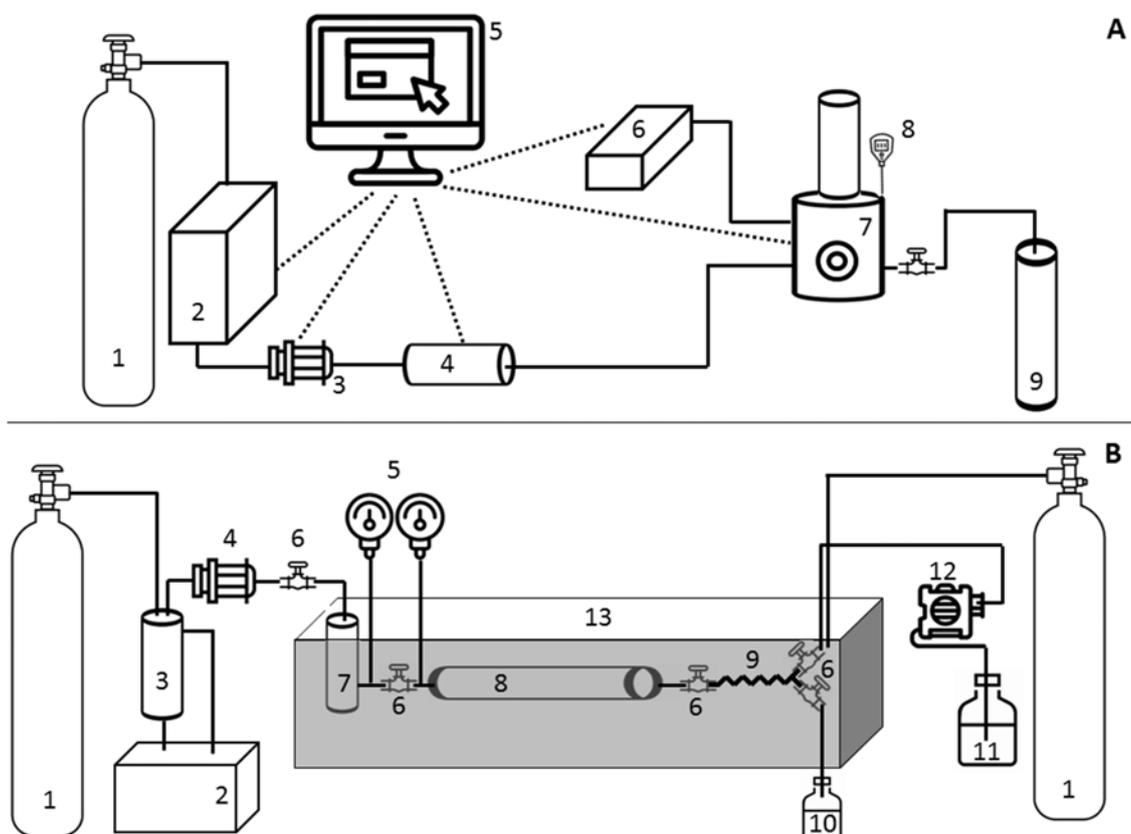
2.1 Material

A cera de abelha utilizada neste trabalho como material lipídico sólido foi adquirida de uma fazenda localizada no município de Pirassununga, Centro-Leste do estado de São Paulo a uma latitude 21°59'46" Sul e a uma longitude 47°25'36" Oeste, estando a uma altitude de 625 metros (CIDADE-BRASIL, 2022). Como lipídio líquido utilizou-se óleo de abacate comercial extraído a frio (Hass, Bauru, Brasil). Dióxido de carbono foi utilizado como fluido supercrítico (99%; Linde, Sertãozinho, BR). Misturas lipídicas (1:1 m/m) de cera de abelha e óleo de abacate foram preparadas a 90 °C por mistura manual antes de serem colocadas na autoclave do equipamento.

2.2 Comportamento lipídico em CO₂ supercrítico observado no monitor de fase

Um equipamento SFC/RESS (Thar Instruments Co./Waters, Pittsburgh, EUA) (Figura 1A) foi adaptado para ser utilizado como monitor de fase para medição das propriedades dos lipídios em CO₂ supercrítico, como T_f, T_s, expansão volumétrica (E_v) e inchaço por absorção de CO₂.

Figura 1. Esquema dos sistemas envolvendo fluido supercrítico utilizados neste trabalho.



Legenda:

Figura 1A: (1) cilindro de CO₂, (2) banho de resfriamento, (3) bomba de alta pressão, (4) trocador de calor, (5) computador equipado com Thar SFCsoftware, (6) regulador de contrapressão automatizado (ABPR), (7) autoclave, (8) termômetro, (9) célula de despressurização.

Figura 1B: (1) cilindro de CO₂, (2) banho refrigerado, (3) tanque de resfriamento de CO₂, (4) bomba de alta pressão, (5) dois manômetros do tipo Bourdon, (6) válvulas de agulha, (7) tanque pulmão, (8) célula de equilíbrio, (9) coletor de volume conhecido, (10) frasco coletor de vidro, (11) frasco de solvente, (12) bomba helicoidal, (13) banho de água com temperatura controlada.

Fonte: Bittencourt, G. M.; Aredo, V; De Oliveira, A.. Behavior of beeswax and edible oils mixtures in supercritical carbon dioxide at moderate temperature. Authorea Preprints, 2021.

Nestes experimentos, uma escala de altura foi colocada dentro do vaso de alta pressão para medir o aumento do nível da amostra devido à expansão com CO₂ pressurizado. A amostra foi derretida a 90 °C para eliminar a memória de cristal, e cerca de 0,2 g de cada

amostra foi colocada em um tubo de vidro transparente (0,3 cm de diâmetro e 4,0 cm de altura) fixado no interior da autoclave de alta pressão (5,5 cm de diâmetro e 5,8 cm de altura) com fita adesiva e próximo ao visor de safira em posição que permitisse sua observação por meio de uma câmera através do visor de safira conforme pode ser observado na Figura 2.

Figura 2. Monitor de fase criado no Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN/FZEA/USP) por meio de fixação de uma escala e de um tubo de vidro no interior da autoclave SFC/RESS, Thar Instruments Co./Waters, Pittsburgh, EUA próximo ao visor de safira.



2.2.1 Temperaturas de fusão e solidificação em CO₂ supercrítico

Primeiro, a célula foi aquecida até que toda a amostra fosse fundida à pressão atmosférica. Para a identificação de T_s , a célula foi resfriada lentamente (cerca de 0,5 °C/min) até que o primeiro cristal de solidificação da amostra fosse observado visualmente. Após a identificação de T_s , a amostra foi resfriada por mais 3 °C abaixo de T_s , aguardando-se 10 minutos para o equilíbrio e então a célula foi aquecida lentamente (cerca de 0,5 °C/min) até que o primeiro brilho fosse visualmente observado, esta temperatura foi identificada como T_f . Este processo foi repetido para todas as pressões estudadas que variaram de 0 bar a 300 bar tanto para a cera de abelha quanto para a mistura de cera de abelha com óleo de abacate. Os T_f e T_s foram usados para definir a temperatura de processo para a formação de partículas. Assim, a expansão volumétrica, o inchamento e a solubilidade de lipídios em CO₂ supercrítico foram determinados e realizados a essa temperatura.

2.2.2 Expansão volumétrica em CO₂ supercrítico

A escala colocada dentro da célula de alta pressão foi calibrada adicionando diferentes volumes de água destilada no tubo de vidro em condições ambientais.

O volume da amostra de lipídios em CO₂ supercrítico foi medido em pressões que variaram de 150 a 300 bar após 10 min em cada pressão para observar claramente a interface lipídio-CO₂. Os testes preliminares foram realizados medindo o volume da amostra 10, 20, 30 min e 1h após o sistema ter atingido a pressão necessária e verificou-se que após 10 min nenhum aumento de volume ocorreu, portanto este foi o tempo adotado para todos os ensaios. A expansão volumétrica foi expressa como o aumento percentual do volume em relação ao volume inicial à pressão atmosférica. No caso de amostras sólidas à pressão atmosférica (cera de abelha e mistura binária de cera de abelha e óleo de abacate), o volume inicial foi registrado como o volume observado em temperatura ligeiramente acima de seu T_f e à pressão atmosférica. Em seguida, a célula foi pressurizada gradativamente a 150 bar e resfriada até atingir a temperatura de processo, mantendo a amostra no estado líquido para permitir a primeira medição e depois a pressão foi aumentada gradativamente até as demais pressões estudadas. Estudo baseado na metodologia descrita por Ciftci e Temelli (2014), todas as medições foram feitas em duplicata.

2.2.3 Intumescimento por absorção de CO₂

A absorção de CO₂ supercrítico em lipídios (g de CO₂/kg de lipídio) produziu intumescimento, que foi calculado a partir de dados de expansão volumétrica. A variação do volume do material lipídico a uma pressão fixa foi considerada como o volume correspondente à massa de CO₂ dissolvida na massa conhecida do material lipídico. A densidade de CO₂ em cada pressão foi usada para calcular a massa de CO₂ a partir da variação do volume. Durante a observação experimental, não foi observada a separação de fases da mistura lipídica.

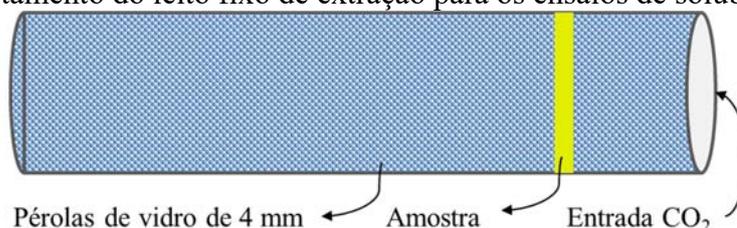
2.2.4 Solubilidade em CO₂ supercrítico

A solubilidade estática da mistura lipídica binária de cera e óleo de abacate em CO₂ supercrítico (g/kg de CO₂) foi determinada com base na metodologia descrita por Cornelio-Santiago et al. (2017). A Figura 1B contém o esquema do equipamento utilizado. O experimento consistiu inicialmente no contato entre 5 g da amostra dispersa em pérolas de vidro de 4 mm de diâmetro (quantidade suficiente para preencher completamente a célula de equilíbrio) e CO₂ supercrítico sob condições fixas de pressão (150, 200 ou 250 bar) e temperatura (60 °C e 70 °C) em uma célula de equilíbrio (300 cm³) empacotada conforme Figura 3. Após um tempo de contato fixo (1, 2 ou 3 horas), uma amostra da mistura, constituída por lipídios solubilizados em CO₂ supercrítico, foi transferida para um coletor de alta pressão de volume conhecido (8,58 cm³).

Para isso, as válvulas de entrada de CO₂ para a célula de equilíbrio e a saída de solução da célula de equilíbrio para o coletor de alta pressão foram abertas simultaneamente para manter a pressão constante dentro da célula de equilíbrio, pois uma variação na pressão poderia desestabilizar a solução.

A amostra da solução contida no coletor de alta pressão foi despressurizada em um frasco de coleta. Após a despressurização, o coletor de alta pressão e a linha de despressurização foram lavados com etanol pressurizado (cerca de 75 mL) para retirada de possíveis materiais remanescentes e, em seguida, foi seco por fluxo de CO₂ de outro cilindro, todo o etanol utilizado nesta limpeza também foi coletado no frasco de coleta. Finalmente, a mistura de material lipídico e etanol foi colocada em estufa a 70 °C para evaporação completa do etanol até que um peso constante fosse alcançado e a massa de lipídeo solubilizado por CO₂ pudesse ser medida.

Figura 3. Empacotamento do leito fixo de extração para os ensaios de solubilidade



Fonte: Bittencourt, G. M. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de araçá (*Psidium Grandifolium Mart. Ex DC.*) obtidos por líquido pressurizado (PLE) e por fluido supercrítico (SFE). 2018. 116 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

O controle da temperatura da célula de equilíbrio e do coletor de alta pressão de volume conhecido foi realizado por imersão em banho termostático (Suprilab, Campinas, Brasil) e o controle da pressão por bomba de alta pressão (Eldex AA100S, Napa, CA, EUA). Todos os experimentos foram feitos em duplicata. Os valores da densidade do CO₂ sob diferentes condições de temperatura e pressão foram calculados usando a equação empírica de Huang et al. (1985). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

2.3 Perfil de ácidos graxos

Determinou-se o perfil de ácidos graxos da cera de abelha e do óleo de abacate. O óleo de abacate foi preparado na forma de ésteres metílicos de ácidos graxos de acordo com o método 969.33 AOAC (AOAC, 2005) e posteriormente analisados por cromatografia gasosa (GC) para determinação do perfil de ácidos graxos. A cera de abelha foi preparada por diluição em clorofórmio seguida de intensa agitação mecânica até a dissolução total, seguindo a metodologia descrita por Svečnjak et al. (2019).

A análise por GC foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GC/MS) (QP 2010 Plus, Shimadzu, Japão) com injetor automático (AOC-5000, SWI). Foi usada uma coluna capilar de poli(biscianopropil siloxano) de fase não ligada (100 m × 0,25 mm x 0,2 µm) (Supelco SPTM2560, Bellefonte, EUA). A temperatura de injeção foi de 250 °C, e a temperatura da coluna variou de 100 °C a 195 °C com uma rampa de temperatura de 5 °C/min e de 195 °C a 250 °C com uma rampa de temperatura de 2 °C/min . A temperatura da interface e da fonte de íons foi 250 °C, com um tempo de corte do solvente de 10 min. O volume injetado foi de 1 µL com uma taxa de divisão de 12,5; hélio foi usado como gás de arraste. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons usando energia de ionização de 70 eV como analisador quadrupolo de 40 e 350 m/z. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados por comparação com espectros de massa usando GC/MS solutions v. 2.5 software, que tem como banco de dados as bibliotecas NIST 11 e NIST 11 s.

2.4 Atividade de eliminação de radicais ABTS

A resistência à oxidação do óleo de abacate foi determinada pelo método de captura do radical livre ABTS, na qual a partir da solução padrão de Trolox (Aldrich Chemistry,

Steinheim, GE) (2.000 M) foram preparadas soluções variando a concentração de 100 mg/L a 2000 mg/L com etanol (99.5%, Exodo Científica, Sumaré, Brasil) a partir das quais construiu-se uma curva padrão de trolox com as leituras realizadas em espectrofotômetro (Genesys 10s UV-Vis, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), no comprimento de onda de 734 nm.

Cinco diferentes diluições em etanol foram preparadas em triplicata para o óleo de abacate (1.000, 5.000, 10.000, 50.000 e 100.000 mg/L). Em ambiente escuro, uma alíquota de 30 µL de cada diluição foi transferida para tubos de ensaio contendo 3,0 mL de radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (Sigma Life Science, Steinheim, GE), que foram homogeneizados em um agitador de tubos. As leituras (734 nm) foram realizadas após 6 min de mistura, e o álcool etílico foi usado como branco para calibrar o espectrofotômetro (Rufino et al., 2007).

2.5 Formação de partículas

Uma proporção de 1:1 (m/m) de lipídio sólido (cera de abelha): lipídio líquido (óleo de abacate) foi usada para a formação de partículas com base nas proporções estudadas por Attama et al. (2006), o processo de formação das partículas foi realizado em equipamento SFC/RESS (Thar Instruments Co., Ltd., Pittsburgh, PA, EUA), com controle informatizado de pressão e temperatura, o que permite um controle confiável dos parâmetros do processo (Figura 1A).

O processo de formação de partículas consistiu em duas etapas sendo a primeira a adição de 4 g de cera de abelha e 4 g de óleo de abacate na autoclave do equipamento (133,5 cm³) para contato com CO₂ supercrítico a uma temperatura de 60 °C e pressões de 150, 200, 250 ou 300 bar por 1 h de agitação a 1250 rpm, seguido pela segunda etapa que consistiu na expansão da solução (lipídios + CO₂) através de um bocal de 203,2 µm dentro de uma câmara de despressurização. As partículas foram armazenadas sob refrigeração (4 °C) em placas de Petri envoltas por papel alumínio e filme de PVC. As condições experimentais foram baseadas naquelas comumente utilizadas na formação de partículas sólidas de lipídios por tecnologia supercrítica e nos dados obtidos no estudo do comportamento dos lipídios utilizados (Couto, Alvarez e Temelli, 2017; Ciftci e Temelli, 2016; Yang e Ciftci, 2016). Este estudo buscou investigar o efeito das diferentes pressões de CO₂ nas propriedades das partículas.

2.6 Caracterização de Partículas

2.6.1 Morfologia

Um microscópio eletrônico de varredura (TM 3000, Hitachi, Tokyo, JP) do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da FZEA/USP foi usado para analisar a morfologia das partículas. Para isso, uma fina camada das partículas foi gentilmente disposta sobre uma fita dupla face de carbono (Ted Pella, EUA) fixada em um porta-amostras de alumínio. As imagens foram capturadas com aceleração de tensão de 5 kV a uma corrente de 1.750 mA (Pelissari et al., 2016).

2.6.2 Distribuição de tamanho e densidade aparente

A distribuição do tamanho das partículas foi determinada por equipamento de difração a laser (Sald-201 V, Shimadzu, Tokyo, Japão) do Laboratório de Tecnologia de Biopolímeros (BIOPOLITEC) da FZEA/USP. As partículas foram suspensas manual e suavemente em solução 1:1 (vol/vol) de água e etanol (99.5%, Exodo Científica, Sumaré, Brasil) à temperatura ambiente. As suspensões de partículas foram colocadas em cubetas de quartzo para medições em níveis de absorvância variando de 0,1 a 0,2 (Villegas et al., 2020); as medidas foram realizadas em triplicata imediatamente após a dispersão na solução de água e etanol. Esse meio de dispersão foi escolhido, após testes preliminares, pois estas partículas são insolúveis em água, parcialmente solubilizadas em etanol anidro e suspensas uniformemente na solução 1:1, característica buscada para a técnica de difração à laser (Villegas et al., 2020). A função Rosin-Rammler foi usada para a análise da distribuição do tamanho das partículas e cálculos dos percentis 10 (D_{10}), 50 (D_{50}) e 90 (D_{90}). Para ajuste dos parâmetros da função de Rosin-Rammler utilizou-se *Solver*. Além disso, o diâmetro médio de De Brouckere ($D [4,3]$) foi calculado. A densidade aparente (mg/mL) foi determinada pesando a massa de partículas que podem preencher um volume de 20 mL em um tubo de ensaio. Essas medições foram feitas em quadruplicata.

2.6.3 Polimorfismo

O polimorfismo foi estudado em difractogramas usando uma difração de raios-X (Miniflex 600, Rigaku, Japão) do Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (MultMat) da FZEA/USP. Os difractogramas foram obtidos à temperatura ambiente (25 °C) usando radiação de cobre $k\alpha$ ($\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$), tensão de 40 kV, corrente de 30 mA e velocidade angular de 0,05 °/s em ângulos que variam de 3 a 50° (Pelissari et al., 2016).

2.6.4 Propriedades térmicas

Os picos térmicos foram investigados com termogramas obtidos por um calorímetro diferencial de varredura (DSC-TA 2010, Thermal Analysis Instruments, New Castle, EUA) do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da FZEA/USP. O procedimento foi baseado em Machado et al. (2016), no qual uma quantidade conhecida de amostra foi pesada, embalada em cadinhos selados e aquecida a 5 °C/min entre -100 °C e 150 °C em uma atmosfera inerte de nitrogênio (45 mL N₂/min).

2.6.5 Estrutura química

O estudo da estrutura química foi realizado em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Spectrum One, PerkinElmer, Norwalk, CO, EUA) do LTA da FZEA/USP. As amostras foram adicionadas diretamente ao equipamento em um Acessório de Amostragem Universal ATR para realizar 40 varreduras com resolução de 4 cm⁻¹ na faixa espectral de 4000–650 cm⁻¹.

2.7 **Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas com o software Statistica[®] (versão 12.0, StatSoft, EUA). Análise de variância (ANOVA) foi realizada para determinar se a pressão de CO₂ influencia nos parâmetros estudados, teste de Tukey (p <0,05) foi usado para a comparação múltipla de médias. O coeficiente de correlação de Pearson (r) e o valor de p foram usados para avaliar a correlação entre a pressão utilizada e a solubilidades da amostra

no CO₂, temperaturas de fusão e solidificação, expansão volumétrica da mistura lipídica e tamanho e a densidade aparente das partículas. O valor de p foi obtido pela ANOVA. O coeficiente de correlação de Pearson, que pode ser calculado pela Equação A, é uma medida de associação linear entre duas variáveis quantitativas que varia de -1 a 1, indicando correlação positiva ou negativa a depender do sinal de r e também correlação forte ou fraca entre os parâmetros analisados, quanto mais perto de 1 (independente do sinal) maior é o grau de dependência estatística linear entre as variáveis (Figueiredo Filho, Silva Júnior, 2009).

$$r = \frac{1}{n-1} \sum \left(\frac{x_i - \bar{X}}{S_x} \right) \left(\frac{y_i - \bar{Y}}{S_y} \right) \quad (A)$$

Em que: n é o número de observações feitas para estimar essa correlação; x_i e y_i são os valores de x e y, respectivamente, para a observação i (i varia de 1 até n); \bar{X} e \bar{Y} representam a média de x e y, respectivamente; S_x e S_y indicam o valor do desvio padrão de x e y, respectivamente.

3 Resultado e Discussão

Antes de iniciar o estudo de formação de partículas propriamente dito, realizaram-se testes de diluições (mistura física) de óleo em cera de abelha. Neste estudo preliminar utilizou-se óleo de soja comercial ao invés do óleo de abacate devido ao seu baixo custo. Nestes ensaios foram utilizados 1 g de cera de abelha derretida a 90 °C por 5 min, adicionada de óleo (variando de 1g a 12g), a mistura fora derretida novamente a 90 °C por aproximadamente 3 min e agitada em vórtex por 1 min e deixada resfriar em repouso em temperatura ambiente. O objetivo deste estudo foi conhecer qual diluição minimizaria o uso da cera de abelha e daria origem à uma mistura sólida (não pastosa), no entanto, todas as diluições ficaram com consistências muito parecidas.

Com base no estudo anterior decidiu-se realizar um primeiro teste de formação de partículas utilizando a proporção de 2 partes de óleo de abacate para 1 parte de cera de abelha e caso fosse possível formar partículas e as partículas ficassem sólidas como esperado, a proporção de óleo na mistura seria aumentada. Neste teste preliminar formou-se partículas, no entanto, as partículas formadas não eram estáveis e em pouco tempo aglomeraram-se. Realizou-se então teste de formação de partículas utilizando a proporção de 1:1 de óleo e cera

de abelha e obtiveram-se partículas mais estáveis, sendo esta a proporção escolhida para o andamento da pesquisa.

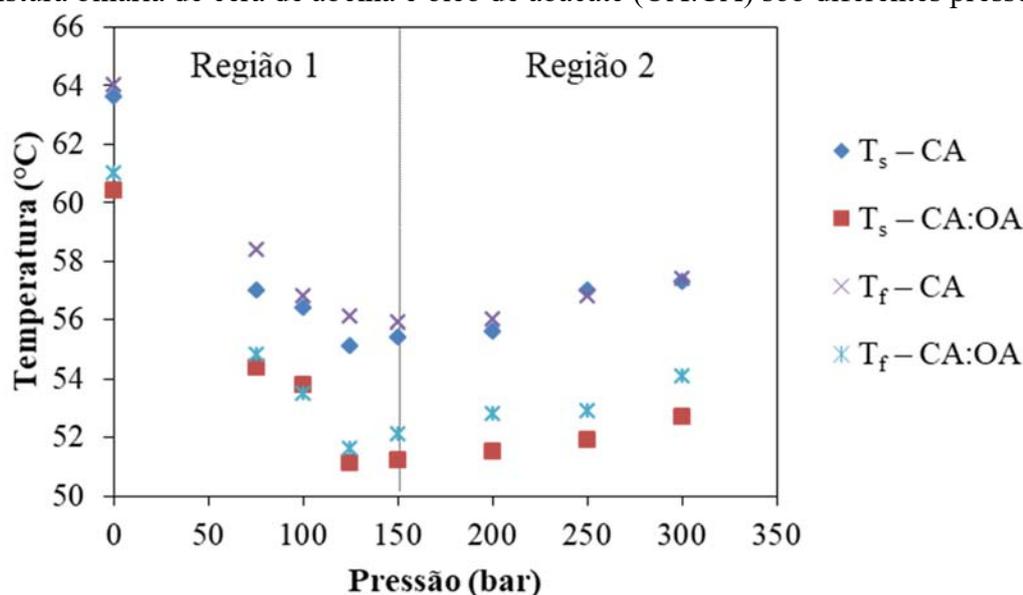
Definida a proporção dos materiais, objetivou-se utilizar as menores temperaturas e pressões possíveis a fim de se estabelecer um processo mais ambientalmente amigável pelo menor consumo de energia e também, principalmente, para manter as propriedades funcionais dos compostos utilizados. Para isso realizou-se o estudo do comportamento lipídico em CO₂ supercrítico.

3.1 Comportamento lipídico em CO₂ supercrítico observado no monitor de fase

3.1.1 Temperaturas de fusão e solidificação em CO₂ supercrítico

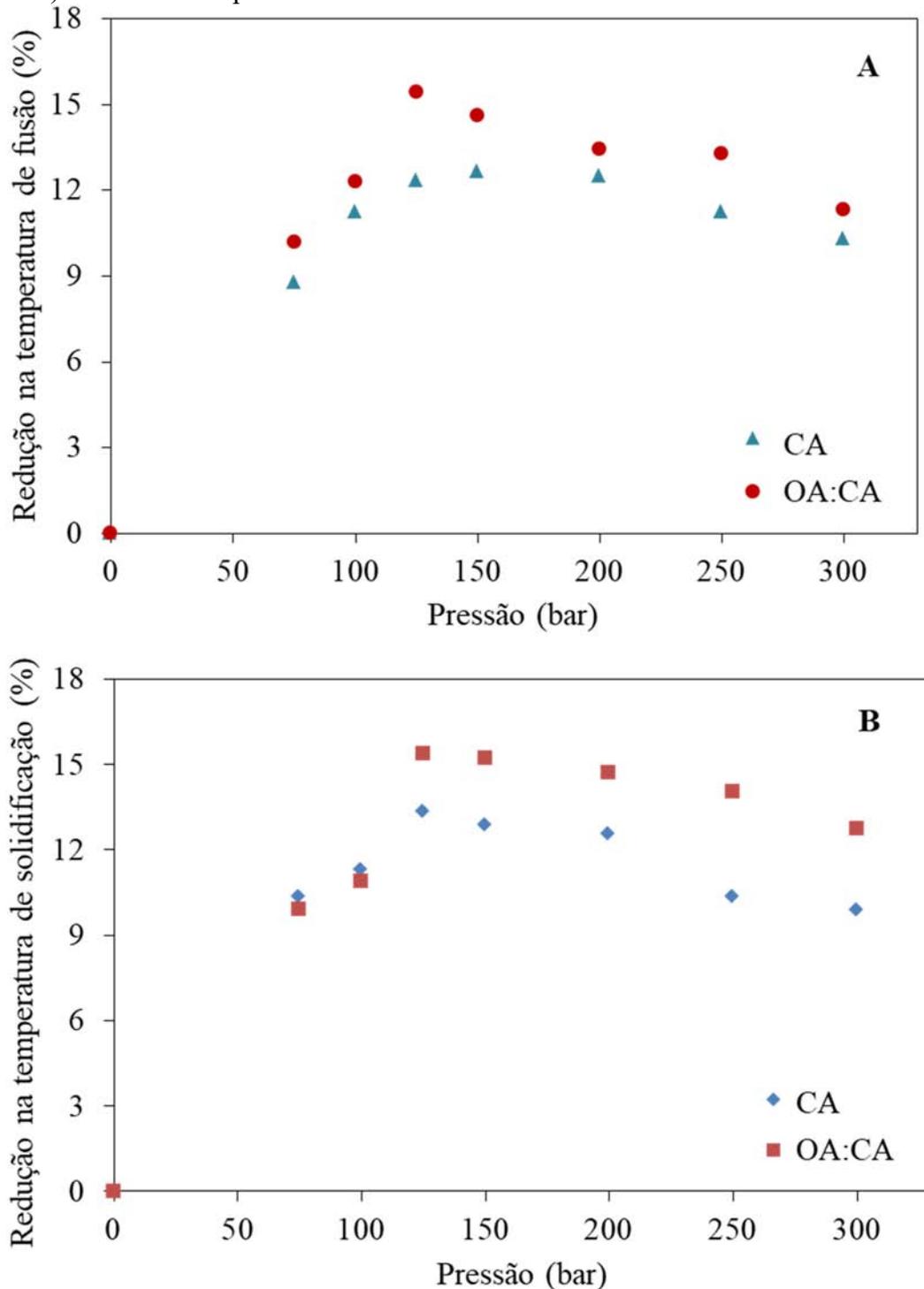
Os dados de T_f e T_s para cera de abelha e sua mistura com óleo de abacate foram divididos em duas regiões as quais foram denominadas região 1 e região 2 (Figura 4). Na região 1, ambas as temperaturas diminuíram com o aumento da pressão, enquanto na região 2 as temperaturas de fusão e solidificação aumentaram com o aumento da pressão. Na transição entre as duas regiões (a 150 bar) cada amostra apresentou um comportamento diferente. Para a cera de abelha, T_s aumentou, mas o T_f continuou a diminuir e para a mistura cera de abelha-óleo de abacate, ambos aumentaram.

Figura 4. Temperatura de fusão (T_f) e temperatura de solidificação (T_s) da cera de abelha (CA), mistura binária de cera de abelha e óleo de abacate (OA:CA) sob diferentes pressões.



De acordo com de Sousa et al. (2006), esse comportamento pode ser explicado por dois fenômenos distintos: o aumento da temperatura de fusão dos compostos devido ao aumento da pressão e a diminuição da temperatura de fusão pela dissolução do CO₂ na amostra.

Figura 5. Redução percentual do ponto de fusão (A) e redução percentual do ponto de solidificação (B) da cera de abelha (CA) e mistura binária de cera de abelha e óleo de abacate (OA:CA) sob diferentes pressões.



As T_f e T_s mensuradas para cada amostra foram usados para determinar a variação percentual nos pontos de fusão e solidificação, respectivamente, a uma dada pressão em comparação com a pressão atmosférica. A Figura 5A introduz a redução percentual de T_f com o aumento da pressão. A redução da temperatura de fusão da cera de abelha apresentou um comportamento mais previsível e modelável quando comparado à mistura binária com óleo de abacate, observa-se também que o percentual de redução de T_f para a mistura binária é superior à observada para a cera de abelha pura em todas as pressões estudadas. Este fenômeno pode indicar que a composição de ácidos graxos das amostras tem um efeito substancial na depressão de T_f em CO_2 pressurizado porque a cera de abelha tem ácidos graxos de cadeia mais longa do que o óleo de abacate. Ciftci e Temelli (2014) observaram uma maior depressão de T_f para lipídios contendo ácidos graxos de cadeia mais curta. Na Figura 5B, que representa a depressão T_s , podemos observar que para pressões de até 100 bar, ambas amostras mostraram depressão T_s semelhante; entretanto, para pressões mais altas, a depressão T_s da mistura lipídica foi maior do que a observada para a cera de abelha pura, fato que pode ser justificado pelo mesmo argumento usado para a depressão de T_f .

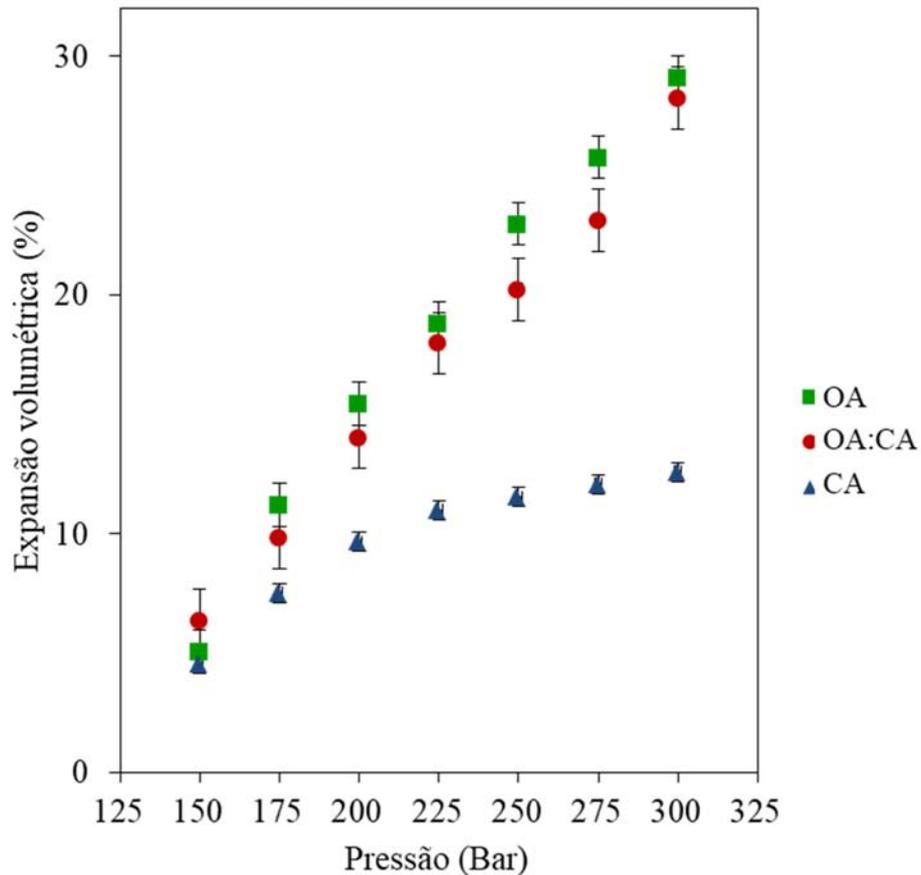
Com base na análise de T_f e T_s , infere-se que as misturas lipídicas estudadas podem ser utilizadas como materiais de transporte para a formação de partículas com CO_2 supercrítico a uma temperatura de 60 °C e pressões entre 150 e 300 bar. Essa temperatura de processo pode garantir uma margem de segurança para a manutenção da mistura lipídica no estado líquido durante o período de contato com o CO_2 supercrítico.

3.1.2 Expansão volumétrica em CO_2 supercrítico

O comportamento observado para a expansão volumétrica (E_v) dos lipídios em resposta ao aumento da pressão variou para cada amostra, conforme mostrado na Figura 6. Na tentativa de investigar a relação entre a expansão volumétrica e a depressão do ponto de fusão, o E_v dos lipídios no CO_2 pressurizado foi estudado em pontos referentes à região 2 da curva de fusão (Figura 4) e em pressões intermediárias para esses pontos. Normalmente, o intumescimento resultante da absorção de CO_2 na mistura de lipídios aumenta com a pressão até um determinado nível e, em seguida, atinge um platô (Jenab e Temelli, 2012); entretanto, este fenômeno não foi observado neste estudo na faixa de pressão utilizada. A menor E_v foi observada para cera de abelha, e a maior E_v para o óleo de abacate, estando a mistura binária em uma região intermediária conforme esperado. No entanto o comportamento da mistura

apresentou-se mais semelhante ao comportamento do OA do que ao da CA e, à 150 bar a mistura de lipídios apresentou E_v maior do que ambos os lipídios isolados.

Figura 6. Expansão volumétrica a 60 °C de óleo de abacate (OA), mistura binária de cera de abelha e óleo de abacate (OA:CA) e cera de abelha (CA) sob diferentes pressões, expressas como porcentagem em relação ao volume inicial.

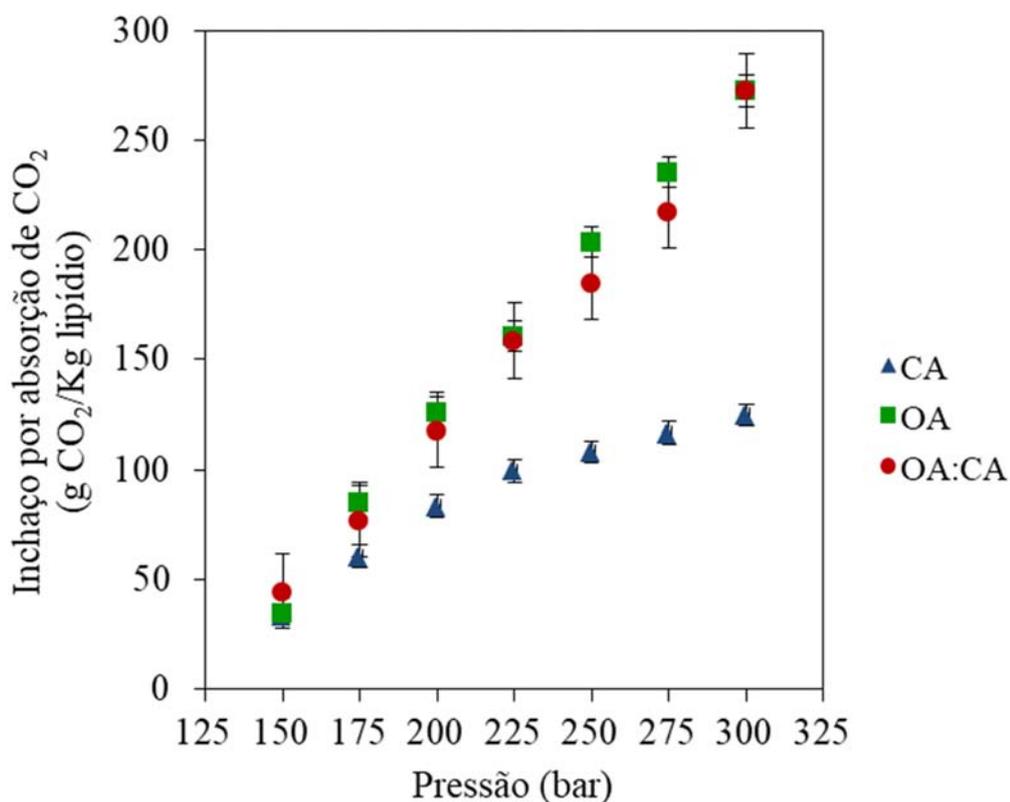


Comparando as Figuras 4 e 6, pode-se observar que para a região estudada ocorre um aumento simultâneo da expansão volumétrica e da temperatura de fusão. Segundo Ciftci e Temelli (2014), existe a possibilidade de um ligeiro aumento da T_f de gorduras e óleos saturados com CO_2 para pressões relativamente altas, o que é atribuído aos efeitos concomitantes do aumento da T_f devido a uma maior pressão hidrostática e diminuição T_f devido à dissolução de CO_2 , sendo neste caso o efeito da pressão superior ao efeito da dissolução de dióxido de carbono.

3.1.3 Intumescimento por absorção de CO₂

O aumento de volume observado nos testes de expansão volumétrica (Figura 7) deve-se à dissolução do CO₂ nas misturas lipídicas estudadas; portanto, determinar o resultado do intumescimento do CO₂ nos lipídios e na mistura de lipídios líquida pode ser útil para interpretar o comportamento da expansão volumétrica do óleo em equilíbrio com o CO₂ supercrítico.

Figura 7. Intumescimento devido à absorção de dióxido de carbono (CO₂) em cera de abelha (CA), óleo de abacate (OA) e mistura binária de cera de abelha e óleo de abacate (OA:CA) sob diferentes pressões, expressas em g CO₂/Kg lipídio.



Conforme mostrado na Figura 7, o intumescimento nos lipídios estudados aumentou com o aumento da pressão. Este fenômeno provavelmente ocorre por dois mecanismos. A primeira é que com o aumento da pressão a densidade do CO₂ aumenta, tornando-se mais semelhante à densidade dos lipídios estudados; o segundo mecanismo é que o aumento da pressão facilita a entrada do CO₂ no tubo contendo os lipídios para que haja regulação da pressão interna e externa ao tubo.

Estudo realizado por de Sousa et al (2006) com Precirol[®] ATO5, Compritol[®] 888 ATO e Gelucire[®] 43-01 como carreadores de lipídios, também verificou que o intumescimento decorrente da absorção do CO₂ pelos lipídios varia com a mudança de pressão.

3.1.4 Solubilidade de lipídios em CO₂ supercrítico

A solubilidade da mistura lipídica estudada em CO₂ supercrítico foi medida a 60 °C e 70 °C sob diferentes pressões (150, 200 e 250 bar) e tempos de contato estático (1, 2 e 3 horas). Os diferentes tempos foram usados para certificar que o equilíbrio foi alcançado. Os valores de solubilidade variaram de 1,84 ± 0,27 g/kg de CO₂ a 6,51 ± 0,02 g/kg de CO₂ quando se aplicou temperatura de 60 °C e de 1,00 ± 0,12 g/kg de CO₂ a 5,95 ± 0,41 g/kg de CO₂ para temperatura de 70 °C (Tabela 1).

Tabela 1. Solubilidade da mistura binária de óleo de abacate e cera de abelha em CO₂ supercrítico (g/Kg CO₂) sob diferentes pressões, temperatura e tempos de contato estático.

Tempertaura (°C)	Pressão (bar)	Densidade do CO ₂ (g/cm ³)	Tempo		
			1 h	2 h	3 h
60	150	0,61	1,95 ± 0,19 ^{a,A}	2,45 ± 0,26 ^{a,A}	1,84 ± 0,27 ^{a,A}
	200	0,73	2,83 ± 0,12 ^{a,A}	4,84 ± 0,23 ^{b,B}	6,51 ± 0,02 ^{b,C}
	250	0,79	4,98 ± 0,60 ^{b,A}	5,78 ± 0,37 ^{b,A}	5,79 ± 0,11 ^{c,A}
70	150	0,51	1,00 ± 0,23 ^{a,A}	1,00 ± 0,12 ^{a,A}	1,35 ± 0,23 ^{a,A}
	200	0,66	2,60 ± 0,20 ^{b,A}	2,80 ± 0,05 ^{b,A,B}	3,18 ± 0,41 ^{b,B}
	250	0,74	4,94 ± 0,50 ^{c,A}	5,64 ± 0,37 ^{c,A}	5,95 ± 0,41 ^{c,A}

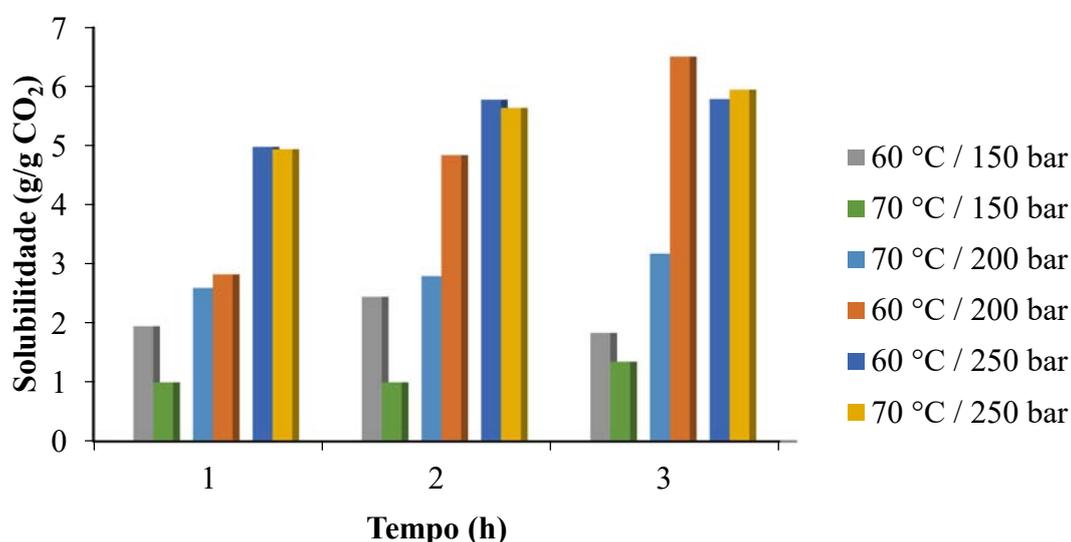
Resultados expressos em média ± desvio padrão, com base em triplicatas.

Os parâmetros seguidos pelas mesmas letras minúsculas na mesma coluna para cada temperatura e letras maiúsculas na mesma linha não diferem estatisticamente entre si no nível de confiança de 95% pelo teste de médias de Tukey.

A solubilidade das misturas lipídicas em CO₂ supercrítico aumentou com o aumento da pressão para ambas as temperaturas e independentemente o tempo estático, o que pode ser facilmente visualizado na Figura 8. Estudos de McHugh e Krukoni (2013) mostram que o poder solvente de um fluido supercrítico está relacionado à sua densidade, o que é reforçado por Rad, Sabet e Varaminian (2019) quando afirmam que um aumento na pressão leva a um aumento na densidade e no poder de solvatação do CO₂ supercrítico. Com base nisso, podemos inferir que a solubilidade das misturas lipídicas no CO₂ supercrítico provavelmente

aumentou com o aumento da pressão, pois a densidade do fluido aumentou, tornando-se mais semelhante à da mistura lipídica. Vale ressaltar que, de acordo com a literatura, à 20 °C, a densidade óleo de abacate é de 0,91 g/cm³ (Lopez-Vega et al., 2021) e da cera de abelha é de 0,96 g/cm³ (Bernal et al., 2005). Sabe-se que esta densidade decai com o aumento da temperatura. Na Figura 8 pode-se observar que em 150 bar a solubilidade da mistura em CO₂ a 70 °C é consideravelmente menor do que a 60 °C independentemente do tempo de contato estático, isso provavelmente se deve à menor densidade do CO₂ à 70 °C.

Figura 8. Solubilidade da mistura binária de cera de abelha e óleo de abacate em CO₂ supercrítico sob diferentes condições.

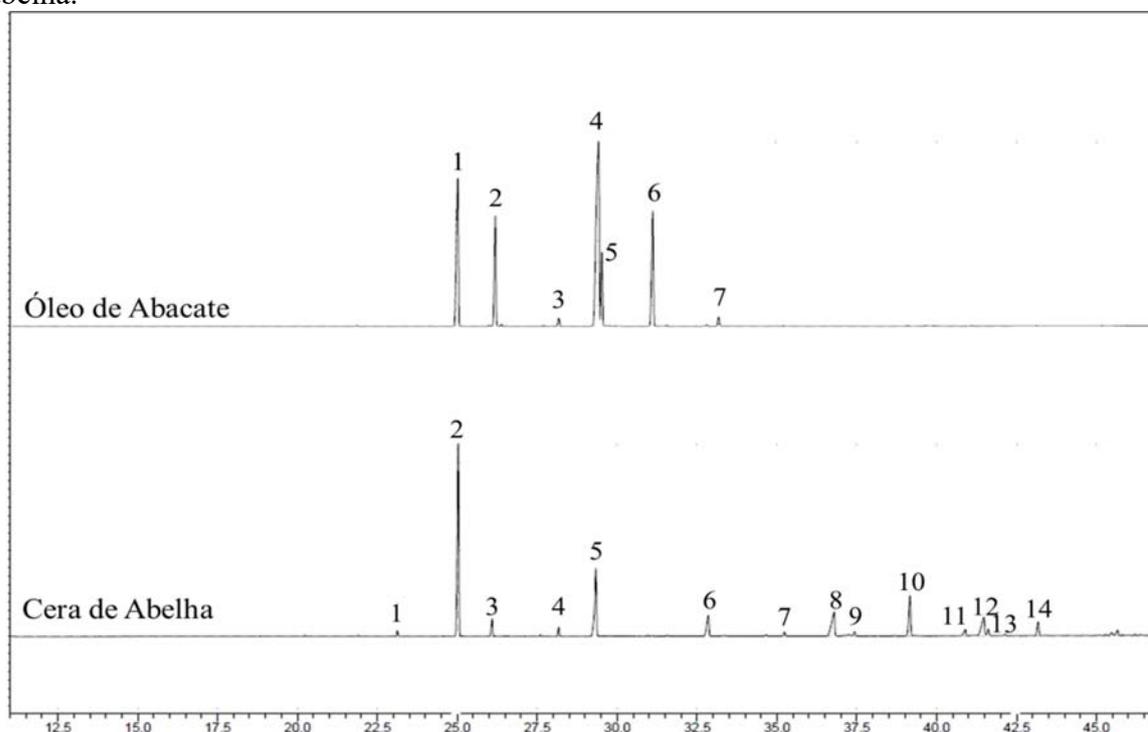


Esses resultados revelaram que a formação de partículas com CO₂ supercrítico utilizando a mistura lipídica estudada pode ser conduzida em um curto tempo de contato para minimizar a degradação de compostos bioativos termossensíveis, pois os dados indicam que o equilíbrio entre a mistura e o CO₂ supercrítico pode ser alcançado em apenas 1h e em temperatura relativamente baixa (60 °C), o que torna essas misturas boas transportadoras de partículas lipídicas sólidas contendo compostos bioativos e fitoterápicos. No entanto, deve-se ressaltar que apesar de, na maior parte das condições estudadas o tempo não ter interferido estatisticamente na solubilidade da mistura cera de abelha com óleo de abacate, a condição que empregou 60 °C e 200 bar foi afetada pelo tempo de contato estático, sendo maior com o aumento do tempo de contato entre o CO₂ supercrítico e a mistura lipídica.

3.2 Perfil de ácidos graxos

Pode-se observar no cromatograma total de íons de ácido graxo encontrado no óleo de abacate e na cera de abelha representado na Figura 9, que diversos picos apresentados pelas amostras possuem tempos de retenção semelhantes, o que indica a presença de ácidos graxos com grupos funcionais semelhantes. Os perfis qualitativos de ácidos graxos dos lipídios estudados são relatados na Tabela 2.

Figura 9. Cromatograma de íons totais para ácidos graxos em óleo de abacate e cera de abelha.



Óleo de abacate: (1) *hexadecanoato de metila*, (2) *ácido cis-10-heptadecenóico, éster metílico*, (3) *margarato de metila*, (4) *elaidato de metila*, (5) *11-octadecenoato de metila*, (6) *éster etílico de ácido linoleico*, (7) *11,14,17-eicosatrienoato de metilo*.

Cera de abelha: (1) *heptadecano*, (2) *palmitato de metila*, (3) *n-eicosano*, (4) *margarato de metila*, (5) *2-octildecanol*, (6) *docosano*, (7) *nonadecanoato de metila*, (8) *n-tetracosano*, (9) *1-Pentacosanol*, (10) *Tetracosanoato de metilo*, (11) *n-Octacosano*, (12) *Heptacosanol*, (13) *Trifluoroacetato de Heneicosilo*, (14) *Hexacosanoato de metilo*.

Margarato de metila e Metil hexacosanoato foram os dois únicos ácidos graxos identificados em ambos os lipídios estudados.

As diferenças no perfil de ácidos graxos provavelmente influenciam os demais resultados obtidos tal como a solubilidade da mistura de lipídios em CO₂ supercríticos e a

solubilidade deste fluido nos lipídios, pois estas medidas são afetadas pelo perfil de ácidos graxos devido à diferença de polaridade e densidade de cada ácido graxo que afeta diretamente as características do lipídio como um todo. Além disso, a cera de abelha, que é uma cera sólida à temperatura ambiente, apresenta um perfil de ácidos graxos mais complexo do que o encontrado para o óleo de abacate, apresentando apenas dois ácidos graxos semelhantes, o que provavelmente justifica seu comportamento diferente. Além de a cera possuir ácidos graxos com cadeias de carbonos maiores, os álcoois nos quais os ácidos graxos estão esterificados também costumam ter alto peso molecular.

Tabela 2. Ácidos graxos presentes no óleo de abacate e na cera de abelha, determinado por análise de GC-MS.

Ácido graxo	Amostra	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Número CAS	Tempo de retenção (min)
1-Pentacosanol	CA	C ₂₃ H ₄₈ O	368,7	26040-98-2	37,43
2-Octyldecanol	CA	C ₂₀ H ₄₂ O	298,5	5333-42-6	29,34
Cis-10-heptadecenoic acid, methyl ester	OA	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,5	75190-82-8	26,23
Docosane	CA	C ₂₂ H ₄₆	310,6	629-97-0	32,85
Eicosyl pentafluoroptopionate	CA	C ₂₃ H ₄₁ F ₅ O ₂	444,6	-	45,66
Heneicosyl trifluoroacetate	CA	C ₂₃ H ₄₃ F ₃ O ₂	408,6	-	41,62
Heptacosanol	CA	C ₂₇ H ₅₆ O	396,7	2004-39-9	41,47
Heptadecane	CA	C ₁₇ H ₃₆	240,5	629-78-7	23,12
Linoleic acid ethyl ester	OA	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308,5	544-35-4	31,14
Methyl 11,14,17-eicosatrienoate	OA	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	320,5	55682-88-7	33,20
Methyl 11-octadecenoate	OA	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296,5	6198-58-9	29,56
Methyl elaidate	OA	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296,5	1937-62-8	29,46
Methyl hexacosanoate	OA, CA	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270,5	112-39-0	25,07
Methyl margarate	OA, CA	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284,5	1731-92-6	28,22
Methyl nonadecanoate	CA	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312,5	1731-94-8	31,59
Methyl palmitate	CA	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270,5	112-39-0	25,03
Methyl tetracosanoate	CA	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	382,7	2442-49-1	39,16
n-Eicosane	CA	C ₂₀ H ₄₂	282,5	112-95-8	26,09
n-Octacosane	CA	C ₂₈ H ₅₈	394,8	630-02-4	40,89
n-Tetracosane	CA	C ₂₄ H ₅₀	338,7	646-31-1	36,79
n-Triacontanol	CA	C ₃₀ H ₆₂ O	438,8	593-50-0	45,48

CAS: Serviço de Resumo Químico (em inglês: *Chemical Abstract Service*), OA: óleo de abacate, CA: cera de abelha.

3.3 Atividade de eliminação de radicais ABTS

Para o cálculo da atividade de eliminação dos radicais ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) do óleo de abacate construiu-se uma curva padrão de trolox com cinco pontos que deu origem à equação da reta $y = -0,0003x + 0,7089$ com coeficiente de regressão de 0,99, em que x é a absorbância mensurada e y é a atividade antioxidante expressa em μM de trolox. Com absorbâncias médias obtidas para cada diluição do óleo, calculou-se o equivalente em trolox na captura dos radicais ABTS do óleo de abacate como sendo $74,38 \mu\text{M trolox/g}$.

3.4 Estudo das partículas formadas por PGSS

3.4.1 Características macroscópicas e morfologia

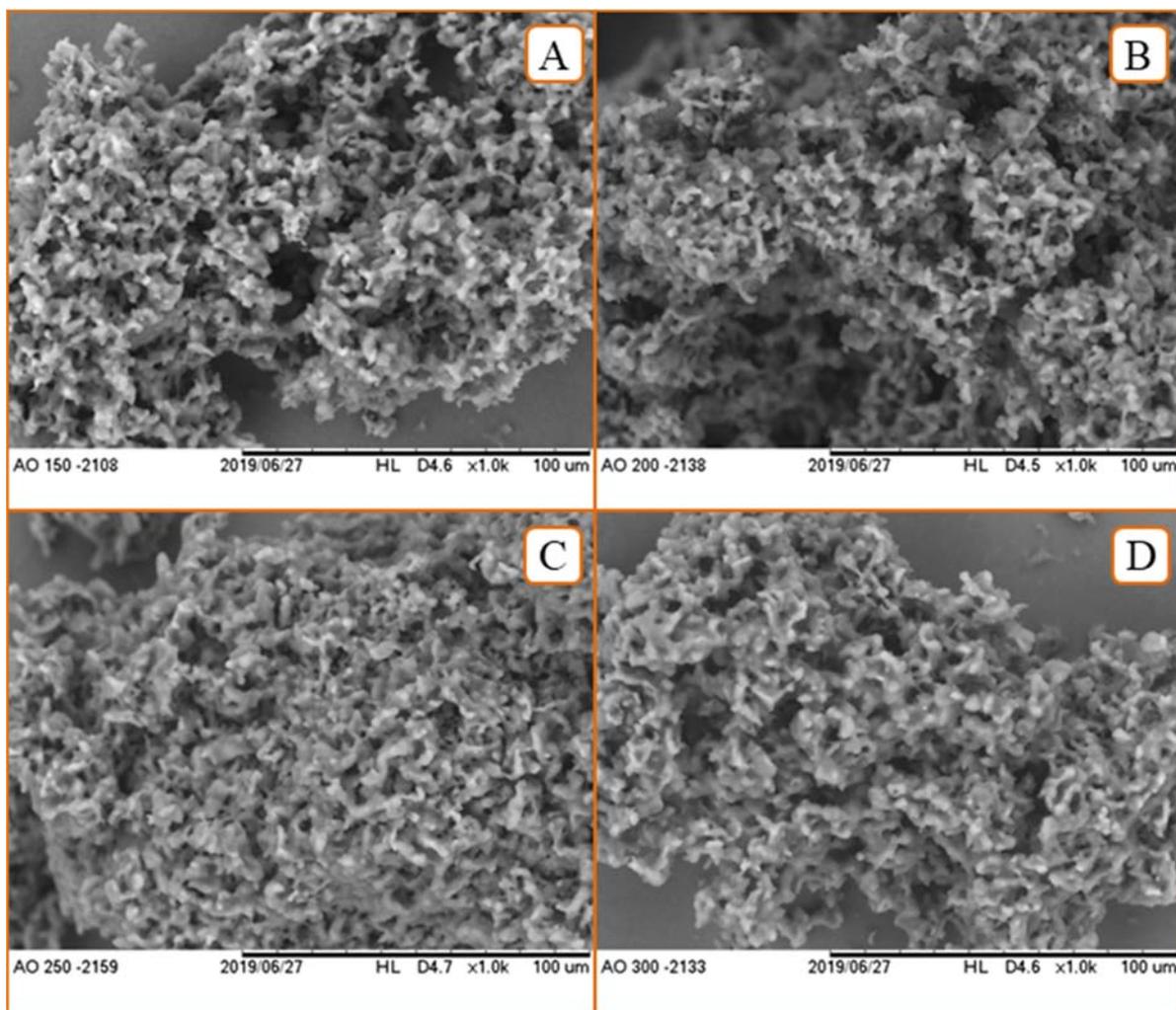
A cera de abelha sólida, após purificação, apresenta uma aparência brilhante e coloração marrom clara, características que podem ser diferentes a depender da origem do material pois estas podem ser influenciadas pelo ecossistema e pelo tipo de abelha que a produz (Tulloch e Hoffman, 1972), o óleo de abacate comercial utilizado (Hass, Bauru, Brasil) apresenta coloração verde amarelada translúcida, já as partículas formadas com a mistura binária de cera de abelha e óleo de abacate possuem aparência opaca com uma coloração amarelo claro (Figura 10).

Figura 10. Aparência física da cera de abelha sólida, do óleo de abacate pura e das partículas formadas pela mistura binária de óleo de abacate de cera de abelha por PGSS com CO_2 supercrítico a 300 bar e 60°C .



Ao serem observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), notou-se que as partículas apresentavam aspecto semelhante ao de esponjas (Figura 11). As diferentes pressões de CO₂ empregadas não acarretaram em diferenças perceptíveis na morfologia das partículas observadas por MEV. Resultado semelhante ao observado por Aredo e colaboradores (2021) para partículas de cera de abelha carregadas com óleo de castanha do Brasil.

Figura 11. Microscopias eletrônicas de varredura das partículas obtidas à partir da mistura binária de óleo de abacate e cera de abelha por PGSS com CO₂ supercrítico a 60°C e (A) 150 bar, (B) 200 bar, (C) 250 bar e (D) 300 bar.



3.4.2 Distribuição de tamanho, densidade aparente e análise de correlação

A distribuição do tamanho das partículas (Figura 12) pode ser expressa com sucesso pela função Rosin-Rammler (R^2 mínimo = 99,75%) (Tabela 3); portanto, os parâmetros Rosin-Rammler (n e X_R) e os descritores estimados (D_{10} , D_{50} e D_{90}) foram confiáveis para comparar as distribuições de tamanho das partículas. A distribuição de tamanho das partículas de cera de abelha carregadas com óleo de abacate teve uma ampla distribuição e não evidenciou diferenças importantes entre elas causadas pela variação da pressão de CO_2 no processo.

Figura 12. Distribuição do tamanho de partículas formadas pela mistura binária de cera de abelha e óleo de abacate em CO_2 supercrítico à 60 °C sob diferentes pressões.

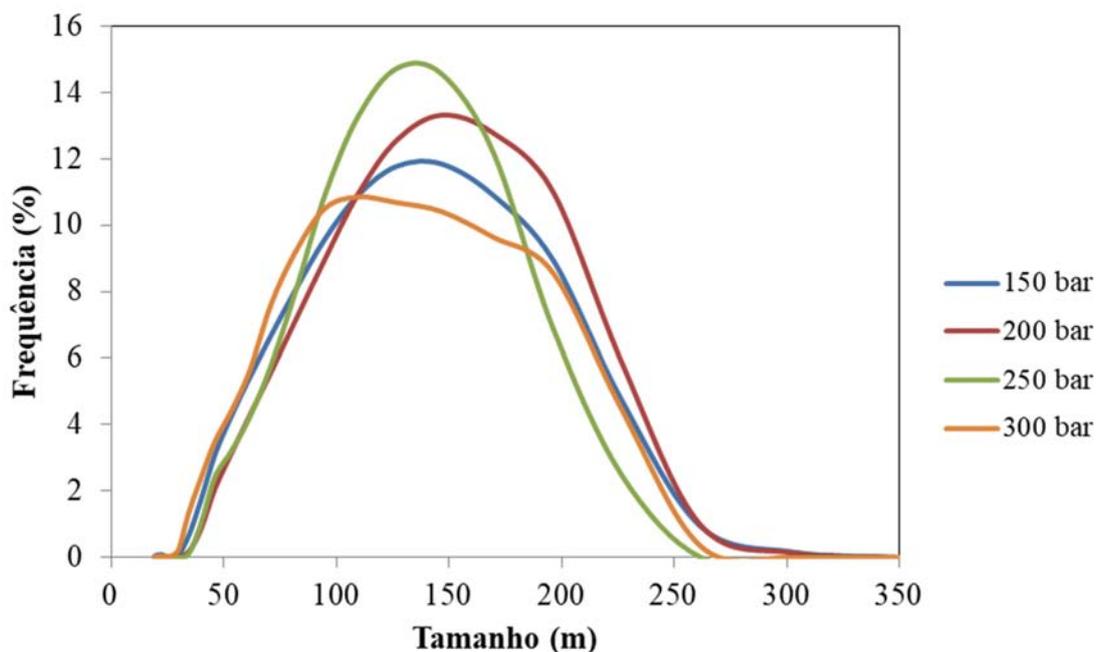


Tabela 3. Análise da distribuição de tamanho de partículas formadas pela mistura binária de cera de abelha e óleo de abacate em CO_2 supercrítico à 60 °C sob diferentes pressões.

Pressão (bar)	Parâmetro de Rosin-Rammler		R^2 (%)	Descritores Estimados			D [4,3] (μm)
	n	X_R (μm)		D_{10} (μm)	D_{50} (μm)	D_{90} (μm)	
150	$2,5 \pm 0,1^a$	148 ± 9^a	$99,8^a$	60 ± 3^a	128 ± 7^a	207 ± 13^a	178 ± 15^a
200	$2,8 \pm 0,4^a$	158 ± 11^a	$99,8^a$	70 ± 10^a	138 ± 10^a	215 ± 18^a	180 ± 15^a
250	$3,0 \pm 0,3^a$	146 ± 4^a	$99,9^a$	69 ± 4^a	129 ± 2^a	193 ± 9^a	162 ± 8^a
300	$2,4 \pm 0,2^a$	141 ± 13^a	$99,7^a$	55 ± 3^a	121 ± 10^a	199 ± 22^a	172 ± 12^a

Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

Os parâmetros seguidos pelas mesmas letras na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si no nível de confiança de 95% pelo teste de médias de Tukey.

A densidade aparente das partículas de cera de abelha carregadas com óleo de abacate variou de 81 a 97 mg/mL (Tabela 4).

Com base na Tabela 4 pode-se observar que usando CO₂ supercrítico (60 °C) a 300 bar, as partículas de cera de abelha carregadas com óleo de abacate tiveram uma densidade aparente aumentada quando comparadas àquelas formadas em pressões de CO₂ mais baixas, diferindo estatisticamente. Comportamento inverso àquele observado por Aredo e colaboradores (2021) para partículas de cera de abelha carregadas com óleo de castanha do Brasil. Portanto, a pressão de CO₂ e o óleo comestível empregado devem ser levados em consideração para o projeto de partículas com densidade aparente reduzida.

Tabela 4. Análise da distribuição de tamanho de partículas formadas pela mistura binária de cera de abelha e óleo de abacate em CO₂ supercrítico à 60 °C sob diferentes pressões.

Pressão (bar)	Densidade aparente (mg/mL)
150	78,56 ± 4,07 ^a
200	83,28 ± 5,51 ^a
250	76,05 ± 4,80 ^a
300	95,57 ± 3,61 ^b

Resultados dos valores mensurados expressos em média ± desvio padrão.

Os parâmetros seguidos pelas mesmas letras na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si no nível de confiança de 95% pelo teste de médias de Tukey.

A Tabela 5 apresenta coeficientes de correlação da pressão aplicada com alguns parâmetros analisados. Com base no coeficiente de correlação de Pearson se pode afirmar que a pressão de CO₂ teve uma forte correlação positiva com a expansão volumétrica e com a solubilidade da mistura lipídica no CO₂ supercrítico, afirmação corroborada pelo p valor pois p é menor que α . O tamanho de partícula não sofreu influência significativa da pressão ($p > 0,05$), o que corrobora com o teste de Tukey apresentado na Tabela 3. Devido ao diferente comportamento apresentado pelas temperaturas de fusão e solidificação em diferentes intervalos de pressão, conforme observado na Figura 4, analisou-se as correlações para o intervalo inteiro de pressão estudado em também para pressões superiores e inferiores a 150 bar. Com isso se pode observar que de modo geral, as temperaturas de fusão e solidificação tiveram correlação negativa moderada com a pressão, mas quando analisados intervalos de pressão observa-se que em pressões entre 0 e 150 bar tanto T_s quanto T_f tiveram forte correlação negativa com a pressão e que para pressões entre 150 e 300 bar a pressão não influenciou significativamente nestes parâmetros ($p > 0,05$).

Esses resultados sugeriram que a maior solubilidade da mistura lipídica em CO₂ supercrítico em pressões mais altas poderia levar à redução do tamanho e conseqüentemente ao aumento da densidade aparente das partículas de cera de abelha carregadas com óleo de abacate obtidas por PGSS. Informação que pode ser útil para o projeto do processo dessas partículas. Não é seguro afirmar que as mesmas correlações observadas neste trabalho possam ser extrapoladas para a mistura lipídica de cera de abelha com outros lipídios líquidos, sendo necessária a análise individual para cada lipídio ou combinação de lipídios de interesse.

Tabela 5. Análise da correlação entre a pressão utilizada e a solubilidade em CO₂ supercrítico, expansão volumétrica e temperaturas de fusão e solidificação da mistura lipídica de cera de abelha e óleo de abacate (1:1) e tamanho e a densidade aparente das partículas obtidas por PGSS à partir da mistura lipídica a 60 °C com agitação de 1250 rpm por 1h.

Parâmetro correlacionado		Variação na Pressão (bar)	r	p*
Temperatura de Fusão		0 a 300	-0,59	0,0033
		0 a 150	-0,97	0,0061
		150 a 300	0,95	0,6044
Temperatura de Solidificação		0 a 300	-0,68	0,0025
		0 a 150	-0,91	0,0060
		150 a 300	0,97	0,7475
Expansão Volumétrica		0 a 300	0,98	0,0000
Solubilidade da mistura no CO ₂ supercrítico (60 °C)	1 hora		0,97	0,0083
	2 horas	150 a 300	0,97	0,0031
	3 horas		0,79	0,0039
Tamanho Partícula (D ₅₀)		150 a 300	-0,56	0,1437
Densidade aparente		150 a 300	0,65	0,0003

r: coeficiente de correlação de Pearson; p: p valor obtido pela ANOVA

* $\alpha=0,05$

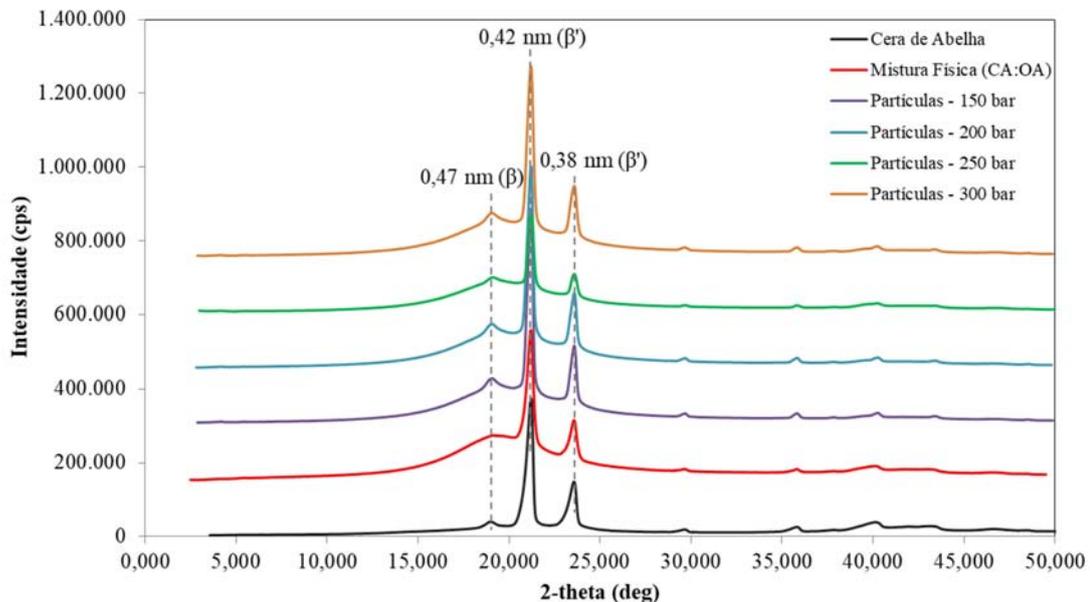
3.4.3 Polimorfismo e propriedades térmicas

O difratograma de raios X obtidos para a cera de abelha, mistura física binária de cera de abelha e óleo de abacate e para partículas obtidas à partir desta mistura a diferentes pressões estão apresentados na Figura 13.

Os padrões cristalinos de polimorfismos β' (0,42 e 0,38 nm) foram identificados em todas as amostras e o polimorfismo β (0,47 nm) foi mal definido na mistura física, mas foi claramente identificado nas partículas. Não se verificou alteração na estrutura cristalina das partículas em decorrência variação na pressão utilizada em sua formação. Notou-se que

próximo a 0,47 nm a estrutura da mistura binária apresentou-se mais amorfa quando comparada às demais amostras. Esses resultados sugerem que o processo de formação de partículas potencializou o polimorfismo β reportado na literatura como típico da cera de abelha, assim como o polimorfismo β' e deve ser levado em consideração nos estudos de estabilidade dessas partículas (Aredo et al., 2021; Soleimanian et al., 2018; Attama, Schicke, Müller-Goymann, 2006 e 2007).

Figura 13. Difratoograma de raios X da cera de abelha, da mistura física binária entre cera de abelha e óleo de abacate e das partículas de cera de abelha carregadas com óleo de abacate produzidas por PGSS a 60 °C, agitação de 1250 rpm por 1 hora e pressões de 150, 200, 250 e 300 bar.

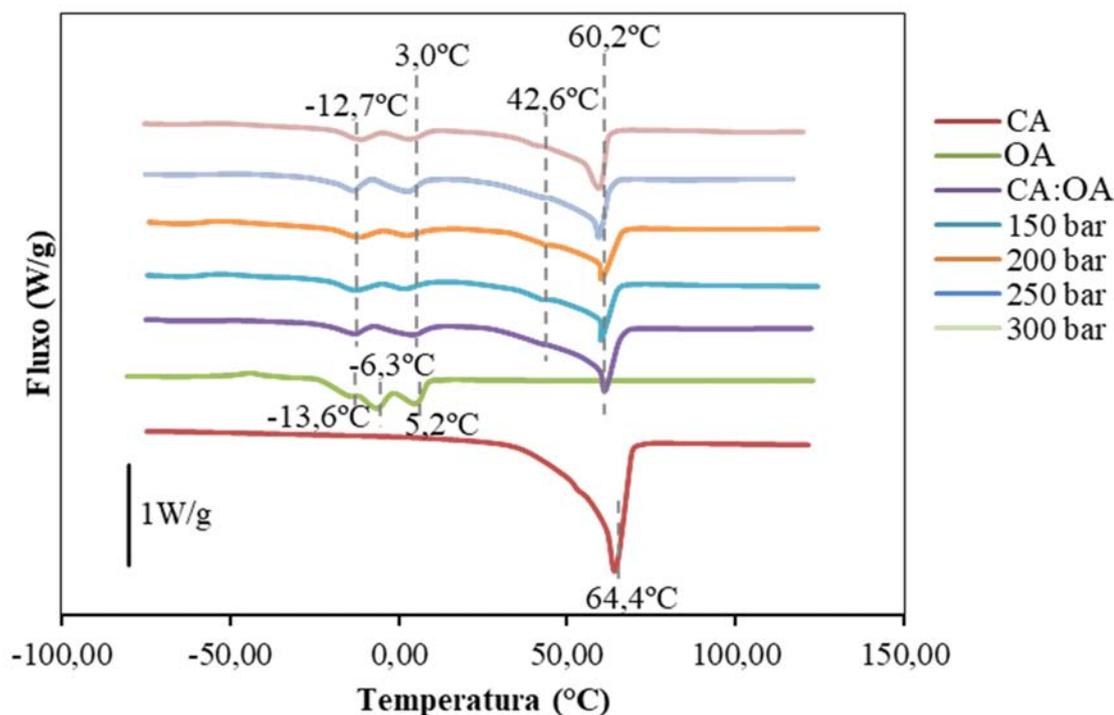


O perfil térmico do óleo de abacate (Figura 14) apresenta dois picos definidos em -6,3 °C e 5,2 °C e um ombro a -13,6 °C, a cera de abelha apresenta apenas um grande pico característico representando sua T_f a 64,4 °C valor semelhante ao determinado no ensaio em pressão ambiente apresentado na Figura 4.

Ao analisar o perfil térmico da mistura binária e das partículas formadas em diferentes pressões podemos observar termogramas similares entre si, com a presença de dois picos pouco definidos na região em que ocorrem os picos do óleo de abacate, um pico bem definido em temperatura próxima à T_f da cera de abelha e o surgimento de ombro em uma região intermediária, a 42,6 °C. Com isso podemos inferir que a T_f das partículas obtidas neste trabalho é de 60,2 °C e que o tratamento a alta pressão não altera o perfil térmico da mistura

lipídica indicando que não ocorre alteração nas moléculas que compõem a mistura, alteração ocorre apenas na interação entre elas.

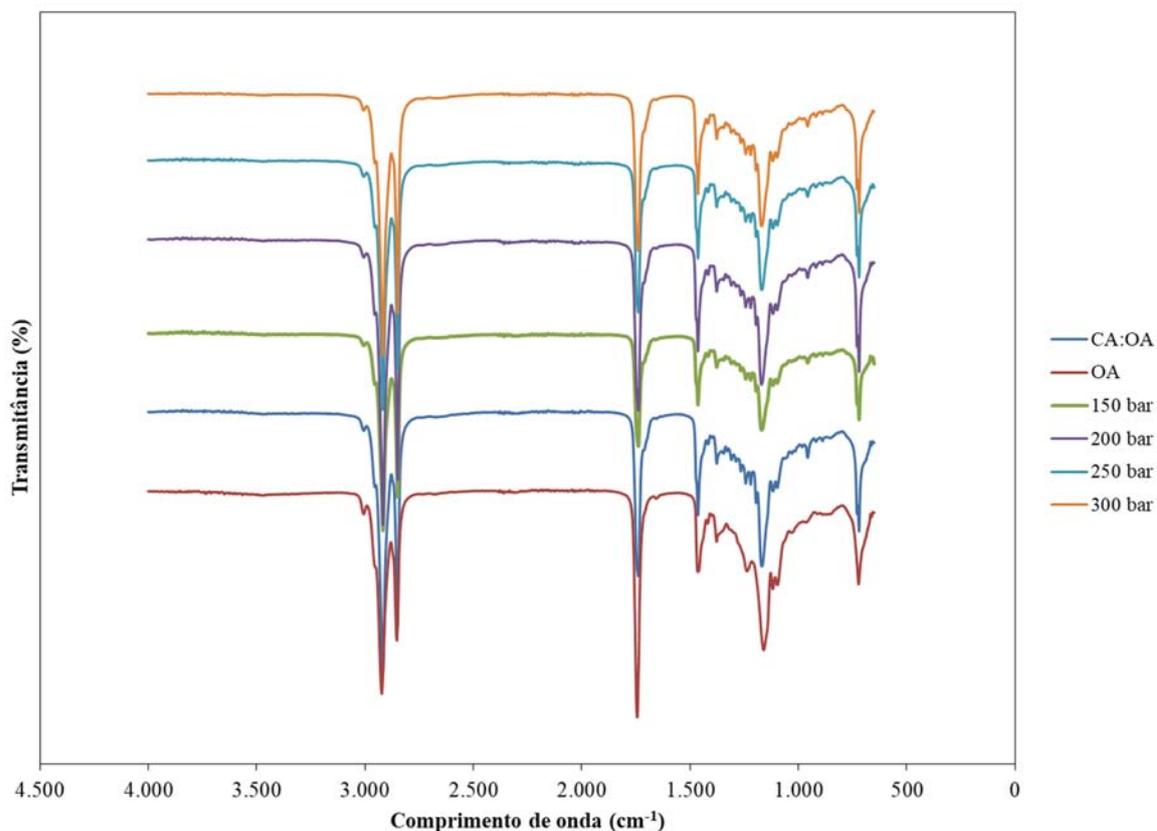
Figura 14. Termograma contendo os picos térmicos mensurados para (CA) cera de abelha, (OA) óleo de abacate, (CA:OA), mistura física binária de cera de abelha e óleo de abacate, partículas de cera de abelha carregadas com óleo de abacate produzidas por PGSS a 60 °C, agitação de 1250 rpm por 1 hora e pressões de 150, 200, 250 e 300 bar.



3.4.4 Estruturas químicas

Todos os espectros infravermelhos apresentados obtidos por transformada de Fourier (Figura 15) apresentaram as mesmas características a olho nu, características estas semelhantes às esperadas para óleos comestíveis e para a cera de abelha (Ribeiro et al., 2017; Guillen, Cabo, 1997). Como o posicionamento dos principais picos espectrais tanto das amostras contendo cera de abelha e óleo de abacate quanto das amostras de óleo de abacate puro foram semelhantes, podendo-se inferir que o mesmo grupo funcional de vibrações estavam presentes. Pode-se afirmar também que o processamento a alta pressão e a interação com o CO₂ supercrítico não alteraram quimicamente a cera de abelha e o óleo de abacate.

Figura 15. Espectro infravermelho de transformada de Fourier Termograma para (OA) óleo de abacate, (CA:OA), mistura física binária de cera de abelha e óleo de abacate, partículas de cera de abelha carregadas com óleo de abacate produzidas por PGSS a 60 °C, agitação de 1250 rpm por 1 hora e pressões de 150, 200, 250 e 300 bar.



4 Conclusão

Com base no comportamento da T_f , observou-se que a temperatura de 60 °C garante que tanto a cera de abelha pura quanto a mistura de cera de abelha com óleo de abacate esteja fundida em pressões iguais ou superiores a 50 bar; no entanto, para garantir que o CO_2 presente no meio esteja no estado supercrítico, são recomendadas pressões maiores que 75 bar. Quanto maior a pressão aplicada no processo, maior será o intumescimento da mistura devido à absorção de CO_2 e maior será a expansão volumétrica observada na faixa de pressão estudada.

As partículas obtidas neste trabalho apresentaram microestruturas esponjosas e não apresentaram diferenças em sua morfologia, propriedades térmicas, polimorfismo e estrutura química causadas pela variação na pressão de CO_2 durante sua formação.

Esses resultados indicam que essa mistura lipídica pode ser potencial carreadora para partículas lipídicas carregadas com compostos bioativos para serem aplicadas em alimentos

funcionais ou em cosméticos. Estes dados também podem servir como ponto de partida para estudos envolvendo outras misturas lipídicas para formação de partículas utilizando tecnologia supercrítica.

5 Referencias

- AKBARI, Z. et al. Application of supercritical fluid technology for preparation of drug loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 1, p. 13-33, 2020.
- AOAC. Method 969.33, 16th ed., Official methods of analysis of AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, 2005.
- AREDO, V. et al. Formation of edible oil-loaded beeswax microparticles using PGSS–Particles from Gas-Saturated Solutions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 169, p. 105106, 2021.
- ATTAMA, A. A.; SCHICKE, B. C.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Further characterization of theobroma oil–beeswax admixtures as lipid matrices for improved drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 3, p. 294-306, 2006.
- ATTAMA, A. A.; SCHICKE, B. C.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Novel physically structured lipid matrices of beeswax and a homolipid from *Capra hircus* (goat fat): a physicochemical characterization for application in drug delivery. **Journal of drug delivery Science and technology**, v. 17, n. 2, p. 103-112, 2007.
- BERNAL, J. L. et al. Physico-chemical parameters for the characterization of pure beeswax and detection of adulterations. **European journal of lipid science and technology**, v. 107, n. 3, p. 158-166, 2005.
- BRUNO, C.; ALMEIDA, M. R. Óleos essenciais e vegetais: matérias-primas para fabricação de bioprodutos nas aulas de química orgânica experimental. **Química Nova**, v. 44, p. 899-907, 2021.
- CICERO, N. et al. Chemical characterization of a variety of cold-pressed gourmet oils available on the Brazilian market. **Food Research International**, v. 109, p. 517-525, 2018.
- CIDADE-BRASIL. Município de Pirassununga. Disponível em: < <https://www.cidade-brasil.com.br/municipio-pirassununga.html>>. Acesso em 02 jun. 2022.
- CIFTCI, O. N.; TEMELLI, F. Melting point depression of solid lipids in pressurized carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 208-214, 2014.

- CIFTCI, O. N.; TEMELLI, F. Formation of solid lipid microparticles from fully hydrogenated canola oil using supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 178, p. 137-144, 2016.
- CORNELIO-SANTIAGO, H. P. et al. Supercritical CO₂ extraction of oil from green coffee beans: Solubility, triacylglycerol composition, thermophysical properties and thermodynamic modelling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 386-394, 2017.
- COUTO, R.; ALVAREZ, V.; TEMELLI, F. Encapsulation of Vitamin B2 in solid lipid nanoparticles using supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 120, p. 432-442, 2017.
- DORĐEVIĆ, V. et al. Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 4, p. 452-490, 2015.
- DOS SANTOS, A. E. et al. Micronization of luteolin using supercritical carbon dioxide: Characterization of particles and biological activity in vitro. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 181, p. 105471, 2022.
- FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, v. 18, n. 1, p. 115-146, 2009.
- GANESAN, P.; NARAYANASAMY, D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, p. 37-56, 2017.
- GANESAN, P. et al. Recent developments in solid lipid nanoparticle and surface-modified solid lipid nanoparticle delivery systems for oral delivery of phyto-bioactive compounds in various chronic diseases. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 1569, 2018.
- GUILLEN, M. D.; CABO, N. Characterization of edible oils and lard by Fourier transform infrared spectroscopy. Relationships between composition and frequency of concrete bands in the fingerprint region. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 10, p. 1281-1286, 1997.
- HUANG, F. H. et al. An accurate equation of state for carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 18, n. 6, p. 490-496, 1985.
- JENAB, E.; TEMELLI, F. Density and volumetric expansion of carbon dioxide-expanded canola oil and its blend with fully-hydrogenated canola oil. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 70, p. 57-65, 2012.
- JOSE, J.; NETTO, G. Role of solid lipid nanoparticles as photoprotective agents in cosmetics. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 18, n. 1, p. 315-321, 2019.

- KATOUIZIAN, I. et al. Formulation and application of a new generation of lipid nano-carriers for the food bioactive ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 68, p. 14-25, 2017.
- KNEZ, Ž. et al. Are supercritical fluids solvents for the future?. **Chemical Engineering and Processing-Process Intensification**, v. 141, p. 107532, 2019.
- LOPEZ-VEGA, L. A. et al. Hass avocado oil extraction: In the way of malaxation process optimization. **LWT**, v. 152, p. 112312, 2021.
- MACHADO, L. C.; PELEGATI, V. B.; OLIVEIRA, A. L. Study of simple microparticles formation of limonene in modified starch using PGSS-Particles from gas-saturated suspensions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 260-269, 2016.
- MATOS, R. L. et al. Dense CO₂ technology: Overview of recent applications for drug processing/formulation/delivery. **Chemical Engineering and Processing-Process Intensification**, v. 140, p. 64-77, 2019.
- MCHUGH, M.; KRUKONIS, V. **Supercritical fluid extraction: principles and practice**. Elsevier, 2013.
- MÜNÜKLÜ, P.; JANSENS, P. J. Particle formation of edible fats using the supercritical melt micronization process (ScMM). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, n. 1, p. 181-190, 2007.
- PANIGRAHI, S. S. et al. Nanoencapsulation strategies for lipid-soluble vitamins. **Chemical Papers**, v. 73, n. 1, p. 1-16, 2019.
- PELISSARI, J. R. et al. Production of solid lipid microparticles loaded with lycopene by spray chilling: Structural characteristics of particles and lycopene stability. **Food and bioproducts processing**, v. 98, p. 86-94, 2016.
- POOVI, G.; VIJAYAKUMAR, T. M.; DAMODHARAN, N. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: a review of the effect of physicochemical formulation factors in the optimization process, different preparation technique, characterization, and toxicity. **Current Nanoscience**, v. 15, n. 5, p. 436-453, 2019.
- RAD, H. B.; SABET, J. K.; VARAMINIAN, F. Determination of valsartan solubility in supercritical carbon dioxide: Experimental measurement and molecular dynamics simulation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 294, p. 111636, 2019.
- RIBEIRO, L. N. M. et al. Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, p. 102-112, 2017.
- RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.

- RYDLEWSKI, A. A. et al. Evaluation of possible fraud in avocado oil-based products from the composition of fatty acids by GC-FID and lipid profile by ESI-MS. **Chemical Papers**, v. 74, n. 9, p. 2799-2812, 2020.
- SANTOS, V. S.; RIBEIRO, A. P. B.; SANTANA, M. H. A. Solid lipid nanoparticles as carriers for lipophilic compounds for applications in foods. **Food Research International**, v. 122, p. 610-626, 2019.
- SARKISYAN, V. et al. Beeswax fractions used as potential oil gelling agents. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 98, n. 3, p. 281-296, 2021.
- SVEČNJAK, L. et al. Standard methods for *Apis mellifera* beeswax research. **Journal of apicultural research**, v. 58, n. 2, p. 1-108, 2019.
- SOLEIMANIAN, Y. et al. Formulation and characterization of novel nanostructured lipid carriers made from beeswax, propolis wax and pomegranate seed oil. **Food Chemistry**, v. 244, p. 83-92, 2018.
- SOUSA, A. R. S. et al. Solubility of carbon dioxide in three lipid-based biocarriers. **The Journal of supercritical fluids**, v. 39, n. 1, p. 13-19, 2006.
- SOUZA, I. D. L. et al. Multiple response optimization of beeswax-based nanostructured lipid carriers for the controlled release of vitamin E. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 20, n. 1, p. 31-41, 2020.
- SPIILIMBERGO, S. et al. Effect of high-pressure gases on phase behaviour of solid lipids. **The Journal of supercritical fluids**, v. 38, n. 3, p. 289-294, 2006.
- TAN, C. X. Virgin avocado oil: An emerging source of functional fruit oil. **Journal of functional foods**, v. 54, p. 381-392, 2019.
- TULLOCH, A. P.; HOFFMAN, L. L. Canadian beeswax: analytical values and composition of hydrocarbons, free acids and long chain esters. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 49, n. 12, p. 696-699, 1972.
- VILLEGAS, M. E. et al. Commercial starch behavior when impregnated with food additives by moderate temperature supercritical CO₂ processing. **Starch-Stärke**, v. 72, n. 11-12, p. 1900231, 2020.
- YANG, J.; CIFTCI, O. N. Formation of hollow solid lipid micro-and nanoparticles using supercritical carbon dioxide. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 151-160, 2016.
- YANG, T. M. et al. Solid Solubilities of Sulfonamides and Use of Rapid Expansion of Supercritical Solutions for Microparticle Production. **Chemical Engineering & Technology**, v. 43, n. 6, p. 1115-1123, 2020.
- ZHU, L. et al. Encapsulation of menthol in beeswax by a supercritical fluid technique. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2010, 2010.



**CAPÍTULO 4 Micropartículas lipídicas
carregadas com extrato de
folhas de alcachofra
formadas por rápida
expansão de solução
supercrítica**



Resumo

O extrato etanólico de folhas de alcachofra é um fitoterápico com ações antidiarréica, antiinflamatória, diurética, hepatoprotetora e antidiabética, além de ser uma fonte de prebiótico. A microencapsulação e a impregnação são estratégias utilizadas para proteger o material bioativo de condições ambientais adversas e também visando liberação controlada da substância encapsulada e mascarar sabor e/ou cor indesejados. Neste sentido partículas lipídicas são carreadores adequados para prebióticos visto que a digestão de lipídios ocorre no intestino, local ideal para liberação deste composto a fim de melhorar a qualidade da microbiota intestinal. Micropartículas lipídicas de cera de abelha e óleo de abacate foram obtidas por PGSS (do inglês *Particle from Gas Saturated Solutions*) (60 °C, 200 bar, 1250 rpm, 3 horas) visando a impregnação/encapsulação de extrato de folhas de alcachofra obtidos por extração com etanol pressurizado (60 °C, 5 ciclos de 10 minutos, volume de enxague de 80% do volume da célula e 10,3 MPa). Avaliou-se a viabilidade da produção destas micropartículas pela análise de sua morfologia, polimorfismo, propriedades térmicas, estrutura química e estabilidade em condições desfavoráveis. Duas proporções diferentes da relação cera de abelha:óleo de abacate:extrato de folhas de alcachofra (1:2:3 e 1:2:6) foram estudadas. As partículas obtidas pela proporção 1:2:6 apresentaram menor distribuição de tamanho de partícula e tamanho médio, mas não se observou diferenças em relação à estabilidade em diferentes soluções.

Palavras-chave: CO₂ supercrítico, PGSS, inulina, prebiótico, *Cynara cardunculus* L.

1 Introdução

As técnicas que empregam fluidos supercríticos na formação de partículas são bem amplas e vantajosas por serem técnicas ambientalmente amigáveis, algumas livres de solventes orgânicos, originarem partículas secas, apresentarem grande versatilidade e potencial para fabricação em larga escala, pois apesar de exigir um investimento inicial relativamente alto o custo operacional é baixo (O'Sullivan, Ryan, Padrela, 2022; Liu et al, 2019). As propriedades físicas e químicas dos fluidos supercríticos fazem com que com pequenas alterações de pressão e temperatura impliquem no controle da densidade e polaridade destes fluidos além de ser relevante considerar que esse tipo de fluidos apresentam tensão superficial quase nula (Silva, Meireles, 2014).

O fluido supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono (CO₂) seguido pela água (Gouin, 2004). CO₂ é considerado quimicamente inerte, possui baixa toxicidade e não é inflamável, além de ser o fluido ideal para tratar substâncias sensíveis ao calor, pois sua temperatura e sua pressão críticas são consideradas baixas, gerando com isso, custos de energia relativamente baixos quando comparado, por exemplo com processos envolvendo água supercrítica. Outra vantagem bastante considerável de usar CO₂ supercrítico é o fato de que a pressão e temperatura ambiente ele se torna gás e se desprende das partículas, fazendo com que as partículas obtidas sejam secas e livres de solvente, ou seja, não precisem de uma etapa posterior de secagem (Liu et al., 2019; Majerik et al, 2006).

No início da década de 1990, os lipídios sólidos começaram a ser usados como material carreador na formação de partículas lipídicas sólidas, sendo estudados como alternativa aos sistemas carreadores tradicionais devido à possibilidade de produção em larga escala (Chutoprapat, Kopongpanich, Chan, 2022). No entanto estes carreadores possuem baixa capacidade de carga de compostos bioativos e baixa retenção dos mesmos a longo prazo devido à transição polimórfica do estado de alta energia para estado de baixa energia acarretando em uma rede cristalina mais organizada e portanto com menos espaço para o composto bioativo (Xu et al., 2021). Por este motivo tem-se estudado a mistura de lipídios líquidos e sólidos, conhecidos como carreadores nanoestruturados, que favorecem o aprisionamento e estabilidade do composto bioativo, pois a mistura leva à formação de uma rede cristalina menos ordenada (Pandey, Gupta, Yadav, 2018). Partículas de Soluções Saturadas de Gás (PGSS) consistem na saturação de gorduras comestíveis derretidas com CO₂ supercrítico que são posteriormente expandidas através de um bocal (Klettenhammer et al.,

2022). A rápida expansão na passagem e conseqüentemente rápida liberação CO₂ causa uma diminuição abrupta na temperatura levando à formação das partículas (Yun et al., 2013). Esta tecnologia tem se mostrado eficiente, no entanto, a estabilidade das partículas é subnotificada nesta área, e este é um atributo crítico de qualidade do produto (O'Sullivan, Ryan, Padrela, 2022).

O abacate (*Persea americana* Mill) é um fruto tropical/subtropical originário da América Central e pertence à família das *Lauraceae* que possui alto valor nutricional. O óleo de abacate é rico em compostos bioativos relacionados à efeito protetor contra câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (Arimalala, Hervé, Rafihavanana, 2022; Cervantes-Paz, Yahia, 2021).

A cera de abelha é um produto natural relativamente abundante e comestível, mas não digerível, constituído de uma mistura complexa de mais de 300 hidrocarbonetos, ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos, álcoois graxos, diésteres e substâncias exógenas, embora a composição da cera de abelha varie ligeiramente com base na família e raça das abelhas (Sarkisyan et al., 2021, Fratini et al., 2016).

A alcachofra (*Cynara scolymus* L.) pertencente à família Asteraceae é nativa da bacia mediterrânea e possui em suas folhas, partes estas que geralmente são consideradas como resíduo da produção da inflorescência para consumo, ao alto teor de compostos biologicamente ativos tais ácidos polifenólicos, ácidos cafeico, clorogênico, cumárico, ferúlico e derivados de ácidos di-cafeoilquínicos e flavonóides (Francavilla et al., 2021; Pérez-Esteve et al., 2018; Dias et al., 2018; Gominho et al., 2018).

O formulário de fitoterápicos brasileiro (Brasil, 2011) recomenda a ingestão diária de tintura das folhas de alcachofra para ação antidispeptica, antifatulenta, antiemética, diurética e antiaterosclerótica e também como coadjuvante no tratamento de hipercolesterolemia leve a moderada e da síndrome do intestino irritável. Na literatura também se reporta ação hepatoprotetora, antidiabética, efeito colerético e colagogo (Lattanzio et al., 2009; Rodriguez, Giménez, Vázquez, 2002).

Este trabalho objetivou estudar a microencapsulação/impregnação de extratos de folhas de alcachofra em partículas lipídicas de cera de abelha e óleo de abacate por PGSS e avaliar suas características e estabilidade em condições adversas, visando futura aplicação em alimentos.

2 Metodologia

2.1 Obtenção de extrato de folha de alcachofra

Os extratos de folhas de alcachofra foram obtidos por extração com solvente pressurizado em equipamento PLE - ASE 150 (Dionex, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA), utilizou-se célula de extração de 66 cm³ e 10 g de folhas de alcachofra secas e trituradas que foram submetidas à temperatura de 60 °C, 5 ciclos de extração com 10 minutos de tempo estático em cada ciclo, volume de rince de 80% e pressão de 10,3 MPa. Etanol 99,5% (Dinâmica, Indaiatuba, SP, BR) foi empregado como solvente de acordo. Esta condição de extração foi utilizada por ser a que resultou em maiores rendimento, atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos. O extrato obtido foi rotoevaporado a 60 °C até que todo o etanol fosse eliminado.

A extração com líquido pressurizado acelera o processo convencional de extração utilizando baixo volume de solvente a pressão e temperatura controladas, com o objetivo de manter o solvente no estado líquido durante todo o processo de extração. Esse equipamento é operado em bateladas, intercalando tempo estático de contato entre a matriz vegetal e o solvente e extração dinâmica. Ao final de cada ciclo o extrato é direcionado para um recipiente de coleta. Para que a extração seja mais eficiente e ocorra um equilíbrio osmótico entre a matriz vegetal e o solvente é importante que haja tempo estático de contato entre o solvente e a amostra (Bittencourt, 2018).

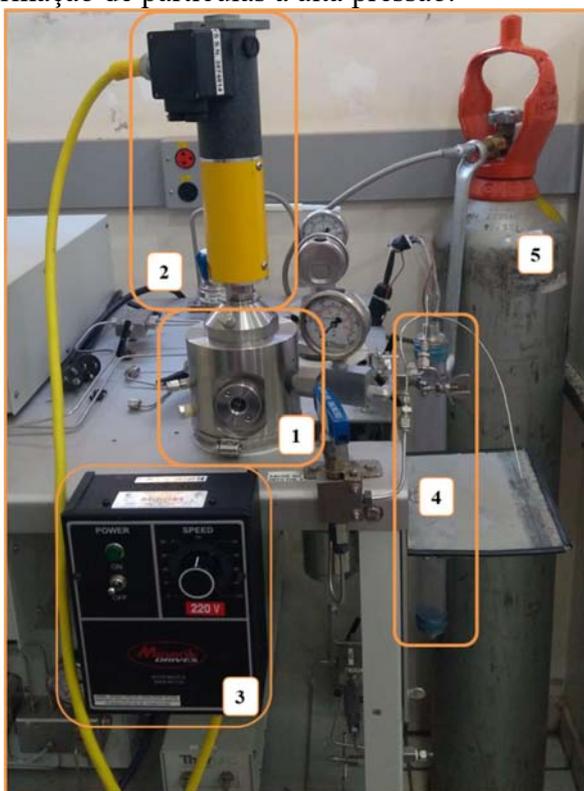
2.2 Impregnação em meio supercrítico

Estudou-se duas formulações diferentes de formação de partículas lipídicas por PGSS em equipamento de alta pressão SFC/RESS (Thar Instruments Co./Waters, Pittsburg, USA) (Figura 1), sendo a primeira na proporção de 1:2:3 e a segunda na proporção 1:2:6 de extrato de folhas de alcachofra, óleo de abacate e cera de abelha, respectivamente. A proporção 1:2:3 foi utilizada de modo a manter a proporção entre sólido (cera de abelha) e não sólido (óleo de abacate + extrato de folhas de alcachofra) em 1:1 conforme estudo realizado por Aredo et al. (2021) com partículas lipídicas sólidas (parte dos resultados apresentado no capítulo 3 desta tese), como as características físico-químicas do extrato de folhas de alcachofra e do óleo de abacate são diferentes, estudou-se também a proporção 1:2:6 em que mais material sólido foi

utilizado para garantir a integridade das partículas. Foram realizados ensaios preliminares em que a proporção da mistura lipídica foi de 1:1 e o extrato adicionado em diferentes proporções, mas as partículas obtidas se aglomeravam rapidamente após sua produção.

Inicialmente o extrato seco de folhas de alcachofra e o óleo de abacate foram homogeneizados. Para isso testou-se dois métodos de homogeneização, agitação em ultra turax (Ika, T25, DE) na velocidade mínima por aproximadamente 20 segundos e em agitador magnético (Tecnal, TE-089, Indaiatuba, BR) e verificou-se que ao aplicar 27% de agitação por aproximadamente 7 minutos. Os dois métodos de homogeneização apresentaram resultado similar, no entanto no ultra turax observou-se perda significativa de matéria prima na superfície e interior do equipamento o que fazia com que a proporção entre a mistura e cera de abelha na formação das partículas fosse alterada, fazendo com que não fosse possível ter controle sobre essa variável de processo. Portanto a metodologia de homogeneização escolhida foi a agitação magnética, apesar do maior tempo requerido para homogeneização.

Figura 1. Sistema de formação de partículas a alta pressão.



Legenda:

(1) autoclave, (2) agitador, (3) controle do agitador, (4) célula de despressurização, (5) cilindro de dióxido de carbono.

Na autoclave do equipamento de alta pressão, adicionou-se cera de abelha previamente derretida e a mistura homogeneizada. A autoclave foi então pressurizada com CO₂ a 200 bar, a 60 °C com agitação mecânica sob rotação de 1250 rpm por 3 horas, o tempo de homogeneização foi determinado por estudos preliminares de modo a favorecer a dispersão do extrato na mistura lipídica. Após o tempo de homogeneização a alta pressão, procedeu-se a expansão de solução supercrítica (lipídios, extrato e CO₂) através de um bocal de 152,4 µm. As partículas coletadas foram armazenadas sob refrigeração (4 °C) em placas de Petri cobertas com papel alumínio e filme de PVC. As condições escolhidas para a formação das partículas lipídicas foi baseada no estudo apresentado no capítulo 3.

2.3 Caracterização das micropartículas lipídicas carregadas com extrato de folhas de alcachofra

A caracterização das partículas em relação a tamanho médio, distribuição de tamanho, morfologia, polimorfismo e propriedades térmicas foi realizada seguindo as metodologias descritas nos itens de 2.6.1 a 2.6.4 do capítulo 3 desta tese.

2.4 Análise da estabilidade das micropartículas sob condições desfavoráveis

Possíveis alterações na morfologia das micropartículas sob condições de stress foram determinadas com base na metodologia descrita por Comunian et al. (2016) com alterações e consistiu em dispersar as partículas obtidas a partir das formulações testadas em diferentes soluções aquosas submetê-las a agitação com auxílio de um ultrassom, analisar se ocorreram alterações na morfologia com auxílio de um microscópio ótico e quantificar teor de inulina disperso nas soluções para verificar se os extratos presentes nas partículas havia sido liberado.

As soluções testadas foram escolhidas com o intuito de verificar como as partículas se comportariam quando aplicadas em diferentes meios, nos indicando se seria possível ou não a aplicação delas em diversos tipos de alimentos. Portanto as soluções avaliadas foram glicose, xilitol e cloreto de sódio (NaCl) pela constante presença desses compostos em alimentos com grande potencial para a aplicação das microcápsulas. Avaliou-se também soluções com valores de pHs próximos aos encontrados em nosso trato gastro-intestinal.

Todas as soluções foram feitas com água ultrapura, o açúcar (União, Sertãozinho, BR) e o xilitol (Lowçucar, Marialva, BR) foram diluídos nas concentrações 15%, 30% e 45%, o NaCl (Cisne, Guarulhos, BR) em concentrações de 1%, 3% e 5%, com auxílio de um pHmetro (Gehaka, PG1800, São Paulo, BR), soluções com pH de 2, 7 e 12 com auxílio de ácido fosfórico (Êxodo Científica, Hortolândia, BR) e hidróxido de sódio (Êxodo Científica, Hortolândia, BR). Adicionou-se 2 mL de cada solução em tubos falcons previamente identificados e 0,01 g de partículas e agitou-se por 5 minutos em ultrassom Ultronique Q 3.0–40 (Tecnal, Indaiatuba, BR). A fim de comparação realizou-se controle em que as partículas ficaram em contato com água ultrapura também sob agitação por ultrassom por 5 min.

As partículas foram coletadas e analisadas em microscópio ótico a fim de verificar possíveis alterações em sua morfologia. As soluções (após serem separadas das partículas) foram analisadas em relação ao teor de inulina.

A quantificação no teor de inulina nas soluções foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 2.3.5 do capítulo 2 desta tese.

2.5 Análise Estatística

Análise de variância (ANOVA) foi realizada para determinar se as formulações testadas influenciaram nos parâmetros estudados, teste de Tukey ($p < 0,05$) foi usado para a comparação múltipla de médias.

3 Resultados e Discussão

3.1 Estudo das características das micropartículas

3.1.1 Tamanho médio e distribuição do tamanho das partículas

A distribuição do tamanho das partículas foi ajustada pela função Rosin-Rammler, com coeficientes de regressão 88,88% e 96,69% para as amostras 1:2:3 e 1:2:6, respectivamente, indicando que o modelo se aproxima consideravelmente dos valores experimentais (Tabela 1). Portanto, os parâmetros Rosin-Rammler (n e X_R) e os descritores estimados (D_{10} , D_{50} e D_{90}) foram confiáveis para comparar as distribuições de tamanho das partículas. A distribuição do tamanho das partículas variou de acordo com as proporções de extrato, óleo e cera utilizado no processo de formação de partículas via PGSS.

Tabela 1. Análise da distribuição de tamanho das partículas de cera de abelha e óleo de abacate com extrato de folhas de alcachofra formadas com CO₂ supercrítico (60 °C, 200 bar, 3 horas) com diferentes proporções lipídios/extrato.

Partícula	Parâmetros Rosin-Rammler		R ² (%)	Descritores estimados			D [4,3] (µm)
	n	X _R (µm)		D ₁₀ (µm)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)	
1:2:3	1,7±0,2 ^a	173,8±17,0 ^a	88,88	44,5±2,1 ^a	139,1±9,9 ^a	288,9±44,5 ^a	261,8±7,6 ^a
1:2:6	2,9±0,2 ^b	51,8±0,5 ^b	96,69	24,3±2,3 ^b	46,3±2,3 ^b	70,3±1,5 ^b	74,2±6,2 ^b

Resultados expressos em média ± desvio padrão.

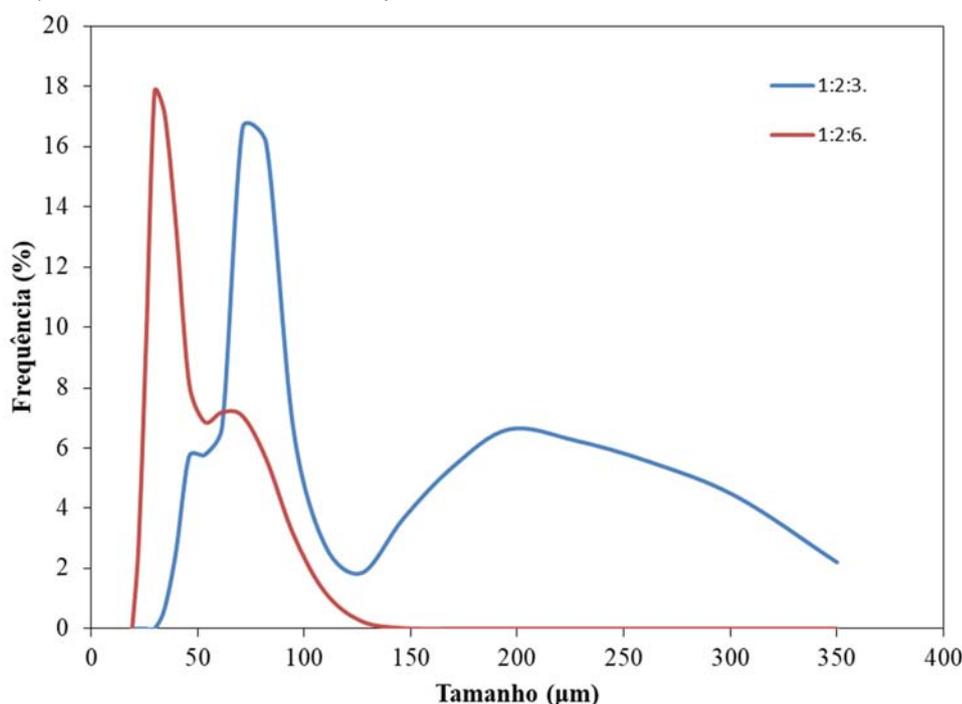
Os parâmetros seguidos pelas mesmas letras na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si no nível de confiança de 95% pelo teste de médias de Tukey.

Legenda: 1:2:3 – partículas lipídicas obtidas via PGSS com a proporção de 1 parte de extrato de folhas de alcachofra, 2 partes de óleo de abacate e 3 partes de cera de abelha.

1:2:6 – partículas lipídicas obtidas via PGSS com a proporção de 1 parte de extrato de folhas de alcachofra, 2 partes de óleo de abacate e 6 partes de cera de abelha.

Analisando a Tabela 1 nota-se que as partículas obtidas com menor proporção de cera (1:2:3) apresentaram diâmetro médio (D [4,3]) de 249,7 µm e as partículas obtidas através das proporções 1:2:6 apresentaram diâmetro médio de 74,2 µm. Pela Figura 2 foi possível observar que as partículas obtidas pela proporção 1:2:3 além possuem tamanho médio maior, apresenta maior diversidade de tamanho.

Figura 2. Distribuição do tamanho das partículas formadas com CO₂ supercrítico (60 °C, 200 bar, 3 horas) com diferentes concentrações.



Legenda: 1:2:3 – partículas lipídicas obtidas via PGSS com a proporção de 1 parte de extrato de folhas de alcachofra, 2 partes de óleo de abacate e 3 partes de cera de abelha.

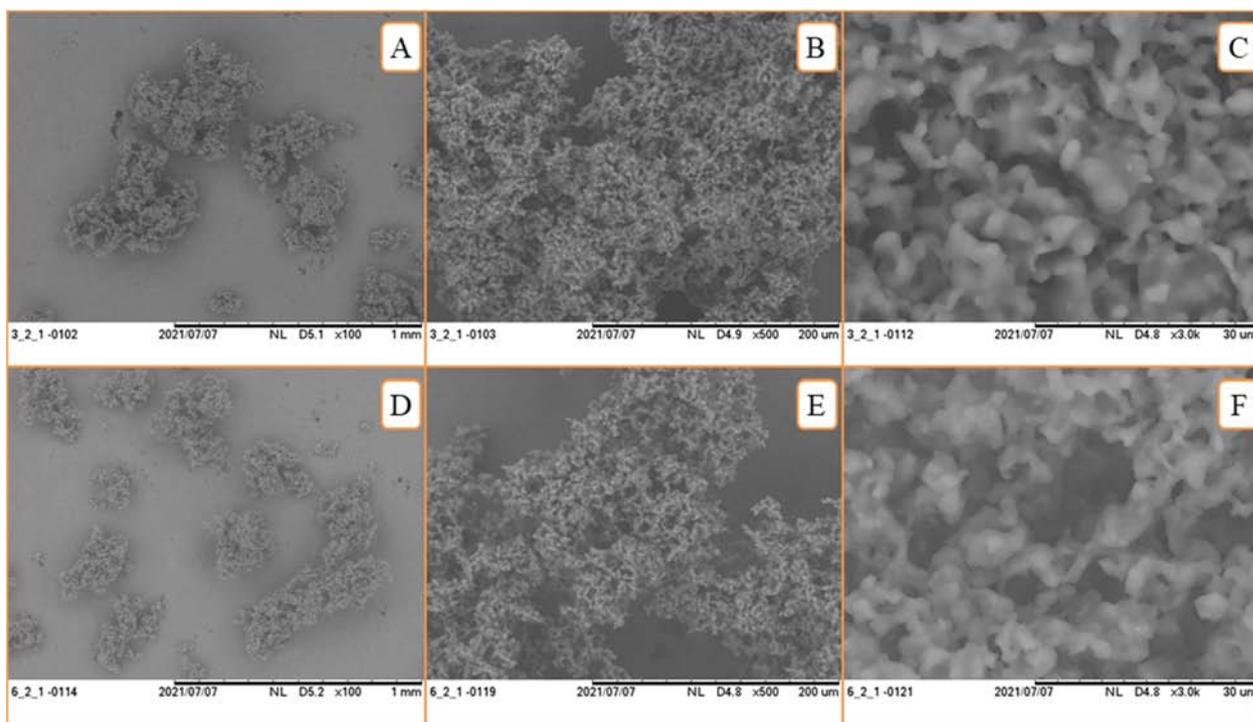
1:2:6 – partículas lipídicas obtidas via PGSS com a proporção de 1 parte de extrato de folhas de alcachofra, 2 partes de óleo de abacate e 6 partes de cera de abelha.

3.1.2 Morfologia

Ao observar as partículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) apresentadas na Figura 3, pode-se notar aspecto semelhante a esponjas, assim como observado no Capítulo 3 no estudo das condições de processo para formação de partículas sem a adição de composto bioativo.

Comparando as diferentes formulações, pode-se perceber pelas microscopias apresentadas na Figura 3A e 3D, com aumento de 100x que as partículas com maior teor de cera de abelha possuem tamanho reduzido, corroborando com os resultados apresentados de tamanho das partículas. Pode-se observar também, não houve outras alterações perceptíveis na morfologia em decorrência da proporção de cera de abelha na formulação.

Figura 3. Microscopias eletrônicas de varredura das partículas de cera de abelha e óleo de abacate com extrato de folhas de alcachofra obtidas por PGSS com CO₂ supercrítico a 60 °C nas proporções (A, B e C) 1:2:3 e (D, E e F) 1:2:6, respectivamente.

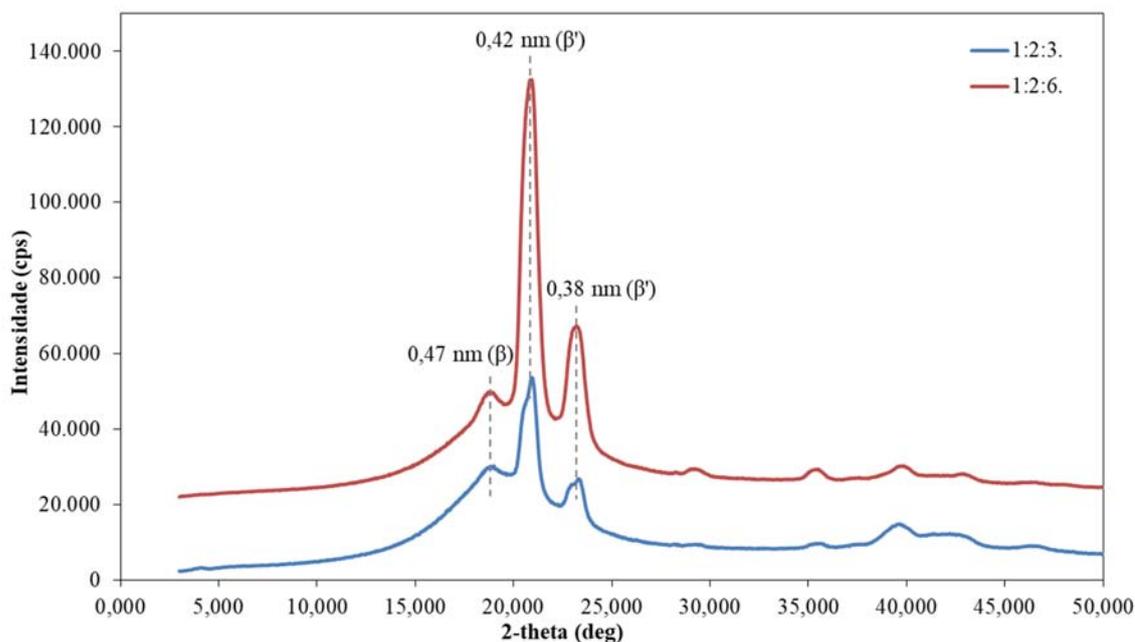


3.1.3 Polimorfismo e propriedades térmicas

Nos difratogramas de raios X obtidos para as duas formulações partículas estudadas, observa-se os mesmos padrões cristalinos de polimorfismos β (0,47 nm) e β' (0,42 e 0,38 nm) apresentados no capítulo 3. Nota-se também que as partículas com maior teor de cera de

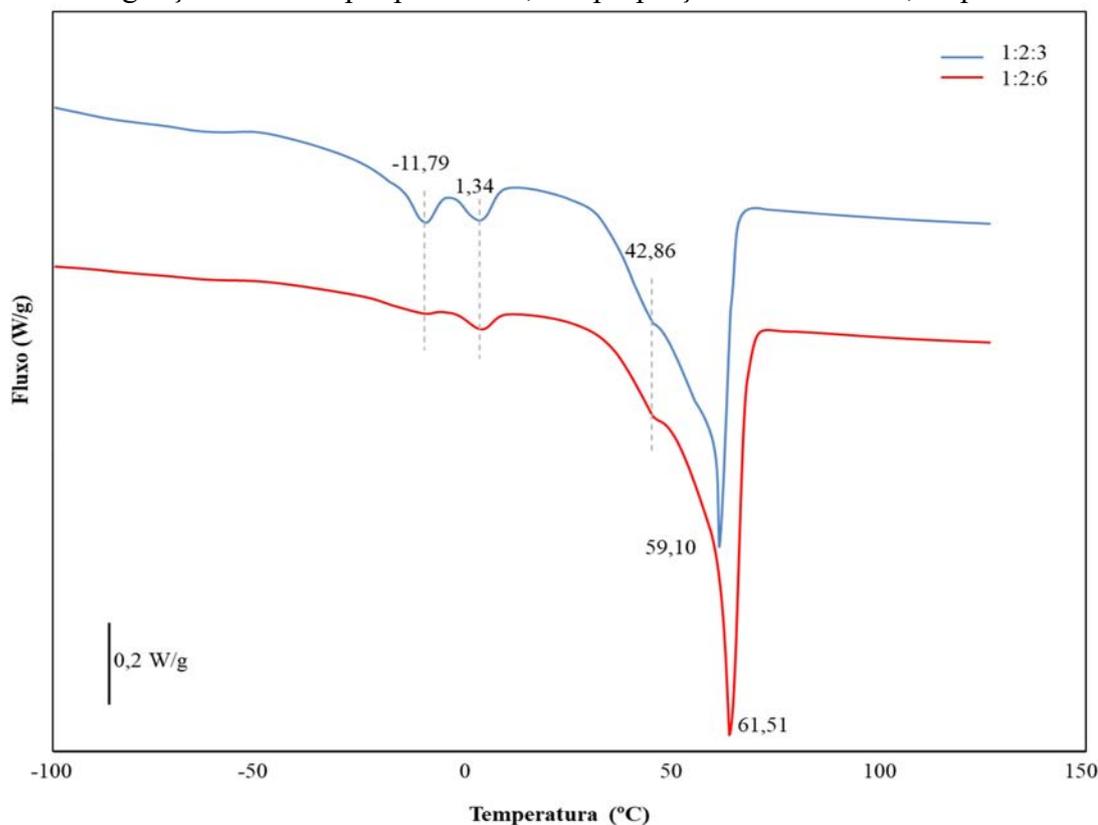
abelha apresentam um padrão mais cristalino, devido ao pico mais acentuado, o que já era esperado devido às características já conhecidas da cera de abelha (Figura 4). Esses resultados sugerem que a adição de extratos de folha de alcachofra às partículas não acarretou em alterações estruturais.

Figura 4. Difratoograma de raios X das partículas de cera de abelha e óleo de abacate com extrato de folhas de alcachofra obtidas por PGSS com CO₂ supercrítico a 200 bar, 60 °C e agitação de 1250 rpm por 3 horas, nas proporções 1:2:3 e 1:2:6, respectivamente.



O perfil térmico das partículas adicionadas de extrato de folhas de alcachofra (Figura 5) é similar ao das partículas sem adição do composto bioativo, com a presença de dois picos pouco definidos na região em que ocorrem os picos do óleo de abacate -11,79 °C e 1,34 °C, ombro em a 42,86 °C e um pico bem definido em 59,10 °C para as partículas 1:2:3 e em 61,51 °C para as partículas 1:2:6, ambos na região em que ocorre o pico da cera de abelha. Com isso inferi-se que o tratamento a adição do extrato rico em compostos bioativos não altera o perfil térmico da mistura lipídica indicando que não ocorre alteração nas moléculas que compõem a mistura, isso provavelmente se deve à baixa concentração de extrato em relação à concentração de lipídios.

Figura 5. Termograma contendo o perfil térmico das partículas de cera de abelha e óleo de abacate com extrato de folhas de alcachofra obtidas por PGSS com CO₂ supercrítico a 200 bar, 60°C e agitação de 1250 rpm por 3 hora, nas proporções 1:2:3 e 1:2:6, respectivamente.



3.2 Análise da estabilidade das micropartículas sob condições desfavoráveis

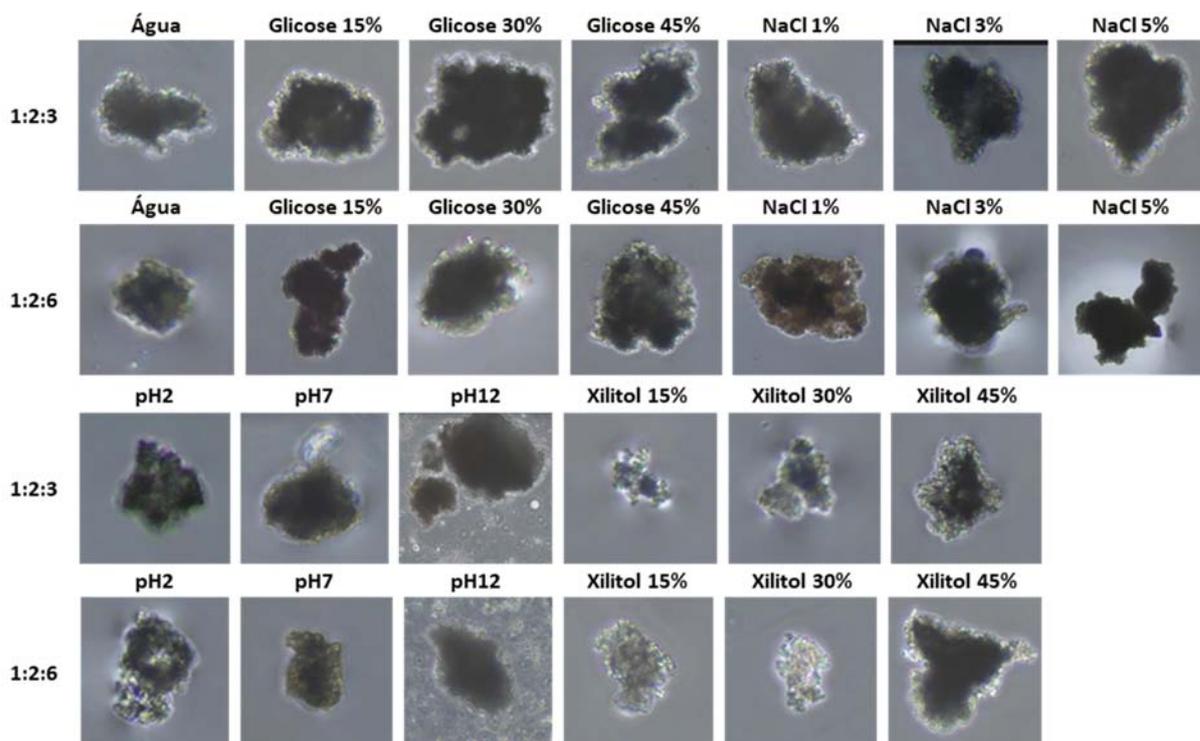
3.2.1 Microscopia ótica

A fim de verificar a possibilidade de emprego, das partículas formadas neste trabalho, em diferentes alimentos realizou-se testes de estabilidade simulando alguns possíveis fatores adversos. Os pHs 2 e 12 foram estrategicamente escolhidos por serem próximos aos encontrados no estômago e no intestino humano respectivamente, assim como o NaCl e os edulcorantes (glicose e xilitol), que foram escolhidos por serem amplamente empregados na composição de diferentes alimentos. Na Figura 3 pode-se observar as imagens realizadas em microscópio ótico das partículas dispersas nas diferentes soluções estudadas após a agitação em ultrassom.

Na Figura 7 pode-se notar que as partículas dispersas em todas as concentrações de glicose e de NaCl e em pH neutro (pH 7) apresentam estrutura bem similar àquela observada no controle (água), o que significa que houve apenas pequenas alterações nas partículas

dessas amostras quando comparadas ao controle, nos indicando que esses meios não ocasionaram grandes instabilidades para as partículas, comportamento esse que se espera ao aplicar partículas em alimentos parecidos com esses meios.

Figura 7. Imagens de microscopia ótica das partículas lipídicas com extrato de folhas de alcachofra obtidas por PGSS dispersos em diferentes soluções.



Legenda: 1:2:3 – partículas lipídicas obtidas via PGSS com a proporção de 1 parte de extrato de folhas de alcachofra, 2 partes de óleo de abacate e 3 partes de cera de abelha.
 1:2:6 – partículas lipídicas obtidas via PGSS com a proporção de 1 parte de extrato de folhas de alcachofra, 2 partes de óleo de abacate e 6 partes de cera de abelha.

No entanto nas figuras representativas das partículas dispersas em xilitol verificou-se uma alteração na estrutura da partícula principalmente nas concentrações de 15 e 30% quando comparadas com as figuras representativas das partículas em água, o que nos indica uma maior instabilidade. Certamente um alimento com xilitol em sua composição traria comportamento completamente diferente dos alimentos com NaCl, glicose e pH neutro.

Com relação ao pH notou-se uma pequena alteração nas amostras com pH 2 quando comparadas com as imagens do controle (água), observou-se também uma pequena alteração ao comparar as partículas com diferentes teores de cera de abelha.

Ao analisar as imagens obtidas das partículas dispersas na solução com pH 12 apesar de não ter alterações perceptíveis visualmente nas partículas, nota-se a presença de estruturas

dispersas na solução e também foi possível verificar visualmente, ao observar o tubo contendo a dispersão a olho nu, que a solução se encontrava opaca. Sabe-se que o pH 12 é superior àquele encontrado no intestino humano, local onde ocorre majoritariamente a digestão de lipídeos o que pode justificar o fenômeno observado e pode-se inferir que possivelmente se o período de contato entre as partículas e a solução sob agitação fosse maior do que o estudado a partícula teria se desfeito.

3.2.2 Quantificação do teor de inulina disperso nas soluções

Complementarmente às análises microscópicas, quantificou-se o teor de inulina disperso nas soluções para verificar a estabilidade da partícula especificamente em relação à capacidade de manter a inulina impregnada. Para isso quantificou-se o teor de inulina disperso nas diferentes soluções testadas e os resultados estão expressos na Tabela 2.

Apesar de também ter sido estudada a influência de diferentes concentrações de glicose na estabilidade das partículas sob condições de stress, não foi possível verificar a influência desta variável na capacidade da partícula de reter inulina, pois a metodologia de quantificação utilizada quantifica carboidratos o que faria com que os açúcares adicionados à solução também fossem quantificados, gerando assim um falso resultado.

Os maiores teores de inulina foram quantificados nas soluções contendo xilitol, no entanto, soluções com concentração de xilitol de 15% fizeram com que as partículas fossem menos estáveis do que aquelas contendo maior teor de xilitol, sendo observado um comportamento de instabilidade inversamente proporcional ao teor de xilitol, para o intervalo testado. Comportamento similar ao que foi observado para as soluções de NaCl.

Ao contrário do que era esperado, não se observou uma elevada correlação entre o pH e o teor de inulina na solução. Com base nas imagens apresentadas na Figura 7, esperava-se que em pH 12 fosse possível quantificar mais inulina pois este pH é superior ao do intestino humano, local onde ocorre a digestão principal de lipídeos, dado que partículas estudadas são lipídicas. Pode ser que tal resultado não tenha sido obtido devido a possível degradação da inulina dispersa na solução em decorrência do elevado pH.

Esse estudo é de extrema importância como uma fase inicial de verificação da viabilidade de aplicação da inulina em diferentes alimentos, pois para o efeito bioativo do extrato de folhas de alcachofra ser obtido via alimentação a partícula deve continuar estável após todas as etapas do processamento dos alimentos aos quais possa ser adicionada. No caso

deste extrato em específico, a impregnação em partículas também teve como mascarar sua forte coloração verde intensa (Figura 8) e gosto amargo, viabilizando assim a veiculação deste extrato em alimentos para que se possa beneficiar dos benefícios de seu consumo sem que ocorram alterações sensoriais nos alimentos enriquecidos com extrato de folhas de alcachofra.

Tabela 2. Porcentagem de inulina dispersa nas diferentes soluções preparadas após agitação magnética por 5 minutos.

Partícula	Solução	Concentração	% de inulina presente na solução (média ± desvio padrão)
1:2:3	NaCl	1%	1,11 ± 0,16
		3%	0,02 ± 0,00
		5%	0,14 ± 0,11
1:2:6	NaCl	1%	1,42 ± 0,39
		3%	0,27 ± 0,17
		5%	0,06 ± 0,04
1:2:3	Xilitol	15%	12,73 ± 0,17
		30%	3,73 ± 0,18
		45%	0,90 ± 0,09
1:2:6	Xilitol	15%	14,27 ± 1,62
		30%	6,31 ± 1,55
		45%	1,92 ± 0,36
1:2:3	pH	2	0,32 ± 0,25
		7	0,31 ± 0,11
		12	0,27 ± 0,02
1:2:6	pH	2	0,33 ± 0,12
		7	0,33 ± 0,18
		12	0,56 ± 0,33
1:2:3	Água	-	0,01 ± 0,05
1:2:6		-	0,05 ± 0,00

Legenda: 1:2:3 – partículas lipídicas obtidas via RESS com a proporção de 1 parte de tintura de folhas de alcachofra, 2 partes de óleo de abacate e 3 partes de cera de abelha.

1:2:6 – partículas lipídicas obtidas via RESS com a proporção de 1 parte de tintura de folhas de alcachofra, 2 partes de óleo de abacate e 6 partes de cera de abelha.

Figura 8. Extrato de folhas de alcachofra utilizado na formação de partículas.



4 Conclusão

A produção de partículas lipídicas de cera de abelha e óleo de abacate carregadas com extrato de folhas de alcachofra via PGSS a 200 bar, 60 °C com agitação mecânica de 1250 rpm por 3 horas se mostrou uma alternativa viável e consideravelmente estável para aplicação em matrizes alimentícias. Foram observadas diferenças estatísticas em relação ao tamanho de partículas ao variar o teor de cera na formulação da partícula, concluindo-se que para uma menor variação no tamanho e diversidade das partículas a concentração 1:2:6 (Extrato, Óleo de abacate, Cera de abelha) é mais adequada. As partículas com maior teor de cera de abelha provavelmente apresentam maior ponto de fusão pois a cera de abelha é o único componente da partícula que é sólido em temperatura ambiente e o perfil térmico obtido por varredura de calorimetria diferencial das amostras sugere temperatura de fusão de 59,10 °C e 61,51 °C para as partículas 1:2:3 e 1:2:6, respectivamente. Por meio dos métodos analíticos realizados foi observado que a alteração na composição da partícula não demonstrou influenciar na estabilidade destas contra as condições adversas testadas.

5 Referências

- ARIMALALA, A. F.; HERVÉ, R. P.; RAFIHAVANANA, R. Modeling and kinetics study of avocado oil extraction from Madagascar using different mathematical models. **South African Journal of Chemical Engineering**, 2022.
- BITTENCOURT, G. M. **Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de araçá (*Psidium grandifolium* Mart. ex DC.) obtidos por líquido pressurizado (PLE) e por fluido supercrítico (SFE)**. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 126p., 2011.
- CERVANTES-PAZ, B.; YAHIA, E. M. Avocado oil: Production and market demand, bioactive components, implications in health, and tendencies and potential uses. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 4, p. 4120-4158, 2021.
- COMUNIAN, T. A. et al. Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. **Carbohydrate polymers**, v. 150, p. 319-329, 2016.
- CHUTOPRAPAT, R.; KOPONGPANICH, P.; CHAN, L. W. A Mini-Review on Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Topical Delivery of Phytochemicals for the Treatment of Acne Vulgaris. **Molecules**, v. 27, n. 11, p. 3460, 2022.
- DIAS, M. I. et al. Phenolic profile and bioactivity of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) inflorescence parts: selecting the best genotype for food applications. **Food Chemistry**, 2018.
- FRANCAVILLA, M. et al. Artichoke biorefinery: From food to advanced technological applications. **Foods**, v. 10, n. 1, p. 112, 2021.
- FRATINI, F. et al. Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 9, p. 839-843, 2016.
- GOMINHO, J. et al. *Cynara cardunculus* L. as a biomass and multi-purpose crop: A review of 30 years of research. **Biomass and Bioenergy**, v. 109, p. 257-275, 2018.
- GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing Technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 330-347, 2004.
- KLETTENHAMMER, S. et al. Microencapsulation of linseed oil enriched with carrot pomace extracts using Particles from Gas Saturated Solutions (PGSS) process. **Journal of Food Engineering**, v. 312, p. 110746, 2022.
- LATTANZIO, V. et al. Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 131-144, 2009.

- LIU, H. et al. Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: a review. **Journal Critical Reviews In Food Science And Nutrition**. Canadá, p. 2863-2878. jul. 2019.
- MAJERIK, V., et al. **Bioavailability enhancement of an active substance by supercritical antisolvent precipitation**). Elsevier, Nova York, v. 1, n. 40, p. 101-110, mar. 2006.
- O'SULLIVAN, A.; RYAN, K. M.; PADRELA, L. Production of Biopharmaceutical Dried-Powders using Supercritical CO₂ Technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, p. 105645, 2022.
- PANDEY, P.; GUPTA, P. C.; YADAV, S. Solid lipid nanoparticle: a potential approach in drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 5, n. 9, p. 225-236, 2018.
- PÉREZ-ESTEVE, É. et al. Polyphenolic composition of Spanish cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). **Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus**, v. 17, n. 2, p. 177-184, 2018.
- RODRIGUEZ, T. S.; GIMÉNEZ, D. G.; VÁZQUEZ, R. P. Choleric activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 687-693, 2002.
- SILVA, E. K.; MEIRELES, M. A. A.. Encapsulation of Food Compounds Using Supercritical Technologies: Applications of Supercritical Carbon Dioxide as an Antisolvent. **Food And Public Health**. Campinas, p. 247-258. out. 2014.
- SARKISYAN, V. et al. Beeswax fractions used as potential oil gelling agents. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 98, n. 3, p. 281-296, 2021.
- XU, L. et al. Lipid nanoparticles for drug delivery. **Advanced NanoBiomed Research**, v. 2, n. 2, p. 2100109, 2022.
- YUN, J. H. et al. Micronization and characterization of squid lecithin/polyethylene glycol composite using particles from gas saturated solutions (PGSS) process. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 686-691, 2013.



**CAPÍTULO 5 Micropartículas de
quitosana e TPP carregadas
com extrato de folhas de
alcachofra formadas por
gelificação iônica**



Resumo

O desenvolvimento de alimentos funcionais tem estado em pauta nos últimos anos devido aos grandes desafios tecnológicos para a indústria alimentícia. Dentre eles, pode-se destacar a possível degradação dos compostos ativos, bem como a influência desses nos atributos sensoriais do produto. As folhas de alcachofra, por exemplo, possuem alto teor de compostos benéficos para a saúde, tais como compostos fenólicos e inulina. Entretanto, apresenta, forte gosto amargo, tornando os alimentos impalatáveis. Nesse sentido, as nano/micropartículas de quitosana têm se mostrado uma alternativa viável por apresentar alta eficiência de encapsulação, não empregar solventes orgânicos em seu processamento e não exigir altos custos iniciais com equipamentos. Assim, este trabalho objetivou o desenvolvimento de partículas de quitosana por gelificação iônica com tripolifosfato de sódio (TPP) para encapsulação de extrato de folhas de alcachofra. Para isso estudou-se dois métodos de formação de partícula, um com adição de fosfolipídio ao extrato e formação prévia de lipossomas e outra com adição direta do extrato na solução de quitosana em ácido acético. Para ambos os métodos foram estudadas a incorporação de diferentes teores de extrato. As partículas obtidas foram avaliadas em relação ao aspecto físico, morfologia, estabilidade, estrutura química, comportamento térmico e polimorfismo. Todas as partículas obtidas neste trabalho apresentaram dimensões de micropartículas, não sendo alcançada a formação de partículas com dimensões nanométricas para nenhuma das condições estudadas. As TPP-quitossomas (partículas formadas com fosfolipídios) apresentaram contornos mais regulares, tamanho de partículas menores e foram capazes de encapsular um maior teor de extrato possivelmente devido à sua característica anfifílica, no entanto, foram mais instáveis do que as demais partículas.

Palavras-chave: tripolifosfato de sódio, quitossomas, *Cynara cardunculus* L, processamento verde, alimentos funcionais.

1 Introdução

A aplicação de ingredientes bioativos nas indústrias alimentícias é frequentemente estudada no desenvolvimento de alimentos funcionais (Abaee, Mohammadian, Jafari, 2017;). No entanto, a incorporação de bioativos nos alimentos pode ser limitada devido à alta taxa de degradação destes compostos em condições industriais, baixa solubilidade nas matrizes de interesse ou à não palatabilidade. Dessa forma, a encapsulação desses compostos é uma alternativa bastante pesquisada para resolver tais problemas preservando suas propriedades até o momento do consumo, além de permitir a liberação controlada dos ativos (Iida et al., 2019; McClements, 2014).

A quitosana é um polissacarídeo catiônico, altamente organizado, composto por unidades de glucosamina (β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose), obtido por meio da desacetilação da quitina em meio alcalino (Arkoun et al., 2018, Younes, Rinaudo, 2015). Este biopolímero é bastante versátil devido às suas propriedades físicas e mecânicas, possibilitando uma ampla gama de processamentos (Kou, Peters, Mucalo, 2022) e tem sido bastante estudado devido à suas características como, propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidante, biodegradabilidade, biocompatibilidade, bioadesão e baixa toxicidade (Abd El-Hack et al., 2020; Zhang, Li, Jiang, 2020; Devi, Dutta, 2017; Dutta et al., 2009; Vásconez et al., 2009) e efeitos biológicos como ação anticolesterolemica (Ahn, Cho, Choi, 2021), antitumoral (Chen et al., 2021; Song et al., 2020), imunoestimulante (Anna et al., 2020; Li et al., 2020) e anti-inflamatória (Arafa, Girgis, El-Dahan, 2020; He et al., 2020), dentre outras.

A natureza mucoadesiva da quitosana possibilita aumentar o tempo de permanência das partículas e, conseqüentemente, o tempo de liberação de compostos ativos no trato gastrointestinal e a permeabilidade intestinal (Hamedi et al., 2022; Shahid, Arachchi, Jeon, 1999).

As partículas de quitosana têm sido estudadas em diversas áreas da medicina e dos alimentos com crescente interesse na encapsulação de compostos ativos. Tais nanopartículas podem ser obtidas por diferentes métodos, sendo o mais estudado a gelificação iônica com tripolifosfato de sódio (TPP). Nesse processo, os grupos amino positivamente carregados da quitosana se ligam aos fosfatos negativamente carregados do TPP formando ligações inter e intramolecular que dão origem a uma rede tridimensional mais estável (de Moura, Aouada, Mattoso, 2008, Janes, Alonso, 2003, Peniche et al., 2003, Kumar, 2000). O tamanho das

partículas varia de acordo com as concentrações de quitosana e TPP utilizadas, velocidade e altura de gotejamento, velocidade de agitação da solução, composto encapsulado e sua concentração (de Carvalho et al., 2019; Hassani et al., 2015, de Britto et al., 2014; Fan et al., 2012; Keawchaon, Yoksan, 2011). O controle do tamanho da partícula é extremamente importante, pois está associado à estabilidade, agregação, interação com o solvente, importantes fatores para a preparação de dispersões coloidais e membranas (Tosi et al., 2020; Katouzian, Jafari, 2019; Rostami et al., 2019).

De acordo com Lima e colaboradores (2010), as nanopartículas de quitosana e TPP obtidas por gelificação iônica em baixas concentrações não apresentam toxicidade em estudos *in vitro*.

Os lipossomas são partículas interessantes para a encapsulação de compostos fitoquímicos, caracterizadas pela forma de vesículas esféricas formadas por pelo menos uma bicamada concêntrica de fosfolipídios que se organizam espontaneamente ou por processos mecânicos em meio aquoso; devido à sua característica anfifílica, são capazes de reter compostos polares no seu interior e apolares nas bicamadas lipídicas (Mallick, Choi, 2014). No entanto, os lipossomas são instáveis nas condições do trato gastrointestinal, pois têm baixa resistência ao pH do suco gástrico e são muito suscetíveis à lise enzimática, podendo sofrer degradação através da oxidação e hidrólise dos lipídeos presentes em sua estrutura e ocasionar a liberação dos compostos encapsulados (Caddeo et al., 2016; Taylor et al., 2005). Outros fatores que contribuem para essa instabilidade incluem hidrofobicidade e fluidez da membrana (Ezzat, Elnaggar, Abdallah, 2019; Lian, Ho, 2001). A formação de uma parede polimérica circundante tem sido bastante utilizada com o objetivo de aumentar a estabilidade, resistência, dureza, biodegradabilidade, condutividade elétrica, distribuição uniforme das partículas, baixa tendência a aglomeração, prolongar o tempo de residência no intestino (Tosi et al., 2020; Ezzat, Elnaggar, Abdallah, 2019; Almasi, Jafarzadeh, Mehryar, 2018). Dentre os biopolímeros utilizados, podem ser citados amido, quitosana, proteínas ou celulose (Nahar et al., 2014; Nunes et al., 2016; Tan, Wang, Sun, 2021).

Ao formar uma rede tridimensional estável, o complexo quitosana-TPP melhora a estabilidade das partículas, sem alteração das vesículas, dando origem às quitossomas (Zhou et al., 2018; Alavi, Haeri, Dadashzadeh, 2017). Esta cobertura ocorre, pois em soluções aquosas com valores de pH abaixo de 6,5, os grupos amino da quitosana estão protonados (NH_3^+) passando a apresentar comportamento policatiónico que faz com que esses grupos interajam eletrostaticamente com os grupos negativamente carregados da superfície dos

lipossomas (Ding et al., 2019). Formando assim, uma nuvem conformacional ao redor dos lipossomas que confere maior estabilidade estérica, aumentando a integridade estrutural da membrana e diminuindo a fluidez da mesma, o que, por sua vez, aumenta a estabilidade físico-química da partícula e diminui sua tendência de agregar (Mertins, Dimova, 2011; Mady, Darwish, 2010, Laye, McClements, Weiss, 2008). Reporta-se que, nas quitossomas, a liberação dos compostos bioativos ocorreu preferencialmente em meio alcalino, o que confere proteção à acidez estomacal.

A produção de TPP-quitossomas se dá pela adição da suspensão de quitosana à suspensão contendo os lipossomas sob agitação magnética, a fim de promover deposição eletrostática do biopolímero seguida de gotejamento com solução de TPP (Kaushal, Singh, Sangwan, 2022). Algumas condições devem ser controladas para que sejam formadas partículas mais estáveis, como a proporção TPP:quitosana:lipossoma, o tamanho das vesículas, a carga superficial e o fluxo de adição (Laye, McClements, Weiss, 2008). Pois, uma baixa concentração de quitosana pode não ser suficiente para recobrir os lipossomas, enquanto que seu excesso pode acarretar em uma força atrativa que supera as forças repulsivas intermoleculares causando a formação de aglomerados (Zhuang et al., 2010; Laye, McClements, Weiss, 2008).

Na formação das TPP-quitossomas, uma rede tridimensional com interações reversíveis é criada, proporcionando propriedades interessantes para a liberação controlada de ingredientes bioativos (Bugnicourt; Ladavière, 2016; Caddeo et al., 2016; Esposto et al., 2021). Outros agentes reticulantes podem ser utilizados em substituição ao TPP no processo de gelificação iônica, tais como alginatos, sulfatos ou polifosfatos. No entanto, o mais utilizado e discutido na literatura é o tripolifosfato de sódio (Bugnicourt, Ladavière, 2016).

Apesar deste tipo de partícula ser ainda pouco estudada, alguns estudos destacaram resultados positivos na encapsulação de quercetina e vitamina D3 em TPP-quitossomas (Caddeo et al., 2016, Iida et al., 2019).

Assim, o objetivo deste estudo foi produzir partículas TPP-quitossomas para encapsulação de extrato de folhas de alcachofra para posterior aplicação em alimentos funcionais.

2 Material e Métodos

2.1 Produção das micropartículas por gelificação iônica

Foram estudados dois tipos de obtenção de partículas por gelificação iônica entre quitosana e tripolifosfato de sódio (TPP): (1) por adição direta do extrato na solução de quitosana e posterior gotejamento de TPP, formando as nano/micropartículas de quitosana, e (2) por formação de TPP-quitossomas, conforme explicado a seguir.

Os extratos de folhas de alcachofra utilizados neste trabalho foram obtidos por extração com etanol (99,5%, Dinâmica, Indaiatuba, BR) pressurizado a 10,3 Mpa, 60 °C, 80% de volume de solvente em relação ao volume da célula para rince e 5 clicos com 10 min de tempo estático em cada (conforme metodologia descrita no item 2.4 do Capítulo 2 desta tese).

A quitosana (Dinâmica, Indaiatuba, BR) foi solubilizada em solução de ácido acético (1%) (Labsynth, Diadema, BR) em concentração de 4 mg/mL por 16 h sob agitação magnética. Separadamente, preparou-se uma solução de tripolifosfato de sódio (TPP) (Dinâmica, Indaiatuba, BR) com concentração de 1,3 mg/mL em água ultrapura.

Nas partículas obtidas por adição direta (Figura 1A), o extrato de folhas de alcachofra foi adicionado diretamente em 25 mL solução de quitosana nas proporções de 11,11%, 16%, 44,3% e 100% (proporções relativas à parte sólida) e agitados em banho de ultrassom Ultronique Q 3.0 – 40 (Tecnal, Indaiatuba, BR) por 2 minutos.

Na adição através da formação de lipossomas por emprego de fosfolipídio (Figura 1B), primeiramente promoveu-se a dispersão do extrato (nas proporções de 11,11%, 16%, 44,3% e 100% - proporções relativas à parte sólida) em 2 mL de etanol (99,5%, Dinâmica, Indaiatuba, BR) e 100 mg de fosfolipídio comercial com auxílio de banho de ultrassom por 30s, em seguida adicionou-se essa dispersão em 25 mL da solução de quitosana e agitou-se por mais 2 minutos em banho de ultrassom para promover a formação das quitossomas.

Após a dispersão do extrato ou dos lipossomos na solução de quitosana, a dispersão foi colocada sob agitação magnética em agitador magnético microcontrolado TE080 (Tecnal, Indaiatuba, BR) e gotejou-se 25 mL da solução de TPP na proporção de 1:1 (taxa de adição aproximada de 1 mL/min), a 8 cm de altura, totalizando 50 mL de solução de partículas (Silva et al., 2021). Amostras sem adição de extrato foram produzidas para controle e chamadas de “branco”. A Tabela 1 apresenta as nomenclaturas e concentrações utilizadas em cada ensaio.

Figura 1. Esquema de produção das micropartículas por (A) adição direta do extrato de folhas de alcachofra à solução de quitosana e (B) pela formação prévia de lipossomas entre o extrato de fosfolipídio.

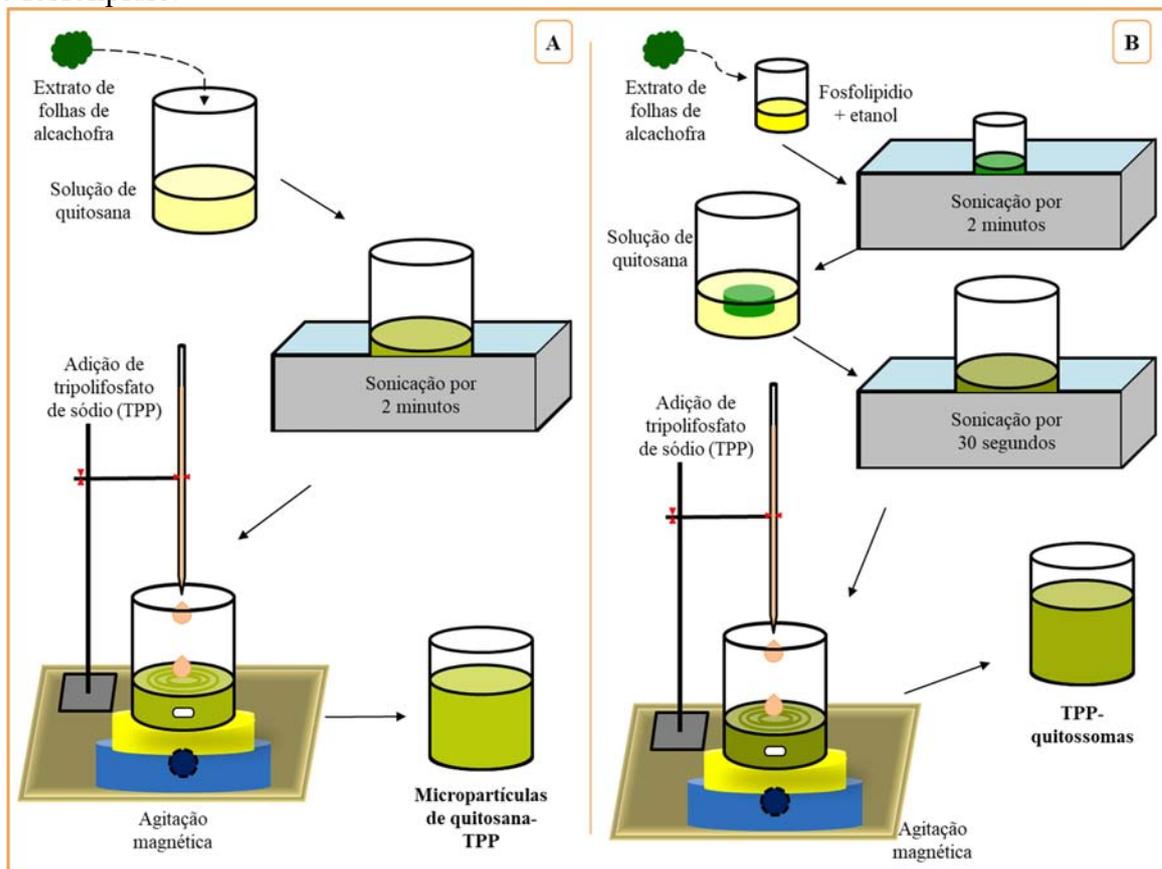


Tabela 1. Partículas de quitosana e tripolifosfato de sódio obtidas por gelificação iônica com e sem pré solubilização do extrato de folhas de alcachofra em fosfolipídio.

Amostra	Quitosana* (mg/100 mL)	TPP* (mg/100 mL)	Concentração de fosfolipídio (mg/100mL)	Concentração de extrato de folhas de alcachofra (mg/100mL)
BQL	400	130	200	-
QL11	400	130	200	28,88
QL16	400	130	200	43,34
QL44	400	130	200	120
QL100	400	130	200	200
BQ	400	130	-	-
Q11	400	130	-	28,88
Q16	400	130	-	43,34
Q44	400	130	-	120
Q100	400	130	-	200

*Concentração na solução inicial

BQL, QL11, QL16, QL44, QL100: partículas obtidas com a formação prévia de lipossomas, sendo, respectivamente, o branco (sem adição de extrato) e as diferentes concentrações de extrato (%) em base seca em relação à massa de quitosana.

BQ, Q11, Q16, Q44, Q100: partículas obtidas pela adição direta do extrato na quitosana, sendo, respectivamente, o branco (sem adição de extrato) e as diferentes concentrações de extrato (%) em base seca em relação à massa de quitosana.

2.2 Caracterização físico-química das suspensões

2.2.1 Morfologia

A morfologia das partículas foi observada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). As amostras foram depositadas em uma grade revestida de carbono, coradas com 2,0% de acetato de uranila (solução aquosa), secas à temperatura ambiente por 24 h e examinadas com um microscópio JEM 100CXII (JEOL, Tóquio, JP) a uma voltagem de aceleração de 100 kV. O microscópio está equipado com uma câmera Olympus MegaView III e software iTEM CE.

2.2.2 Determinação do diâmetro médio por espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta

A distribuição do diâmetro das partículas e o diâmetro médio foram obtidos por espectroscopia de correlação de fótons utilizando-se equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, Holsville, NY, EUA) com um laser de He-Ne de 627 nm, ângulo de incidência de 90°, na temperatura de 25°C e sensibilidade à faixa de 1 nm a 6 µm. Antes da análise as amostras foram agitadas em banho de ultrassom Ultronique Q 3.0 – 40 (Tecnal, Indaiatuba, BR) por 3 minutos, diluídas com água deionizada na proporção de 1:10 para evitar o fenômeno de espalhamento múltiplo de luz. As análises dos dados foram realizadas pelo software incluído no sistema (90Plus).

O potencial zeta foi determinado por medidas de mobilidade eletroforética, no mesmo equipamento ZetaPlus. A mobilidade eletroforética foi calculada utilizando-se a equação de Helmholtz-Smoluchowski. As análises dos dados foram realizadas pelo software incluído no sistema (ZetaPlus) e para cada medida foram feitas 10 corridas fornecendo como resultado uma média do potencial zeta em mV.

2.2.3 Determinação do diâmetro médio por difração à laser

A distribuição do diâmetro das partículas após cinco meses de armazenamento sob refrigeração, foi determinada em um equipamento de difração de raio laser em comprimento de onda de 375 nm SALD-201V (Shimadzu, Tóquio, JP), o qual é sensível à faixa de tamanho de 0,01 e 300 µm. Para isso, a solução de partículas foi diluída em água deionizada e colocada

em cubetas de quartzo para a leitura em níveis de absorvância variando de 0,1 a 0,2. As medidas foram realizadas em triplicata imediatamente após a diluição.

2.2.4 Polimorfismo

O polimorfismo das partículas liofilizadas foi estudado em difratogramas que foram obtidos em um difrator de raios-X (Miniflex 600, Rigaku, JP) em temperatura ambiente (25°C) usando radiação de cobre $\text{K}\alpha$ ($\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$), voltagem de 40 kV, corrente de 30 mA, velocidade angular de 0,05°/s em ângulos variando de 3 a 50°.

2.2.5 Perfil térmico

O perfil térmico das amostras foi investigado por meio de termogramas obtidos em um calorímetro diferencial de varredura (DSC-TA 2010, Thermal Analysis Instruments, New Castle, EUA) com base em Tessaro e colaboradores (2021). As curvas térmicas foram obtidas na faixa de temperatura de -120 a 120 °C com taxa de aquecimento de 5 °C/min, em dupla varredura, seguido por resfriamento com nitrogênio líquido e em uma atmosfera inerte (45 mL de N₂/min).

2.2.6 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi realizada em equipamento TGA Q-500 (TA Instruments, New Castle, EUA) para acompanhar a variação da massa das amostras em função da temperatura. As condições de empregadas na análise foram taxa de aquecimento de 10 °C/min, até 800 °C com vazão 40 mL/min de nitrogênio e 60 mL/min de ar.

2.2.7 Estrutura química

O estudo da estrutura química foi realizado em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Spectrum One, PerkinElmer, Norwalk, EUA) equipado com um acessório de amostragem universal ATR, que permite a análise dos partículas sem

nenhum preparo prévio. Os espectros infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos realizando 40 varreduras na faixa espectral de 4000–650 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

2.2.8 Estabilidade Física

A estabilidade física das partículas foi analisada seguindo metodologia descrita por Tessaro (2020), com auxílio de uma fotocentrífuga analítica de multi amostras (LUMisizer, L.U.M. GmbH, Berlim, Alemanha) com comprimento de onda de 865 nanômetros, 2325xg por 3600s, em temperatura ambiente (cerca de 25 °C). Os resultados foram obtidos utilizando-se o software do equipamento e expressos como índice de instabilidade (de 0 até 1) de acordo com a porcentagem de transmissão de luz através da amostra.

2.3 **Análise estatística**

Análise de variância (ANOVA) foi realizada para determinar se as formulações testadas influenciaram nos parâmetros estudados, teste de Tukey ($p < 0,05$) foi usado para a comparação múltipla de médias.

3 **Resultados e Discussão**

Inicialmente foram estudadas oito condições de microencapsulação de extrato de folhas de alcachofra por gelificação iônica, sendo quatro concentrações de extrato e duas formulações de preparo das partículas (nano/micropartículas de quitosana e TPP-quitossomas). Estas condições foram estudadas a fim de verificar qual formulação permitiria a encapsulação de um maior teor de extrato.

3.1 Características macroscópicas

As Figuras 2 e 3 que contêm fotos de todas as condições estudadas e do controle (sem adição de extrato) antes e após gelificação iônica da quitosana por gotejamento de TPP sob agitação, respectivamente. Com base nestas figuras pode-se observar que sem adição de fosfolípido a quitosana não foi capaz de solubilizar o extrato nas concentrações de 40% e 100%, sobrando, portanto extrato não encapsulado disperso na suspensão. Como visivelmente não houve encapsulação eficiente nestas condições, estas dispersões não foram estudadas. A maior capacidade de encapsulação do extrato pelas TPP-quitossomas provavelmente se deve à possibilidade de encapsular compostos de diferentes polaridades em razão de sua característica anfifílica, pois apresenta uma região hidrofóbica na bicamada e hidrofílica na rede de quitosana reticulada com TPP, além disso compostos hidrofílicos podem ficar aprisionados no interior das partículas.

Macroscopicamente, pode-se observar que as suspensões adicionadas de extrato de folhas de alcachofra apresentaram coloração esverdeada devido à coloração do extrato e que as suspensões contendo quitossomas (Figura 2, segunda linha) e TPP-quitossomas (Figura 3, segunda linha) são mais opacas e menos translúcidas.

Figura 2. Suspensões de extrato de folhas de alcachofra em solução de quitosana, com e sem adição de fosfolípido, após etapa de sonicação e antes da gelificação iônica.

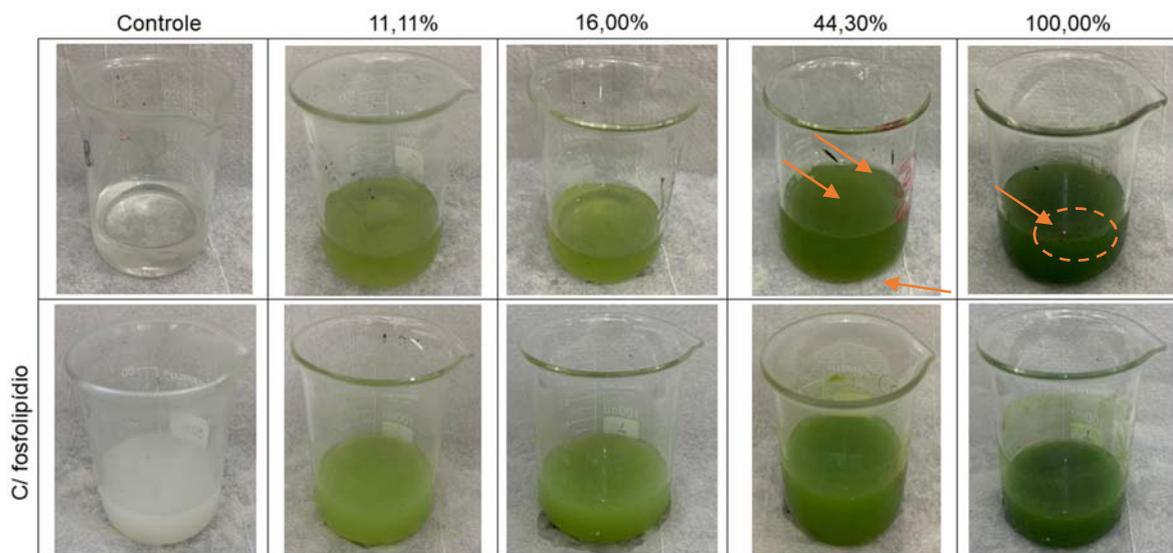
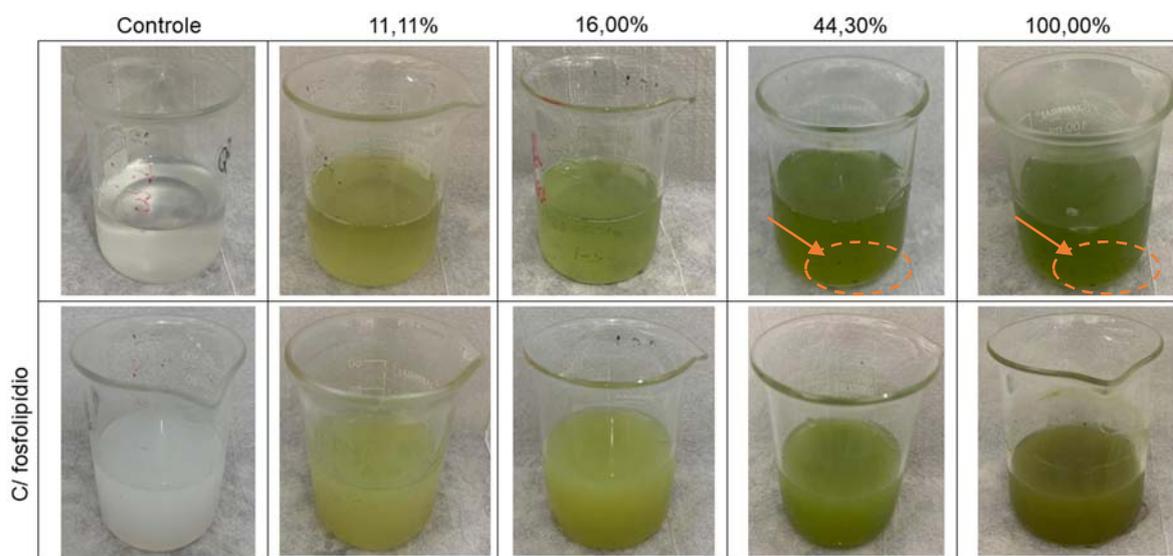


Figura 3. Suspensões de extrato de folhas de alcachofra em solução de quitosana, com e sem adição de fosfolipídio, após gelificação iônica pela adição de tripolifosfato de sódio.



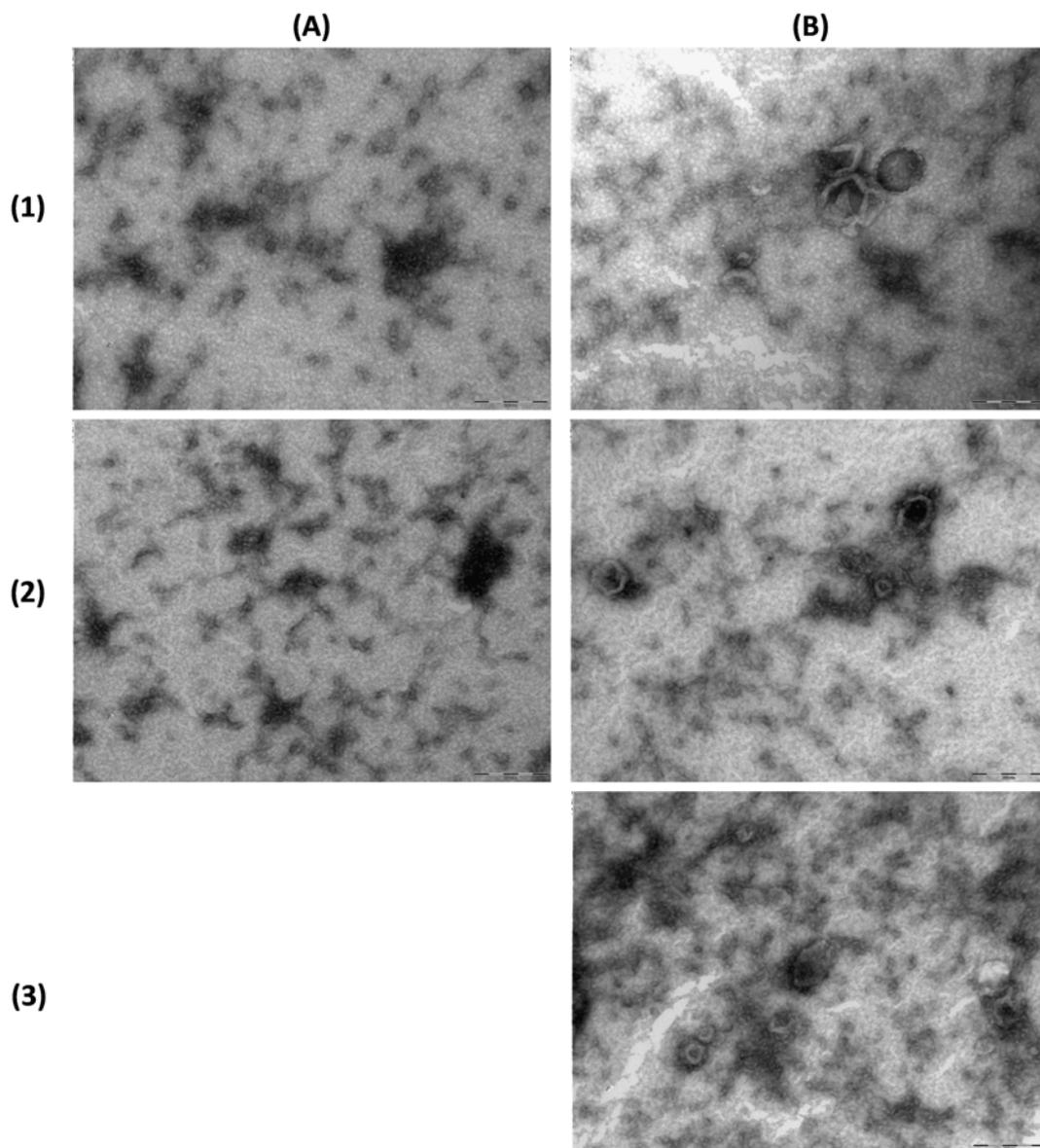
Na caracterização das suspensões estudaram-se as micropartículas de quitosana e TPP sem adição de extrato (BQ), com adição de 11% de extrato (Q11) e as TPP-quitossomas sem adição de extrato (BQL), com 11% de extrato (QL11) e com 100% de extrato (QL100). Com exceção do diâmetro de partículas e potencial zeta em que todas as suspensões foram estudadas.

3.2 Caracterização das suspensões

3.2.1 Morfologia

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão estão apresentadas na Figura 4. Nas imagens referentes às micropartículas de quitosana e TPP (Figura 4 - A1 e A2) observa-se regiões mais escuras indicando provável partícula, porém sem contornos bem definidos. Nas imagens referentes às TPP-quitossomas (Figura 4 - B1, B2 e B3), vesículas com apenas uma bicamada com contornos irregulares bem definidos e com tamanhos e formas variados podem ser claramente observadas, micrografia semelhante à apresentada por Tan e colaboradores (2016) em estudo envolvendo TPP-quitossomas carregadas com licopeno, betacaroteno, luteína e cantaxantina. O contorno bem definido observado para as TPP-quitossomas pode ser um indicativo de estrutura núcleo-casca, no qual o núcleo é constituído pelo lipossoma e a casca pela quitosana reticulada com TPP.

Figura 4. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de (A) micropartículas de quitosana e (B) TPP-quitossomas: (1) sem extrato e carregado com (2) 11% e (3) 100% de extrato. Barra de escala = 200 nm.



3.2.2 Tamanho de partículas e potencial Zeta

O diâmetro médio das partículas é um importante parâmetro a ser determinado por exercer influência diretamente na estabilidade, pois quanto maior o diâmetro médio, maior a tendência das partículas se aglomerarem e sedimentarem. A fim de verificar se houve diferenças no diâmetro das partículas após 5 meses de armazenamento sob refrigeração mediu-se a distribuição de tamanho das partículas no dia em que foram produzidas (dia 0) e após 5 meses. Como o diâmetro médio das partículas armazenadas aumentou, provavelmente devido a aglomeração, não foi possível realizar sua determinação no mesmo equipamento

utilizado no dia 0, devido à sensibilidade do mesmo, sendo portanto determinada por difração a laser, metodologia capaz de medir partículas maiores.

Os resultados obtidos por ambas medições e também pela determinação do potencial Zeta (ζ) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Análise do diâmetro das partículas em suspensão e potencial Zeta

	Amostra	Diâmetro (Dia 0) (μm)	Diâmetro após 5 meses (μm)	Potencial ζ (mV)
COM fosfolipídio	BQL	1,83 \pm 0,19 ^a	8,21 \pm 0,63 ^a	18,13 \pm 0,78 ^{a, b}
	QL11	2,38 \pm 0,41 ^{a, b}	8,94 \pm 1,97 ^a	18,96 \pm 0,70 ^{a, b, c}
	QL16	2,46 \pm 0,11 ^{a, b}	7,63 \pm 1,07 ^a	17,26 \pm 0,77 ^a
	QL44	2,58 \pm 0,86 ^{a, b}	7,41 \pm 0,90 ^a	18,78 \pm 0,79 ^{a, b, c}
	QL100	3,05 \pm 0,22 ^{a, b}	9,87 \pm 2,62 ^a	16,16 \pm 0,79 ^a
SEM fosfolipídio	BQ	4,96 \pm 1,65 ^{b, c}	9,15 \pm 2,32 ^a	22,55 \pm 0,87 ^{b, c}
	Q11	5,04 \pm 2,19 ^{b, c}	8,03 \pm 0,33 ^a	23,15 \pm 0,51 ^c
	Q16	7,70 \pm 0,23 ^c	9,89 \pm 1,19 ^a	23,23 \pm 0,65 ^c

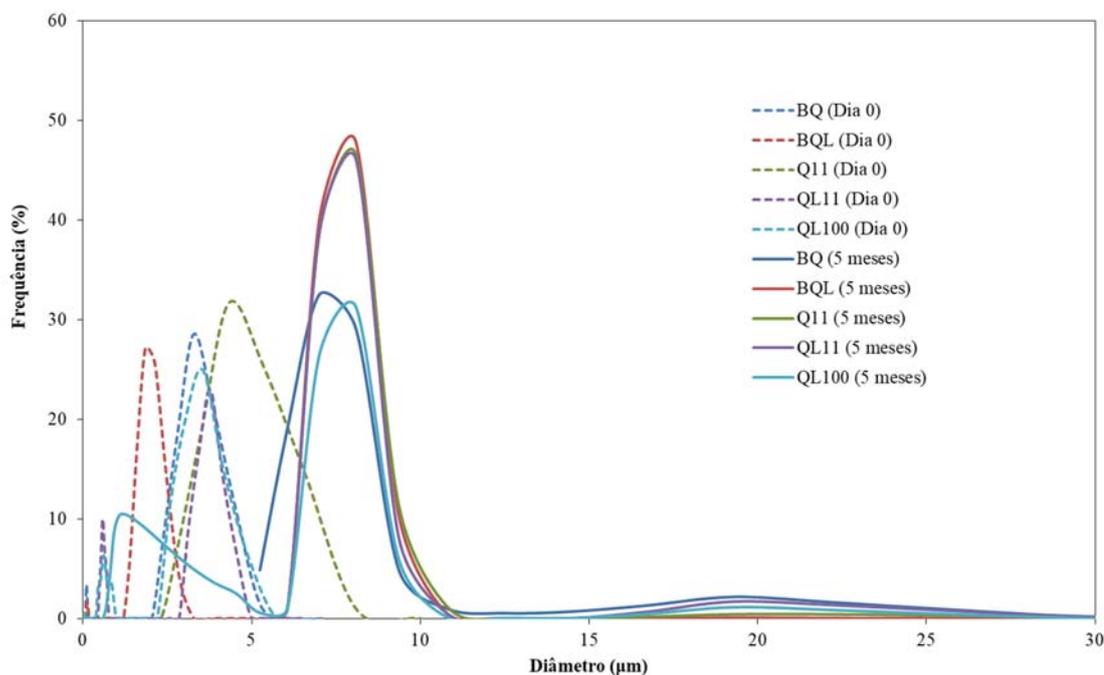
Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

Parâmetros seguidos por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de confiança de 95% pelo teste de médias de Tukey.

Com base nos dados apresentados na Tabela 2, notamos que no dia em que foram preparadas, o diâmetro das partículas apresentou uma correlação positiva com o aumento do teor de extrato encapsulado e que o diâmetro médio das TPP-quitossomas são menores do que aqueles mensurados nas partículas formadas sem adição de fosfolipídios. As TPP-quitossomas apresentaram diâmetro variando entre 4,96 $\mu\text{m} \pm 1,65 \mu\text{m}$ e 7,70 $\mu\text{m} \pm 0,23 \mu\text{m}$ enquanto o diâmetro médio das micropartículas de quitosana com TPP variou de 1,83 $\mu\text{m} \pm 0,19 \mu\text{m}$ a 3,05 $\mu\text{m} \pm 0,22 \mu\text{m}$. Um dos possíveis fatores que acarretaram essa diferença pode estar relacionado com a morfologia apresentada pelas partículas, pois, o cálculo de diâmetro de partícula é válido somente para amostras esféricas. Os valores medidos para as partículas de quitosana com TPP foram bastante superiores àqueles reportados na literatura para este tipo de partícula.

Após armazenamento, pode-se observar um aumento significativo no diâmetro das partículas (8,64 μm) obtidas por ambos os métodos, evidenciando aglomeração. A distribuição do diâmetro de todas as partículas estudadas tanto no dia 0 quanto após 5 meses de armazenamento sob refrigeração estão apresentados na Figura 5.

Figura 5. Distribuição de diâmetro de (BQL) TPP-quitossoma vazia, (QL11)(QL100), TPP-chitossomas com 11% e 100% de extrato de folhas de alcachofra, respectivamente, (BQ) micropartículas de quitosana e TPP vazias, (Q11) micropartículas de quitosana e TPP carregadas com 11% de extrato de folhas de alcachofra.



Os potenciais zeta (ζ) das dispersões de partículas obtidas também estão apresentados na Tabela 2, Essa medida está relacionada com a estabilidade das dispersões, pois indica a magnitude das alterações nas cargas elétricas das superfícies das partículas, que podem contribuir para as forças repulsivas entre elas e interferir na taxa de aglomeração (Kale, Deodore, 2016). Sistemas com potenciais ζ com valores entre -30 mV e 30 mV apresentam menor estabilidade devido à maior contribuição das forças atrativas entre as partículas (Oropeza, 2011). Os valores obtidos neste trabalho variam entre 16,16 mV \pm 0,79 mV e 18,96 mV \pm 0,70 mV para as TPP-chitossomas e de 22,55 mV \pm 0,87 mV a 23,23 mV \pm 0,65 mV para as partículas sem adição de fosfolípidios. A aglomeração observada nos ensaios após armazenamento está de acordo com o previsto de acordo com o potencial ζ pois o potencial medido para partícula BQ, Q11 e Q16 foi mais próximo de 30 mV e apesar destas terem apresentado um diâmetro médio inicial maior quando comparada às TPP-quitossomas, o que teoricamente aumentaria a tendência delas de aglomerarem-se, passaram a ter diâmetro similar às demais partículas após 5 meses de armazenamento.

Na análise de variância observada na Tabela 3, confirma-se que nem o modo de formação das partículas em suspensão e nem o teor de extrato de folhas de alcachofra

influenciaram significativamente no diâmetro médio das partículas após armazenamento, pois $F_{\text{calculado}}$ é menor que F_{tabelado} ao nível de significância de 95%. Além disso, há evidência estatística de que pelo menos uma das variáveis independentes estudadas exerceram efeito significativo sobre o diâmetro de partículas no dia zero, sobre o potencial ζ e sobre o índice de instabilidade das suspensões pois, $F_{\text{calculado}}$ é maior que F_{tabelado} .

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para modelos de primeira ordem para diâmetro de partícula (Dia 0 e 5 meses), potencial Zeta e índice de instabilidade.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Diâmetro de partícula (Dia 0)					
Regressão	83,49	7	11,93	11,59	> 2,66
Resíduo	16,47	16	1,03		
Total	99,95	23	-		
Diâmetro de partícula (5 meses)					
Regressão	20,20	7	2,88	1,10	< 2,66
Resíduo	41,78	16	2,61		
Total	61,98	23	-		
Potencial ζ					
Regressão	164,44	7	23,49	8,67	> 2,66
Resíduo	43,33	16	2,71		
Total	207,77	23	-		
Índice de instabilidade					
Regressão	0,29	4	0,07	9,69	> 5,19
Resíduo	0,04	5	0,01		
Total	0,33	9	-		

$F_{\text{calculado}}$ maior que o F_{tabelado} ao nível de 95% de confiança.

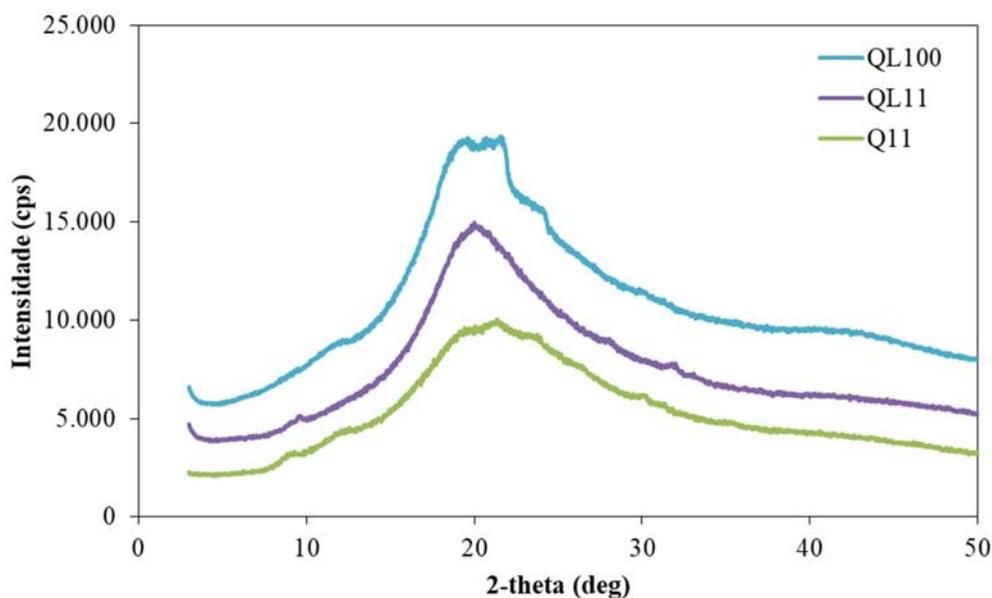
3.2.3 Polimorfismo

O DRX (Difratograma de Raios X) é utilizado para avaliar a estrutura primária de materiais cristalinos em escala atômica (Thandapani et al., 2017), os padrões de difração de raios X das partículas liofilizadas estão apresentados na Figura 6.

Observa-se que não houve formação de picos bem definidos para nenhuma das partículas estudadas que apresentaram uma região amorfa em $2-\theta$ ao redor de 20, fato que pode ser entendido como presença de cristais imperfeitos pois a largura do pico está relacionada com o tamanho do cristalito e quanto mais definido e estreito o pico, maior a cristalinidade (Jingou et al., 2011).

Os difratogramas obtidos são semelhantes aos apresentados por Thansapani e colaboradores (2017) para nanopartículas de quitosana e TPP e também por Tessaro (2020) para filmes de quitosana.

Figura 6. Difratograma de raios X das TPP-quitossomas com 11% e 100% de extrato de folhas de alcachofra (QL11 e QL100, respectivamente) e micropartículas de quitosana e TPP carregadas com 11% de extrato de folhas de alcachofra (Q11).



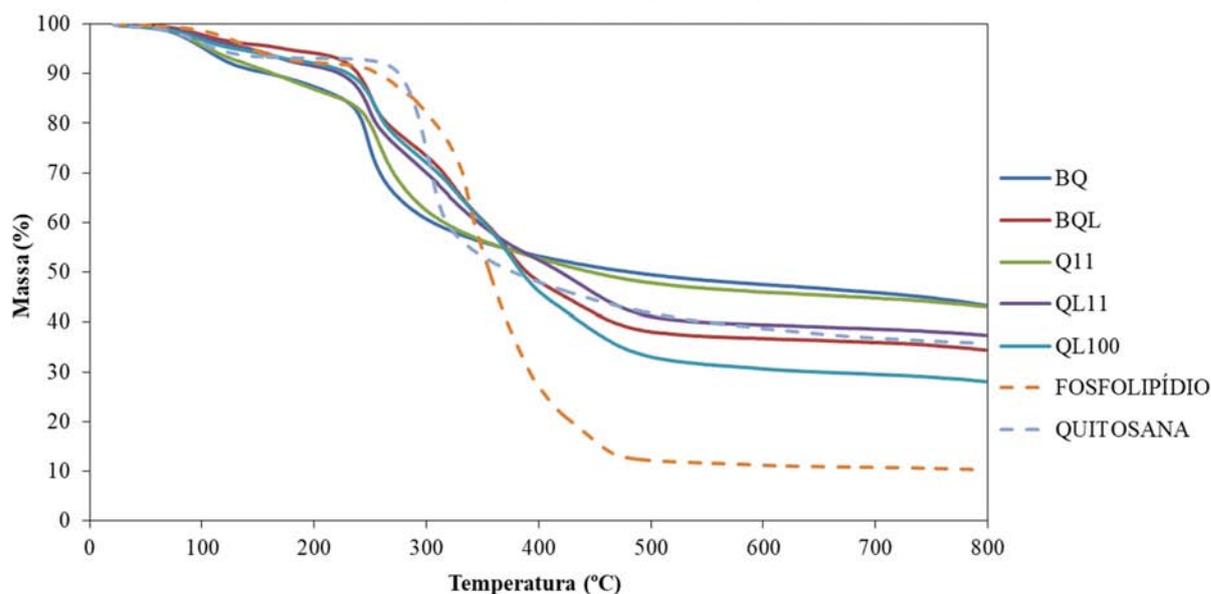
3.2.4 Análises térmicas

A análise termogravimétrica é utilizada para avaliar a estabilidade térmica e a perda de massa de diferentes materiais de acordo com uma ampla faixa de temperatura aplicada (Yang et al., 2015).

No termograma apresentado na Figura 7 é possível comparar o decaimento térmico das diferentes suspensões de partículas obtidas neste trabalho e também dos materiais de parede utilizados na formação das partículas. Observa-se que o fosfolípido apresenta duas etapas de decaimento de massa, sendo a primeira em temperaturas entre 100 e 200 graus e a segunda, mais acentuada em temperaturas entre 250 °C e 480 °C aproximadamente, estabilizando após um decaimento de cerca de 90% em massa e que a quitosana apresentou três etapas de decaimento de massa, sendo a primeira em temperatura próxima a 100 °C, a segunda e mais acentuada em temperaturas entre 280 °C e 330 °C com um decaimento suave

em temperaturas superiores a 330 °C, não sendo possível verificar uma estabilização do decaimento em massa da quitosana no intervalo testado.

Figura 7. Decaimento de massa em função da temperatura determinada por análise termogravimétrica para TPP-quitossoma vazia (BQL), TPP-quitossomas com 11% e 100% de extrato de folhas de alcachofra (QL11 e QL100, respectivamente), micropartículas de quitosana e TPP vazias (BQ), micropartículas de quitosana e TPP carregadas com 11% de extrato de folhas de alcachofra (Q11) e para fosfolipídio e quitosana livres.



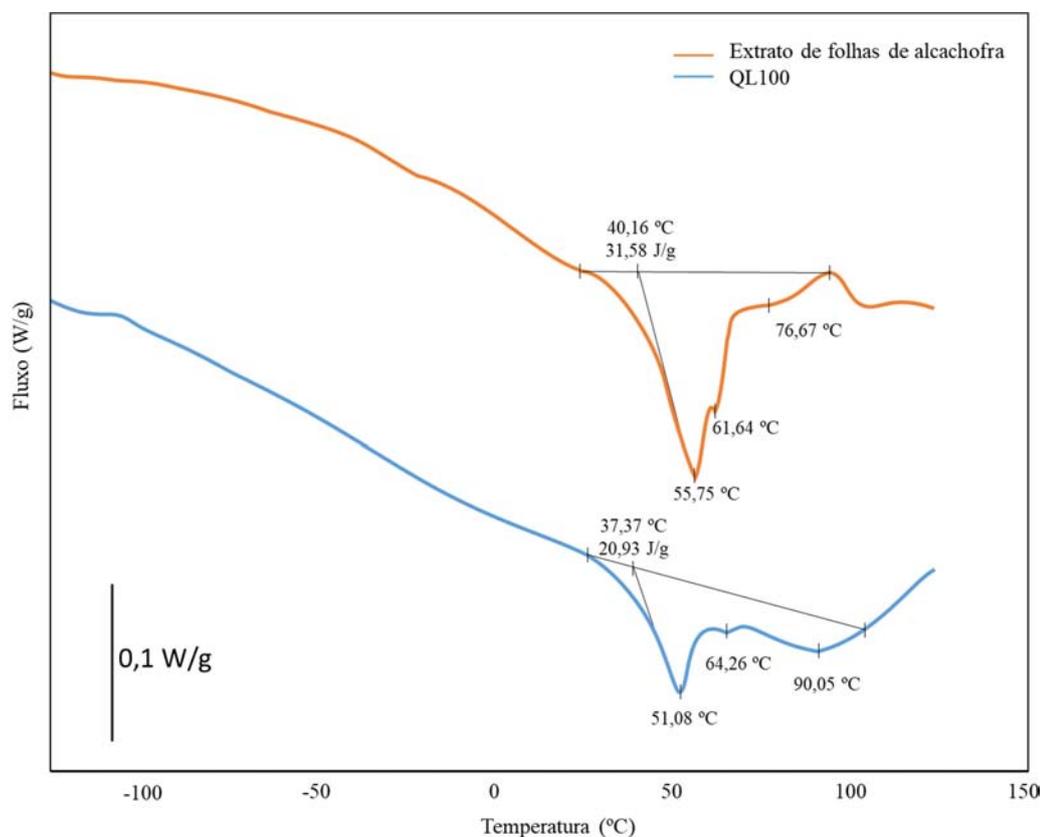
As partículas obtidas sem adição de fosfolipídio (BQ e Q11) se mostraram mais estáveis do que as demais, com decaimento em massa máximo de cerca de 58% no intervalo de temperatura testado, não havendo diferença entre as partículas carregadas com extrato de folhas de alcachofra e as partículas vazias (controle).

As TPP-quitossomas (BQL, QL11 e QL100) apresentaram estabilidade semelhante entre si em temperatura de até cerca de 380 °C, em temperaturas superiores a esta, o teor de extrato de folhas de alcachofra influenciou na estabilidade, sendo QL11 (decaimento de ~ 62% em massa) a mais estável, QL100 (decaimento de ~ 71% em massa) a menos estável e BQL (decaimento de ~ 66% em massa) com estabilidade intermediária.

A calorimetria diferencial de varredura é um método essencial para avaliar o estado físico do material da parede e do núcleo, associando o comportamento do calor e diferentes temperaturas, obtendo informações como temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão e de cristalização. Sendo frequentemente utilizada para se obter informações relacionadas a alterações conformacionais (Nollet, 2004).

Estudou-se o termograma obtido por calorimetria diferencial de varredura de QL100 (Figura 8), pois esta foi a condição que propiciou maior encapsulação do material fitoterápico sendo, portanto, a que será utilizada em estudos futuros de aplicação em alimentos. A temperatura de fusão de QL100 é 51,08 °C, não sendo observadas variações importantes em temperaturas de refrigeração (cerca de 8 °C) e de congelamento, o que indica sua possível aplicação em uma ampla faixa de alimentos.

Figura 8. Termograma contendo o perfil térmico das (QL100) TPP-quitossomas com 100% de extrato de folhas de alcachofra e do extrato de folhas de alcachofra livre.



3.2.5 Estrutura química

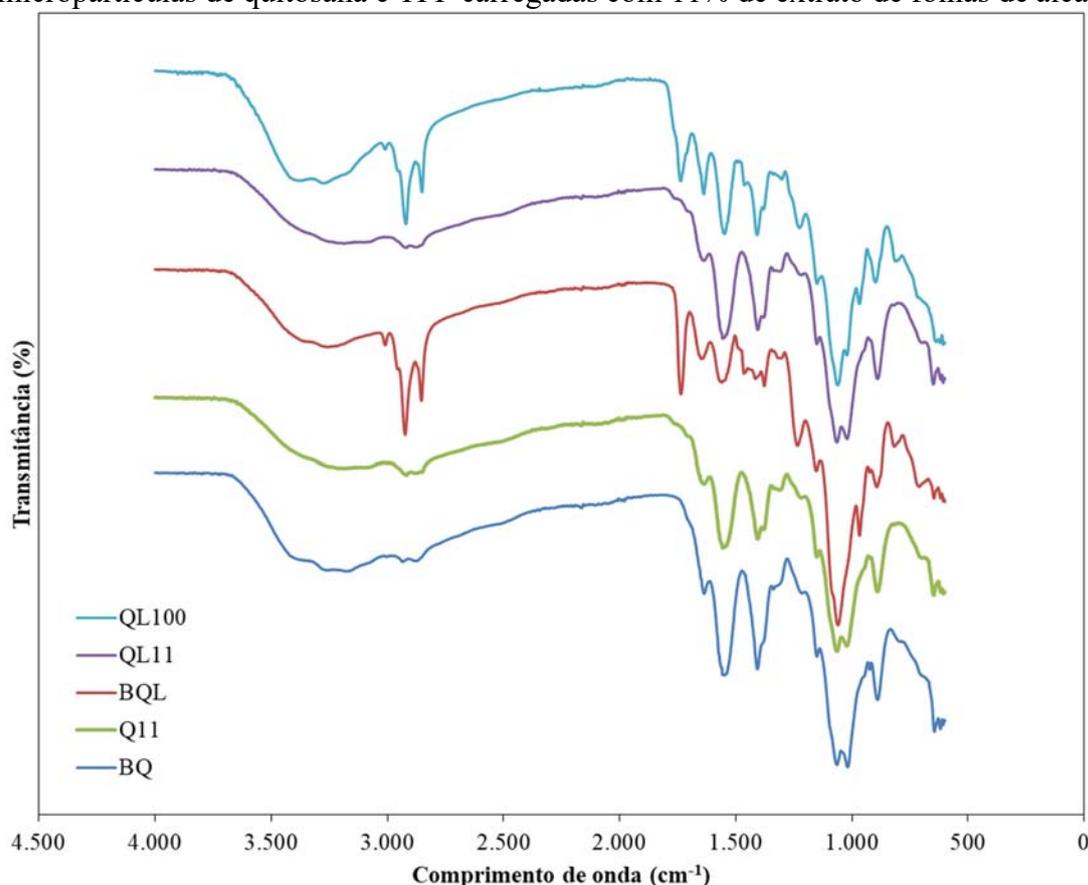
A espectroscopia no infravermelho se baseia na frequência de vibração específica que as ligações químicas das substâncias possuem, chamados níveis vibracionais. Os espectros obtidos são importantes para identificar grupos funcionais ou investigar mudanças estruturais na amostra, em nível molecular (Schalch, 2019; Dammak et al., 2017) relacionadas à instabilidade oxidativa devido à formação de hidroperóxidos (primeiro produto da oxidação) entre 3200-3600 cm^{-1} e de cetonas e aldeídos entre 1730-1750 cm^{-1} (Haider et al. 2017).

Picos largos e intensos são observados na faixa entre $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ e estão relacionados à vibração de estiramento simétrico e assimétrico dos grupos fosfato presentes no TPP e vibração de alongamento C-O na quitosana e em compostos fenólicos presentes nos extratos de folhas de alcachofra (Martins et al., 2012).

Observou-se também um decaimento na transmitância de todas as amostras nas faixas referentes à formação de hidroperóxidos, cetonas e aldeídos (Figura 9) e também uma banda em 1548 cm^{-1} que confirma a presença da quitosana em todas as amostras (Esposto, 2021), sendo um indicativo de que ocorreu a reticulação. Para a BQL e QL100 foram identificados picos bem demarcados na região entre $2750\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ que foram menos intensos, mas presentes para as demais amostras e em $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$, que não foram identificados nas demais amostras.

Em geral, os espectros obtidos são semelhantes aos apresentados na literatura por Esposto (2021), Tessaro (2020) e Comunian (2017) para este tipo de partículas.

Figura 9. Espectro infravermelho de transformada de Fourier Termograma para (BQL) TPP-quitossoma vazia, (QL11)(QL100), TPP-chitossomas com 11% e 100% de extrato de folhas de alcachofra, respectivamente, (BQ) micropartículas de quitosana e TPP vazias, (Q11) micropartículas de quitosana e TPP carregadas com 11% de extrato de folhas de alcachofra.



3.2.6 Estabilidade Física

Os índices de instabilidade das suspensões foram determinados pelo equipamento LUMiSizer® (Tabela 4), suas dispersões foram traçadas como perfis de transmissão relacionados ao espaço e ao tempo ao longo do comprimento da amostra que estão apresentados nas Figuras 10 (BQ e Q11) e 11 (BQL, QL11 e QL100).

A dispersão das suspensões BQL ($0,362 \pm 0,052$) e QL11 ($0,372 \pm 0,028$) não apresentaram diferença estatística entre si e mostraram-se mais estáveis do que as demais partículas analisadas. BQ ($0,787 \pm 0,179$), Q11 ($0,668 \pm 0,001$) e QL100 ($0,652 \pm 0,047$) também não diferiram estatisticamente entre si.

Os perfis de transmissão de BQ e Q11 apresentaram alta transmissão e BQ possui formato mais linear. Nos perfis de transmissão de BQL, QL11 e QL100 é possível observar perfis de separação entre os componentes das partículas, indicando diferentes velocidades de sedimentação (que também ocorreu em Q11, porém em menor proporção) sendo mais acentuado para Q100 que possui maior teor de extrato de folhas de alcachofra.

Tabela 4. Índice de instabilidade obtido por LUMiSizer para (BQL) TPP-quitossoma vazia, (QL11)(QL100), TPP-chitossomas com 11% e 100% de extrato de folhas de alcachofra, respectivamente, (BQ) micropartículas de quitosana e TPP vazias, (Q11) micropartículas de quitosana e TPP carregadas com 11% de extrato de folhas de alcachofra

Amostra	Índice de Instabilidade
BQ	$0,787 \pm 0,179^b$
BQL	$0,362 \pm 0,052^a$
Q11	$0,668 \pm 0,001^b$
QL11	$0,372 \pm 0,028^a$
QL100	$0,652 \pm 0,047^b$

Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

Parâmetros seguidos por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de confiança de 95% pelo teste de médias de Tukey.

Os fenômenos de instabilidade estão intimamente relacionados à sedimentação e flutuação das partículas, ou a mudanças na distribuição do tamanho das partículas (por exemplo, interação entre as partículas) seguidas pela migração das partículas (Caddeo et al., 2013).

Figura 10. Perfis de transmissão para (BQ) micropartículas de quitosana e TPP vazias, (Q11) micropartículas de quitosana e TPP carregadas com 11% de extrato de folhas de alcachofra.

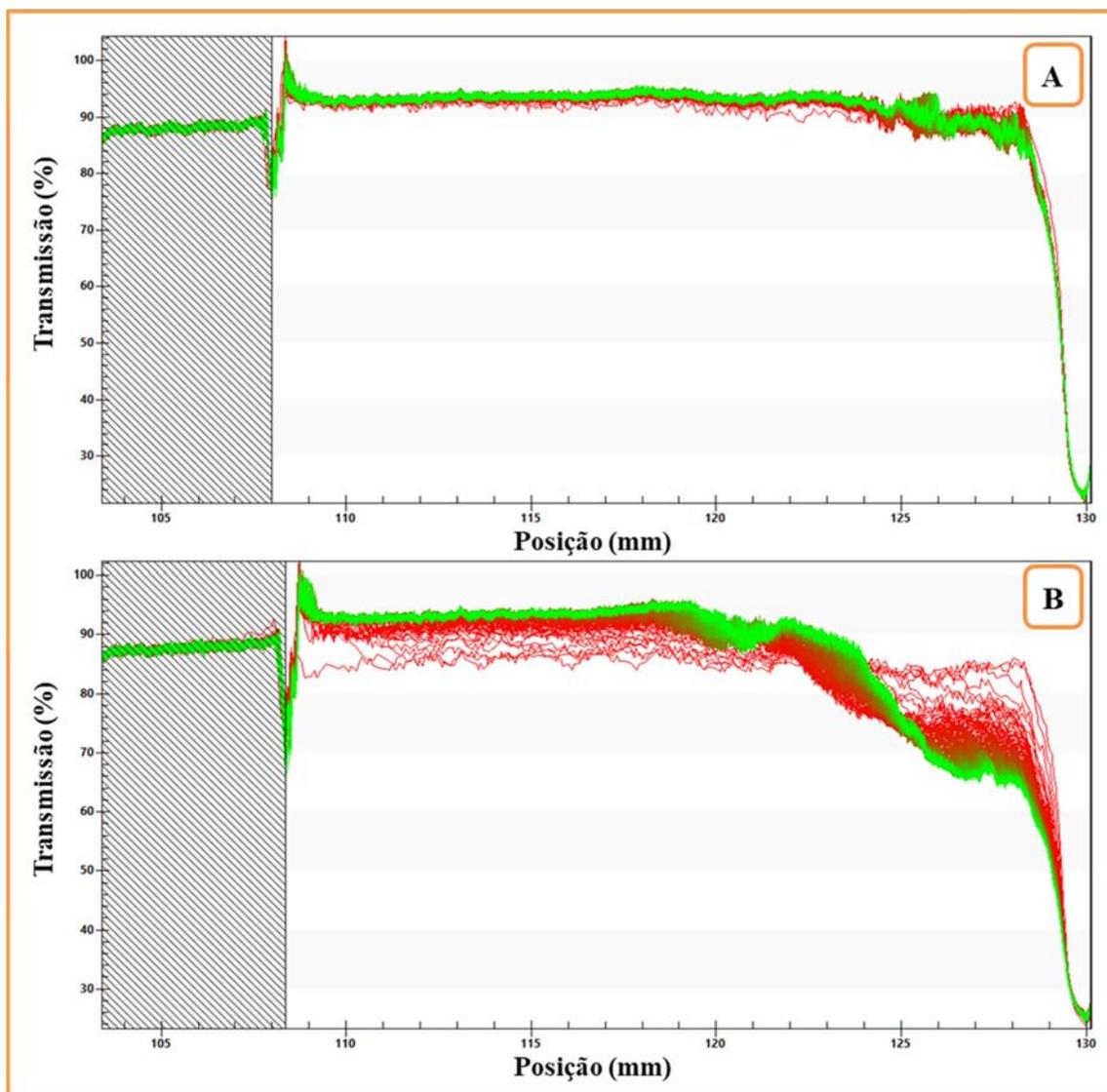
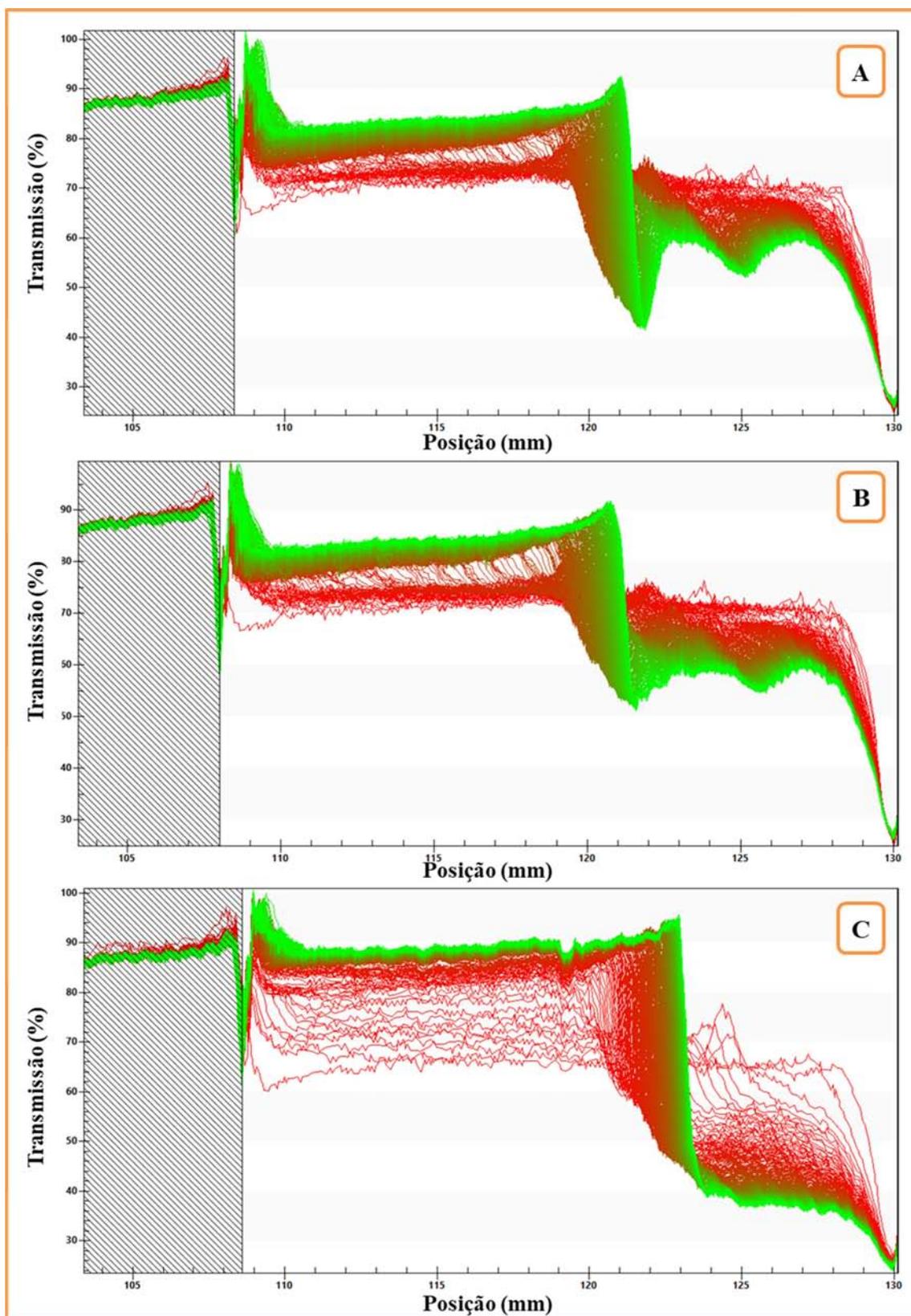


Figura 11. Espectro infravermelho de transformada de Fourier Termograma para (BQL) TPP-quitossoma vazia, (QL11)(QL100), TPP-chitossomas com 11% e 100% de extrato de folhas de alcachofra, respectivamente.



4 Conclusão

A encapsulação de extratos de folhas de alcachofra em micropartículas formadas por gelificação iônica de quitosana e TPP é viável, ressaltando que partículas mais uniformes e com maior capacidade de encapsulação do extrato foram obtidas quando fosfolipídio foi adicionado com formação prévia de lipossomas envolvendo o extrato e posteriormente formando-se as TPP-quitossomas. Isso foi possível devido à possibilidade de encapsular compostos de diferentes polaridades em lipossomas, sendo que os lipofílicos permanecem na bicamada e os hidrofílicos podem estar no interior das partículas ou incorporados na rede de quitosana reticulada no TPP.

As micropartículas obtidas possuem características interessantes para aplicação nas indústrias alimentícias por serem formadas por tecnologia GRAS (Geralmente Reconhecida como Segura à Saúde) que não emprega solventes orgânico e nem altas temperaturas durante o processo.

5 Referências

- ABAE, A.; MOHAMMADIAN, M.; JAFARI, S. M. Whey and soy protein-based hydrogels and nano-hydrogels as bioactive delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 70, p. 69-81, 2017.
- ABD EL-HACK, M. E. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2726-2744, 2020.
- AHN, S. I.; CHO, S.; CHOI, N. J. Effectiveness of chitosan as a dietary supplement in lowering cholesterol in murine models: A meta-analysis. **Marine drugs**, v. 19, n. 1, p. 26, 2021.
- ALAVI, S.; HAERI, A.; DADASHZADEH, S. Utilization of chitosan-caged liposomes to push the boundaries of therapeutic delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 991-1012, 2017.
- ALMASI, H.; JAFARZADEH, P.; MEHRYAR, L. Fabrication of novel nanohybrids by impregnation of CuO nanoparticles into bacterial cellulose and chitosan nanofibers: Characterization, antimicrobial and release properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, p. 273-281, 15 abr. 2018.
- ANNA, B. et al. Pharmacological and biological effects of chitosan. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 13, n. 2, p. 1043-1049, 2020.

- ARAFI, M. G.; GIRGIS, G. N. S.; EL-DAHAN, M. S. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for enhanced ocular anti-inflammatory efficacy of atorvastatin calcium. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 1335, 2020.
- ARKOUN, M. et al. Chitosan-based structures/coatings with antibacterial properties. In: TIWARI, A. (Ed.). **Handbook of Antimicrobial Coatings**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 357-389.
- BUGNICOURT, L.; LADAVIÈRE, C. Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 60, p. 1-17, 2016.
- CADDEO, C. et al. Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 461, p. 69-78, 2016.
- CADDEO, C. et al. Physico-chemical characterization of succinyl chitosan-stabilized liposomes for the oral co-delivery of quercetin and resveratrol. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1853-1861, 2017.
- CHEN, M. et al. The kinetics and release behaviour of curcumin loaded pH-responsive PLGA/chitosan fibers with antitumor activity against HT-29 cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 265, p. 118077, 2021.
- COMUNIAN, T. A. **Simultaneous encapsulation of echium (Echium Plantagineum L.) seed oil, phytosterols and phenolic compounds: characterization and application of microcapsules**. 2017. 353 f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.
- DAMMAK, I. et al. Properties of active gelatin films incorporated with rutin-loaded nanoemulsions. **International journal of biological macromolecules**, v. 98, p. 39-49, 2017.
- DE BRITTO, D. et al. Entrapment characteristics of hydrosoluble vitamins loaded into chitosan and N, N, N-trimethyl chitosan nanoparticles. **Macromolecular Research**, v. 22, n. 12, p. 1261-1267, 2014.
- DE CARVALHO, F. G. et al. Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on *C. albicans* biofilm formation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, p. 109885, 2019.
- DE MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. **Journal of colloid and interface science**, v. 321, n. 2, p. 477-483, 2008.
- DEVI, N.; DUTTA, J. Preparation and characterization of chitosan-bentonite nanocomposite films for wound healing application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1897-1904, 1 nov. 2017.
- DING, L. et al. Impact of pH, ionic strength and chitosan charge density on chitosan/casein complexation and phase behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 208, p. 133-141, 2019.

- DUTTA, P. K. et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1173-1182, 2009.
- ESPOSTO, B. S. et al. Liposomes vs. chitosomes: Encapsulating food bioactives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 40-48, 2021.
- EZZAT, H. M.; ELNAGGAR, Y. S. R.; ABDALLAH, O. Y. Improved oral bioavailability of the anticancer drug catechin using chitosomes: Design, in-vitro appraisal and in-vivo studies. **International journal of pharmaceutics**, v. 565, p. 488-498, 2019.
- FAN, W. et al. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 21-27, 2012.
- HAIDER, J. et al. Formation of chitosan nanoparticles to encapsulate krill oil (*Euphausia superba*) for application as a dietary supplement. *Food Hydrocolloids*, v. 63, p. 27-34, 2017.
- HAMEDI, H. et al. Chitosan based bioadhesives for biomedical applications: A review. **Carbohydrate Polymers**, p. 119100, 2022.
- HASSANI, S. et al. Preparation of chitosan–TPP nanoparticles using microengineered membranes–Effect of parameters and encapsulation of tacrine. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 482, p. 34-43, 2015.
- HE, G. et al. Anti-inflammatory catecholic chitosan hydrogel for rapid surgical trauma healing and subsequent prevention of tumor recurrence. **Chinese Chemical Letters**, v. 31, n. 7, p. 1807-1811, 2020.
- IIDA, A. S. L. et al. Investigation of TPP-Chitosomes particles structure and stability as encapsulating agent of cholecalciferol. **Polímeros**, v. 29, n. 4, p. 1 8, 2019.
- JANES, K. A.; ALONSO, M. J. Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: Preparation and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, n. 12, p. 2769 2776, 20 jun. 2003.
- JINGOU, Ji et al. Preparation, characterization of hydrophilic and hydrophobic drug in combine loaded chitosan/cyclodextrin nanoparticles and in vitro release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 1, p. 103-107, 2011.
- KALE, S. N.; DEORE, S. L. Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 8, n. 1, p. 39, 2017.
- KATOUZIAN, I.; JAFARI, S. M. Protein nanotubes as state-of-the-art nanocarriers: Synthesis methods, simulation and applications. **Journal of Controlled Release**, v. 303, p. 302-318, 2019.
- KAUSHAL, N.; SINGH, M.; SANGWAN, R. S.. Flavonoids: food associations, therapeutic mechanisms, metabolism and nanoformulations. **Food Research International**, p. 111442, 2022.

- KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V. 84, n. 1, p. 163-171, 2011.
- KOU, S. G.; PETERS, L.; MUCALO, M. Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms. **Carbohydrate Polymers**, p. 119132, 2022.
- KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**. V.46, n.1, p. 1-27, 2000.
- LAYE, C.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Formation of biopolymer-coated liposomes by electrostatic deposition of chitosan. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, p. N7-N15, 2008.
- LI, Z. et al. A fast-dissolving microneedle array loaded with chitosan nanoparticles to evoke systemic immune responses in mice. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, n. 2, p. 216-225, 2020.
- LIAN, T.; HO, R. J. Y. Trends and developments in liposome drug delivery systems. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 90, n. 6, p. 667-680, 2001.
- LIMA, R. et al. Evaluation of the genotoxicity of chitosan nanoparticles for use in food packaging films. **Journal of food science**. V.75, n.6, p. 89-96, 2010.
- MADY, M. M.; DARWISH, M. M. Effect of chitosan coating on the characteristics of DPPC liposomes. **Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 3, p. 187-191, 2010.
- MALLICK, S.; CHOI, J. S. Liposomes: versatile and biocompatible nanovesicles for efficient biomolecules delivery. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 755-765, 2014.
- MARTINS, Alessandro F. et al. Chitosan/TPP microparticles obtained by microemulsion method applied in controlled release of heparin. **International journal of biological macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1127-1133, 2012.
- MCCLEMENTS, D. J. **Nanoparticle-and microparticle-based delivery systems: Encapsulation, protection and release of active compounds**. CRC press, 2014.
- MERTINS, O.; DIMOVA, R. Binding of chitosan to phospholipid vesicles studied with isothermal titration calorimetry. **Langmuir**, v. 27, n. 9, p. 5506-5515, 2011.
- NAHAR, K. et al. Starch-coated magnetic liposomes as an inhalable carrier for accumulation of fasudil in the pulmonary vasculature. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 464, n. 1 2, p. 185 195, 2014.
- NIAZ, T. et al. Polyelectrolyte multicomponent colloidosomes loaded with nisin Z for enhanced antimicrobial activity against foodborne resistant pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1 19, 2018.
- NOLLET, L. M. L. Differential Scanning Calorimetry in the Analysis of Foods. In: **Handbook of Food Analysis-3 Volume Set**. CRC Press, 2004. p. 1826-1842.

- NUNES, P. S. et al. Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1 2, p. 473-482, 2016.
- OROPEZA, M. V. C. **Síntese e caracterização de nanopartículas núcleo-casca de poliestireno e polimetacrilato de metila obtidas por polimerização em emulsão sem emulsificante e foto iniciada**. 2011. 277 p. Tese (Doutorado) Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 2011.
- PENICHE, C. et al. Chitosan: an attractive biocompatible polymer for microencapsulation. **Macromolecular Bioscience**, v. 3, n. 10, p. 511-520, 2003.
- ROSTAMI, M. R. et al. Application of different biopolymers for nanoencapsulation of antioxidants via electrohydrodynamic processes. **Food Hydrocolloids**, v. 97, p. 105170, 2019.
- SCHALCH, N. O. O. **Associação de nanocelulose e nanopartícula de quitosana na estabilização de ácido fólico (vitamina B9)**. 2019. 79 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.
- SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in food science & technology**, v. 10, n. 2, p. 37-51, 1999.
- SILVA, N. C. et al. Extraction of phenolic compounds from acerola by-products using chitosan solution, encapsulation and application in extending the shelf-life of guava. **Food Chemistry**, v. 354, p. 129553, 2021.
- SONG, X. et al. Effect of molecular weight of chitosan and its oligosaccharides on antitumor activities of chitosan-selenium nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 231, p. 115689, 2020.
- TAN, C. et al. Biopolymer-coated liposomes by electrostatic adsorption of chitosan (chitosomes) as novel delivery systems for carotenoids. **Food hydrocolloids**, v. 52, p. 774-784, 2016.
- TAN, C.; WANG, J.; SUN, B. Biopolymer-liposome hybrid systems for controlled delivery of bioactive compounds: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 48, p. 107727, 2021.
- THANDAPANI, G. et al. Size optimization and in vitro biocompatibility studies of chitosan nanoparticles. **International journal of biological macromolecules**, v. 104, p. 1794-1806, 2017.
- TAYLOR, T. M. et al. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 45, n. 7-8, p. 587-605, 2005.
- TESSARO, L. **Produção de emulsão dupla A/O/A rica em extrato de folha de pitangueira (Eugenia uniflora L.) para aplicação em filmes ativos de gelatina e/ou quitosana**. 2020. 151 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

- TESSARO, L. et al. Gelatin and/or chitosan-based films activated with “Pitanga”(Eugenia uniflora L.) leaf hydroethanolic extract encapsulated in double emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 106523, 2021.
- TOSI, M. M. et al. Dynamic light scattering (DLS) of nanoencapsulated food ingredients. In: **Characterization of nanoencapsulated food ingredients**. Academic Press, 2020. p. 191-211.
- VÁSCONEZ, M. B. et al. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 762-769, 2009.
- YANG, X. et al. Development and evaluation of novel microcapsules containing poppy-seed oil using complex coacervation. **Journal of Food Engineering**, v. 161, p. 87-93, 2015.
- YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133-1174, 2015.
- ZHANG, W.; LI, X.; JIANG, W. Development of antioxidant chitosan film with banana peels extract and its application as coating in maintaining the storage quality of apple. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 1205-1214, 2020.
- ZHOU, F. et al. Chitosan-coated liposomes as delivery systems for improving the stability and oral bioavailability of acteoside. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 17-24, 2018.
- ZHUANG, J. et al. Effects of chitosan coating on physical properties and pharmacokinetic behavior of mitoxantrone liposomes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 1, p. 407-416, 2010.



CAPÍTULO 6 **Pesquisa de mercado de sorbet funcional com efeito simbiótico acrescido de xilitol, *L. gasseri* e inulina**



Resumo

A população mundial está cada vez mais à procura de alimentos que promovam benefícios à saúde, tenham boa aceitação sensorial, sejam prontos para consumo e com rótulo limpo (*clean label*). Neste sentido, o *sorbet* é uma opção de alimento capaz de atender a essa demanda pois são prontos para consumo e elaborados basicamente com polpa de fruta adoçada, possuindo assim poucos ingredientes em sua formulação. Podendo também ser pouco calóricos quando acrescidos de adoçantes de baixa caloria. Esta pesquisa apresenta ao consumidor um *sorbet* adicionado de partículas promotoras de saúde com efeito simbiótico elaborada com produtos naturais, o que garante a manutenção do “*clean label*”. O *sorbet* é um alimento ideal para a adição dos compostos bioativos, pois sua baixa temperatura de armazenamento contribui para a manutenção dos mesmos por um longo período. Nesta pesquisa de mercado, realizada *online*, foi avaliado o perfil de possíveis consumidores de *sorbet* funcional com efeito simbiótico utilizando a plataforma *Google Forms* com divulgação por meio de redes sociais e listas de *e-mail*. O questionário, respondido por 339 voluntários, constava de 26 perguntas divididas em três grupos “Um pouco sobre você”, “Sobre seus padrões de consumo” e “Intenção de compra”. A maior parte dos voluntários (82,79%) relataram ter o hábito de consumir alimentos industrializados considerados saudáveis, 85,16% afirmaram que comprariam um *sorbet* funcional acrescido de xilitol e microcápsulas de *Lactobacilos gasseri* e extrato de folhas de alcachofra e 91,39% disseram que o fato de saber que este *sorbet* tem compostos naturais promotores de saúde faria com que escolhessem esse *sorbet* em detrimento dos tradicionais. As respostas obtidas neste trabalho de pesquisa sugerem que o *sorbet* funcional com efeito simbiótico terá grande aceitação pelos consumidores. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (FZEA/USP) sob o número CAAE 42925221.7.0000.5422.

Palavras-chave: Alimento Funcional. Micropartículas. Prebiótico. Probiótico.

1 Introdução

Os consumidores estão cada vez mais cientes de que o que comem impacta diretamente em sua saúde, tanto de forma negativa quanto positiva e que portanto uma dieta variada rica com alimentos nutritivos associada com um estilo de vida saudável está associada a melhor qualidade de vida e longevidade (Fadnes et al., 2022, Díaz, Fernández-Ruiz, Cámara, 2020; Wong, Lai, Chan, 2015). Neste cenário os alimentos funcionais estão ganhando cada vez mais notoriedade.

O conceito de alimentos funcionais foi introduzido no Japão em meados da década de vinte, pois o governo japonês tinha como objetivo desenvolver alimentos que promovessem benefícios à saúde de modo a proporcionar menores gastos à saúde pública, em vista da elevada expectativa de vida no país. Assim, iniciaram-se as pesquisas em busca de alimentos com a mesma experiência sensorial proporcionada pelos alimentos convencionais, que fossem práticos de serem consumidos no dia a dia e que seu consumo esteja relacionado a benefícios à saúde tanto na prevenção quanto como auxiliar no tratamento de diversas doenças, além de exercerem as funções nutricionais básicas (Martirosyan, Lampert, Ekblad, 2022; Bigliardi, Galati, 2013; Stringheta et al., 2007). Além disso, estes alimentos devem receber o título de GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros à Saúde, do inglês *Generally Recognized As Safe*), o que se refere ao que oferece pouco ou nenhum risco à saúde dos consumidores após a ingestão (Penner et al., 2005; Ranadheera et al., 2010).

No Brasil a legislação não define alimento funcional, mas sim a alegação de propriedade funcional e de propriedade de saúde, de modo a estabelecer as diretrizes para sua utilização. As diretrizes permitem alegações funcionais que estejam relacionadas com o papel fisiológico no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo, além de alegações sobre a manutenção geral da saúde e redução de risco de doenças, contudo, não é permitido declaração de que o alimento é referente à cura ou prevenção de doenças (BRASIL, 1999a). Desta forma, alimentos enriquecidos com probióticos e/ou prebióticos podem conter alegação de alimento com propriedade funcional desde que sejam realizados estudos comprobatórios dos benefícios alegados.

Probióticos, ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), prebióticos, vitaminas, proteínas, fibras e antioxidantes estão entre os ingredientes funcionais mais comuns na indústria alimentícia (Granato et al., 2020). Os probióticos são bactérias vivas que, quando administradas em quantidades suficientes, proporcionam benefícios à saúde (FAO/OMS,

2001), sendo as bactérias do ácido lático os probióticos mais amplamente utilizados (Singh; Bhushan, Vij, 2020). A ingestão de probióticos está relacionada com diversos benefícios à saúde tais como alívio dos sintomas de intolerância à lactose, propriedades anticancerígenas, tratamento de doenças inflamatórias intestinais, síndrome do intestino irritável, diarreia, estimulação da absorção de cálcio, redução do colesterol no sangue, infecções do trato respiratório, constipação, infecções do trato urinário, síntese de vitaminas, dentre outros (Kerry et al., 2018; Nagpal et al., 2012).

O *Lactobacillus gasseri* foi descrito como um probiótico multifuncional, que possui tolerância aos ácidos biliares e, dessa forma, é uma das espécies dominantes no intestino humano. Vários benefícios para a saúde foram atribuídos a este probiótico por meio de agentes antimicrobianos e imunomodulação (Fujiwara et al., 2001; Takahashi et al., 2006). No contexto da recente pandemia de COVID-19, de acordo com Morais *et al.* (2020), existem alternativas relacionadas à terapia nutricional que podem auxiliar no controle da infecção, por meio do uso de *L. gasseri* e baixo teor de purina na dieta, os quais melhorariam o sistema imunológico e enfraqueceriam a replicação viral, de modo a auxiliar no tratamento desta doença viral.

Prebióticos foram inicialmente descritos por Gibson e Roberfroid (1995), como sendo um ingrediente alimentar não digerível que afeta beneficemente o hospedeiro ao aumentar seletivamente o crescimento/atividade de uma ou um número limitado de bactérias no cólon, e assim melhorar a saúde do hospedeiro. Esta definição foi atualizada e ampliada em 2010 de forma a incluir também outros compostos, passando a serem definidos como sendo um ingrediente seletivamente fermentado que resulta em alterações específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo assim benefício(s) à saúde do hospedeiro (Gibson et al., 2010). Os principais objetivos do consumo de prebióticos é fornecer substrato seletivo para o desenvolvimento de bifidobactérias que são capazes de degradar diversos carboidratos complexos, auxiliar na regulação da microbiota intestinal e também na recolonização da mucosa intestinal, após tratamento com antibióticos (Bock et al., 2021; Suarez, 2013). De acordo com a visão do mercado global, a demanda comercial do prebiótico está crescendo e deve atingir US\$ 8,5 bilhões até 2024 (Hlalukana et al., 2021).

A inulina é um prebiótico caracterizado como um polissacarídeo vegetal do tipo frutílico que tem adquirido valor como um nutriente natural com boa biocompatibilidade, de baixo custo e de imediata disponibilidade. Além disso, tem a capacidade de melhorar o sabor dos alimentos dispondo de várias funções fisiológicas, como a redução do açúcar e gordura no

sangue, propriedades anticâncer, regulação da microbiana intestinal, promoção da absorção mineral e de vitaminas (Wan et al., 2020).

A fim de conciliar dois dos ramos crescentes do mercado alimentício, o dos alimentos funcionais e dos gelados comestíveis (Silva, Azevedo, Coelho, 2016), houve a necessidade de desenvolver um produto que atenda ao novo nicho de consumidores conscientes, que almejam por produtos saudáveis, nutritivos, funcionais e prontos para consumo. Neste cenário, o *sorbet* ganha visibilidade quando adoçado com edulcorantes de baixa caloria, como o xilitol que é um edulcorante de origem natural que vem se destacando por apresentar seu metabolismo independente da insulina, valor calórico reduzido, efeito anticariogênico (Maia et al., 2008) e baixo índice glicêmico (Elamin et al., 2012), sendo, portanto, indicado do tratamento de obesos, diabéticos e até mesmo na nutrição parenteral (O'donnell, Kearsley, 2012). Além dos benefícios conferidos à saúde, o xilitol também apresenta propriedades tecnológicas atuando como agente encorpante e inibidor da cristalização (Nabors 2002).

Segundo a Portaria nº 379 de 26 abr. de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Brasil, 1999b), *sorbets* são produtos elaborados basicamente com polpas, sucos ou pedaços de frutas e açúcares, podendo ter adição de outros ingredientes alimentares. *Sorbets* são alimentos de baixa caloria principalmente devido ao fato de sua formulação não contar com adição de leite e de qualquer tipo de gordura (Goff, Hartel, 2013). O *sorbet*, além de ser um alimento refrescante, leve, adequado para pessoas que sofrem com alergias ou intolerância a lactose ou proteína do leite de vaca, são excelentes transportadores de prebióticos (Palka, Skotnicka, 2022, Marinho et al., 2019, Szydłowska, Kołożyn-Krajewska, 2019, Oliveira, Souza, Monteiro, 2008). Estudo realizado pelo Instituto Noa (2020) estima que 35% da população brasileira apresenta algum tipo de desconforto digestivo após o consumo de leite e seus derivados.

Os alimentos simbióticos são aqueles que promovem uma associação entre probióticos e prebióticos, apresentando diversos efeitos benéficos à saúde, podendo, por exemplo, ajudar no controle e tratamento de indivíduos com diabetes, restringindo a glicemia de jejum e no controle de outras doenças crônicas (Bock et al., 2021; Mofid et al., 2020), atuam também na prevenção e gestão da obesidade por meio da modulação da microbiota intestinal (Vallianou et al., 2020). Neste sentido este trabalho propõe o desenvolvimento de um *sorbet* simbiótico adicionado de partículas contendo inulina e *L.gasseri*.

Diante a tantos benefícios desses compostos bioativos, tem se estudado uma forma de protegê-los contra possíveis danos acarretados pelo armazenamento prolongado,

processamento dos alimentos em que são empregados e condições do trato gastrointestinal pois os benefícios para a saúde das culturas probióticas dependem de sua capacidade de sobreviver ao trânsito pelo trato gastrointestinal superior, colonização e crescimento no intestino do hospedeiro (Bhat et al., 2015). Para garantir que os probióticos sobrevivam à todas estas interpéries, pesquisadores têm estudado a encapsulação de uma extensa gama de probióticos e diversos outros bioativos obtendo resultados promissores em simulações *in vitro* (Gharibzahedi, Smith, 2021). Ademais, pesquisadores relatam que o coencapsulamento de mais de um composto bioativo fornece o efeito sinérgico com melhor bioatividade e funcionalidade do que quando isolados, o que vai de encontro ao alimento proposto neste trabalho que é enriquecido com partículas simbióticas (Misra, Pandey, Mishra, 2021).

A pesquisa do consumidor tem desempenhado um papel fundamental na indústria de alimentos e bebidas, desde para testes de produtos de laboratório para até serviços de testes corporativos, que usam uma extensa escola de análises e indicadores para aferir as respostas dos consumidores aos produtos e/ou conceitos (Moskowitz, Saguy, 2013). De acordo com Eynon, Fry e Schroeder (2008) a internet se tornou o “laboratório para as ciências sociais” o que justifica, em partes, a crescente na realização de pesquisas de mercado *online*. Embora pareça mais simples a aplicação da pesquisa *online*, esta deve ser realizada de forma equilibrada e que contenha perguntas com respostas éticas, devendo existir uma orientação moral para o desenvolvimento do estudo (Germain et al., 2017).

Buscando caracterizar possíveis consumidores de *sorbet* funcional e de alimentos funcionais ricos em probióticos e/ou prebióticos, bem como suas preferências de consumo, realizou-se uma pesquisa de mercado *online*. Identificando as preferências e motivações que os levam a adquirir e a consumir este tipo de alimento.

2 Material e Métodos

2.1 Realização da pesquisa

A abordagem utilizada para a pesquisa de mercado foi um questionário *online* elaborado na plataforma *Google Forms*, divulgado pelas redes sociais como *Facebook*, *WhatsApp*, *LinkedIn*, *Instagram* e listas de *e-mails*. A pesquisa foi amplamente divulgada por um período de 14 dias, iniciando no dia 23/02/2021 (terça-feira) as 14:30 h e encerrando no dia 08/03/2021 (segunda-feira) as 14:30 h. Para o levantamento dos dados utilizou-se uma

pesquisa descritiva direta e estruturada por meio de amostragem aleatória simples, através da aplicação de questionário *online*.

Todos os consumidores, ao clicarem no *link* que os direcionava para o questionário, tiveram acesso ao termo de consentimento livre e esclarecido, no qual foram esclarecidos que, ao apertarem o botão continuar, concordariam com sua participação na pesquisa. Neste termo foi informado que todas as respostas seriam anônimas e que caso desejassem interromper sua participação na pesquisa, poderiam fazê-la a qualquer instante sem que fossem penalizados (as) de forma alguma. Também foi disponibilizado um *link* para que pudessem ter acesso ao termo de consentimento livre e esclarecido assinado pela pesquisadora responsável.

O questionário constituído de 26 perguntas com tempo estimado para resposta de 10 min, foi apresentado em três sessões de perguntas denominadas como: “Um pouco sobre você”, “Sobre seus padrões de consumo” e “Intenção de compra”. A transcrição deste questionário está apresentada no Apêndice B.

As perguntas do primeiro grupo, “Um pouco sobre você”, buscaram caracterizar os participantes da pesquisa em relação à identidade de gênero, faixa etária, prática de atividades físicas, região em que habitavam, se possuíam filhos, presença de doença crônica pré-existente, grau de escolaridade, renda familiar mensal e quantas pessoas dependiam desta renda.

No segundo grupo de perguntas, “Sobre seus padrões de consumo”, buscou-se conhecer os participantes da pesquisa em relação à frequência de consumo de sorvetes, *sorbets* ou sobremesas congeladas, consumo de alimentos industrializados, gatilhos para compras, conhecimentos sobre produtos probióticos, prebióticos, simbióticos e os benefícios de seu consumo.

No terceiro e último grupo de perguntas, “Intenção de compra”, como o próprio título diz, buscou-se saber se estes voluntários seriam potenciais consumidores de *sorbet* funcional acrescido de microcápsulas de *L. gasseri* e extrato de folhas de alcachofra rico em inulina, um prebiótico natural. Os participantes da pesquisa também foram questionados em relação à preferência de sabor para o referido alimento, tamanho da porção que estariam dispostos a comprar e valor que estariam dispostos a pagar.

Ressalta-se que esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos (CEPH/FZEA/USP) no dia 19 de fevereiro de 2021 sob o número CAAE (Certificado de Apresentação de Apreciação Ética) 42925221.7.0000.5422.

2.2 Análise dos dados

Todos os dados obtidos foram tabulados em planilhas e as repostas analisadas em relação à frequência que selecionadas pelos voluntários participantes da pesquisa.

As respostas dadas pelos provadores à perguntas abertas foram agrupadas em categorias além de analisadas em relação à frequência em que foram citadas, foram apresentadas na forma de nuvens de palavras que foram contruídas com auxílio da plataforma gratuita de auxílio à educação *Mentimeter* que pode ser acessada no endereço <https://www.mentimeter.com>. As nuvens de palavras foram construídas a fim de facilitar a visualização deste resultado em vez que o tamanho em que as palavras aparecem na imagem são diretamente proporcionais à frequência em que foram citadas.

3 Resultados e Discussão

O formulário *online* que deu origem a este trabalho foi acessado por 339 indivíduos e, após a leitura do termo de consentimento livre e esclarecido, apenas 2 pessoas optaram por não continuar. Dos 337 voluntários que optaram por seguir participando da pesquisa, todos responderam a totalidade das perguntas, não havendo nenhuma abstenção, mesmo tendo sido informados de que isso poderia ser realizado sem qualquer ônus.

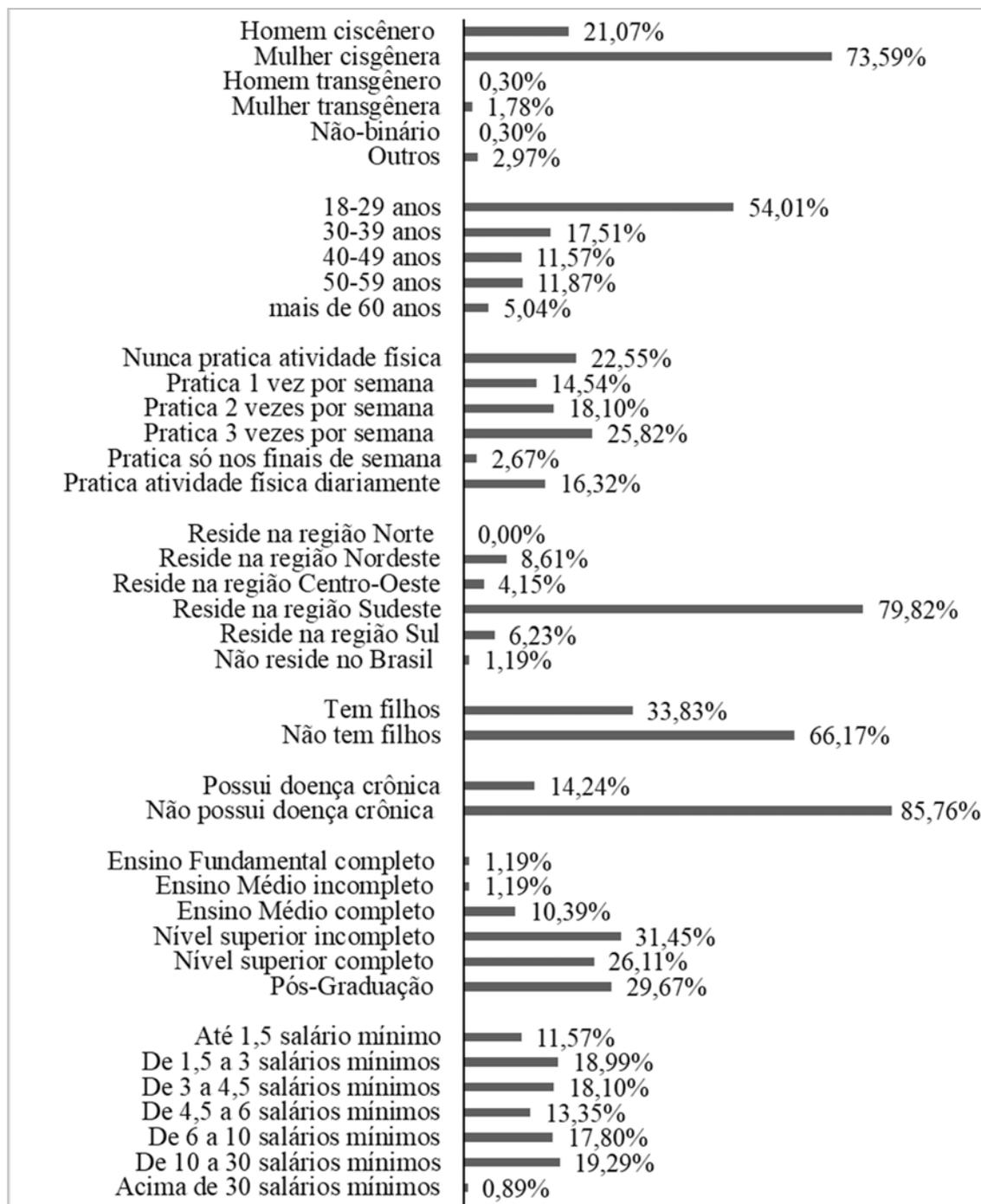
3.1 Características Demográficas

A Figura 1 apresenta os dados completos em relação às características demográficas dos participantes da pesquisa, expressos em porcentagem.

Com base na Figura 1 pode-se inferir que os participantes da pesquisa foram em sua maioria, mulheres cisgêneras, entre 18 e 29 anos, residentes na região sudeste brasileira, que não têm filhos, doenças crônicas ou restrições alimentares.

Em relação à prática e exercícios físicos, escolaridade, renda e divisão de residência não houveram respostas que se destacaram.

Figura 1. Características demográficas dos voluntários participantes da pesquisa *online*



(continua...)

(... continuação)



3.2 Hábitos de consumo

A primeira pergunta desta seção foi relacionada à frequência de consumo de sorvete, *sorbet* ou outras sobremesas congeladas, obtendo como resposta que 46,59% dos entrevistados consomem estes alimentos somente nos finais de semana, 29,08% relataram consumir apenas uma vez na semana e 9,50% reportaram não costumar consumir este tipo de alimento.

Em relação ao consumo de alimentos industrializados, 82,79% dos entrevistados relataram ter o hábito de consumir alimentos industrializados considerados saudáveis e 57,57% já comprou algum alimento apenas pelo fato de o rótulo alegar algum benefício à saúde. Na sequência o questionário apresentava uma pergunta aberta sobre quais foram os alimentos que eles já haviam comprado pelos benefícios à saúde alegados, sendo possível inserir quantas e quais palavras desejassem, e as respostas que mais apareceram foram iogurte (16,67%), barras de cereal, fibras castanhas e granola com 10,19% das respostas cada. A Figura 2 apresenta uma nuvem de palavras contendo todas as palavras que apareceram como resposta à esta pergunta. A proporção de tamanho entre as palavras na imagem é relativo ao número de vezes que foram citadas, ou seja, quanto maior a frequência de menção, maior o tamanho da palavra na representação.

Mais de oitenta por cento dos entrevistados (81,60%) afirmaram ter conhecimento sobre o que são alimentos probióticos e dos benefícios à saúde em decorrência do consumo destes alimentos, 90,80% afirmaram que comprariam algum produto por conter probióticos. Em relação ao conhecimento sobre alimentos prebióticos e dos benefícios de seu consumo, as

respostas afirmativas caíram para 62,31% e em relação ao conhecimento sobre alimentos simbióticos as respostas positivas foram de apenas 35,01%. No entanto, após serem apresentados às definições de alimentos prebióticos e de alimentos simbióticos bem como dos benefícios à saúde em decorrência do consumo destes alimentos, 87,83% dos voluntários sinalizaram que comprariam algum produto com alegação prebióticos e 59,35% comprariam alimentos simbióticos.

Figura 2. Nuvem de palavras citadas pelos voluntários quando perguntados sobre quais alimentos se lembravam ter comprado só pelo fato de o rótulo alegar benefícios a saúde



As nuvens de palavras apresentadas nas Figuras 3 e 4 apresentam, respectivamente, as palavras mencionadas pelos entrevistados em perguntas abertas sobre alimentos probióticos e prebióticos que estes já consumiram. Nestas respostas os participantes também poderiam citar quantas e quais palavras quisesse, não foram impostas limitações. Dentre os probióticos, os alimentos mais citados foram iogurte (20,77%) e leite fermentado (24,64%); dentre os prebióticos o mais citado foi aveia (9,35%), vários outros alimentos apresentaram frequência similar dentre eles, conforme pode ser observado na Figura 4.

Como as respostas para estas perguntas eram livres, a palavra “não” apareceu com bastante frequência, sendo a mais mencionada para ambas as perguntas (30,92% das respostas em relação aos alimentos probióticos já consumidos e 42,06% em relação aos alimentos prebióticos já consumidos) provavelmente indicando que não se lembravam de já terem consumido ou realmente nunca consumiram algum alimento pertencente a estas

categorias. A palavra “não” foi o único termo citado pelos entrevistados que não foi incluído nas nuvens de palavras das Figuras 3 e 4.

Figura 3. Nuvem de palavras contendo as palavras citadas pelos voluntários quando questionados sobre quais alimentos probióticos já haviam consumido.



Figura 4. Nuvem de palavras contendo as palavras citadas pelos voluntários quando questionados sobre quais alimentos prebióticos já haviam consumido.



Com base nas Figuras 3 e 4 podemos inferir que, apesar de uma menor fração de voluntários ter relatado conhecimento sobre alimentos prebióticos em relação àqueles que relataram ter conhecimento sobre alimentos probióticos, a variedade de alimentos prebióticos já consumidos pelos provadores foi superior em 250% à de alimentos probióticos.

A última pergunta desta seção foi “Você sabe o que é *sorbet*?” 59,35% das respostas foram afirmativas. Estes resultados sugerem que a população já está habituada ao consumo de sobremesas congeladas e de alimentos industrializados, além de estarem familiarizados com

os conceitos de alimentos pro e prebióticos e dos benefícios de seu consumo, o que diminui a barreira de entrada no mercado do alimentos simbiótico proposta nesta pesquisa.

3.3 Intenção de compra

Grande parte dos entrevistados (85,16%) afirmaram que comprariam um *sorbet* funcional acrescido de xilitol e microcápsulas de *L. gasseri* (probiótico) e extrato de folhas de alcachofra (rico em inulina, um prebiótico natural) e 91,39% assinalaram resposta indicando que o fato de saber que este *sorbet* tem compostos naturais que podem promover benefícios à saúde faria com que escolhessem este *sorbet* em detrimento dos tradicionais.

Ao serem informados de que os compostos promotores de saúde adicionados possivelmente não irão interferir no sabor do *sorbet* e indagados sobre qual sabor favoreceria sua compra, morango foi o que obteve o maior número de votos (28,96%), seguido por açaí (18,21%), abacaxi (17,19%), limão (16,40%) e uva (11,99%), sendo kiwi (7,24%) o sabor que obteve a menor porcentagem dos votos. Nesta pergunta, os voluntários poderiam selecionar mais de um sabor e com isso obteve-se uma média de 2,62 votos por pessoa.

Cerca de dois terços dos voluntários demonstraram maior interesse em encontrar esse produto em porções individuais (150 mL) em detrimento de porções de 1,5 ou 2 litros, estando disposto a pagar entre R\$ 3,60 e R\$ 4,50 por unidade individual e entre R\$ 20,00 e R\$ 29,00 por embalagens de 1,5 ou 2 litros.

Nesta seção também havia uma pergunta em relação a qual outro alimento os participantes desta pesquisa gostariam de encontrar em uma versão mais saudável, adicionada de probióticos e/ou prebióticos. Esta foi uma pergunta aberta, de resposta livre e o alimento mais citado foi sorvete (11,11%), seguido de sucos (9,26%) e iogurte (8,64%). Todas as palavras citadas em resposta a esta pergunta estão representadas na nuvem de palavras apresentada na Figura 5, quanto maior o tamanho da palavra representada, maior o número de vezes em que foi citada.

Nota-se na Figura 5 que muitas das palavras citadas referem-se a doces e sobremesas, totalizando 37,65% das respostas, classe essa em que o *sorbet* está inserido, a segunda classe de produtos mais citada na somatória foram os derivados de leite com 19,14%. Além disso, foram citadas palavras que não remetem a alimentos como “não sei”, “nenhum”, “probiótico”

benefícios de seu consumo, sendo maior entre aqueles que afirmaram praticar exercício físico diariamente.

Mais de 87% dos participantes da pesquisa alegaram possuir ensino superior completo ou incompleto e destes, cerca de um terço alegou ter pós-graduação. Este grau de escolarização não condiz com a média brasileira em que, de acordo com dados reportados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, apenas 21,4% dos brasileiros possuem nível de instrução de ensino superior completo ou incompleto (Brasil, 2019). Este recorte populacional não intencional pode ter feito com que os resultados não representassem a população brasileira de forma geral. Ao analisar as respostas ao questionário buscando correlações envolvendo o grau de escolaridade, observou-se que dentre os participantes com maior grau de escolaridade, foi maior a porcentagem daqueles que alegaram já ter comprado algum alimento só pelo fato de o rótulo alegar benefícios à saúde. Observou-se também que, dentre aqueles com maior grau de escolaridade, houve uma maior porcentagem de respostas afirmativas em relação ao conhecimento sobre alimentos probióticos e dos benefícios de seu consumo e em relação à intenção de compra de produtos acrescidos de probióticos. No entanto, a mesma correlação não foi observada em relação às perguntas envolvendo alimentos prebióticos e simbióticos. Ademais, informa-se que não houve questionamento sobre a área de formação dos voluntários entrevistados.

Sendo assim, com base nos dados obtidos, infere-se que o público-alvo deste produto são mulheres em duas diferentes faixas etárias, entre 18 e 19 anos e entre 40 e 49 anos.

4 Conclusão

As respostas dadas pelos 337 voluntários que participaram da pesquisa em sua totalidade sugerem que o *sorbet* funcional com efeito simbiótico acrescido de xilitol, *L. gasseri* e extrato de folhas de alcachofra terá grande aceitação pelos consumidores pois, não possuirá em sua formulação ingredientes de origem animal ou que usualmente estão relacionados à alergia alimentar, além de os consumidores habitualmente já consumirem sobremesas congeladas e alimentos industrializados que promovam benefícios à saúde.

Ressalta-se que, quando os voluntários foram questionados, em pergunta aberta, sobre quais alimentos gostariam de encontrar em uma versão mais saudável, muitas das respostas referiram-se a doces e sobremesas ou a frutas, o que vai de encontro com o alimento proposto neste trabalho que é sobremesa congelada à base de fruta, de baixa caloria e promotor de

saúde. O que não exclui a necessidade de um teste de aceitação sensorial do produto após sua elaboração, pois nesse questionário assumiu-se que a adição das micropartículas simbióticas não alteraria a percepção sensorial do produto.

5 Referências

- BHAT, A. R. et al. Improving survival of probiotic bacteria using bacterial poly- γ -glutamic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 196, p. 24-31, 2015.
- BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. **Trends In Food Science & Technology**, v. 31, n. 2, p. 118-129, 2013.
- BRASIL^a. Portaria n° 398, de 30 de abril de 1999. Dispõe sobre diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Ministério da Saúde, Brasília, DF, 30 abr. 1999a. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1999/prt0398_30_04_1999.html. Acesso em: 07 jan. 2020.
- BRASIL^b. Portaria n° 379, de 26 de abril de 1999. Dispõe sobre a necessidade de fixação da identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer os Gelados Comestíveis, Preparados, Pós para o Preparo e Bases para Gelados Comestíveis. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Ministério da Saúde, Brasília, DF, 26 abr. 1999b. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1999/prt0379_26_04_1999.html. Acesso em: 15 nov. 2020.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Conheça o Brasil – População – Educação**. 2019. Disponível em < <https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/populacao/18317-educacao.html>>. Acesso em 07 jul. 2022.
- BOCK, P. M. *et al.* The effect of probiotics, prebiotics or synbiotics on metabolic outcomes in individuals with diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Diabetologia**, v. 64, n. 1, p. 26-41, 2021.
- DÍAZ, L. D.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; CÁMARA, M. An international regulatory review of food health-related claims in functional food products labeling. **Journal of Functional Foods**, v. 68, p. 103896, 2020.
- ELAMIN, K. *et al.* Calorimetric and relaxation properties of xylitol-water mixtures. **The Journal of Chemical Physics**, v. 136, n. 10, p. 104508, 2012.
- EYNON, R., FRY, J., SCHROEDER, R. The ethics of internet research. *In*: Hughes, J. (ed.) **SAGE Internet Research Methods**. London: Sage, 2008. p. 23-41. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=A6mHAWAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA279&dq=EYNON,+R.,+FRY,+J.,+SC>

HROEDER,+R.+The+ethics+of+internet+&ots=csZM0QvWNl&sig=eGMGlvqm7kZvaP34VQdiSI84aw#v=onepage&q=EYNON%2C%20R.%2C%20FRY%2C%20J.%2C%20SCHROEDER%2C%20R.%20The%20ethics%20of%20internet&f=false. Acesso em: 17 mar. 2021.

FADNES, L. T. et al. Estimating impact of food choices on life expectancy: A modeling study. **PLoS medicine**, v. 19, n. 2, p. e1003889, 2022.

Food and Agriculture Organization and World Health Organization Expert Consultation. (2001). **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. FAO/WHO.
<http://pc.ilele.hk/public/pdf/20190225/bd3689dfc2fd663bb36def1b672ce0a4.pdf>

FUJIWARA, S. *et al.* Establishment of orally-administered *Lactobacillus gasseri* SBT2055SR in the gastrointestinal tract of humans and its influence on intestinal microflora and metabolism. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 343-352, 2001.

GERMAIN, J. *et al.* Why Should We Use Online Research Methods? Four Doctoral Health Student Perspectives. **Qualitative Health Research**, v. 28, n. 10, p. 1650-1657, 2017.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; SMITH, B. Legume proteins are smart carriers to encapsulate hydrophilic and hydrophobic bioactive compounds and probiotic bacteria: a review. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 1250-1279, 2021.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R. et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Sci Technol Bull Funct Foods**, v. 7, n. 1, p. 1-19, 2010.

GOFF, H. D.; HARTEL, R. W. **Ice Cream**, 7th ed.; Springer: New York, NY, USA, 2013

GRANATO, D. et al. Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. **Annual review of food science and technology**, v. 11, p. 93-118, 2020.

HLALUKANA, N. et al. Enzymatic conversion of mannan-rich plant waste biomass into prebiotic mannoooligosaccharides. **Foods**, v. 10, n. 9, p. 2010, 2021.

KERRY, R. G. et al. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, n. 3, p. 927-939, 2018.

MAIA, M. C. et al. Sensory evaluation of ice creams prepared with xylitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 146-151, 2008.

MARINHO, J. F. U. et al. Evaluation of probiotic and synbiotic jussara *sorbets*. **Nutrition & Food Science**, 2019.

- MARTIROSYAN, D.; LAMPERT, T.; EKBLAD, M. Classification and regulation of functional food proposed by the Functional Food Center. **Functional Food Science**, v. 2, n. 2, p. 25-46, 2022.
- MISRA, S.; PANDEY, P.; MISHRA, H. N. Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, 2021.
- MOFID, V. *et al.* Therapeutic and Nutritional Effects of Synbiotic Yogurts in Children and Adults: a clinical review. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 3, p. 851-859, 2020.
- MORAIS, A. H. A. *et al.* Can Probiotics and Diet Promote Beneficial Immune Modulation and Purine Control in Coronavirus Infection? **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1737, 2020.
- MOSKOWITZ, H. R.; SAGUY, I. S. Reinventing the Role of Consumer Research in Today's Open Innovation Ecosystem. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 53, n. 7, p. 682-693, 2013.
- NAGPAL, R. *et al.* Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS microbiology letters**, v. 334, n. 1, p. 1-15, 2012.
- NOA, Instituto. **Intolerância à lactose atinge 35% dos brasileiros**. Disponível em: <https://www.institutonoa.org/single-post/2017/07/13/Intoler%C3%A2ncia-%C3%A0-lactose-atinge-35-dos-brasileiros>. Acesso em: 05 fev. 2020.
- O'DONNELL, K.; KEARSLEY, M. **Sweeteners and sugar alternatives in food technology**. 2 ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2012.
- OLIVEIRA, K. H.; SOUZA, J. A. R.; MONTEIRO, A. R. Caracterização reológica de sorvetes. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 3, p. 592-598, 2008.
- PALKA, A.; SKOTNICKA, M. The Health-Promoting and Sensory Properties of Tropical Fruit *Sorbets* with Inulin. **Molecules**, v. 27, n. 13, p. 4239, 2022.
- PENNER, R.; FEDORAK, R. N.; MADSEN, K. L. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. **Current opinion in pharmacology**, v. 5, n. 6, p. 596-603, 2005.
- RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food research international**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2010.
- SILVA, V. B.; AZEVEDO, L. C.; COELHO, E.M. Avaliação do comportamento de diferentes espessantes na elaboração de *sorbet* de vinho. *In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Alimentação: a árvore que sustenta a vida*, XXV, 2016, Gramado **Anais [...]**, Gramado: SBCTA Regional, 2016, 25. Disponível: <http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/files/25.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2020.

- SINGH, B. P.; BHUSHAN, B.; VIJ, S. Antioxidative, ACE inhibitory and antibacterial activities of soy milk fermented by indigenous strains of lactobacilli. **Legume Science**, v. 2, n. 4, p. e54, 2020.
- STRINGHETA, P. C. *et al.* Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 181-194, 2007.
- SUAREZ, J. E. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. **Nutrición Hospitalaria**, v. 28, p. 38-41, 2013. Disponível em: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112013000700009&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 18 mar. 2021.
- SZYDŁOWSKA, A.; KOŁOŻYN-KRAJEWSKA, D. Development of potentially probiotic and synbiotic pumpkin frozen desserts. **CyTA-Journal of Food**, v. 17, n. 1, p. 251-259, 2019.
- TAKAHASHI, H. *et al.* Monitoring and survival of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in the human intestinal tract. **Microbiology and immunology**, v. 50, n. 11, p. 867-870, 2006.
- VALLIANOU, N. *et al.* Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, Postbiotics, and Obesity: Current Evidence, Controversies, and Perspectives. **Current Obesity Reports**, v. 9, p. 179-192, 2020.
- WAN, X. *et al.* The physiological functions and pharmaceutical applications of inulin: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 246, n. 15, p. 116589, 2020.
- WONG, A. Y. T.; LAI, J. M. C.; CHAN, A. W. K. Regulations and protection for functional food products in the United States. **Journal Of Functional Foods**, v. 17, p. 540-551, 2015.



CAPÍTULO 7 Desenvolvimento e aceitação sensorial de sorbet funcional contendo micropartículas fitoterápicas



Resumo

Nas duas últimas décadas, com o advento e crescente das indústrias alimentícias e da alimentação rápida, o número de obesos no Brasil vem aumentando representando atualmente mais de um quarto da população adulta. Como a busca por alimentos hiperpalatáveis e prontos para consumo é crescente, pesquisas têm se intensificado em busca de desenvolver alimentos funcionais que atendam essa necessidade da população sem acarretar em danos para a saúde, pois sabe-se que a obesidade está relacionada a várias doenças comuns da população brasileira. Neste sentido, este trabalho buscou desenvolver um *sorbet* funcional de morango adoçado com xilitol de enriquecido com micropartículas contendo extrato de folhas de alcachofra que é um fitoterápico reportando como tendo vários benefícios à saúde, sendo, portanto, uma sobremesa saudável e benéfica para a saúde. Estudou-se a elaboração do *sorbet* com dois tipos de partículas lipídicas sólidas obtidas por tecnologia supercrítica e TPP-quitossomas obtidas por gelificação iônica. O *sorbet* obtido foi caracterizado por meio de análises físico-químicas, reológicas, microbiológicas e sensoriais. Realizou-se também ensaios de digestibilidade *in vitro*. A formulação do *sorbet* influenciou significativamente na composição centesimal, nas propriedades reológicas e na aceitação sensorial. Em relação à aceitação sensorial, em uma escala hedônica de 9 pontos, na qual 9 indica “gostei extremamente” e 1 “desgostei extremamente”, o *sorbet* adoçado com xilitol sem adição de partículas foi avaliado em média como “gostei muito” (8), entretanto quando enriquecido com as partículas funcionais, apenas cor e textura foram avaliados entre “gostei muito” e “gostei moderadamente” (7) enquanto os demais parâmetros foram avaliados em média como “desgostei ligeiramente” (4). Em uma escala de cinco pontos com extremos de 5 (certamente compraria) e 1 (certamente não compraria), a intenção de compra do *sorbet* adoçado com xilitol, mas sem adição de partículas funcionais foi de 4,82, no entanto, a intenção de compra caiu para 2,38 e 2,53 para os *sorbets* enriquecidos TPP-quitossomas e partículas lipídicas sólidas, respectivamente.

Palavras-chave: sobremesa gelada, morango, prebiótico, alcachofra, alimento promotor de saúde.

1 Introdução

Frutas e vegetais são alimentos são ricos em fitoquímicos que desempenham um papel protetor em várias doenças crônicas (Esparza et al, 2020; Jiménez-Moreno et al., 2020). No entanto, suas partes que geralmente não são consumidas e são consideradas subprodutos ou resíduos, como sementes, cascas e folhas também contêm muitos compostos bioativos (Pattnaik et al., 2021), como é o caso das folhas de alcachofra. Os compostos bioativos recuperados podem ser usados como ingredientes para fortificar produtos alimentícios, tornando-os funcionais (Norfezah, Hardacre, Brennan, 2011). De acordo com trabalho de revisão realizado por Salem e colaboradores (2015) os extratos de folhas de alcachofra apresentam diversos benefícios à saúde tais como efeitos hipoglicêmico, anticolesterolêmico, hepatoprotetor, antioxidante, anti-aterosclerótico, anti-HIV, coleréticoprebiótico e anti-inflamatório além de estar relacionado à prevenção de câncer e auxiliar na saúde cardiovascular e digestiva.

O Japão foi um dos primeiros países a regulamentar os suplementos alimentares, utilizando, em 1991, o termo FOSHU (Alimentos para Uso Específico para Saúde, do inglês *Foods for Specified Health Use*), originando posteriormente o conceito de alimento funcional (Santini et al., 2018). A indústria de alimentos funcionais é inovadora, caracterizada pelo crescimento dinâmico com lançamento contínuo de novos produtos (Topolska, Florkiewicz, Filipak-Florkiewicz, 2021).

A legislação brasileira, não define alimento funcional, mas sim alimentos contendo alegação de propriedade funcional e de saúde de modo a estabelecer as diretrizes para sua utilização. As diretrizes permitem alegações funcionais que estejam relacionadas com o papel fisiológico no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo, além de alegações sobre a manutenção geral da saúde e redução de risco de doenças. No entanto, não é permitida a declaração referente à cura ou prevenção de doenças. Desta forma, o alimento ou ingrediente defende possuir propriedades funcionais e/ou de saúde, além de funções básicas, devendo ser seguro para consumo sem a supervisão médica (Brasil, 1999b).

Durante o processamento e armazenamento dos alimentos funcionais, há um alto risco de degradação dos compostos bioativos ou de interações adversas entre estes compostos nutracêuticos e as substâncias presentes na matriz alimentar, que podem resultar em alterações relacionadas às propriedades sensoriais e vida de prateleira dos produtos alimentícios (Chen, Hu, 2020). Outro possível fator limitante do emprego de extratos bioativos de plantas, na

formulação de alimentos funcionais são possíveis sabor e cor marcantes que poderiam influenciar negativamente nas características finais do alimento. Visando proteger os compostos bioativos ou mascarar suas características sensoriais, a microencapsulação vem se mostrando uma alternativa viável (Ahmad, Zaidi, Ahmad, 2020; Rehman et al., 2019; Đorđević et al., 2015).

Diferentes tecnologias podem ser utilizadas para formação de micropartículas contendo ingredientes bioativos para incorporação em alimentos, dentre elas estão as micropartículas lipídicas sólidas e as TPP-chitossomas que foram escolhidas para serem utilizadas no desenvolvimento de alimento funcional neste estudo.

As partículas lipídicas sólidas utilizadas neste trabalho foram obtidas por tecnologia supercríticos por meio de um processo denominado PGSS (Partículas de Soluções Saturadas de Gás, do inglês *Particles from Gas Saturated Solutions*) no qual ocorre a saturação e fundição de lipídios com o CO₂ supercrítico, juntamente com o extrato bioativo, que se expande em sequência através de um bico aspersor (Klettenhammer et al., 2022; Aredo et al., 2021). Os lipídios utilizados foram cera de abelha e óleo de abacate que também estão associados à benefícios à saúde (Cervantes-Paz, Yahia, 2021; Fratini et al., 2016).

As TPP-quitossomas utilizadas neste trabalho foram obtidas gelificação iônica entre quitosana, tripolifosfato de sódio (TPP) e lipossomas contendo extrato de folhas de alcachofra. A quitosana é um biopolímero relacionado a diversos benefícios à saúde, dentre eles destaca-se sua propriedade mucoadesiva o que o torna ideal na formação de partículas contendo extrato perbiótico (Inanli et al., 2020; Singh, Mittal, Benjakul, 2021; Zhou et al., 2021).

Sorbet é uma sobremesa elaborada há mais de 3000 anos pelos chineses que vem ganhando notoriedade (Gris et al., 2004). Segundo a Consulta Pública nº 28 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Brasil, 2000), *sorbets* são produtos elaborados basicamente com polpas, sucos ou pedaços de frutas e açúcares, podendo ter adição de outros ingredientes alimentares. *Sorbet* possui textura próxima à textura de sorvetes, mas apresenta vantagens da não adição de gorduras em sua composição, presença de fibras naturais e nutrientes advindos das frutas utilizadas na preparação, baixa caloria e fácil digestão (Palka, Skotnicka, 2022, Sakawulan, Budi, Syamsir, 2014).

Pesquisas têm sido realizadas a fim de estudar as características e aceitação de sobremesas geladas com propriedades funcionais como, por exemplo, o trabalho realizado por Makouie e colaboradores (2021) em que os pesquisadores estudaram características físico-

químicas e sensoriais de sorvete incorporado com microcápsulas de óleo de semente de *Nigella sativa*, os resultados obtidos sugeriram que a incorporação de micropartículas bioativas ao sorvete melhorou as propriedades funcionais do alimento, aumentando a resistência ao derretimento, conteúdo mineral e atividade antioxidante e conteúdo fenólico sem prejuízo das características tecnológicas e sensoriais.

Sobremesas de baixa caloria como o *sorbet* e que possua ingredientes promotores de saúde devem ser desenvolvidos e seu consumo incentivado em detrimento de outras sobremesas e snacks, pois de acordo com relatório do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, mais de 25% dos adolescentes brasileiros entre 15 e 17 anos estão obesos ou com sobrepeso, dentre os adultos, acima de 20 anos, esse percentual sobe para quase 80%. Estes índices são preocupantes, pois estão relacionados comuns aos brasileiros também citadas no relatório como, por exemplo, hipertensão arterial, diabetes, doenças no coração e depressão (IBGE, 2019).

Com base na crescente busca por alimentos funcionais, que atendam aos padrões de consumo atuais, promovam benefícios à saúde e sejam de baixa caloria, este trabalho objetivou o desenvolvimento de *sorbet* funcional contendo partículas de extrato de folhas de alcachofra, um subproduto agrícola, formadas por tecnologias ambientalmente amigáveis.

2 Material e métodos

2.1 Processamento do sorbet

A formulação do *sorbet* utilizado neste trabalho foi baseada na formulação descrita na literatura e na legislação pertinente (Marshall e Arbuckle, 1996; Brasil, 1999a; Goff e Richard, 2013). Em testes preliminares foram testadas diferentes concentrações de edulcorante xilitol e de blend para *sorbet Multimix Ice* (Alibra, Campinas, BR) constituído de maltodextrina, emulsificante mono e diglicerídeos de ácidos graxos (INS 417) e estabilizantes, goma guar (INS 412) e goma alfarroba (INS 410).

O *sorbet* foi processado em uma sorveteira da linha Tramontina by Breville – Gelato Express (Tramontina, Barueri, BR), na funcionalidade de *sorbet* com temperaturas menores de -30 °C, por 2 h de processamento, contendo em sua formulação 40% de morango (L&J, Ribeirão Preto, Brasil), 15 % de xilitol (Lowçucar, Marialva, Brasil), 0,4 % de *Multmix Ice* e 44,60% de água filtrada.

Todos os ingredientes foram homogeneizados com o auxílio de um liquidificador e pasteurizados por 60 segundos a 80 °C sob agitação constante para que a temperatura fosse o mais uniforme possível em todo o produto. Após resfriamento rápido, a calda obtida foi armazenada sob refrigeração entre 4 e 5 °C por 16 horas para maturação e após esse período a calda foi congelada sob agitação constante na sorveteira até se transformar em *sorbet*. O *sorbet* foi armazenado em freezer à - 18 °C até o momento das análises físico-químicas e sensorial.

Esta foi a formulação base, o padrão para adição de partículas. As partículas foram adicionadas após a maturação, logo antes do início do processamento para que essas não sofressem nenhuma interferência devido a temperatura durante o processo de pasteurização e maturação. Quando adicionadas, foram homogeneizadas manualmente antes do processamento na sorveteira e caso houvesse necessidade foi homogeneizado novamente durante o processamento dentro da sorveteira, devido à diferença de densidade entre as partículas e a calda do *sorbet*.

Para as análises físico-químicas produziu-se também *sorbet* com sacarose em substituição ao xilitol, na proporção 1:1 (massa:massa) a fim de verificar se os diferentes edulcorantes influenciariam nos parâmetros analisados.

As micropartículas foram acrescentadas ao *sorbet* em proporções estabelecidas em testes preliminares de forma que uma porção de 150 g tivesse os teores de extrato de folhas de alcachofra próximo à ingestão diária recomendada pelo formulário de fitoterápicos da farmacopéia brasileira (Brasil, 2011). Adicionando-se, para cada 100 g de *sorbet*, 0,25 g de partículas lipídicas sólidas 0,07 g de TPP-quitossomas liofilizadas.

As partículas lipídicas sólidas utilizadas neste trabalho foram obtidas por PGSS, tendo como condições de processo 60 °C, 200 bar, 1250 rpm por 3 horas, utilizando a proporção 1:2:6 (extrato de folhas de alcachofra: óleo de abacate comercial: cera de abelha; m:m:m). De acordo com a metodologia descrita no item 2.2 do capítulo 4 desta tese.

As TPP-quitossomas (rede tridimensional estável formada pela interação entre lipossomas, tripolifosfato de sódio, quitosana e extrato de folhas de alcachofra) na proporção de 100% entre o extrato e a quitosana em base seca, foram produzidas de acordo com metodologia descrita no item 2.1 do capítulo 5 desta tese. Estudou-se a adição no *sorbet* dessas partículas em solução (da forma como são formadas) e também na forma liofilizada, para verificar se esses dois modos de aplicação das partículas acarretaria em diferenças físico-

químicas no alimento. A análise sensorial foi realizada apenas com as TPP-quitossomas liofilizadas, pois em testes preliminares observou-se menor alteração sensorial de sabor.

2.2 Caracterização físico-química, reológica e microbiológica

2.2.1 Composição centesimal

A composição centesimal do *sorbet* foi definida por metodologias descritas pela Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*) e pelo instituto Adolfo Lutz calculando-se a composição centesimal por via da determinação de sólidos totais (método 900.101 da AOAC), sólidos solúveis (adaptação do método 932.12 da AOAC e 315/IV do Adolfo Lutz), proteína bruta (método 970.22 da AOAC), cinzas (método 972.15 da AOAC), gorduras totais (metodologia 412/IV do Adolfo Lutz) e acidez titulável (adaptação do método 925.34 da AOAC e 311/IV (2008) e 13.6.2 (1985) do Adolfo Lutz) (AOAC, 2007; Pregnotatto, Pascuet, 1985; Zenebon, Pascuet, Tiglea, 2008).

2.2.2 Caracterização reológica

As curvas de fluxo (tensão de cisalhamento *versus* taxa de deformação) das formulações de *sorbet* com e sem micropartículas contendo extrato de folhas de alcachofra foram obtidas usando um reômetro rotacional AR 2000 (TA Instruments Co., New Castle, DE). Foram realizados testes preliminares usando duas geometrias diferentes placa lisa (60 mm, gap 1 μm) e placas paralelas rugosas (40 mm de diâmetro e gap 1 μm). A geometria que apresentou melhor repetibilidade dos resultados, foi a de placas paralelas rugosas, as quais foram usadas para as análises reológicas da calda do *sorbet* a 20 °C. Foram feitas rampas crescente e decrescente de taxa de deformação no intervalo de 0 a 200 s^{-1} , em modo logarítmico, e os valores de tensão de cisalhamento foram obtidos como resposta, conforme metodologia descrita em Okuro (2013).

Foi utilizado o *software* Rheology Advantage Data Analysis para modelar os pontos experimentais (tensão de cisalhamento, σ (Pa), *vs* taxa de deformação, $\dot{\gamma}$ (s^{-1})) obtidos para as diferentes formulações de *sorbet*. Os modelos Herschel-Bulkley (Equação 1) e Lei da Potência (Equação 2) foram usados para descrever o comportamento reológico das diferentes

formunulações. As propriedades reológicas desses modelos são a tensão de cisalhamento inicial (σ_0 , Pa), o índice de consistência (K, Pa.sⁿ) e o índice de comportamento de escoamento (n, adimensional).

$$\sigma = \sigma_0 + K \times \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

$$\sigma = K \times \dot{\gamma}^n \quad (2)$$

2.2.3 Teste de coloração

O teste de coloração foi realizado visualmente, a fim de averiguar se houve diferença de cor perceptível entre as amostras.

2.2.4 Análise microbiológica

Para a análise microbiológica de *Salmonella* e de *E. coli*, utilizou-se placas prontas *Compact Dry*[®] para identificação e contagem de microrganismos, seguindo metodologia descrita pelo fabricante.

2.3 **Digestibilidade *in vitro* e quantificação do teor de inulina**

A digestibilidade *in vitro* foi realizada seguindo metodologia descrita por Brodkorb et al. (2019). Em que 4,975 mL de fluido salivar simulado e 25 μ L de CaCl₂ foram adicionados a 5 g de amostra a 37 °C, após 2 minutos, adicionou-se 8 mL de suco gástrico simulado, 0,5 mL de solução de pepsina, 5 μ L de CaCl₂ (0,3 M), homogeneizou-se rapidamente a solução, ajustou-se o pH para 3 pela adição de HCl e incubou-se em B.O.D. por 2 horas sob agitação constante em temperatura entre 37,5 °C e 38 °C. Após o período adicionou-se NaOH para interromper a reação e ajustar o pH para 7. As alterações causadas na amostra a cada etapa da digestão simulada pode ser observada na Figura 1.

A fim de verificar se houve ruptura das partículas após a digestão simulada do *sorbet*, quantificou-se o teor de inulina na solução resultante da última etapa da digestibilidade *in*

canetas e bandejas foram assepsiadas com álcool 70% após cada uso, o demais itens utilizados foram de uso único.

Visando avaliar a aceitação sensorial do *sorbet* desenvolvido, a análise foi realizada em duas etapas, na primeira etapa cada provador recebeu as 3 amostras codificadas, foi orientado para que provasse as amostras da esquerda para a direita para garantir que a aleatorização na ordem de apresentação das amostras seria mantida e que entre cada amostra comesse um pedaço da bolacha de água e sal e tomasse um gole de água. Juntamente com as amostras a primeira ficha foi entregue. Após o preenchimento da primeira ficha os provadores foram orientados a avisar os pesquisadores por meio do acendimento de uma luz, neste momento a primeira ficha foi recolhida e a segunda entregue aos provadores (ambas as fichas estão apresentadas no apêndice C).

A primeira ficha contava de três seções, na primeira, com base em uma escala hedônica de nove pontos com os termos variando de 1 – desgostei extremamente a 9 – gostei extremamente, os provadores foram orientados a avaliar as amostras de *sorbet* de modo geral, e em relação a sabor, cor, textura e sabor residual. Na segunda, haviam duas perguntas de resposta livre sobre o que os provadores mais gostaram e menos gostaram nas amostras. Na terceira e última parte, com base em uma escala hedônica de 5 pontos com termos variando de 1 – certamente não compraria a 5 – certamente compraria, foi pedido para que os provadores manifestassem sua atitude caso encontrasse cada uma das amostras à venda.

Na segunda ficha, havia um breve texto indicando os possíveis benefícios do consumo do *sorbet* desenvolvido neste trabalho e na sequência foi pedido que novamente indicassem sua reação ao encontrarem à venda este *sorbet* de morango com base na mesma escala hedônica de 5 pontos. O preparo, apresentações, montagens e condições gerais da análise sensorial foram feitas com base na metodologia descrita por Almeida (2006).

2.5 Análise Estatística

2.5.1 Análise das notas das amostras através de ANOVA.

Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), a fim de comparar se haviam diferenças significativas entre as amostras. Em caso de diferença significativa, realizou-se teste de Tukey.

Todas as figuras resultantes da análise estatística dos dados da análise sensorial foram feitas com auxílio do *software* de acesso aberto Rstudio, versão 4.1.2. Análise de Componente

Principal com base em todos os dados obtidos na análise sensorial (modo geral, sabor, cor, textura, sabor residual, intenção de compra 1 e 2) também foi realizada com auxílio deste *software*.

As respostas dadas pelos provadores às perguntas abertas foram agrupadas em categorias, analisadas em relação à frequência em que foram citadas e apresentadas na forma de nuvens de palavras que foram contruídas com auxílio da plataforma gratuita de auxílio à educação *Mentimeter* que pode ser acessada no endereço <https://www.mentimeter.com>. As nuvens de palavras foram construídas a fim de facilitar a visualização deste resultado em vez que o tamanho em que as palavras aparecem na imagem são diretamente proporcionais à frequência em que foram citadas.

3 Resultados e discussão

3.1 Caracterização físico-química do sorbet

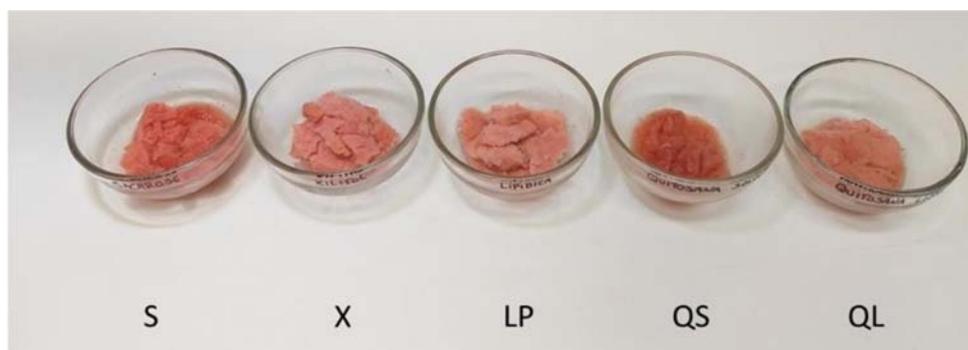
3.1.1 Características visíveis

Sorbets, embora macios possuem baixo *overrun* (aumento de volume acarretado pela incorporação de ar no alimento). Especificamente para as formulações elaboradas nesta pesquisa, não foi possível fazer a determinação desta propriedade física.

A massa de *sorbet* após o processamento apresentou-se muito firme, não sendo possível calcular o volume ocupado pela massa após seu congelamento pois não foi executável preencher de forma uniforme e sem espaços vazios o recipiente usado para a medida do *overrun* e os espaçamentos de ar impediram uma medida precisa. Para realizar a uma medição exata seria necessário que o produto derretesse o que ocasionaria a perda da incorporação de ar pela massa, ocorrida durante o processamento, gerando dados incorretos.

A coloração das amostras foi comparada visualmente (Figura 2). A amostra com TPP-quitossomas em solução (QS) apresentou coloração mais forte, vermelho mais intenso, quando comparado com as demais, seguida pela amostra de *sorbet* que continha sacarose na sua formulação (S). As demais partículas apresentaram coloração rosada, sendo que formulação com xilitol e sem partículas (X) de uma rosa um pouco mais intenso e a formulação com partículas lipídicas sólidas (LP) apresentou coloração rosada com um fundo amarelado.

Figura 2. Comparação de coloração entre as formulações de *sorbet*.



(S) *sorbet* com sacarose; (X) *sorbet* com xilitol; (LP) *sorbet* com xilitol e adição de partículas lipídicas; (QS) *sorbet* com xilitol e adição de TPP-quitossomas em solução; (QL) *sorbet* com xilitol e adição de TPP-quitossomas liofilizadas.

3.1.2 Composição centesimal

Os resultados da caracterização centesimal das diferentes formulações de *sorbet* estão apresentados na (Tabela 1), esta caracterização foi realizada também com a fruta batida com água, na mesma proporção utilizada na produção do *sorbet* a fim de verificar a influências de todos os ingredientes utilizados na formulação.

Com base na ANOVA, podemos inferir que pelo menos uma variável de processo interferiu na composição centesimal, pois para todos os parâmetros analisados $F_{\text{calculado}}$ é maior que F_{tabelado} , o que foi confirmado pelo teste de médias de Tukey.

Tabela 1. Resultados de análises da composição centesimal

Amostra	Sólidos Totais (g/100g)	Sólidos Solúveis (°Brix)	Proteína (g/100g)	Cinzas (g/100g)	Gorduras (g/100g)	Acidez titulável (g/100g) (m/m)
F	27,63±0,76 ^a	4,31±0,12 ^b	—	—	—	0,003±2*10 ⁻⁴ ^a
S	21,74±0,59 ^b	21,19±0,80 ^a	0,39±7.10 ⁻³ ^b	0,10±0,01 ^a	0,32±0,02 ^{b,c}	0,003±4*10 ⁻⁵ ^a
X	22,27±0,21 ^b	20,12±0,72 ^a	0,49±0,01 ^a	0,12±0,02 ^a	0,30±0,03 ^{b,c}	0,003±2*10 ⁻⁴ ^a
LP	27,20±0,94 ^a	18,92±0,14 ^a	0,30±0,00 ^c	0,12±0,00 ^a	0,57±0,12 ^a	0,003±2*10 ⁻⁴ ^a
QS	27,26±0,53 ^a	20,54±1,98 ^a	0,31±0,01 ^c	0,14±0,00 ^a	0,36±0,05 ^b	0,002±6*10 ⁻⁴ ^b
QL	26,97±0,29 ^a	20,42±0,72 ^a	0,31±0,02 ^c	0,14±0,01 ^a	0,26±0,05 ^c	0,002±3*10 ⁻⁴ ^b

(F) água e fruta; (S) *sorbet* com sacarose; (X) *sorbet* com xilitol; (LP) *sorbet* com xilitol e adição de partículas lipídicas; (QS) *sorbet* com xilitol e TPP-quitossomas em solução; (QL) *sorbet* com xilitol e TPP-quitossomas liofilizadas.

* Parâmetros seguidos por letras iguais na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância.

Analisando os resultados obtidos para teor de gordura, pode-se notar que LP apresenta um teor de estatisticamente maior que as demais amostras, o que já era esperado devido à adição de partículas lipídicas em sua formulação. De acordo com a ANVISA, produtos com até 0,5 g de gorduras totais/ 100 g de alimento pode ser caracterizado um alimento que não contém gordura, dessa forma, todas as formulações, exceto a lipídica, possuíam valores inferiores ao estipulado podendo ser denominados produtos que não contém gordura. Apesar de LP não poder ser considerado um alimento livre de gordura, pode ser considerado um alimento com baixo teor de gordura, uma vez que possui quantidade inferior a 3 g/100 g de produto conforme estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 1998).

Tabela 2. ANOVA para os resultados da composição centesimal

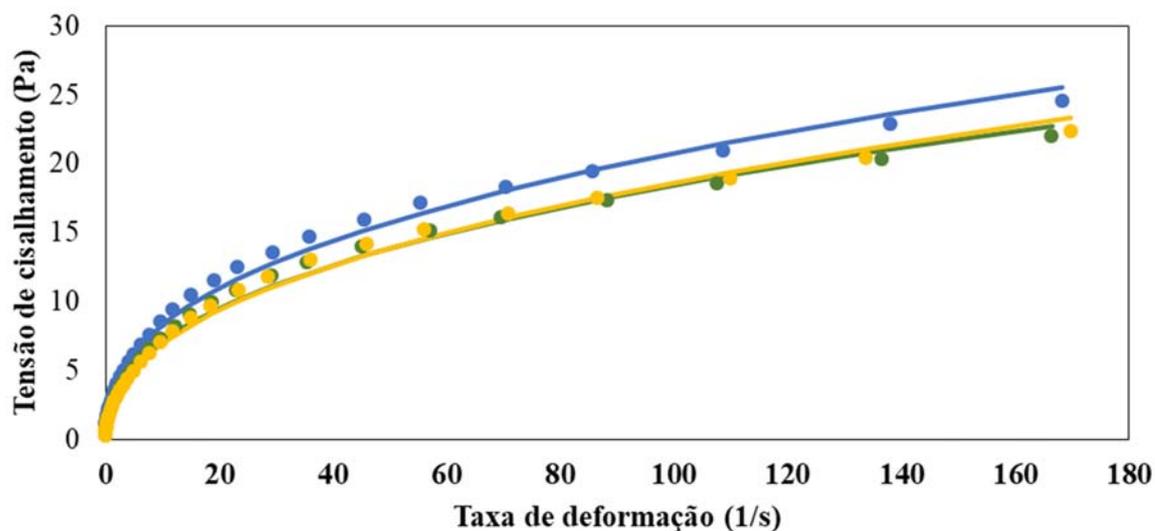
Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}	F _{tabelado}	p
Sólidos Totais						
Amostra	123,58	5	24,71			
Resíduos	2,91	12	0,24	101,80	3,10	2,1e ⁻⁹
Total	126,49	17				
Sólidos Solúveis						
Amostra	631,89	5	126,38			
Resíduos	11,08	12	0,92	136,83	3,10	3,8e ⁻¹⁰
Total	642,97	17				
Proteína						
Amostra	0,05	4	0,013			
Resíduos	9,5.10 ⁻⁴	5	1,9.10 ⁻⁴	67,45	5,19	1,5.10 ⁻⁴
Total	0,05	9				
Cinzas						
Amostra	2,2.10 ⁻³	4	5,5.10 ⁻⁴			
Resíduos	8,5.10 ⁻⁴	5	1,7.10 ⁻⁴	3,23	5,19	0,11
Total	3,0.10 ⁻³	9				
Gordura						
Amostra	0,12	4	0,03			
Resíduos	0,01	10	1,0.10 ⁻³	31,19	3,48	1,3e ⁻⁵
Total	0,13	14				
Acidez titulável						
Amostra	2,3e ⁻⁶	5	4,6e ⁻⁷			
Resíduos	1,8e ⁻⁶	18	9,7e ⁻⁸	4,72	2,77	6,3.10 ⁻³
Total	4e ⁻⁶	23				

F_{calculado} maior que o F_{tabelado} ao nível de 95% de confiança.

3.1.3 Caracterização reológica

Exemplos de curvas de fluxo obtidas para as formulações de *sorbet* X, LP e S são apresentadas na Figura 3. O comportamento reológico para todas as amostras de *sorbet* é do tipo Não Newtoniano, pois a relação entre a tensão de cisalhamento e taxa de deformação é não linear. Os modelos Herschel-Bulkley e Lei da Potência foram ajustados aos pontos experimentais obtidos na rampa 2 (rampa decrescente de taxa de deformação) para as três formulações de *sorbet*. Os valores de tensão de cisalhamento inicial (σ_0), calculados usando o modelo Herschel-Bulkley, foram negativos. Então, esse modelo não pode ser usado para descrever o comportamento reológico dessas amostras, pois valores tensão de cisalhamento inicial negativos não têm sentido físico.

Figura 3. Curva de fluxo para as formulações X, LP e S de *sorbet* obtidas a 20 °C.



*Os pontos representam os dados experimentais e a linha contínua o ajuste do modelo Lei da Potência.

** Amostra S (com sacarose, azul), amostra X (com xilitol, verde) e amostra LP (com xilitol e partículas lipídicas sólidas, amarela).

Na Figura 3, pode-se observar linhas contínuas que correspondem ao modelo Lei da Potência ajustados aos pontos experimentais ($R^2 \sim 0,99$) para descrever o comportamento reológico das três formulações de *sorbet*. As propriedades reológicas das amostras calculadas por esse modelo (Equação 2) são apresentadas na Tabela 3. O valor do índice de

comportamento de escoamento foi de aproximadamente 0,40 (Tabela 3), o que caracteriza o comportamento de Fluido Não Newtoniano do tipo pseudoplástico. O índice de consistência para a amostra S ($3,37 \text{ Pa.s}^n$) foi maior quando comparada à formulação de *sorbet* contendo partículas lipídicas sólidas ($2,65 \text{ Pa.s}^n$). Pela análise do teste de Tukey com 95 % de significância (Tabela 3), foi possível verificar que não houve diferença significativa entre os valores de n para todas as amostras.

Tabela 3. Propriedades reológicas das formulações de *sorbet*, utilizando sacarose (S), xilitol (X), xilitol e micropartículas de alcachofra (LP).

	S	X	LP
Índice de consistência (Pa.s^n)	$3,37 \pm 0,56^a$	$2,93 \pm 0,27^{ab}$	$2,65 \pm 0,19^b$
Índice de comportamento de escoamento	$0,40 \pm 8,9 \cdot 10^{-3}^a$	$0,40 \pm 0,01^a$	$0,42 \pm 7,6 \cdot 10^{-3}^a$
R^2	0,99	0,99	0,99

(S) *sorbet* com sacarose; (X) *sorbet* com xilitol; (LP) *sorbet* com xilitol e adição de partículas lipídicas.

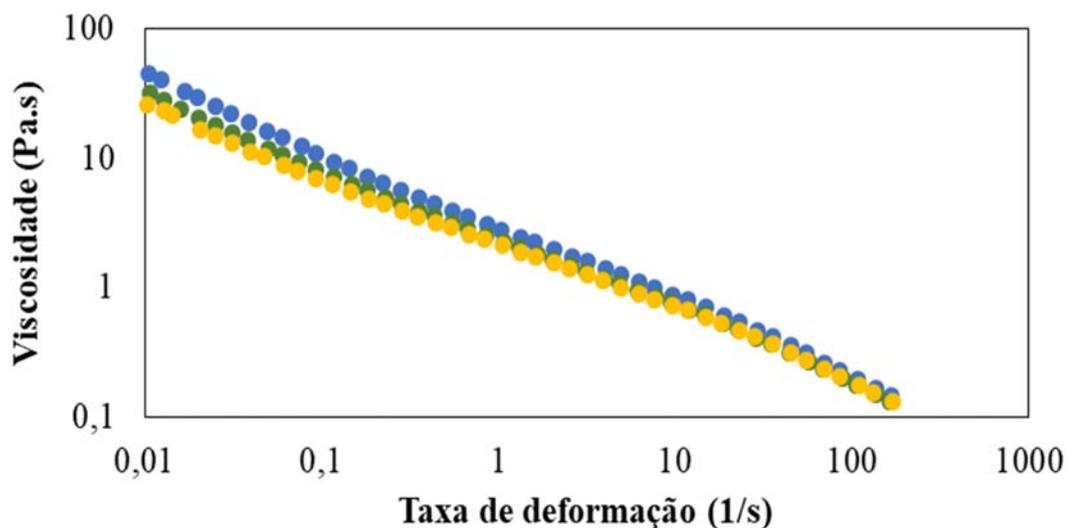
* Parâmetros seguidos por letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância.

O comportamento reológico de *sorbet* de limão tradicional (TLS) e o *sorbet* de limão de amaranço (ALS) foi determinado por Malgor, Sabbione e Scilingo (2020), a 20°C . Para essas formulações de *sorbet*, o modelo com maior coeficiente de correlação ($R^2 > 0,99$) usado para ajustar os dados experimentais de tensão de cisalhamento e a taxa de deformação foi o modelo Herschel-Buckley. Essas formulações apresentaram valores de viscosidade (Pa.s) em torno de $0,11 \pm 0,02$ para TLS e $0,42 \pm 0,07$ para ALS. Comportamento diferente do apresentado pelas formulações de *sorbet* de morango estudadas neste trabalho. A diferença dos modelos utilizados entre o *sorbet* de limão e o de morango elaborado neste experimento pode estar associado à composição, pois, no estudo realizado por Malgor, Sabbione e Scilingo além de usar suco de limão, açúcar e água, adicionou-se clara de ovo e o amido de milho no TLS, e isolado de proteína e amido de milho no ALS, sendo que esses ingredientes podem ter acarretado na redução da viscosidade do *sorbet* de limão. As formulações dos *sorbets* de morango foram elaboradas com um mix de emulsificante e estabilizante diferente, o que ocasiona outro comportamento reológico diferente.

Exemplos do comportamento da viscosidade aparente em função da taxa de deformação são mostrados na Figura 4. Todas as amostras apresentaram redução da viscosidade com o aumento da taxa de deformação, característica esperada para fluidos Não

Newtonianos pseudoplásticos, sendo que a presença de partículas lipídicas sólidas não alterou a pseudoplasticidade do *sorbet*, pois não houve diferença significativa entre os valores de n (Tabela 3) (Silva, Silva, Pinto, 2019). De maneira geral, os valores de viscosidade aparente foram maiores para a amostra X, sugerindo que o modo como o *sorbet* foi adoçado promoveu maior diferença na viscosidade entre as formulações do que a presença das partículas lipídicas sólidas.

Figura 4. Curvas de viscosidade aparente em função da taxa de deformação para as diferentes amostras de *sorbet*.



* Amostra S (com sacarose, azul), amostra X (com xilitol, verde) e amostra LP (com xilitol e partículas lipídicas sólidas, amarela).

Chang e Hartel (2002), afirmam que uma alta viscosidade é fundamental para a elaboração dos gelados comestíveis, entretanto para o congelamento rápido, quando se utiliza equipamentos modernos, uma viscosidade mais baixa é desejável. No entanto, é essencial que o produto tenha um certo nível de viscosidade para que haja uma boa retenção de ar, corpo e textura do alimento.

3.2 Digestibilidade *in vitro* e quantificação do teor de inulina

O extrato de alcachofra é rico em inulina e por isto, este componente foi escolhido como demarcador do rompimento das partículas e consequente liberação do extrato durante a digestibilidade simulada *in vitro* dos *sorbets*. Os resultados da quantificação de inulina nas

formulações LP, QS e QL antes da digestão e na solução resultante da etapa final da digestão estão apresentados na Tabela 4.

Cada porção de 150 g de *sorbet* continha 5,04 mg de inulina, que corresponde a 0,0336 mg de inulina por grama de *sorbet*. Ao analisar a Tabela 4, verifica-se que após a digestão simulada na fase oral e gástrica os valores de inulina foram superiores a quantidade adicionada no *sorbet*, isto pode ter acontecido devido a presença de algum outro composto que interferiu na quantificação de inulina ao realizar a análise.

Considerando o teor de inulina no *sorbet* antes e após a digestão simulada para as fases oral e gástrica, constatou-se um aumento não significativo desta substância na solução. Esse comportamento mostra que as partículas, durante a digestibilidade *in vitro*, liberaram a inulina, indicando possivelmente que as partículas estudadas provavelmente não resistiram à passagem pelo trato gástrico simulado. No caso de QL que foi a formulação que apresentou maior teor de inulina inicial, parte das partículas podem ter rompido durante o processo de liofilização deixando um pouco de extrato exposto na superfície das partículas, no entanto ao mesmo tempo pode ter tornado as partículas mais resistentes ao processo de digestão estomacal quando comparada com as partículas em solução. Além disso, não houve diferença significativa quando aplicado o Teste de Tukey ao nível de 95 % de significância em nenhuma amostra quando comparada antes e depois da simulação na fase oral e gástrica.

Outra possibilidade para os elevados valores mensurados tanto antes quanto após a digestão simulada é o fato de que o indicador utilizado talvez não tenha sido a melhor escolha, pois a metodologia de quantificação de inulina envolve altas temperatura e adição de ácido sulfúrico, que podem ter destruído as partículas e liberado a inulina.

Tabela 4. Resultados da quantificação de inulina.

Sorbet	Antes da digestão (mg inulina/ g sorbet)	Após a digestão simulada nas fases oral e gástrica (mg inulina/ g sorbet)
LP	0,02±0,00 ^a	0,04±0,01 ^a
QS	0,02±0,00 ^a	0,06±0,01 ^a
QL	0,03±0,01 ^a	0,04±0,00 ^a

(LP) *sorbet* com xilitol e partículas lipídicas; (QS) *sorbet* com xilitol e TPP-quitossomas em solução; (QL) *sorbet* xilitol e TPP-quitossomas liofilizadas.

Parâmetros seguidos por letras iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância.

3.3 Análise microbiológica

A fim de avaliar a segurança alimentar dos provadores, os testes de *Salmonella* e de *E. coli*, indicaram que os *sorbets* de morango elaborados com diferentes formulações apresentaram resultados dentro da legislação brasileira. Pois, de acordo com a Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, estabelece que para gelados comestíveis sem leite, *Salmonella* deve ser ausente em 25 g (Brasil, 2019). Como não foi observado crescimento microbiológico em nenhum dos testes realizados o produto estava apto para o consumo.

3.4 Análise sensorial

A análise sensorial de *sorbet* de morango funcional contou com a presença de 125 provadores voluntários, um número bastante expressivo visto o momento em que esta análise foi realizada e o fato de que as aulas presenciais no campus estavam suspensas.

A análise de variância das respostas dadas pelos provadores, com base nas escalas hedônicas, em relação à avaliação da amostra de modo geral, sabor, cor, textura, sabor residual, intenção de compra 1 (logo após degustarem o *sorbet* e antes de serem informados dos possíveis benefícios à saúde em decorrência do consumo deste alimento) e intenção de compra 2 (resposta dada na segunda ficha, após serem informados dos possíveis benefícios à saúde em decorrência do consumo deste alimento). Verificou-se que todos os valores de $F_{\text{calculado}}$ foram superiores ao F_{tabelado} , indicando diferença significativa entre pelo menos uma das diferentes formulações de *sorbet* de morango para os atributos analisados.

Ao verificar que houve diferenças entre pelo menos duas amostras realizou-se o teste de média de Tukey (Tabela 6). Os resultados indicaram que quase todos os atributos apresentaram diferença significativa entre a formulação de *sorbet* de morango com xilitol sem adição de partículas (X) e aquelas com adição de partículas (QL e LP), sendo que para estes parâmetros não houve diferença significativa entre QL e LP. A cor das amostras foi o único parâmetro em que LP diferiu estatisticamente das demais amostras e não houve diferença significativa entre X e QL ao nível de confiança de 95%.

Tabela 5. ANOVA para os resultados da análise sensorial.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}	F _{tabelado}	p
Modo geral						
Amostra	1006	2	503,0			
Resíduos	1058	372	2,8	176,9	2,99	2e ⁻¹⁶
Total	2064	374				
Sabor						
Amostra	1422	2	710,8			
Resíduos	1134	372	3,0	233,2	2,99	2e ⁻¹⁶
Total	2556	374				
Cor						
Amostra	33,2	2	16,59			
Resíduos	513,8	372	1,38	12,01	2,99	8,79e ⁻⁶
Total	547	374				
Textura						
Amostra	50,4	2	25,22			
Resíduos	777,0	372	2,09	12,07	2,99	8,3e ⁻⁶
Total	827,4	374				
Sabor residual						
Amostra	1467	2	733,5			
Resíduos	1331	372	3,6	205,1	2,99	2e ⁻¹⁶
Total	2798	374				
Intenção de compra 1						
Amostra	588,2	2	294,10			
Resíduos	385,4	372	1,04	283,9	2,99	2e ⁻¹⁶
Total	973,6	374				
Intenção de compra 2						
Amostra	470,3	2	235,2			
Resíduos	408,6	372	1,1	214,1	2,99	2e ⁻¹⁶
Total	878,9	374				

F_{calculado} maior que o F_{tabelado} ao nível de 95% de confiança.

Tabela 6. Teste de aceitação do consumidor dos *sorbets* de morango elaborados com xilitol, sem e com partículas de extrato de alcachofra.

	Modo geral	Sabor	Cor	Textura	Sabor Residual
X	8,22 ± 0,81 ^a	8,22 ± 0,96 ^a	8,18 ± 1,00 ^a	8,05 ± 1,45 ^a	7,85 ± 1,45 ^a
QL	4,63 ± 2,00 ^b	3,93 ± 1,99 ^b	7,84 ± 1,10 ^a	7,24 ± 1,59 ^b	3,51 ± 2,05 ^b
LP	4,88 ± 1,97 ^b	4,26 ± 2,06 ^b	7,45 ± 1,39 ^b	7,30 ± 1,54 ^b	3,81 ± 2,10 ^b

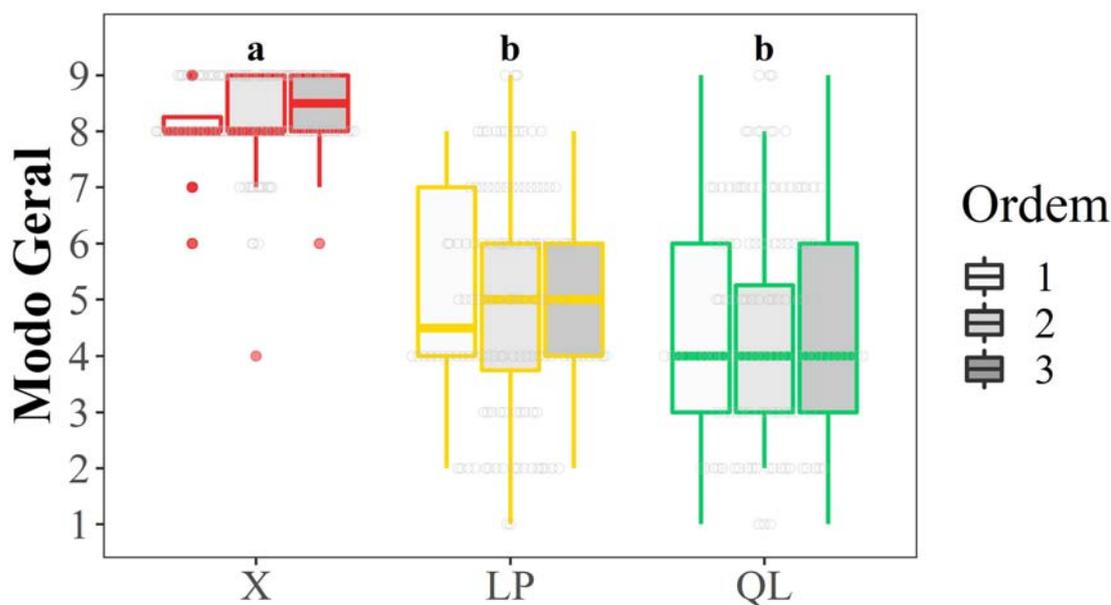
(X) *sorbet* com xilitol; (LP) *sorbet* com xilitol e adição de partículas lipídicas; (QL) *sorbet* com xilitol e TPP-quitossomas liofilizadas.

* Parâmetros seguidos por letras iguais na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância.

A fim verificar a distribuição de notas para cada parâmetro avaliado e verificar se a ordem de apresentação das amostras influenciou da avaliação do *sorbet*, contruiu-se histogramas (Figuras 5, 6 e 7).

No histograma apresentado na Figura 5 observa-se que quando X foi apresentado na primeira posição na bandeja entregue aos provadores, ele foi avaliado majoritariamente como “gostei muito” e quando foi apresentado nas posições 2 e 3 as avaliação tenderam a ser mais favoráveis, variando entre “gostei muito” e “gostei extremamente”, para as demais amostras a ordem de apresentação não influenciou na avaliação nos *sorbets* de modo geral.

Figura 5. Histograma gerado pela avaliação de modo geral dos *sorbets*, de acordo com a nota dada pelos 125 provadores voluntários



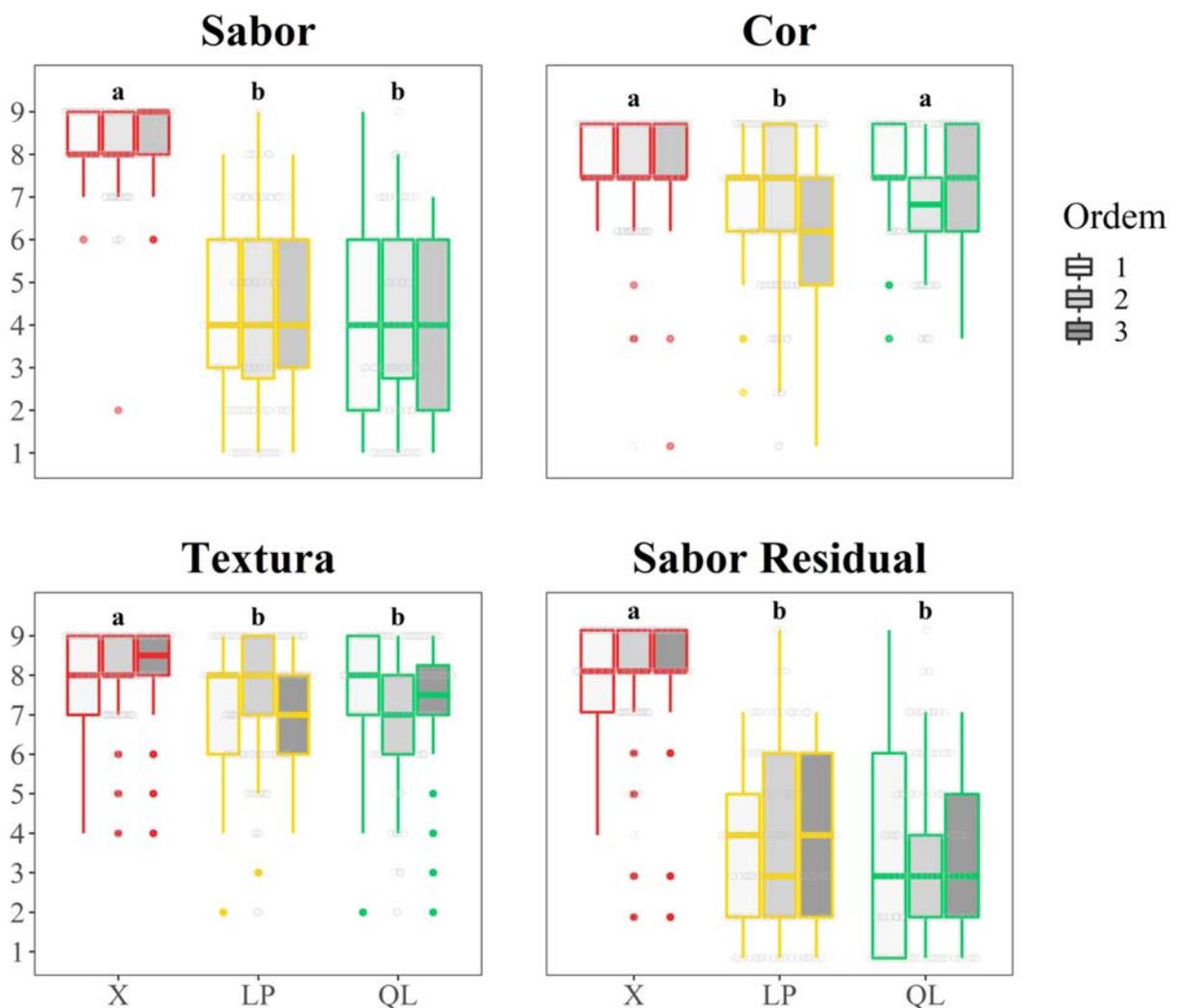
(X) *sorbet* com xilitol; (LP) *sorbet* com xilitol e adição de partículas lipídicas; (QL) *sorbet* com xilitol e TPP-quitossomas liofilizadas.

Em nenhum caso apresentado na Figura 6 houve diferença significativa entre as notas que cada amostra recebeu em relação à ordem em que ela foi entregue aos provadores. Observa-se que as notas de sabor, textura e sabor residual de X apresentaram-se significativamente maiores ($p > 0,05$) que as notas de LP e QL. Em relação à cor, as notas de LP foram significativamente menores ($p > 0,05$) que X e QL.

Analisando os histogramas que se referem à avaliação sensorial do sabor e sabor residual (Figura 6) observa-se uma ampla dispersão das notas recebidas por LP e QL. Variando majoritariamente, em relação ao sabor entre “desgostei moderadamente” e “gostei ligeiramente” para LP e entre “desgostei muito” e “gostei ligeiramente” para QL. Enquanto para X as notas foram menos esparsas, ficando entre “gostei muito” e “gostei extremamente”. Em relação ao sabor residual a variação majoritária das respostas para QL foi ainda maior, variando entre “desgostei extremamente” e “gostei ligeiramente”.

Em relação à cor e à textura, todas as três amostras receberam avaliações majoritariamente favoráveis.

Figura 6. Histograma gerado pela avaliação de sabor, cor, textura e sabor residual dos sorbets, de acordo com a nota dada pelos 125 provadores voluntários.

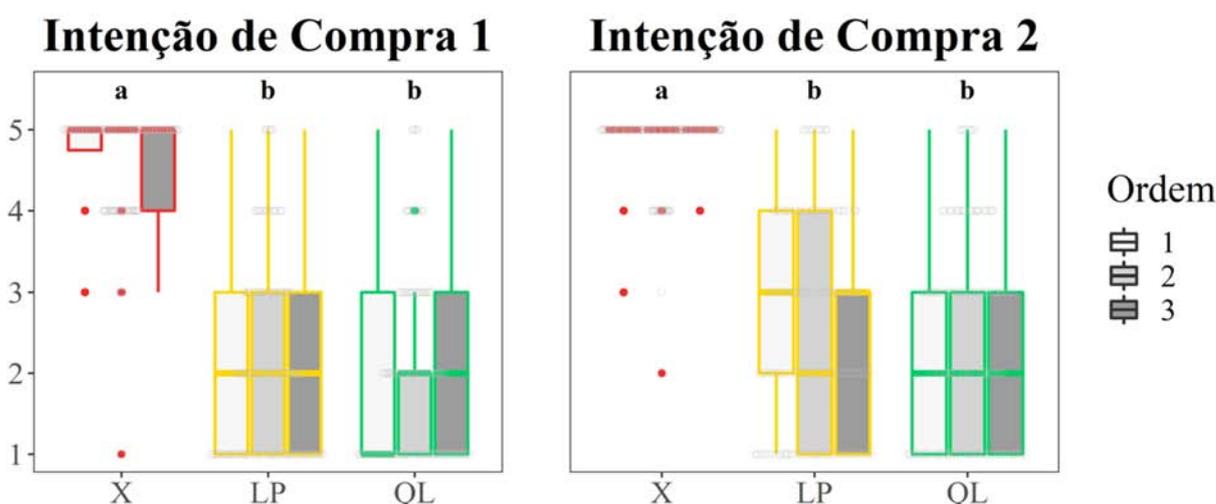


(X) *sorbet* com xilitol; (LP) *sorbet* com xilitol e adição de partículas lipídicas; (QL) *sorbet* com xilitol e TPP-quitossomas liofilizadas.

Há diferença significativa entre as intenções de compra 1 e 2 ($p < 0,005$), ou seja, após serem informados sobre o potencial benefício à saúde relacionado ao consumo deste *sorbet*, os provadores tenderam a apresentar maior aceitação ao alimento. Em ambos os cenários, pode-se observar que as intenções de compra de X apresentaram-se significativamente maiores ($p < 0,005$) que LP e QL (Figura 7).

QL e LP não apresentaram, média, respostas favoráveis à compra, na intenção de compra 2 as médias aumentaram, principalmente para LP, mas ainda com baixa intenção de compra apresentando resposta média entre “possivelmente não compraria” e “talvez comprasse/talvez não comprasse”, para QL a resposta média foi “possivelmente não compraria”.

Figura 7. Histograma gerado pela intenção de compra dos 125 provadores voluntários, (1) antes de conhecer os benefícios do consumo de extrato de folhas de alcachofra e (2) após ser informado sobre tais benefícios.



(X) *sorbet* com xilitol; (LP) *sorbet* com xilitol e adição de partículas lipídicas; (QL) *sorbet* com xilitol e TPP-quitossomas liofilizadas.

Segundo Maia *et al.* (2008), ao analisar a intenção de compra para diferentes sabores de sorvetes com a substituição da sacarose por xilitol, obtiveram um alto índice de intenção de compra para o produto com o adoçante, o que confirma a alta aceitação de X.

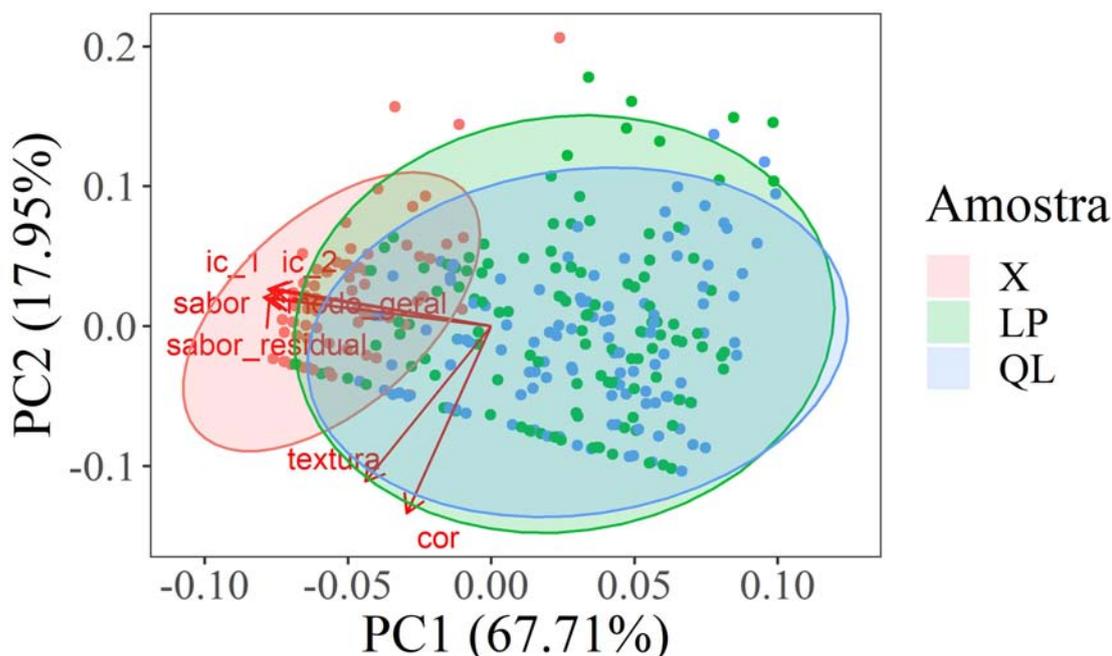
Romano (2012), estudou a aceitação de frozen yogurt simbiótico com teor reduzido de lactose quando adicionado diferentes concentrações de inulina, ao realizar análise sensorial

obteve que a inulina alterou, significativamente, a avaliação global, o aroma, o sabor e a consistência das amostras, entretanto ainda se obteve um alto índice de aceitação, em torno de gostei ligeiramente e moderadamente.

De acordo com Marinho (2016), ao realizar a comparação da intenção de compra de *sorbet* de polpa de juçara com o controle e a adição de prebióticos e probióticos, a formulação contendo prebióticos (polidextrose) obteve notas significativamente menores em relação as outras amostras, devido sua menor aceitabilidade global, em virtude das alterações de textura e sabor.

Resultados de uma Análise de Componente Principal (PCA), na qual obteve-se um eixo PC1 que explica 67,71% da variação dos dados e um eixo PC2 explicando 17,95% da variação destes. É possível observar forte sobreposição entre QL e LP indicando que ambas possuem grande semelhança sensorial no que diz respeito a todos os fatores indicados. Por outro lado, nota-se que os principais fatores que diferenciam QL e LP de X são: Intenção de Compra 1 e 2, sabor, sabor residual e modo geral. Textura não está entre os principais fatores relacionados com a diferenciação de X o que pode ser um indicativo de que as partículas de escala micrométrica não foram perceptíveis sensorialmente em relação à textura.

Figura 10. Análise dos componentes principais da amostra



(Ic_1) Intenção de compra1; (Ic_2) Intenção de compra 2; (X) *sorbet* com xilitol; (LP) *sorbet* com xilitol e adição de partículas lipídicas; (QL) *sorbet* com xilitol e TPP-quitossomas liofilizadas.

Em relação às perguntas abertas na segunda parte da primeira ficha entregue aos avaliadores, as repostas obtidas foram agrupadas por categorias. Todas as menções à amostra codificada com X foram computadas como a palavra “xilitol”, as menções à amostra LP foram computadas como “lipídica” e aquelas referentes à QL como “quitosana”.

A Figura 11 contém a nuvem de palavras gerada pelos termos-chave que representam as respostas dos provadores à pergunta “O que você mais gostou?”. O termo mais mencionado foi “xilitol” representando 38,46% do total das respostas, em seguida, os termos referentes as palavras utilizadas pelos provadores, ordenados por da maior para a menor frequência de citação, foram: sabor (22,56%), textura (20%), cor (12,31%), aroma (2,56%), leveza (1,54%), lipídica e acidez (1,03%) e proposta (0,51%).

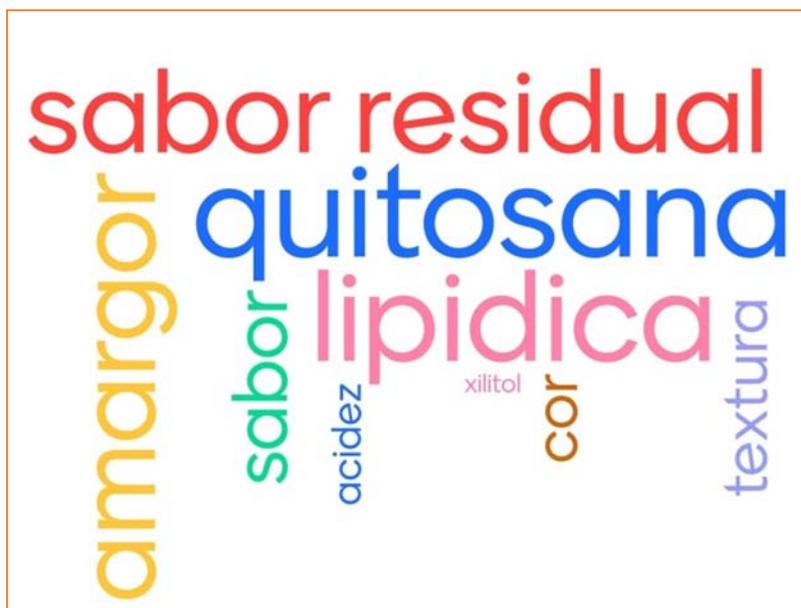
Figura 11. Nuvem de palavras contendo termos-chave que resumem aqueles utilizados pelos provadores na análise sensorial para se referir ao que mais gostaram nas amostras de *sorbet*.



Nuvem de palavras contendo termos-chave que representam as respostas dos provadores à pergunta “O que você menos gostou?” está apresentada na Figura 12. O termo mais citado foi “quitosana”, representando 30,8% dos das respostas, seguida por “lipídica” 27,9% das citações, “sabor residual” com 17,1%, “amargor” com 15,6%. Os termos sabor (3,3%), textura e cor (1,9%), acidez (0,95%) e xilitol (0,47%) apareceram com uma frequência menor. Ressalta-se que o termo “textura” além de ter sido pouco citado, foi citado igualmente entre as 3 amostras, o que é outro indicativo de que as partículas foram pequenas o suficiente para sua textura não ser perceptível sensorialmente.

Com isso pode-se afirmar que ambas as partículas estudadas não foram capazes de mascarar o gosto amargo dos extratos fitoterápicos de folhas de alcachofra.

Figura 12. Nuvem de palavras contendo termos-chave que resumem aqueles utilizados pelos provadores na análise sensorial para se referir ao que menos gostaram nas amostras de *sorbet*.



4 Conclusão

As diferentes formulações de *sorbet* desenvolvidas neste projeto não apresentaram variações significativas com relação às propriedades físico-químicas, ou reológicas, no entanto, quando analisadas sensorialmente o produto adicionado de partículas fitoterápicas não teve boa aceitação sensorial, para nenhuma das partículas adicionadas obtidas por técnicas e materiais de revestimento diferentes. O *sorbet* que foi desenvolvido neste trabalho e utilizado como base para adição de partículas teve boa aceitação sensorial em todas os parâmetros analisados e boa intenção de compra portanto pode-se afirmar que a baixa aceitação de LP e QL não estão relacionadas à formulação base usada e sim nas alterações causadas pela adição das partículas, o que indica que os processos de encapsulação utilizados visando mascarar o gosto amargo do extrato de folhas de alcachofra e sua coloração verde intensa, não foi eficiente em relação ao sabor, mas foi eficiente em relação à cor, pois este parâmetro sensorial

juntamente com a textura foram os melhores avaliados e X e QL não apresentam diferenças estatísticas em relação à cor. O fato de a textura ter sido avaliada com termos favoráveis indica que as partículas formadas foram pequenas o suficiente para sua textura não ser sentida na boca.

5 Referências

- ALMEIDA, S. B., **Efeito de diferentes aromas cítricos sobre a qualidade e estabilidade sensoriais de suco de laranja pronto para beber**. 2006. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.
- AHMAD, F.; ZAIDI, S.; AHMAD, S. Role of by-products of fruits and vegetables in functional foods. In: **Functional Food Products and Sustainable Health**. Springer, Singapore, 2020. p. 199-218.
- AREDO, V. et al. Formation of edible oil-loaded beeswax microparticles using PGSS– Particles from Gas-Saturated Solutions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 169, p. 105106, 2021.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2005) 18th., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, Official Method. Revision 2, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente a Informação Nutricional Complementar. Brasília. 1998.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 379 de 16 de abril de 1999. Brasília: Anvisa, 1999a.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 398 de 30 de abril de 1999. Brasília: Anvisa, 1999b.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº28. Brasília: Anvisa, 2000.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. Brasília: Anvisa, 2011. 126 p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº60, de 23 de dezembro de 2019. Estabele as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Brasília: Anvisa, 2019.
- BRODKORB, A. et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature protocols**, v. 14, n. 4, p. 991-1014, 2019.

- CERVANTES-PAZ, B.; YAHIA, E. M. Avocado oil: Production and market demand, bioactive components, implications in health, and tendencies and potential uses. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 4, p. 4120-4158, 2021.
- CHANG, Y.; HARTEL, R. W. Stability of air cells in ice cream during hardening and storage. **Journal of Food Engineering**, v. 55, n. 1, p. 59-70, 2002.
- CHEN, J.; HU, L. Nanoscale delivery system for nutraceuticals: Preparation, application, characterization, safety, and future trends. **Food Engineering Reviews**, v. 12, n. 1, p. 14-31, 2020.
- DORĐEVIĆ, V. et al. Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 4, p. 452-490, 2015.
- ESPARZA, I. et al. Fruit and vegetable waste management: Conventional and emerging approaches. **Journal of Environmental Management**, v. 265, p. 110510, 2020.
- FRATINI, F. et al. Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 9, p. 839-843, 2016.
- GOFF, H. D.; RICHARD W. H. Ice cream. 7th ed. New York: Springer, 2013.
- GRIS, E. F. et al. Avaliação do tempo de meia-vida de antocianinas de uvas cabernet sauvignon em *sorbet*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 22, n. 2, 2004.
- IBGE. Pesquisa nacional de saúde: atenção primária à saúde e informações antropométricas. Brasil, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro, 66p., 2019.
- INANLI, A. G. et al. The impact of chitosan on seafood quality and human health: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 97, p. 404-416, 2020.
- JIMÉNEZ-MORENO, N. et al. Valorization of selected fruit and vegetable wastes as bioactive compounds: Opportunities and challenges. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 20, p. 2061-2108, 2020.
- KLETTENHAMMER, S. et al. Microencapsulation of linseed oil enriched with carrot pomace extracts using Particles from Gas Saturated Solutions (PGSS) process. **Journal of Food Engineering**, v. 312, p. 110746, 2022.
- MAIA, M. C. A. et al. Avaliação sensorial de sorvetes à base de xilitol. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 146-151, 2008.
- MAKOUIE, S. et al. Physicochemical, textural, and sensory characteristics of ice cream incorporated with *Nigella sativa* seed oil microcapsules. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 10, p. e15804, 2021.
- MALGOR, M.; SABBIONE, A. C.; SCILINGO, A. Amaranth lemon *sorbet*, elaboration of a potential functional food. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 75, n. 3, p. 404-412, 2020.

- MARINHO, J. F. U. **Desenvolvimento e avaliação de sorbets probióticos e simbióticos elaborados com polpa de juçara (*Euterpe edulis*)**. 2016. 132 p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.
- MARSHALL, R. T.; ARBUCKLE W. S. Ice cream. 5th ed. New York: Chapman and Hall, 1996.
- NORFEZAH, M. N.; HARDACRE, A.; BRENNAN, C. S. Comparison of waste pumpkin material and its potential use in extruded snack foods. **Food Science and Technology International**, v. 17, n. 4, p. 367-373, 2011.
- OKURO, P. K. **Desenvolvimento, avaliação e aplicação de micropartículas simbióticas produzidas por spray chilling**. 2013. 220 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.
- PALKA, A.; SKOTNICKA, M. The Health-Promoting and Sensory Properties of Tropical Fruit *Sorbets* with Inulin. **Molecules**, v. 27, n. 13, p. 4239, 2022.
- PATTNAIK, M. et al. Innovative technologies for extraction and microencapsulation of bioactives from plant-based food waste and their applications in functional food development. **Foods**, v. 10, n. 2, p. 279, 2021.
- PREGNOLATTO, W., PASCUET, N. S. Métodos físicos-químicos para análise de alimentos. **Instituto Adolfo Lutz** (São Paulo). 3^a edição. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.
- REHMAN, A. et al. Pectin polymers as wall materials for the nano-encapsulation of bioactive compounds. **Trends in Food Science & Technology**, v. 90, p. 35-46, 2019.
- ROMANO, C. C.. **Influência da inulina nas características químicas, sensoriais e sobrevivência do *L. acidophilus* em frozen yogurt simbiótico com teor reduzido de lactose**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 33 f. 2012.
- SAKAWULAN, D.; BUDI, F. S.; SYAMSIR, E. Pembuatan velva fruit pisang dengan bahan dasar tepung pisang dan carboxy methyl cellulose sebagai bahan penstabil. **Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan**, v. 3, n. 4, 2014.
- SALEM, M. B. et al. Pharmacological studies of artichoke leaf extract and their health benefits. **Plant foods for human nutrition**, v. 70, n. 4, p. 441-453, 2015.
- SANTINI, A. et al. Nutraceuticals: Opening the debate for a regulatory framework. **British journal of clinical pharmacology**, v. 84, n. 4, p. 659-672, 2018.
- SILVA, C. M.; SILVA, T. L. J.; PINTO, I. M. J. Caracterização reológica de fluidos não newtonianos e sua aplicabilidade na indústria. **Ciências exatas e tecnológicas: cadernos de graduação**. Alagoas, v. 5, n.2, p. 285-300, 2019.
- SINGH, A.; MITTAL, A.; BENJAKUL, S. Chitosan nanoparticles: Preparation, food applications and health benefits. **Science Asia**, v. 47, p. 1-10, 2021.

TOPOLSKA, K.; FLORKIEWICZ, A.; FILIPIAK-FLORKIEWICZ, A. Functional food - Consumer motivations and expectations. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 10, p. 5327, 2021.

ZENEBON, O; PASCUET, N. S, TIGLEA, P. Métodos físicos-químicos para análise de alimentos, Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). 4^a edição, 1^a edição online, São Paulo: **Instituto Adolfo Lutz**, 2008.

ZHOU, D. Y. et al. Chitosan and derivatives: bioactivities and application in foods. **Annual review of food science and technology**, v. 12, p. 407-432, 2021.



CONSIDERAÇÕES FINAIS



Este estudo buscou atender a demanda no mercado por alimentos que promovam benefícios à saúde, mas que sejam sensorialmente semelhantes aos alimentos tradicionais. Para isso, por meio do emprego de tecnologias emergentes, obteve-se extrato fitoterápico à partir de um resíduo agroalimentar e desenvolveu-se partículas fitoterápicas para aplicação em alimentos tornando-os funcionais.

Inicialmente o objetivo deste trabalho foi desenvolver um alimento adicionado de partículas simbióticas que auxiliasse na perda de peso de forma natural e saudável pois tanto a inulina (prebiótico que buscava-se extrair das folhas de alcachofra) quanto o *Lactobacillus gasseri* são descritos na literatura como tendo esta função. E por este motivo o alimento escolhido desde o princípio foi o *sorbet* adoçado com edulcorante xilitol.

Para isso estudou-se, a princípio, a produção de partículas simbióticas e para isso estudou-se paralelamente a produção, resistência à alta pressão e encapsulação do *Lactobacillus gasseri* (probiótico) e a extração e encapsulação do extrato de folhas de alcachofra para posterior estudo das partículas simbióticas. Esperava-se que, de acordo com a literatura, o extrato de folhas de alcachofra fosse rico em inulina (prebiótico) no entanto, no entanto os extratos obtidos neste trabalho não apresentaram teores significantes de inulina e, apesar de a inulina ter continuado sendo um marcador para vários estudos realizados ao longo do trabalho, o foco no uso destes extratos mudou para partículas fitoterápicas ao invés de prebióticas. Em relação às partículas probióticas, esta parte do estudo precisou ser interrompida devido à falta de verba para isso, os resultados que foram obtidos neste estudo estão apresentados no APÊNDICE A.

No estudo da obtenção de extratos de folhas de alcachofra utilizando PLE, uma tecnologia ambientalmente amigável, obtiveram-se extratos com maior atividade antioxidante e maior teor de compostos fenólicos quando comparado com metodologias tradicionais também estudadas neste trabalho (SOX, MAG e ULT), apesar de o rendimento ser sensivelmente menor que aquele observado na extração por percolação em soxhlet.

Como a mistura de cera de abelha com óleo de abacate como material carreador foi inovadora, realizou-se todo estudo de mistura destes lipídios em diferentes proporções, interação com o CO₂ supercrítico, comportamento em meio supercrítico e formação de partículas “vazias” visando avaliar a viabilidade do uso destes carreadores na produção de partículas por PGSS. Com base no estudo da solubilidade da mistura de cera de abelha e óleo de abacate em CO₂ supercrítico foi possível confirmar que são bons materiais de parede para

ser utilizados na formação de partículas via PGSS, o que foi comprovado pelo estudo da formação de partículas lipídicas sólidas.

A impregnação supercrítica de extratos de folhas de alcachofra em partículas lipídicas sólidas de cera de abelha e óleo de abacate quando observada pela ótica físico-química se mostrou uma alternativa viável, consideravelmente estável sob condições adversas e quando aplicadas em sorbet não alterou sua reologia. No entanto, sob a ótica sensorial esta impregnação visou mascarar cor e sabor marcante do extrato estudado, não se mostrando eficiente em relação ao sabor pois não teve boa aceitação em análise sensorial, com avaliação média variando entre “desgostei ligeiramente” e “nem gostei/nem desgostei”, tanto para sabor quanto para sabor residual, enquanto a amostra referente ao mesmo alimento sem adição de partículas foi avaliado em média como “gostei muito”.

Estudou-se também a formação de partículas por gelificação iônica de quitosana e TPP para avaliar o comportamento de dois diferentes tipos de partículas quando adicionados a um alimento. Na produção destas partículas, quando houve uma etapa prévia de formação de lipossomas entre o extrato e fosfolipídio, devido às características anfifílicas destas partículas. As mesmas considerações apresentadas para as partículas lipídicas podem ser aplicadas às TPP-quitossomas, pois estas se mostraram físico-quimicamente viáveis, mas também não obtiveram aceitação sensorial em relação à sabor e sabor residual quando aplicadas em *sorbet* de morango com avaliação média variando entre “desgostei moderadamente” e “desgostei ligeiramente” para estes parâmetros.

O *sorbet* foi o alimento escolhido para ser alimento base para incorporação de partículas por ser um alimento leve, refrescante, de baixa caloria, à base de frutas e que pode facilmente ser associado a uma alimentação saudável. Em pesquisa *online* de intenção de compra de um sorbet teórico com propriedades funcionais, 85,16% dos participantes da pesquisa afirmaram que comprariam este sorbet funcional e 91,39% indicaram que ter o conhecimento sobre os potenciais benefícios à saúde relacionados ao consumo desse alimento favoreceria sua escolha em detrimento das demais sobremesas geladas. Com base nesta mesma pesquisa, determinou-se que o sabor do *sorbet* seria morango, de modo a potencializar a aceitação do produto na análise sensorial.

Ambas as partículas quando adicionadas ao sorbet não alteraram as propriedades físicas deste alimento e nem foram reportadas pelos provadores como perceptíveis em relação à textura na boca, o que indica que possuem potencial para serem estudadas na encapsulação/impregnação de outros compostos bioativos que não necessitem mascarar sabor,

como por exemplo, microrganismos probióticos. Sugere-se também estudos que investiguem os componentes responsáveis pelo amargor do extrato de folhas de alcachofra.

Outra possibilidade de estudo futuro seria a aplicação das partículas obtidas neste trabalho em outros tipos de alimentos, pois talvez em alimentos com sabor mais marcante o gosto amargo dos extratos de folha de alcachofra não sejam tão perceptíveis e não interfira negativamente na aceitação do produto.

Observou-se também que as partículas lipídicas sólidas de cera de abelha e óleo de abacate obtidas neste trabalho se fundem ao serem levemente friccionadas sobre a pele, o que sugere uma possível aplicação destas partículas para impregnação de compostos bioativos a serem veiculados em cosméticos.



APÊNDICE



APÊNDICE A **Micropartículas Lipídicas Carregadas *Lactobacillus gasseri*.**

Resumo

Microrganismos probióticos são aqueles que alteram de forma benéfica a microbiota intestinal ao colonizar o intestino humano, acarretando em melhorias para a saúde do hospedeiro. Para que tal benefício seja alcançado, deve-se tomar alguns cuidados de forma a garantir que esses microrganismos estes atravessem o trato gastrointestinal chegando viáveis ao intestino. Uma maneira de garantir essa viabilidade é a microencapsulação, pois esta visa à imobilização ou envolvimento de compostos de interesse por materiais que forneçam proteção à acidez do estômago etambém protegem quanto a fatores externos como luz, umidade, calor e interações negativas com outros ingredientes alimentícios, fazendo com que diferentes tipos de alimentos possam ser enriquecidos e apresentar propriedades probióticas sem alterações organolépticas. Nesta pesquisa estudou-se a produção e liofilização de *Lactobacillus gasseri* e a estabilidade deste microorganismo após processo de formação de partículas lipídicas a alta pressão por PGSS (Partículas de Solução Saturada de Gás, do inglês *Particle from Gas Saturated Solutions*). Esta técnica foi utilizada por apresentar diversas vantagens tais como o emprego de solvente com baixa toxicidade (CO₂), obtenção de partículas secas e total controle das variáveis de processo. Para a produção de partículas utilizou-se cera de abelha e óleo de abacate como materiais de parede e as condições de operação utilizadas foram 60 °C, 200 bar e rotação do agitador mecânico do reator de 1250 rpm. Estudou-se a influência do tempo de homogeneização (de 1 a 3 horas) em condições supercrítica sobre a viabilidade do *Lactobacillus gasseri*. Em todas as condições estudadas verificou-se que as células do probiótico estudado continuaram viáveis. As partículas também foram analisadas em relação à distribuição de tamanho e verificou-se que o tempo estático de 1 hora originou partículas com maior diâmetro médio.

Palavras-chave: PGSS, cera de abelha, óleo de abacate, probiótico, alimento funcional, promotor de saúde.

1 INTRODUÇÃO

O intestino humano é colonizado por mais de 1000 espécies de bactérias que em conjunto são denominadas microbiota intestinal ou microbiota intestinal e desempenham diferentes funções para o bom funcionamento do corpo humano como um todo, tais como quebra de nutrientes de modo a favorecer sua absorção, proteção contra patógenos e produção de ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas e metabólitos (Kowalska et al., 2022). Probióticos são microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro e auxiliam na manutenção de uma microbiota intestinal saudável (Swanson, 2020). Os efeitos probióticos podem ser adquiridos por meio da ingestão direta desses micrornismos, via suplementação ou pelo consumo de alimentos funcionais. De acordo com Lillo-Pérez e colaboradores (2021), os alimentos probióticos representam 70% do mercado de alimentos funcionais. Neste cenário o *Lactobacillus gasseri* tem se destacado por ser uma bactéria ácido láctica de origem humana, tolerante à bile, que adere aos tecidos intestinais, estimula macrófagos, produz bacteriocinas com capacidade de reduzir microrganismos patogênicos (Jurado-Gámez et al., 2016; Selle, Klaenhammer, 2013) e protege a barreira intestinal evitando a entrada de substâncias inflamatórias como lipopolissacarídeos, reduzindo assim a inflamação do tecido adiposo (Kawano et al., 2016). Outros benefícios à saúde atribuídos aos *L. gasseri* incluem perda de peso e prevenção do acúmulo de gordura visceral e obesidade (Oh et al., 2020; Sun et al., 2020; Kawano et al., 2016); efeito antifúngico (Parolin et al., 2021) e antimicrobiano contra microrganismos patogênicos como, por exemplo *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *K. oxytoca* e *L.monocytogenes* (Gao et al., 2022; Scillato et al., 2021; Itoh et al., 1995) e manutenção da saúde do trato urogenital feminino (Fok et al., 2018). Sawada e colaboradores (2017) baseados em seus estudos com humanos sugerem que *L. gasseri* possuem efeitos promotores da saúde física e mental.

Entretanto há algumas limitações tecnológicas que impedem de ser adicionados em alguns alimentos como, por exemplo, adversidades durante o processamento e armazenamento dos alimentos e passagem pelo trato gastrointestinal (Sharma, Rashidinejad, Jafari, 2022). Dessa forma, alguns estudos envolvendo microencapsulação/impregnação estão sendo desenvolvidos para garantir que as células microbianas cheguem viáveis no intestino para que possam colonizá-lo e assim exercer os possíveis efeitos benéficos à saúde após seu

consumo. A microencapsulação também apresenta a vantagem de permitir a liberação controlada do probiótico no intestino grosso que é o local-alvo de sua ação (Varela-Pérez et al., 2022; Kowalska et al., 2022; Pato et al., 2022). Além dos benefícios apresentados a microencapsulação é uma solução promissora para os problemas relacionados às alterações organolépticas durante o armazenamento dos alimentos funcionais devido à bioatividade das células probióticas vivas (Liao et al., 2017).

Muitos métodos têm sido estudados para microencapsular/impregnar bactérias probióticas, incluindo extrusão, emulsificação, coacervação, secagem por pulverização e liofilização que são denominados métodos tradicionais (Sharma, Rashidinejad, Jafari, 2022; Kowalska et al., 2022). As microcápsulas preparadas usando esses quatro métodos podem melhorar a tolerância dos probióticos a ambientes adversos, mas existem algumas desvantagens em cada método, tais como desidratação e estresse térmico devido às altas temperaturas quando spray dryer é empregado (Bommasamudram, Muthu, Devappa, 2022), partículas relativamente grandes são obtidas por extrusão e na emulsificação é difícil controlar tamanho e forma das partículas (Xu et al., 2022; Reque, Brandelli, 2021).

A formação de partículas em meio supercrítico oferece diversos benefícios tais como controle preciso das variáveis de processo, uso de dióxido de carbono como solvente, que por ser gás em condições ambientes faz com que as partículas obtidas sejam secas e partículas livres de traços de solvente orgânico (Klettenhammer et al., 2020). Em particular, o processo conhecido como Partículas de Soluções Saturadas de Gás (PGSS do inglês *Particle from Gas Saturated Solutions*), apresenta várias vantagens para o encapsulamento de bioativos onde tanto o material da parede quanto o bioativo são solúveis em CO₂ em seu estado supercrítico. PGSS é uma técnica de formação de partículas baseada na interação de CO₂ supercrítico com polímeros e lipídios de baixo ponto de fusão junto com componentes ativos, seguida por expansão através de um bocal (Lee, Surendhiran, Chun, 2022). Quando esta mistura saturada de gás atinge a pressão atmosférica, o gás dissolvido é liberado, causando uma rápida queda de temperatura devido ao efeito Joule-Thomson, levando à rápida coagulação dos polímeros ou lipídios, dando origem as partículas (Griffin et al., 2014; Yun et al., 2013; Fages et al., 2004).

A escolha do material utilizado na formação de partículas, visando encapsular/impregnar probióticos é de extrema importância, pois visto a complexidade do trato digestivo, estes materiais devem resistir ao pH de diferentes áreas (cavidade oral, estômago e intestino delgado) e os efeitos de várias enzimas (amilase salivar, pepsina e tripsina), de modo que a

seleção de materiais de parede torna-se particularmente importante (Xu et al., 2022) além de ser necessário garantir que este material não seja tóxico e que garanta a liberação direcionada no cólon enquanto resiste a vários ambientes adversos (Zhou et al., 2022; Zhao et al., 2022). Materiais de grau alimentício utilizados para encapsular/impregnar probióticos incluem proteínas, lipídios, gomas, maltodextrina, carboidratos, leite, soro de leite, alginatos, pectina, quitosana, fruto-oligossacarídeos e inulina (Kowalska et al., 2022; Sharma, Rashidinejad, Jafari, 2022).

Neste sentido, o presente trabalho de pesquisa visou produzir *Lactobacillus gasseri* e estudar a estabilidade deste microrganismo em partículas lipídicas sólidas de cera de abelha e óleo de abacate obtidas por PGSS.

2 Material e Métodos

2.1 Material

As cepas de *Lactobacillus gasseri* (*American Type Culture Collection* - ATCC 33323), isoladas de intestino humano foram adquiridas da Fundação André Tosello (Campinas, BR).

Utilizou-se como meio de cultura, ágar e caldo De Man, Rogosa e Sharpe, frequentemente abreviado para MRS (Acumedia, Indaiatuba, BR). Este meio de cultura favorece o crescimento de bactérias do gênero *Lactobacillus* e inibe o crescimento de muitas outras bactérias.

Toda a manipulação envolvendo o microrganismo foi realizada em capela esterilizada com álcool 70% e luz ultravioleta, com fluxo laminar e próximo ao bico de Bunsen. E todos os materiais, veículos e meios de cultura utilizados foram autoclavados a 121 °C por 15 min, com exceção do agente crioprotetor que foi autoclavado a 110 °C por 15 min. A descrição da solução crioprotetora está descrita no item 2.3.1.

2.2 Produção de *Lactobacillus gasseri*

2.2.1 Diluição Seriada

Preparou-se a solução 0,2%, de peptona (Acumedia, Heywood, UK) em água destilada. Adicionou-se 10 mL de água peptonada em um tubo com tampa rosqueada e 9 mL em outros 6 tubos e realizou-se diluição seriada da bactéria de acordo com a Tabela 1, para

isso, fez-se uma raspagem em superfície da cepa adquirida da Fundação André Tosello, com o auxílio da alça de platina, após a raspagem, a alça de platina foi inserida dentro do primeiro tubo, ficando este com concentração de 10^0 , e agitada para que a amostra coletada fosse dispersa na solução de água e peptona. Em seguida, com auxílio de uma pipeta com ponteira autoclavada, transferiu-se 1 mL deste primeiro tubo para o segundo que já continha 9 mL de água peptonada, agitou-se o tubo e seguiu-se realizando diluições seriadas até o sétimo tubo que possuía concentração de 10^{-6} .

Tabela 1. Diluição seriada de *Lactobacillus gasseri* em água peptonada 0,2%.

Tubo	Concentração	Composição
1	10^0	10 mL de água peptonada + amostra de bactéria coletada por raspagem em superfície
2	10^{-1}	9 mL de água peptonada + 1 mL do conteúdo do tubo 1
3	10^{-2}	9 mL de água peptonada + 1 mL do conteúdo do tubo 2
4	10^{-3}	9 mL de água peptonada + 1 mL do conteúdo do tubo 3
5	10^{-4}	9 mL de água peptonada + 1 mL do conteúdo do tubo 4
6	10^{-5}	9 mL de água peptonada + 1 mL do conteúdo do tubo 5
7	10^{-6}	9 mL de água peptonada + 1 mL do conteúdo do tubo 6

2.2.2 Cultura de bactérias lácticas em ágar MRS

Para o preparo do meio de cultura, diluiu-se 70 g de ágar MRS (Acumedia, Indaituba, BR) em 1 L de água destilada, conforme especificação do fabricante. Após autoclavagem, esperou-se o meio de cultura atingir 50 °C para prosseguir com o preparo das placas.

Como *L. gasseri* é uma bactéria ácido láctica, sua incubação deve ser em profundidade, para isso, pipetou-se 1 mL do conteúdo dos tubos referentes às diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} preparadas de acordo com o item 2.2.1 e despejou-se em placas de Petri estéreis descartáveis de 7 cm de diâmetro respectivamente identificadas. Em seguida adicionou-se cerca de 20 mL do meio de cultura preparado sobre cada placa de Petri contendo a diluição de *L. gasseri* e homogeneizou-se o conteúdo realizando movimentos em forma de 8 por 10 vezes. Após a homogeneização, as placas tampadas foram mantidas em repouso, dentro da

capela de Fluxo Laminar até a completa solidificação do ágar. Logo após, despejou-se uma fina camada de ágar MRS em cada placa e deixando-a solidificar novamente.

Após a completa solidificação, as placas foram incubadas invertidas em incubadora B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio, do inglês *Biochemical Oxygen Demand*) (Marconi, Piracicaba, BR) a 37 °C por 48 horas.

2.2.3 Isolamento das colônias típicas de *Lactobacillus gasseri*

Após as 48 horas de incubação das placas preparadas do item 2.2.2, estas foram analisadas com o auxílio de um contador de colônias (Phoenix, Araraquara, BR). Realizou-se contagem das colônias formadas e as colônias típicas observadas foram retiradas junto com o ágar ao seu redor que foi recortado com o auxílio de uma lâmina bisturi.

Os pedaços de ágar cortados contendo uma colônia de *L. gasseri* foram depositados em tubos de ensaio com tampa rosqueada contendo 9 mL de caldo MRS (Acumedia, Indaiatuba, BR) preparado de acordo com especificações do fabricante (55 g/L) e autoclavado. Vale ressaltar que cada pedaço de ágar foi colocado em um tubo de ensaio diferente.

Os tubos inoculados com as colônias de *L. gasseri*, foram incubados em incubadora B.O.D. (Marconi, Piracicaba, BR) a 37 °C por 48 horas.

O crescimento dos microrganismos após o período de incubação foi verificado pela turbidez do caldo bacteriológico.

2.2.4 Cultura de bactérias lácticas em caldo MRS

Para a produção de *L. gasseri* para posterior liofilização, primeiro reativou-se as cepas armazenadas preparadas no item anterior, para isso, 1 mL da suspensão de lactobacilos em meio de cultura foi adicionado a um tubo contendo 9 mL de caldo MRS autoclavado (Acumedia, Indaiatuba, BR) e incubado por 48 h a 37 °C em incubadora B.O.D. Após este período de reativação, uma alíquota da suspensão reativada foi adicionada a caldo MRS autoclavado na proporção de 10% em frascos Schotts. Caso esta produção ocorra em dias consecutivos àos da etapa anterior, a reativação das cepas se faz desnecessária.

2.2.5 Coloração Gram

Para certificação de que as bactérias cultivadas pertenciam ao gênero *Lactobacillus*, testes de coloração Gram foram realizados. Para isso, uma alça de platina esterilizada foi inserida no tubo contendo caldo bacteriológico MRS e *L. gasseri*, após o período de incubação, para coleta de amostra em seguida a alça foi esfregada em uma lâmina de vidro para depósito da amostra que em seguida foi seca sob a chama do bico de Bunsen.

Após a secagem, a amostra foi coberta com cristal violeta (Synth, Diadema, BR) e deixada reagir por cerca de 30 segundos. Após este período, a placa foi lavada com água destilada por aproximadamente 45 segundos, em seguida cobriu-se com Lugol (Synth, Diadema, BR), deixando-o agir por 60 segundos, após este período a placa foi lavada com água destilada e em seguida com etanol 95%, na sequência, aplicou-se Fucsina (Synth, Diadema, BR) que agiu sobre a amostra por 30 segundos sendo lavada em seguida. Após estas etapas, a amostra contida na lâmina foi analisada em microscópio ótico.

2.3 **Liofilização de *Lactobacillus gasseri***

2.3.1 Preparação do crioprotetor

Como crioprotetor, utilizou-se uma solução contendo 1,3% de trealose (Dinâmica, São Paulo, Brasil), 0,33% Na₂POH₄ (Êxodo, São Paulo, Brasil), 7,5% de lactose (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e 21% de leite em pó desnatado (Nestlé/Molico, São Paulo, Brasil) em água ultrapura, de acordo com a metodologia descrita por Shu e colaboradores (2018). Após autoclavagem, a solução crioprotetora foi mantida sob refrigeração.

2.3.2 Preparo do microrganismo para o congelamento

Células ativas de *L. gasseri* produzidas conforme item 2.2.4 foram centrifugadas a 5.000 rpm à temperatura ambiente (25 °C) por 15 minutos em centrífuga Excelsa II (Fanem, Guarulhos, BR). Após a centrifugação as células do microrganismo se sedimentaram no fundo de tubos falcon e o caldo MRS sobrenadante foi descartado. Estas células separadas por centrifugação foram lavadas por duas vezes com água destilada asséptica e centrifugadas novamente. Após as lavagens, adicionou-se às células, o agente crioprotetor em igual volume

ao ocupado pelas células secas, aproximadamente e a mistura foi pré-congelada -80 °C. Durante cada etapa de lavagem da cultura e após a adição do crioprotetor, a amostra foi agitada em vórtex por 30 segundos.

2.3.3 Liofilização

As amostras pré-congeladas a -80 °C foram submetidas à baixa pressão e baixa temperatura por 48 h em um liofilizador a vácuo LC 1500 (Terroni, São Carlos, Brasil).

Os microrganismos liofilizados foram armazenados em freezer a -20 °C.

2.4 **Microencapsulação em meio supercrítico.**

Para a formação de partículas utilizou-se um equipamento SFC/RESS (Thar Instruments Co./Waters, Pittsburgh, USA). O material de parede utilizado foi uma mistura de óleo de abacate (Hass, Bauru, BR) e cera de abelha (Pirassununga, BR) em igual proporção (1:1), seguindo metodologia descrita por Aredo e colaboradores (2021) (parte dos resultados apresentados no Capítulo 3 desta tese).

Na autoclave do equipamento adicionou-se 1 g de *L. gasseri* liofilizado e 9 g de mistura lipídica. A autoclave foi então fechada, aquecida a 60 °C e pressurizada com dióxido de carbono supercrítico até pressão de 200 bar com agitação mecânica a 1250 rpm. A variável de processo estudada neste trabalho foi o tempo de contato entre o CO₂ e os materiais durante a etapa de homogeneização. Avaliou-se a influência dos tempos de 1h, 2h e 3h sobre o tamanho das partículas formadas e sobre a viabilidade de *L. gasseri* após o processamento.

Após o tempo pré-determinado de homogeneização, a mistura foi despressurizada rapidamente, passando por um bico aspersor de 0,06” e as partículas formadas foram acondicionadas sob refrigeração em placas de Petri estéreis, envoltas por filme de PVC e papel alumínio para posterior análise.

2.5 Determinação da viabilidade celular

A contagem no número de células viáveis de bactérias foi realizada antes e após a liofilização e também após o processamento à alta pressão para formação de partículas. Aferiu-se também a viabilidade de *Lactobacillus gasseri* após mistura física com óleo de abacate e cera de abelha na mesma proporção daquela utilizada para produção das partículas a fim de verificar se a presença destes lipídeos exercia alguma influência nesta contagem.

A amostra, constituída por microrganismo disperso em crioprotetor antes do congelamento, microrganismo liofilizado ressuspendido em água ultrapura, partículas ou mistura física de lipídeos e *L. gasseri*, foi dispersa em água peptonada (0,2%) na qual realizou-se diluição seriada. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Para esta análise usou-se 1g de partículas lipídicas e de mistura do microrganismo com lipídios e 1 mL do microrganismo disperso no crioprotetor antes do congelamento e do microrganismo liofilizado ressuspendido (equivalente a 0,1 g do liofilizado). Estes valores foram calculados de modo a serem equivalentes em relação ao volume de microrganismo analisado.

Vale ressaltar que os tubos correspondentes à primeira diluição tanto das micropartículas quanto da mistura física com cera de abelha e óleo de abacate foram aquecidos a 60 °C por 10 min seguido por 1 min de agitação em vórtex para que a camada protetora formada pelos lipídeos ao redor do microrganismo fosse desfeita e esse pudesse ser solubilizado na solução de água peptonada.

Após as diluições, 1 mL de suspensão bacteriana foi despejada no fundo de placas de Petri estéreis descartáveis de 7 cm de diâmetro e seguiu-se metodologia descrita no ítem 2.2.2 deste capítulo. Após as 48 horas de incubação o número de unidades formadoras de colônias (UFC) em cada placa foi contado com o auxílio de um contador de colônias (Phoenix, Araraquara, BR).

2.6 Tamanho médio e distribuição do tamanho das partículas

No estudo do perfil de tamanho das partículas foi utilizado um equipamento de difração de raio laser em comprimento de onda de 375 nm SALD-201V (Shimadzu, Tóquio, JP), o qual é sensível à faixa de tamanho de 0,01 e 300 µm. Para isso, as partículas foram

dispersadas em solução 50% água:etanol e colocadas em cubetas de quartzo para a leitura (Aredo et al., 2021).

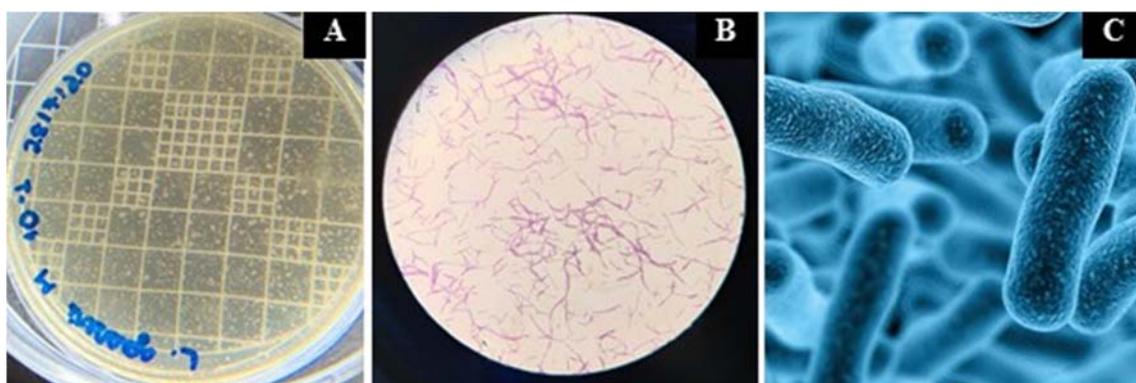
3 Resultados e Discussão

3.1 Produção de *Lactobacillus gasseri*

As placas de petri resultantes da incubação feita à partir da cepa original adquirida da fundação André Tosello foram analisadas inicialmente de forma visual e verificou-se que houve crescimento satisfatório de forma homogênea por toda a extensão da placa e que as unidades formadoras de colônias possuíam formato típico do gênero *Lactobacillus*, conforme pode ser observado na Figura 1 (A). Para confirmar que tais colônias realmente foram formadas por *Lactobacillus* e não por contaminação com outras bactérias, apesar de todas as medidas preventivas terem sido seguidas e todas as manipulações terem sido realizadas em áreas estéreis, realizou-se coloração Gram.

A Figura 1 (B) mostra a imagem em coloração Gram realizado com o corte de uma das colônias que cresceram em ágar, nela foi possível observar, com auxílio em um microscópio ótico, células cilíndricas com formato típico do gênero *Lactobacillus* e com a esperada coloração arroxeada já que esses microrganismos são Gram positivos. A Figura 1 (C) apresenta células típicas de *Lactobacillus gasseri* que serviram como referência para esta análise

Figura 1. Placa de petri contendo colônias de *Lactobacillus gasseri* (A), lâmina de coloração Gram observada em microscópio (B) exemplo de células típicas de *Lactobacillus gasseri* (C).



Fonte: Figuras A e B - Própria autoria, 2020. Figura C - Imagem da internet, disponível em: <<https://www.dalissa.com.br/produto/lactobacillus/lactobacillus-gasseri-1-bilhao-30-capsulas/>>.

3.2 Liofilização

O crioprotetor utilizado, associado ao rápido congelamento a -80°C se mostrou eficaz na preservação da viabilidade das células bacterianas de *L. gasseri*, tendo evitado o rompimento da membrana celular pela formação de cristais de gelo. A viabilidade da liofilização foi avaliada pela contagem de células em uma alíquota antes do processo de congelamento, com um total de $2,24 \cdot 10^{10}$ UFC/mL, e de uma alíquota retirada da mesma amostra e após liofilização resultando em $2,12 \cdot 10^9$ UFC/mL.

3.3 Partículas lipídicas sólidas carregadas com *L. gasseri*

3.3.1 Características macroscópicas

As partículas formadas possuem coloração amarela opaca (Figura 2) e são aparentemente estáveis à temperatura ambiente, aparência semelhante à descrita por Aredo e colaboradores (2021) para as partículas de cera de abelha e óleo de abacate obtidas por PGSS sem impregnação de compostos ativos.

Figura 2. Micropartículas lipídicas de cera de abelha e óleo de abacate contendo *Lactobacillus gasseri* obtidas por PGSS com diferentes tempos de homogeneização (1, 2 e 3 horas, respectivamente) a 200 bar e 60 °C.



3.3.2 Análise do tamanho de partículas

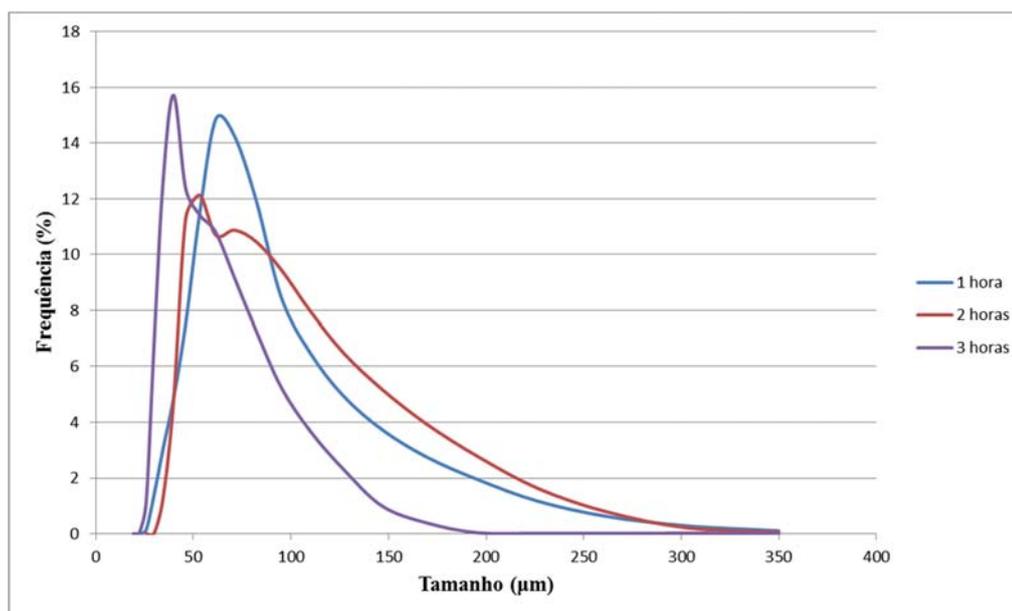
A distribuição do tamanho das partículas (Figura 3) foi ajustada com sucesso pela função Rosin-Rammler, com coeficiente de regressão mínimo de 97,91% mostrando que o modelo se aproxima dos valores experimentais (Tabela 2).

Tabela 2. Análise da distribuição de tamanho das partículas formadas com CO₂ supercrítico (60 °C, 200 bar) com diferentes tempos de homogeneização.

t (h)	Parâmetros Rosin-Rammler		R ² (%)	Descritores estimados			D [4,3] (μm)
	n	X _R (μm)		D ₁₀ (μm)	D ₅₀ (μm)	D ₉₀ (μm)	
1	2,9±0,4 ^a	97,0±4,3 ^a	97,91	44,4±4,8 ^a	85,4±4,1 ^a	129,9±7,3 ^a	161,3±18,7 ^a
2	2,4±0,1 ^a	94,9±3,1 ^a	98,04	37,5±0,6 ^a	81,6±2,2 ^a	134,0±6,2 ^a	151,4±11,2 ^{a,b}
3	2,8±0,2 ^a	65,5±0,7 ^b	98,21	29,0±1,4 ^b	57,4±0,8 ^b	88,7±1,7 ^b	110,4±23,3 ^b

Valores expressos em média ± desvio padrão; n = 3. Em cada coluna de cada tipo de distribuição de tamanho, letras diferentes significam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p <0,05).

Figura 3. Distribuição do tamanho das partículas lipídicas sólidas formadas por PGSS com CO₂ supercrítico (60°C, 200 bar) com diferentes tempos de homogeneização.



Portanto, os parâmetros Rosin-Rammler (n e X_R) e os descritores estimados (D₁₀, D₅₀ e D₉₀) foram confiáveis para comparar as distribuições de tamanho das partículas. A distribuição do tamanho das partículas variou de acordo com o tempo de homogeneização a alta pressão, sendo possível observar que quanto maior o tempo de homogeneização durante o

processo de formação das micropartículas menor o tamanho médio das partículas obtidas. As partículas obtidas após 1 hora de homogeneização supercrítica apresentaram diâmetro médio (D [4,3]) de 161,3 μm , sendo o maior entre as três condições estudadas, as partículas obtidas após 2 horas de homogeneização apresentaram diâmetro médio de 151,4 μm e aquelas obtidas após 3 horas de homogeneização possuem diâmetro médio equivalente a 110,4 μm , havendo diferença estatística em relação ao tamanho de partícula apenas entre 1 e 3 horas de processamento.

3.3.3 Viabilidade celular pós-processamento supercrítico

Os resultados apresentados na Tabela 3 expressos em UFC/g de partícula representam a contagem do número de colônias formadas por células viáveis após inoculação de quatro diferentes amostras.

Tabela 3. Viabilidade das células de *Lactobacillus gasseri* após liofilização, mistura com cera de abelha e óleo de abacate e processamento com CO₂ supercrítico a 60 °C e 200 bar.

Amostra	Contagem de colônias (UFC/ g de partícula)
<i>L. gasseri</i> liofilizado	$2,12 \cdot 10^{10*}$
Mistura física de cera de abelha, óleo de abacate e <i>L. gasseri</i>	$4,50 \cdot 10^8$
Partículas lipídicas obtidas após 1 hora de homogeneização	$4,33 \cdot 10^4$
Partículas lipídicas obtidas após 2 horas de homogeneização	$3,80 \cdot 10^4$
Partículas lipídicas obtidas após 3 horas de homogeneização	$3,47 \cdot 10^4$

*UFC/dg de microrganismo liofilizado, o que equivale a UFC/g de partícula.

Com base nos dados apresentados na Tabela 3 pode-se concluir que ao se preparar a mistura do probiótico com a cera de abelha e o óleo de abacate, ocorre uma redução no número de unidade formadora de colônias (UFC) na ordem de grandeza de dois, o tratamento com CO₂ supercrítico diminui o número de células viáveis em quatro ordens de grandeza. Ao final do processo, a redução da UFC é de seis, no entanto com o número de células mantidas viáveis após o tratamento, ainda é possível aplicar estas partículas no processamento de alimentos probióticos. Parte da elevada variação na contagem de colônias entre o microrganismo liofilizado puro e após mistura com lipídios, de $2,12 \cdot 10^{10}$ para $4,50 \cdot 10^8$ pode ter ocorrido devido à dificuldade de separação entre os microrganismos e a matriz lipídica na

diluição em água peptonada, podendo possivelmente parte das células viáveis do microrganismo ter ficado retida na matriz lipídica, mesmo que todos os cuidados tenham sido tomados neste sentido. O mesmo pode ter ocorrido com a contagem de células viáveis nas partículas.

4 Conclusão

A produção de partículas lipídicas sólidas via PGSS a 200 bar e 60 °C se mostrou uma alternativa viável para a impregnação de probióticos, especificamente *L. gasseri* visando aplicação em alimentos funcionais. Não foram observadas grandes diferenças nessas viabilidades ao comparar diferentes tempos de homogeneização com fluido supercrítico (1, 2 ou 3 horas), porém observou-se uma correlação negativa entre o tempo de homogeneização com fluido supercrítico e o tamanho das partículas, sendo este menor quanto maior o tempo de processamento. No entanto novos estudos devem ser realizados para que os resultados obtidos neste estudo sejam validados.

5 REFERÊNCIAS

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília, DF, 2008.
- BOMMASAMUDRAM, J.; MUTHU, A.; DEVAPPA, S. Effect of sub-lethal heat stress on viability of *Lacticaseibacillus casei* N in spray-dried powders. **LWT**, v. 155, p. 112904, 2022.
- FAGES, J. et al. Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. **Powder Technology**, v. 141, n. 3, p. 219-226, 2004.
- FOK, C. S. et al. Urinary symptoms are associated with certain urinary microbes in urogynecologic surgical patients. **International urogynecology journal**, v. 29, n. 12, p. 1765-1771, 2018.
- GAO, X. et al. A new *Lactobacillus gasseri* strain HMV18 inhibits the growth of pathogenic bacteria. **Food Science and Human Wellness**, v. 11, n. 2, p. 247-254, 2022.

- GRIFFIN, B. T. et al. Comparison of in vitro tests at various levels of complexity for the prediction of in vivo performance of lipid-based formulations: case studies with fenofibrate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 3, p. 427-437, 2014.
- ITOH, T. et al. Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 137-141, 1995.
- JURADO-GÁMEZ, H. et al. Cinética de fermentación, pruebas de desafío in vitro y efecto de inhibición de *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992. **Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line)**, v. 10, n. 2, p. 72-89, 2016.
- KAWANO, M. et al. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 inhibits adipose tissue inflammation and intestinal permeability in mice fed a high-fat diet. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, 2016.
- KLETTENHAMMER, S. et al. Novel technologies based on supercritical fluids for the encapsulation of food grade bioactive compounds. **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1395, 2020.
- KOWALSKA, E. et al. Materials Used for the Microencapsulation of Probiotic Bacteria in the Food Industry. **Molecules**, v. 27, n. 10, p. 3321, 2022.
- LEE, S. C.; SURENDRHIRAN, D.; CHUN, B. S. Extraction and encapsulation of squalene-rich cod liver oil using supercritical CO₂ process for enhanced oxidative stability. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 62, p. 102104, 2022.
- LIAO, L. K. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and in vitro digestion. **LWT-food science and technology**, v. 82, p. 82-89, 2017.
- LILLO-PÉREZ, S. et al. Probiotics in fruit and vegetable matrices: Opportunities for nondairy consumers. **LWT**, v. 151, p. 112106, 2021.
- OH, J. K. et al. Synergistic effect of *Lactobacillus gasseri* and *Cudrania tricuspidata* on the modulation of body weight and gut microbiota structure in diet-induced obese mice. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 14, p. 6273-6285, 2020.
- PAROLIN, C. et al. *Lactobacillus* biofilms influence anti-*Candida* activity. **Frontiers in microbiology**, v. 12, 2021.
- PATO, U. et al. Cellulose Microfiber Encapsulated Probiotic: Viability, Acid and Bile Tolerance during Storage at Different Temperature. **Emerging Science Journal**, v. 6, n. 1, p. 106-117, 2022.
- REQUE, P. M.; BRANDELLI, A. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 1-10, 2021.
- SAWADA, D. et al. Daily intake of *Lactobacillus gasseri* CP2305 improves mental, physical, and sleep quality among Japanese medical students enrolled in a cadaver dissection course. **Journal of Functional Foods**, v. 31, p. 188-197, 2017.

- SCILLATO, M. et al. Antimicrobial properties of Lactobacillus cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. **Microbiologyopen**, v. 10, n. 2, p. e1173, 2021.
- SELLE, K.; KLAENHAMMER, T. R. Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of Lactobacillus gasseri on human health. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 6, p. 915-935, 2013.
- SHARMA, R.; RASHIDINEJAD, A.; JAFARI, S. M. Application of Spray Dried Encapsulated Probiotics in Functional Food Formulations. **Food and Bioprocess Technology**, p. 1-20, 2022.
- SHU, G. et al. Characterization of freeze-dried Lactobacillus acidophilus in goat milk powder and tablet: Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature. **LWT**, v. 90, p. 70-76, 2018.
- SUN, L. et al. Lactobacillus gasseri JM1 with potential probiotic characteristics alleviates inflammatory response by activating the PI3K/Akt signaling pathway in vitro. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 9, p. 7851-7864, 2020.
- SWANSON, K. S. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 11, p. 687-701, 2020.
- VARELA-PÉREZ, A. et al. Encapsulation of Lactobacillus gasseri: Characterization, probiotic survival, in vitro evaluation and viability in apple juice. **Foods**, v. 11, n. 5, p. 740, 2022.
- XU, C. et al. Novel nano-encapsulated probiotic agents: Encapsulate materials, delivery, and encapsulation systems. **Journal of Controlled Release**, v. 349, p. 184-205, 2022.
- YUN, J. H. et al. Micronization and characterization of squid lecithin/polyethylene glycol composite using particles from gas saturated solutions (PGSS) process. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 686-691, 2013.
- ZHAO, X. et al. Physical and oxidative stability of astaxanthin microcapsules prepared with liposomes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2022.
- ZHOU, X. et al. Oil bodies extracted from high-oil soybeans (Glycine max) exhibited higher oxidative and physical stability than oil bodies from high-protein soybeans. **Food & Function**, v. 13, n. 6, p. 3271-3282, 2022.

APÊNDICE B Atividades Gerais e Divulgação dos Resultados

A doutoranda Gabriela Marques Bittencourt ingressou no doutorado em agosto de 2018, sendo bolsista CAPES (código de financiamento 001) por 30 meses.

No primeiro semestre do curso (segundo semestre de 2018), a concepção do projeto foi finalizada, as matérias primas foram adquiridas, realizou-se purificação da cera de abelha que foi utilizada ao longo de todo o trabalho, ensaios de solubilidade estática em CO₂ supercrítico e ensaios preliminares envolvendo diferentes proporções de misturas entre cera de abelha e óleo de soja (o óleo de soja foi utilizado em substituição ao óleo de abacate nestes estudos preliminares visando redução de custos) e formação de partículas por PGSS, testando diferentes pressões e temperaturas e observando características macroscópicas. Em dezembro deste mesmo ano a Prof^ª. Dr^ª. Milena Martelli Tosi foi incluída como co-orientadora.

Em 2019, no primeiro semestre de 2019, a doutoranda cursou as disciplinas Processos de Prevenção e Descontaminação de Matérias-Primas Alimentares (ZEA 5886), Metodologia de Pesquisa Científica em Engenharia (ZEM 5002) e Técnicas de Caracterização de Materiais (ZEM 5001) e no segundo semestre cursou a disciplina Tópicos Especiais em Engenharia de Alimentos (ZEA 5804) e realizou estágio supervisionado em docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à disciplina ZEA0866 – Refrigeração e Cadeia do Frio, ministrada aos alunos de graduação do Curso de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Em relação ao andamento do projeto de pesquisa que resultou nesta tese, neste ano foram realizados os ensaios de obtenção de extrato de folhas de alcachofra, os ensaios de solubilidade estática em CO₂ supercrítico foram finalizados, estudos de comportamento dos lipídios em dióxido de carbono supercrítico foram realizados, os estudos de formação de partículas tanto por PGSS quanto por gelificação iônica, bem como os ensaios envolvendo cultura de *L. gasseri* foram iniciados. Em setembro a doutoranda participou da quinta edição da Conferência Iberoamericana de Fluidos Supercríticos (V Prosciba) apresentando os trabalhos “*Physical evaluation of beeswax particles with avocado oil(1:1) formed via RESS*” e “*Solubility tests on supercritical CO₂ of beeswax and avocado oil mixture*” e em novembro participou da décima terceira edição do Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (13^o SLACA)

apresentando o trabalho “*Study of artichoke tincture obtained by pressurized liquid extraction*”.

Em março de 2020 a doutoranda foi aprovada no Exame de Qualificação tendo como banca avaliadora a Prof^ª. Dr^ª. Cintia Bernardo Gonçalves (*in memoriam*) e Prof. Dr. Julian Martinez, a Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Lopes de Oliveira foi presidente da banca (sem direito a voto). Em novembro participou do Workshop Internacional de Avanços em Probióticos e Prebióticos (IWAPP) apresentando os trabalhos “*Tinctures of Artichoke leaves rich in natural prebiotics obtained by Pressurized Liquid Extraction with intermittent solvent purge*” e “*Study of Lactobacillus gasseri viability after High Pressure Particle Formation Processing*”. No ano de 2020 os estudos de formação de partículas lipídicas sólidas por PGSS foram finalizados e os estudos envolvendo a formação de partículas lipídicas sólidas impregnadas com extrato de folhas de alcachofra e com *L. gasseri* foram realizados.

No ano de 2021 os estudos envolvendo a formação de partículas por gelificação iônica foram finalizados, os estudos de desenvolvimento de partículas probióticas foram interrompidos e foram realizados todos os estudos referentes ao desenvolvimento, caracterização e avaliação sensorial do *sorbet* funcional bem como a pesquisa *online* de intenção de compra e caracterização dos possíveis consumidores deste alimento.

O ano de 2022 foi dedicado à finalização da caracterização das partículas obtidas por gelificação iônica, escrita da tese e de artigos científicos.

→ Atividades extras desenvolvidas

Paralelamente às atividades relacionadas a esta tese algumas outras atividades foram desenvolvidas ao longo do doutorado e estão listadas a seguir.

- ❖ Publicação de um livro em 2020 intitulado “Prazo de validade de alimentos industrializados” juntamente com Catarine Vieira Saltore, Prof^ª. Dr^ª. Maria Teresa de Alavarenga Freire e Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Lopes de Oliveira. Com este livro buscou-se elucidar os consumidores sobre os fatores que conduzem às diferenças nos prazos de validades de alimentos industrializados

pertencentes às mesmas categorias, e também apresenta uma extensa lista contendo o prazo de validade de diferentes produtos alimentícios com base nas informações apresentadas nos rótulos dos produtos. Este livro pode ser acessado gratuitamente em: <http://www.livrosabertos.sibi.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/book/498>

❖ Publicação de artigos:

- Segunda autora no artigo “*Formation of edible oil-loaded beeswax microparticles using PGSS–Particles from Gas-Saturated Solutions*” publicado na revista científica *Journal of Supercritical Fluids* na edição de fevereiro de 2021 (<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105106>).
- Quarta autora no artigo “*Determination of functional compounds in blue shark (*Prionace glauca*) liver oil obtained by green technology*” publicado na revista científica *Grasas y Aceites* na edição de abril-junho de 2020 (<https://doi.org/10.3989/gya.0450191>)

❖ Artigos submetidos para avaliação por pares:

- “*High Pressure Food Processing: Microbiological Inhibition with Sensory Quality*” – Primeira autora
- “*Globe artichoke leaf extracts and production of phytotherapeutic solid lipid particles using high pressure technologies*” – Primeira autora
- “*Behavior of beeswax and edible oils mixtures in supercritical carbon dioxide at moderate temperature*” – Primeira autora

- “*Green processes that employ high pressure technology in obtaining extracts of Curcuma longa Lin - Composition, microbiological and antioxidant activities*” – Primeira autora
 - “*Study of the composition and activity of white turmeric (Curcuma zedoaria) extracts obtained by Supercritical Fluid Extraction*” – Segunda autora
-
- ❖ Vice representante discente junto à Comissão Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Engenharia de alimentos em 2020.

APÊNDICE C **Formulário e termo de consentimento livre e esclarecido da pesquisa de intenção de compra *online*.**

1 **Formulário aplicado aos voluntários por meio da plataforma *Google Forms*.**

1.1 **Parte 1**

“Um pouco sobre você”
<p>1. Qual o gênero você se identifica? *Cisgênero(a) é aquele(a) que se identidade com o gênero corresponde ao gênero que lhe foi atribuído no nascimento</p> <ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Homem cisgênero<input type="radio"/> Mulher cisgênera<input type="radio"/> Homem transgênero<input type="radio"/> Mulher transgênera<input type="radio"/> Não-binário<input type="radio"/> Outros
<p>2. Qual a sua faixa etária?</p> <ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> 18-29 anos<input type="radio"/> 30-39 anos<input type="radio"/> 40-49 anos<input type="radio"/> 50-59 anos<input type="radio"/> +60 anos
<p>3. Com qual frequência você pratica atividade física?</p> <ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Nunca<input type="radio"/> 1 vez por semana<input type="radio"/> 2 vezes por semana<input type="radio"/> 3 vezes por semana<input type="radio"/> Só nos finais de semana<input type="radio"/> Todos os dias

4. Em qual região do país você mora atualmente?

- Norte
- Nordeste
- Centro-oeste
- Sudeste
- Sul
- Se não mora no Brasil, por favor escreva o nome do país em que vive atualmente:

5. Você tem filhos?

- Sim
- Não

6. Possui doença crônica pré existente?

- Sim
 - Não
- Se sim, qual? _____

7. Qual o seu grau de escolaridade?

- Ensino Fundamental completo
- Ensino Médio incompleto
- Ensino Médio completo
- Nível superior incompleto
- Nível superior completo
- Pós- Graduação

8. Qual a sua renda familiar mensal atual?

- Até 1,5 salário mínimo (até R\$ 1.497,00).
- De 1,5 a 3 salários mínimos (R\$ 1.497,01 a R\$ 2.994,00).
- De 3 a 4,5 salários mínimos (R\$ 2.994,01 a R\$ 4.491,00).
- De 4,5 a 6 salários mínimos (R\$ 4.491,01 a R\$ 5.988,00).
- De 6 a 10 salários mínimos (R\$ 5.988,01 a R\$ 9.980,00).
- De 10 a 30 salários mínimos (R\$ 9.980,01 a R\$ 29.940,00).
- Acima de 30 salários mínimos (mais de R\$ 29.940,00).

9. Quantas pessoas da sua família moram com você?

*Considere seus pais, irmãos, cônjuge, filhos e outros parentes que moram na mesma casa com você

- Nenhuma
- Uma
- Duas
- Três
- Quatro
- Cinco ou mais

10. Você possui alguma das restrições de consumo apresentadas abaixo?

- Intolerância a lactose
- Alergia alimentar ao leite de vaca
- Não possuo estas restrições alimentares

1.2 Parte 2

“Sobre seus padrões de consumo”

11. Qual a frequência que você consome sorvete, sorbets ou sobremesas congeladas?

- Nunca
- 1 vez por semana
- 2 vezes por semana
- Só nos finais de semana
- Sempre

12. Você costuma consumir alimentos industrializados que são considerados saudáveis?

- Sim
- Não

13. Você já comprou algum alimento só pelo fato de o rótulo alegar benefícios a saúde?

- Sim
- Não
- Se sim, você se lembra qual era? _____

14. Você tem conhecimento sobre alimentos probióticos e dos benefícios de seu consumo?

* Os probióticos são micro-organismos vivos que agem no corpo facilitando a digestão e a absorção de nutrientes, podendo ajudar a fortalecer a imunidade e a equilibrar a microbiota intestinal.

- Sim
- Não

15. Compra algum produto por ter probióticos?

- Sim
- Não
- Se sim, qual você costuma consumir? _____

16. Você tem conhecimento sobre alimentos prebióticos e dos benefícios de seu consumo?

*Prebióticos estimulam o crescimento e/ou ativam o metabolismo de bactérias benéficas à saúde.

- Sim
- Não

17. Compraria um produto por ter prebióticos?

- Sim
- Não

Se sim, qual você costuma consumir? _____

18. Você tem conhecimento sobre alimentos simbióticos e dos benefícios de seu consumo?

*Simbióticos aliam probióticos e prebióticos em um único alimento

- Sim
- Não

19. Você sabe o que é sorbet?

**Sorbet* é uma sobremesa elaborados basicamente com polpas, sucos ou pedaços de frutas e açúcares.

- Sim
- Não

1.3 Parte 3

“Intenção de compra”

20. Você compraria um sorbet funcional acrescido de xilitol e microcápsulas de *Lactobacilos gasseri* (probiótico) e extrato de folhas de alcachofra (rico em inulina, um prebiótico natural)?

- Sim
- Não
- Se não, por quê? _____

21. O fato de saber que este sorbet tem compostos naturais com podem promover melhorias à saúde faria com que você escolher esse sorbet em detrimento dos tradicionais?

- Sim
- Não
- Se não, por quê? _____

22. Sabendo que os compostos promotores de saúde adicionados não irão interferir no sabor do sorbet, qual destes sabores favoreceria sua compra?

- Morango
- Açaí
- Kiwi
- Limão
- Uva
- Abacaxi

23. Preferiria comprar em porções individuais (150 mL) ou em potes de 1,5/2L?

- Individual
- Potes de 1,5/2 litros

24. Qual o valor você estaria disposto a pagar por 150 mL?

- R\$ 2,00 a 3,50
- R\$ 3,60 a 4,50
- R\$ 4,60 a 5,50
- R\$ 5,60 a 6,50
- R\$ 6,60 a 7,50

25. Qual o valor você estaria disposto a pagar por 2L?

- R\$ 20,00 a 29,00
- R\$ 30,00 a 39,00
- R\$ 40,00 a 49,00
- R\$ 50,00 a 60,00

26. Qual alimento você gostaria de encontrar em uma versão mais saudável, adicionada de probióticos e/ou prebióticos?

- _____

2 Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a), em uma pesquisa online sobre o mercado consumidor de sorbet. Este questionário online consiste em algumas perguntas a respeito de preferências e consumo pessoal de produtos. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, clique em continuar ao final deste documento. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

O objetivo desta pesquisa é traçar o perfil dos consumidores de sorbet e alimentos probióticos e/ou prebióticos identificando comportamento e as motivações que os levam a adquirir e a consumir este tipo de produto.

O tempo necessário para o preenchimento deste questionário é de 5 a 8 minutos e as suas respostas serão totalmente anônimas.

Os possíveis riscos e desconfortos decorridos da participação nesta pesquisa consistem em desconforto em relação ao tempo gasto para responder o questionário e/ou constrangimento em responder alguma pergunta que não se sinta à vontade para responder. O questionário foi estruturado para que não se gaste muito tempo em seu preenchimento e para minimizar qualquer risco referente ao constrangimento em responder alguma das perguntas e ao vazamento de dados, em nenhum momento é pedido que o voluntário se identifique ou insira seu e-mail, resguardando seu total anonimato.

Informamos que não há benefícios diretos aos participantes.

A pesquisa será acompanhada integralmente pela pesquisadora responsável de modo virtual. O questionário será todo online, utilizando a plataforma do Google Forms, e os dados serão acompanhados e coletados pelo próprio site.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS:

Pesquisadora responsável: Doutoranda Gabriela Marques Bittencourt.

Endereço e contato telefônico: Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais, Departamento de Engenharia de Alimentos, Campus Fernando Costa, Universidade de São Paulo - Av. Duque de Caxias Norte, 225, Pirassununga - SP, 13635-900. E-mail: gabrielamb@usp.br. Telefone: (19) 3565-4280.

Número CAAE do projeto: 42925221.7.0000.5422

Número do Parecer de Aprovação da pesquisa pelo CEPH/FZEA: 4.548.311

Data de aprovação: 19 de fevereiro de 2021

Contato do CEPH: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FZEA/USP (CEPH/FZEA/USP). Av. Duque de Caxias Norte, 225, Jd. Elite. CEP: 13635-900. Pirassununga/SP. E-mail: cepfzea@usp.br. Telefone: (19) 3565-6759.



Gabriela Marques Bittencourt

APÊNDICE D Formulários, TCLE e imagens relativas à análise sensorial.

1 Ficha 1 da análise sensorial de sorbet de morango funcional

FICHA DE APLICAÇÃO PARA O TESTE DE CONSUMIDOR

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo três amostras codificadas de SORBET DE MORANGO. Por favor, avalie cada amostra e, utilizando a escala a seguir, indique o número correspondente à resposta que expresse o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra DE MODO GERAL e com relação ao AROMA e SABOR da mesma.

- 9 - Gostei extremamente
- 8 - Gostei muito
- 7 - Gostei moderadamente
- 6 - Gostei ligeiramente
- 5 - Nem gostei / nem desgostei
- 4 - Desgostei ligeiramente
- 3 - Desgostei moderadamente
- 2 - Desgostei muito
- 1 - Desgostei extremamente

AMOSTRA	RESPOSTA				
	MODO GERAL	SABOR	COR	TEXTURA	SABOR RESIDUAL

O que você mais gostou? _____

O que você menos gostou? _____

Agora, com base na sua opinião sobre cada amostra, indique, utilizando a escala a seguir, sua atitude caso você encontrasse cada uma à venda.

Se eu encontrasse este SORBET DE MORANGO à venda, eu:

5 - certamente compraria	AMOSTRA	RESPOSTA
4 - possivelmente compraria	_____	_____
3 - talvez comprasse/talvez não comprasse	_____	_____
2 - possivelmente não compraria	_____	_____
1 - certamente não compraria	_____	_____

MUITO OBRIGADA POR SUA COLABORAÇÃO!

2 Ficha 2 da análise sensorial de sorbet de morango funcional

FICHA DE APLICAÇÃO PARA O TESTE DE CONSUMIDOR

Nome: _____ Data: _____

Supondo que o produto foi formulado com Xilitol, um adoçante natural, cerca de 40 % menos calórico que a sacarose (açúcar da cana-de-açúcar) e que possua extrato de folhas de alcachofra, rico em inulina, dentre outros princípios ativos com propriedades funcionais, indique, utilizando a escala a seguir, sua atitude caso você encontrasse cada um à venda.

Se eu encontrasse este SORBET DE MORANGO à venda, eu:

- 5 - certamente compraria
- 4 - possivelmente compraria
- 3 - talvez comprasse/talvez não comprasse
- 2 - possivelmente não compraria
- 1 - certamente não compraria

AMOSTRA	RESPOSTA
_____	_____
_____	_____
_____	_____

MUITO OBRIGADA POR SUA COLABORAÇÃO!

3 Termo de consentimento livre e esclarecido da análise sensorial



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Termo de consentimento formal de participação no projeto de pesquisa: "Desenvolvimento de sorbet funcional acrescido de xilitol e tintura de *Cynara cardunculus* L."

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a) de uma pesquisa de aceitação sensorial de sorbet de morango, sobremesa congelada feita a partir da fruta. Sua participação na pesquisa se dará por meio da degustação de sorbets. Os dados pessoais obtidos na pesquisa (nome, hábitos de consumo) serão tratados com confidencialidade e utilizados apenas pelas pesquisadoras responsáveis. Os resultados obtidos serão divulgados em publicações técnicas e/ou científicas, de modo que o anonimato seja preservado.

Objetivo: Verificar a aceitação sensorial de sorbet de morango adoçado com xilitol (um adoçante natural presente em vegetais, sendo 40 % menos calórico que o açúcar de cana-de-açúcar) e acrescido de partículas de extrato de alcachofra, que auxilia o processo de digestão.

Justificativa: A preocupação da população em relação à saúde, alimentação e a manutenção de peso tem crescido gradativamente, com isso a qualidade e composição dos alimentos tem chamado a atenção. Consumidores buscam alternativas, como produtos que, além de alimentar, possam oferecer algum benefício à saúde. Sendo assim, foi desenvolvido um sorbet funcional acrescido de xilitol e microcápsulas de extrato de folhas de alcachofra. A ação benéfica à saúde se dará pelo açúcar natural de menor valor calórico e do extrato de alcachofra que auxilia a digestão. Para proteger estes compostos de quaisquer danos causados no processamento do sorbet e também para tentar minimizar alterações sensoriais nos alimentos, estudou-se dois tipos de partículas. Partículas lipídicas de óleo de abacate e cera de abelha e partículas de quitosana, ambas contendo o extrato de alcachofra.

Método:

Produção do sorbet: Na produção do sorbet, serão utilizados morangos congelados, xilitol comercial e partículas contendo extrato de alcachofra. Todo o processo de produção do sorbet será realizado seguindo rigorosos padrões de higiene.

Teste de aceitação sensorial: Serão avaliadas três amostras de sorbet de morango adicionado de xilitol, com duas diferentes partículas de extrato de alcachofra. Você terá que avaliar quanto gostou das amostras e o quanto estaria disposto a comprar os produtos. Serão utilizadas duas fichas de avaliação: uma contendo o teste de aceitação (com escala hedônica de 9 pontos, sendo 9- gostei extremamente a 1- desgostei extremamente) e intenção de compra; e uma segunda ficha onde o participante irá responder através de uma escala de 5 pontos (5- certamente compraria a 1- certamente não compraria) o quanto estaria disposto a comprar o produto. Cada provador receberá três (3) amostras por vez.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos

Riscos e Benefícios: Pode haver desconforto quanto ao tempo de análise, aproximadamente 10 minutos. Para pessoas com alergia ou intolerância alimentar à morango ou xilitol, o risco inerente a essa pesquisa se dá por reação alérgica. Assim, antes do início da pesquisa, os participantes serão questionados sobre alergias a estes compostos, não sendo autorizados a participar do estudo caso a resposta seja positiva. Apesar dos cuidados em relação aos ingredientes utilizados no produto e utilização de boas práticas no processo de fabricação, sempre há um risco mínimo de ocorrência de intoxicações relacionadas ao consumo. Se algum sintoma de intoxicação for percebido o pesquisador responsável deve ser alertado para que possa tomar as providências para assisti-lo. Para minimizar qualquer outro possível risco, os participantes têm plena liberdade de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma. Informamos que não há benefícios diretos ou indiretos aos participantes, exceto os que podem ser produzidos pelos resultados desta pesquisa, com uma possível disponibilização de um produto menos calórico no mercado, no futuro. Caso haja danos decorrentes de sua participação na pesquisa, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelos mesmos.

A pesquisa será acompanhada integralmente pela pesquisadora responsável (Alessandra Lopes de Oliveira) e pela estudante Mariana Naomi Palombo, que se comprometem a cumprir integralmente as cláusulas deste termo.

Quaisquer outros esclarecimentos sobre a pesquisa poderão ser solicitados a qualquer momento através dos nossos contatos (e-mail: alelopes@usp.br ou telefone: 19 3565.4268). Após esses esclarecimentos, se aceitar participar deste estudo, assine este termo, o qual você tem direito a receber uma via assinada pela pesquisadora responsável.

Participante da pesquisa: _____

Pirassununga, ____ de ____ de 2021 Assinatura: _____

Pesquisadora responsável:

Prof. Dr. Alessandra Lopes de Oliveira

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FZEA – CEPH-FZEA sob número de parecer: 4.823.475 com data de aprovação em 02 de julho de 2021.

Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética e que não puder ser resolvida pelos pesquisadores, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa. Contato do CEPH: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FZEA/USP (CEPH/FZEA/USP). Av. Duque de Caxias Norte, 225. Jd. Elite. CEP: 13635-900 Pirassununga/SP. E-mail: cepfzea@usp.br. Fone: (19) 3565- 6759.

4 Convite enviado via e-mail para análise sensorial

Olá!

Você gosta de sobremesas geladas? Então venha participar da nossa análise sensorial de **Sorbet de Morango**.

A análise sensorial ocorrerá nos dias **20 (terça-feira)** e **21 de julho (quarta-feira)**, o tempo de análise será de aproximadamente **10 minutos**; e os horários disponíveis para agendamento são: 8hrs, 8h30, 9hrs, 9h30, 10hrs, 10h30, 11hrs, 11h30, 12hrs, 12h30, 13hrs, 13h30, 14hrs, 14h30, 15hrs, 15h30, 16hrs, 16h30, 17hrs, 17h30.

Os agendamentos podem ser realizados via WhatsApp ou e-mail.

 (016) 981559195

 marianpalombo@uzp.br

Como agradecimento, ao final da análise, você receberá um delicioso brinde contendo chocolate (twix ou tortugueta, a sua escolha), amendoim, paçoquita e bala.



Contamos com seu apoio e participação.
Qualquer dúvida estamos à disposição.

Ass: *Gabriela Mariana*

ATENÇÃO!

Por motivo de segurança para todos, para que não haja aglomeração e visando a manutenção de sua saúde, faremos agendamento de horário e, entre cada provador, as cabines serão higienizadas com álcool 70%.



5 Orientações fixadas na entrada do laboratório de análise sensorial



Análise sensorial de Sorbet Morango

Seja muito bem vindo(a),

Por favor aguarde ser chamado e mantenha sua máscara cobrindo boca e nariz até o momento em que as amostras serão entregues a você. E não se esqueça de recolocar a máscara de forma adequada antes de se levantar e deixar sua cabine.



Muito obrigada por sua participação e colaboração!



6 Aviso utilizado para demarcar cabines na análise sensorial

