



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

**ESTUDO DA ESTABILIDADE EM LONGO PRAZO E APLICAÇÃO DE
NANOLIPOSSOMAS CONTENDO NISINA E EXTRATO DE ALHO.**

Porto Alegre, 2020

CRISTIAN MAURICIO BARRETO PINILLA

**ESTUDO DA ESTABILIDADE EM LONGO PRAZO E APLICAÇÃO DE
LIPOSSOMAS CONTENDO NISINA E EXTRATO DE ALHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Porto Alegre, 2020

CIP - Catalogação na Publicação

Barreto Pinilla, Cristian Mauricio
ESTUDO DA ESTABILIDADE EM LONGO PRAZO E APLICAÇÃO
DE NANOLIPOSSOMAS CONTENDO NISINA E EXTRATO DE ALHO /
Cristian Mauricio Barreto Pinilla. -- 2020.
164 f.
Orientador: Adriano Brandelli.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Nanotecnologia. 2. Antimicrobianos naturais. 3.
Nisina. 4. Alho. 5. Lipossomas. I. Brandelli, Adriano,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio e suporte durante estes seis anos fora de casa, mesmo desde a distância a gente esta junto.

A minha segunda família, meus amigos do laboratório 218, que durante estes últimos anos brindaram apoio, alegria e muitas conversas científicas. Também pela parceria, nos momentos bons e ruins.

A meu orientador o Professor Adriano Brandelli, que acreditou neste trabalho, abriu as portas do laboratório para mi desde meu primeiro dia no ICTA. E desde esse momento foi um apoio constante, e um exemplo a seguir, como pesquisador e como pessoa. Agradeço muito a oportunidade de trabalhar com o senhor, é um grande privilegio e orgulho.

Ao ICTA pelo empréstimo de equipamentos para realização de análises.

A las doctoras Carmen, Pilar y Elvira, del ICTAN, Madrid. Por el recibimiento en sus laboratorios, su constante ayuda, soporte, enseñanzas.

A mis amigos, Ivan, Claudia, Lorena, Rodrigo y Manuel. Que desde Colombia me acompañaron en esta jornada.

Ao sensei Tiago Frossi, pelos ensinamentos. O karate Shotokan tem sido uma ferramenta importante de disciplina física e mental que guardarei para a vida toda.

A CAPES pela bolsa de estudo.

Agradeço a todas as pessoas e amigos que colaboraram para a realização deste trabalho.

Este trabalho é dedicado a minha mãe.

RESUMO

A necessidade por antimicrobianos naturais cresce continuamente à medida que as pessoas procuram alimentos mais saudáveis, criando um desafio para a ciência de alimentos devido a que as poucas alternativas existentes no mercado para empresas de alimentos, têm alto custo e baixa efetividade. Neste contexto, a nano-encapsulação de antimicrobianos naturais em lipossomas, surge como alternativa tecnológica para desenvolvimento de novos antimicrobianos para alimentos. Portanto, neste trabalho foram explorados o desenvolvimento, propriedades e aplicações de antimicrobianos naturais nanoencapsulados. Este trabalho está dividido em quatro partes. Na primeira parte do trabalho, foram estudados diferentes materiais estabilizantes da membrana lipídica, avaliando sua influência nas propriedades oxidativas, características físico-químicas e térmicas de lipossomas contendo a mistura de nisina-extrato de alho. Além disso, foi analisada a estabilidade das preparações lipossomais em estado líquido e liofilizados na presença e na ausência de lioprotector, durante cinco meses em refrigeração; foi concluído que o ácido oleico (AO) é um estabilizante promissor para os lipossomas, já que oferece maiores propriedades antioxidantes e de retenção da atividade antimicrobiana. A segunda parte descreve a aplicação AO-lipossomas contendo extrato de alho em pães de trigo. Estes lipossomas foram caracterizados em quanto a seu tamanho, carga, polidispersão, propriedades térmicas e atividade antifúngica *in vitro*, posteriormente foram adicionados a preparações de pão de trigo antes da etapa de forneado para avaliar mudanças da vida de prateleira. Como resultado foi observado que os lipossomas desenvolvidos apresentaram estabilidade térmica melhorada e quando empregados na formulação de pães de trigo, conseguiram retardar o aparecimento de bolores por até cinco dias. A terceira parte descreve o estudo da interação de lipossomas de diferentes composições e características físico-químicas com proteína miofibrilar de peixe (Surimi). Neste estudo foram avaliadas mudanças estruturais da proteína, mediante análise de FTIR, fluorescência, grupos sulfidril livres e microscopia eletrônica de transmissão. Como resultado, foi observado que lipossomas com grupos carregados na superfície produzem um alto grau de desnaturação da proteína, e lipossomas de composição de 100% fosfatidilcolina produziram desnaturação parcial e um possível efeito de fibrilação. Além disso, foram observadas diferentes dinâmicas de formação de corona proteica, nos lipossomas, dependendo da sua composição. Na quarta e última parte do trabalho se realizou um estudo comparativo da resposta metabólica de células de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, submetidas a concentrações subletais de nisina livre

e encapsulada em lipossomas. Através da extração e identificação de proteínas, foi possível identificar que a nisina livre e encapsulada induz um aumento na atividade metabólica, transcrição de proteínas de transporte e proteínas relacionadas à resposta ao estresse. Não entanto, somente a nisina livre induziu a transcrição das proteínas secD, lmo1539, YfhO e lmo0955, relacionadas com resposta ao estresse e mecanismos de resistência microbiana de *L. monocytogenes*; indicando que a encapsulação em lipossomas modifica o “reconhecimento” inicial da bacteriocina, por parte da bactéria, reduzido assim, fatores de estresse e resistência microbiana.

Palavras chave: Lipossomas, nisina, alho, Antimicrobianos para alimentos, *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

The need for natural antimicrobials continually grows as people seek healthier foods, creating a challenge for food science because the few alternatives on the market for food companies are costly and low effective. In this context, the nano-encapsulation of natural antimicrobials in liposomes, appears as a technological alternative for the development of new antimicrobials for food. Therefore, in this work were explored the development, properties and applications of nano-encapsulated natural antimicrobials. This work is divided in four parts. In the first part of the work, different stabilizing materials of the lipid membrane were studied, evaluating its influence on the oxidative properties, physical-chemical and thermal characteristics of liposomes containing the mixture of nisin-garlic extract. In addition, the stability of liposomal preparations in liquid and lyophilized form was analyzed in the presence and absence of lyoprotectant, for five months in refrigeration; it was concluded that oleic acid (OA) is a promising stabilizer for liposomes, as it offers greater antioxidant properties and retention of antimicrobial activity. The second part describes the application OA-liposomes containing garlic extract in wheat breads. These liposomes were characterized in terms of their size, charge, polydispersity, thermal properties, and antifungal activity *in vitro*, were later added to wheat bread preparations before the baking step to evaluate changes in shelf life. As a result, it was observed that the developed liposomes showed improved thermal stability and when used in the formulation of wheat breads, they managed to delay the appearance of molds for up to five days. The third part describes the study of the interaction of liposomes of different compositions and physicochemical characteristics with fish myofibrillar protein (Surimi). In this study, structural changes of the protein were evaluated, through analysis of FTIR, fluorescence, free sulfhydryl groups and transmission electron microscopy. As a result, it was observed that liposomes with charger groups on the surface produce a high degree of protein denaturation, and liposomes of 100% phosphatidylcholine composition produced partial denaturation and a possible fibrillation effect. In addition, different dynamics of protein corona formation were observed in liposomes, depending on their composition. In the fourth and last part of the work, was carried out a comparative study of the metabolic response of *Listeria monocytogenes* cells ATCC 7644, submitted to sublethal concentrations of free and encapsulated nisin in liposomes. Through protein extraction and identification, it was

possible to identify that free and encapsulated nisin induces an increase in metabolic activity, transcription of transport proteins and proteins related to the stress response. However, only free nisin induced the transcription of *secD*, *lmo1539*, *YfhO* and *lmo0955* proteins, related to the stress response and microbial resistance mechanisms of *L. monocytogenes*; indicating that encapsulation in liposomes modifies the initial bacteriocin “recognition” by the bacteria, thus reducing stress factors and microbial resistance.

Keywords: Liposomes, nisin, garlic, Antimicrobials for food, *Listeria monocytogenes*

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1- Estrutura geral da fosfatidilcolina.....	7
Figura 2- Estrutura geral dos lipossomas.....	8
Figura 3- Vários tipos de compostos bioativos hidrofílicos que podem ser incorporados no interior hidrofílico (W ₂) de lipossomas.....	9
Figura 4- Imagem do alho (<i>Allium sativum</i> L.).....	13
Figura 5- Estruturas químicas dos principais compostos organossulfurados do alho.....	15
Figura 6- Nisina e seu mecanismo de atividade contra bactérias.....	18

SUMÁRIO

1	Introdução	2
2	Objetivos	4
2.1	Objetivo Geral	4
2.2	Objetivos específicos.....	4
3	Revisão Bibliográfica	5
3.1	Nanotecnologia na indústria de alimentos	5
3.2	Lipossomas: Estrutura e propriedades.....	6
3.3	Aplicações de lipossomas em alimentos	9
3.4	Estabilidade e liofilização de lipossomas.....	91
3.5	Alho (<i>Allium sativum</i> L).....	113
3.6	Compostos bioativos do alho	14
3.7	Atividade antioxidante e antimicrobiana do alho.....	15
3.8	Nisina.....	16
4	Artigo 1	20
5	Artigo 2.....	55
6	Artigo 3.....	84
7	Artigo 4.....	113
7.1	Supplementary material (artigo 4).....	139
8	Conclusões.....	146
9	Considerações finais.....	147
10	Referências Bibliográficas.....	148

1. Introdução

O uso de bioconservantes em alimentos vem tornando-se um campo de pesquisa cada vez mais importante. Esta tendência é parcialmente impulsionada pelo surgimento de um número crescente de relatos relacionando produtos químicos em alimentos ao desenvolvimento de doenças crônicas (SEOW et al., 2014). Na atualidade, compostos naturais, como peptídeos e extratos de plantas, apresentam grande potencial de uso em substituição aos conservantes químicos, tendo na nanotecnologia uma ferramenta de desenvolvimento tecnológico para sua aplicação em alimentos, a fim de superar as desvantagens da sua aplicação direta.

A nanotecnologia pode ser utilizada para melhorar a estabilidade antimicrobiana em alimentos, geralmente mostrando vantagens em comparação com os compostos bioativos livres. Nanoestruturas utilizadas como veículos para proteger compostos de interesse, como antimicrobianos, têm sido amplamente estudadas na última década, já que com a encapsulação podem sobreviver à exposição de diferentes estresses ambientais e ajudar no controle de bactérias patogênicas, melhorando assim a sua estabilidade e eficácia (BRANDELLI, 2012).

Dentre as nanopartículas mais empregadas, os lipossomas têm recebido atenção especial. A crescente aplicação destes em alimentos se deve às vantagens que os lipossomas podem fornecer ao serem usados como sistemas encapsulantes de substâncias bioativas, podendo ser utilizados para liberação controlada de componentes funcionais, tais como: proteínas, enzimas, vitaminas, entre outros componentes que podem ser utilizados com o intuito de alterar o sabor ou o aroma dos alimentos (MCCLEMENTS, 2015).

Lipossomas são vesículas esféricas, formados por membranas anfipáticas de bicamadas fosfolipídicas com núcleo aquoso. Têm sido amplamente investigados nos últimos anos, como carreadores coloidais, já que possuem múltiplas vantagens, como a biodegradabilidade, biocompatibilidade e capacidade de liberação controlada de compostos (NEETHIRAJAN & JAYS, 2011). Os lipossomas podem ser utilizados numa vasta gama de aplicações, devido às suas características físicas e químicas, e sua capacidade de incorporar compostos lipofílicos, anfifílicos e/ou hidrofílicos (MCCLEMENTS, 2015). Apresentam ainda diferentes desvantagens como baixa estabilidade e tendência à aglomeração, que podem ser resolvidos facilmente com a liofilização e a adição de estabilizantes (ADITYA et al., 2015).

O alho (*Allium sativum* L.) é uma planta amplamente distribuída em todas as partes do mundo, utilizada não somente como condimento, mas também é considerada uma fonte rica de outros fitonutrientes não voláteis, com importantes propriedades medicinais e terapêuticas. Tais características são atribuídas ao seu conteúdo de flavonoides, saponinas e sapogeninas, compostos fenólicos, óxidos de azoto, amidas e proteínas (LANZOTTI et al., 2014). Com o uso popular do alho, reconhecido como fito terapêutico pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na RDC nº 26 de 13 de maio 2014 (BRASIL, 2014), e a grande procura pela descoberta de novos produtos naturais com atividade antimicrobiana, surge necessidade de realização de estudos que forneçam parâmetros mais precisos quanto ao seu real potencial antimicrobiano. Neste contexto a alicina, principal componente responsável pela atividade antimicrobiana, é um potencial conservante para ser utilizado na indústria de alimentos. No entanto, a alicina é volátil, e sua estabilidade é baixa. Além disso, pode facilmente causar irritação da mucosa gástrica humana e é susceptível à oxidação por luz e calor (BOSE et al., 2014).

A nisina é uma bacteriocina de amplo espectro, com atividade contra bactérias Gram-positivas e alguns microrganismos associados ao deterioro de alimentos (GHARSALLAOUI et al., 2016). Seu uso como um bioconservante de alimentos é limitado pela falta de efeito contra as bactérias Gram-negativas; Deve também notar-se que a nisina não tem atividade inibidora contra células de levedura, fungos filamentosos e vírus. Em circunstâncias normais, as bactérias Gram-negativas são geralmente resistentes à nisina, principalmente devido às suas membranas externas impermeáveis (GÄNZLE et al., 2003). A combinação de bacteriocinas com outros mecanismos de conservação tem sido relatada como alternativa para reduzir a resistência a bacteriocinas em bactérias e também como meio para ampliar sua atividade inibitória para espécies Gram-negativas (BELFIORE et al., 2007, PINILLA & BRANDELLI, 2016).

Neste contexto, o presente estudo foi focado no desenvolvimento e caracterização de sistemas nano estruturados de fosfolipídios, para incorporação de extrato de alho e nisina com propriedades antibacterianas de amplo espectro, estudando as suas propriedades durante longos períodos de estocagem, sua interação com o alimento, sua aplicação *in situ* e finalmente analisando a interação lipossoma-bactéria. Os resultados deste trabalho proporcionam informações de interesse para novos estudos sobre formulações com lipossomas que contenham misturas complexas de compostos bioativos, empregando como modelo a nisina e os compostos do extrato do alho, explorando seu potencial antimicrobiano contra diversas espécies bacterianas e fúngicas em alimentos, assim como avaliando

aplicações inovadoras em alimentos, que façam possível uma real aplicação desta tecnologia na indústria de alimentos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolver lipossomas contendo nisina e extrato de alho, avaliando sua estabilidade, propriedades e potenciais aplicações.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver nano-lipossomas através da metodologia de hidratação de filme lipídico com adição de estabilizantes (colesterol, ácido oleico e octadecilamina) incorporando a mistura de extrato de alho/nisina, avaliando suas características e seu *shelf life* mediante o seguimento de parâmetros de estabilidade e atividade ao longo do tempo.
- Desenvolver lipossomas de alta estabilidade contendo extrato de alho para aplicação em panificação, avaliar suas características físico-químicas e estudando sua aplicação *in situ* em pães de trigo.
- Estudar a interação lipossoma-proteína miofibrilar, mediante a observação de mudanças estruturais da proteína frente a lipossomas com diferentes características de composição, carga e tamanho.
- Investigar os efeitos de concentrações subletais de nisina livre e nano-encapsulada no perfil proteômico de *L. monocytogenes* ATCC 7466, para determinar diferenças na resposta de estresse celular e produção de fatores de virulência nesses tratamentos.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Nanotecnologia na indústria de alimentos

Nanociência e nanotecnologia apresentam um grande potencial em várias áreas do conhecimento, incluindo química, física, ciências da vida, medicina e engenharia. Representa, portanto, uma convergência real entre os diversos campos do conhecimento (ROSSI et al, 2014; KHAN et al., 2015). Diversos projetos de pesquisa e desenvolvimento extensivos estão em andamento com o objetivo de ganhar vantagem competitiva e participação de mercado. Para uma indústria onde a concorrência é intensa e inovação é vital, as nanotecnologias têm surgido como um auxílio potencial para avanços na produção de alimentos de melhor qualidade e com propriedades funcionais (CUSHEN et al., 2012).

As oportunidades e vantagens da nanotecnologia estão se expandindo rapidamente em todos os campos e muitos países estão investindo grandes quantidades de recursos em pesquisa como o governo dos EUA, quem com o objetivo de ter uma grande participação nestas tecnologias, forneceu em 2016 mais de US\$ 1,5 bilhões para a National Nanotechnology Initiative (NNI), um investimento contínuo em apoio das prioridades do governo e sua estratégia de inovação. Os grandes investimentos dos países como EUA, estão ligados ao impacto da nanociência em campos ligados à saúde e bem-estar que são hoje muito fortes. Espera-se que as aplicações de nanotecnologias tragam grandes benefícios para o setor de alimentos e nutrição. Os fenômenos que ocorrem em escala nanométrica oferecem muitas oportunidades de inovação que tem o potencial de impactar substancialmente a indústria de alimentos em todo o mundo. As nanotecnologias podem ser aplicadas a toda a cadeia alimentar, desde a produção até o processamento, incluindo sistemas de liberação controlada de compostos, embalagens e produtos para segurança dos alimentos (BRANDELLI & TAYLOR, 2015; CUSHEM et al., 2012, SILVESTRE et al., 2011). A nanotecnologia pode fornecer novas formas e ferramentas para controlar as propriedades e estruturas dos alimentos, introduzindo novos recursos, que podem acrescentar valor a estes produtos.

Os nano materiais são caracterizados por terem pelo menos, uma dimensão com comprimento entre 1 nm e 100 nm, embora o limite superior de 100 nm seja utilizado por consenso geral sem qualquer evidência científica, para apoiar um desaparecimento de nanopropriedades acima deste valor. Alguns autores sugeriram considerar produtos derivados da nanotecnologia como materiais exibindo propriedades ou fenômenos (incluindo efeitos

biológicos) que são atribuíveis às suas dimensões, mesmo que esta esteja fora da faixa de nano escala dos 100 nm (TINKLE et al., 2014).

Um grande número de nutracêuticos e suplementos nutricionais que contêm nano-ingredientes e aditivos (por exemplo, vitaminas, antimicrobianos, antioxidantes) estão disponíveis no mercado. Estes produtos tipicamente oferecem maior absorção e biodisponibilidade dos ingredientes no corpo. Mesmo assim, as funcionalidades de tais nano materiais, como o tamanho de partículas, distribuição do tamanho, índice de polidispersividade e carga elétrica da superfície, podem ser afetadas pela matriz biológica onde eles são colocados (POWERS et al., 2006), como por exemplo a composição de um alimento.

Embora existam muitos benefícios dessas tecnologias há também preocupação com potenciais efeitos negativos. No caso das partículas de tamanho nanométrico que entram em contato com o corpo humano, por exemplo, a redução no tamanho de partícula associada com a nanotecnologia tem potencial de reduzir a eficácia das barreiras à penetração de matérias estranhas no corpo humano permitindo seu livre movimento dentro do corpo (CUSHEN et al., 2012), resultando no acúmulo de contaminantes tóxicos e, por conseguinte, afetando de forma adversa a saúde humana (CHAU et al., 2007).

3.2. Lipossomas: Estrutura e propriedades

Nanopartículas a base de lipídeos (composta por fosfolipídios, triacilglicerídeos, ácidos graxos, entre outros) são amplamente estudadas, uma vez que podem ser produzidas a partir de ingredientes naturais, podendo encapsular compostos com diferentes solubilidades e ser aplicados em nível industrial (PETERS et al., 2011).

Lipossomas são vesículas de bicamada concêntricas, onde o volume aquoso está inteiramente fechado através de uma bicamada lipídica composta principalmente de fosfolipídios, sendo este o nome dado a lipídeos que possuem um resíduo de ácido fosfórico em sua estrutura. Tal molécula possui duas caudas hidrofóbicas ou apolares, compostas de hidrocarbonetos, e um grupo hidrofílico chamado de cabeça polar (RAWAT et al., 2006). A Figura 1 mostra uma molécula de fosfatidilcolina, um tipo de fosfolipídio cujo grupo polar é a colina.

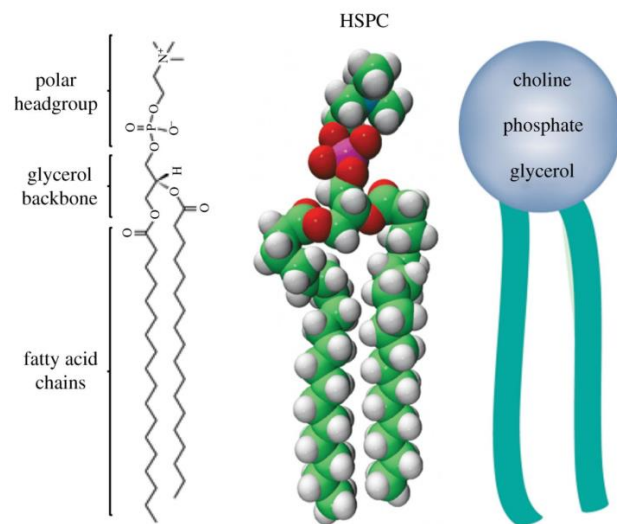


Figura. 1: Estrutura geral da fosfatidilcolina. (MONTEIRO et al 2014)

As moléculas de fosfolípídios são insolúveis em água, porém, quando em ambientes aquosos, dependendo da concentração e da temperatura, formam dispersões e se ordenam em agregados, onde a parte hidrofílica fica em contato com a água, enquanto a parte hidrofóbica se localiza no interior da estrutura, formando as bicamadas lipídicas devido às interações hidrofílicas entre grupos de cabeças polares e interações de van der Waals entre cadeias de hidrocarbonetos com a água (FRÉZARD et al 2005; MCCLEMENTS, 2015). Em solução aquosa, acima de uma determinada concentração, dependendo da temperatura, tais bicamadas lipídicas curvam-se sobre si mesmas dando origem aos lipossomas, onde os fosfolípídios encapsulam parte do meio aquoso onde estão inseridos. A caracterização dos lipossomas é realizada pelo tamanho, carga da superfície e número de bicamadas (RAWAT et al., 2006). Com base no número de bicamadas e vesículas, os lipossomas são classificados como vesículas univesiculares (ULVs, 25 nm a 1 µm), ou vesículas multilamelares (MLVs, 0,1-15 µm) ou vesículas multivestibulares (MVVs, 1,6-10,5 µm), representadas na Figura 2.

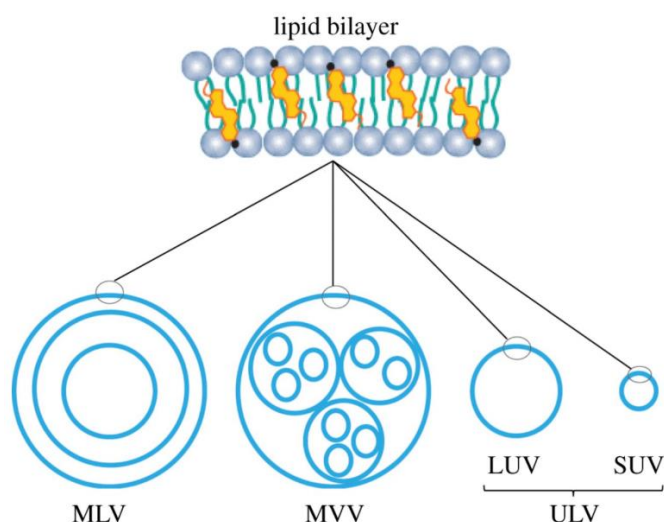


Figura. 2: Estrutura geral dos lipossomas. (MONTEIRO et al 2014). Vesículas univesiculares (ULV), vesículas multilamelares (MLV), vesículas multivesticulares (MVV).

Nanolipossomas são definidos como vesículas de bicamada lipídica (vesículas <30 ou 30-100 nm), que possuem e mantêm o tamanho nanométrico durante a aplicação e armazenamento. A característica comum de moléculas formadoras de bicamadas está na sua anfifilicidade, isto é, possuem regiões polares e não polares definidas que podem reter, entregar e controlar a liberação de materiais solúveis em água e lipídeos (BOUWMEESTER et al., 2009).

A aparência das suspensões de lipossomas depende da sua estrutura, determinando o seu comportamento de dispersão de luz. Suspensões que possuem lipossomas pequenos se apresentam opticamente transparentes, devido ao fato de não dispersarem a luz fortemente, enquanto que as suspensões que contêm lipossomas maiores podem apresentar turbidez (KHLEBTSOV, 2001). As características elétricas dos lipossomas dependem do tipo e da concentração de fosfolipídios dentro da formulação, apresentando para a fosfatidilcolina grupos catiônicos e aniônicos ligados na sua cabeça hidrofílica. O grau de ionização dos grupos de cabeça varia de acordo com o pH, onde a carga da fosfatidilcolina pode ser negativa em valores altos de pH e positiva em pH baixo (MCCLEMENTS, 2015; SINGH et al., 2012). As interações eletrostáticas podem promover a agregação dos lipossomas, afetando a sua estabilidade. Para isso, alternativas tem sido utilizadas, como o revestimento da superfície das vesículas com certos polímeros, tais como polietileno glicol (PEG) e quitosana, ou através da utilização de ingredientes catiônicos/aniônicos na estrutura dos lipossomas. Assim, se torna desejável maximizar as forças de repulsão entre as vesículas

para evitar a agregação e sedimentação das mesmas durante o armazenamento, aumentando sua estabilidade. Em geral, as partículas com valores de potencial zeta maiores que +30 mV ou menores que -30 mV possuem maior duração de estabilidade eletrostática (MOZAFARI et al., 2008).

3.3. Aplicação de lipossomas em alimentos

A crescente aplicação de lipossomas na área alimentícia é devida às vantagens que os lipossomas podem fornecer ao serem usados como sistemas encapsulantes de substâncias bioativas, como a proteção de tais substâncias contra alterações químicas e enzimáticas, bem como da temperatura e a variação da força iônica (MOZAFARI et al., 2008).

Numerosos tipos de bioativos hidrofílicos podem ser potencialmente incorporados na fase interna aquosa de lipossomas, incluindo pequenas moléculas e íons (tais como sais, açúcares, peptídeos), biopolímeros (proteínas e polissacarídeos), e partículas (gotículas lipídicas, nanopartículas, e probióticos) (Figura 3). Uma variedade de moléculas bioativas hidrofóbicas (como, vitaminas A, D, E, carotenoides, e coenzima Q10) e hidrofílicos (por exemplo, vitamina C, ferro, cálcio) foram anteriormente incorporados em sistemas de liberação controlada baseados em lipossomas (SINGH et al., 2012).

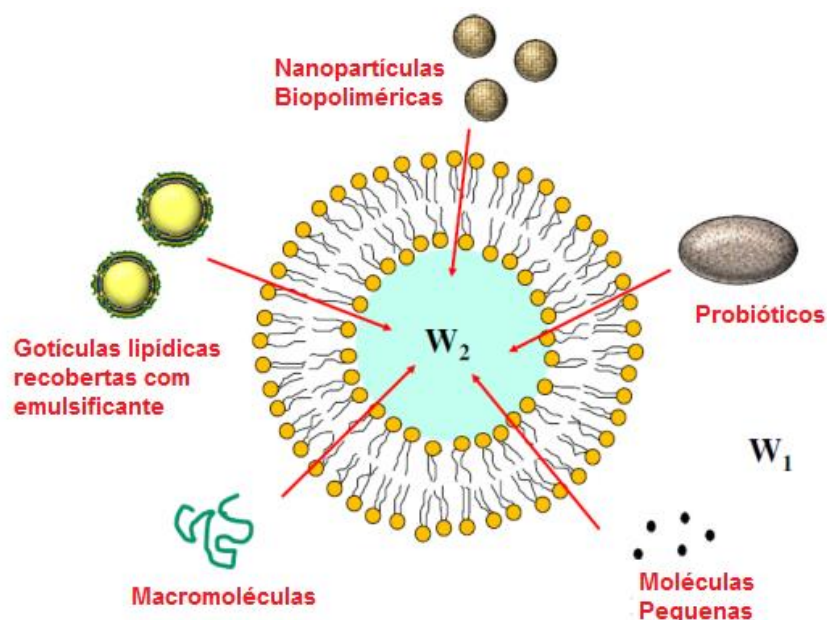


Figura 3. Vários tipos de compostos bioativos hidrofílicos que podem ser incorporados no interior hidrofílico (W₂) de lipossomas. Adaptado de MCCLEMENTS (2014).

Um dos primeiros relatos da aplicação de lipossomas em alimentos foi na fabricação de queijo por LAW e KING (1985), com o objetivo de diminuir o tempo e custo de maturação. Para isso, foram adicionadas proteinases encapsuladas em lipossomas na mistura do queijo, demonstrando que a atividade e a estabilidade das enzimas foram melhores com a encapsulação, além de melhorar o sabor do queijo e diminuir os custos de produção.

TONIAZZO et al. (2014) estudaram a encapsulação de β -caroteno em lipossomas para a aplicação em iogurte. Os lipossomas foram capazes de proteger o β -caroteno da degradação por um período de até 95 dias e, quando aplicados nos iogurtes, mostraram que a textura não foi afetada, sugerindo que uma parte dos corantes artificiais poderiam ser substituídos pelos lipossomas encapsulando β -caroteno. Lipossomas foram estudados como transportadores de vitamina C e E, com o objetivo de serem incorporados em suco de laranja. A combinação de formulações de lipossomas e vitaminas não alterou as características organolépticas do suco de laranja, além disso, mostrou estabilidade microbiológica após a pasteurização e armazenamento a 4°C, por 37 dias (MARSANASCO et al., 2011).

Peptídeos antimicrobianos têm sido extensivamente estudados como potenciais bioconservadores, porém, sua atividade antimicrobiana pode ter seu efeito diminuído devido à degradação proteolítica e a interação do peptídeo antimicrobiano com os componentes alimentares. A encapsulação de bacteriocinas em lipossomas pode ser uma alternativa para ultrapassar esse problema (MAHERANI et al., 2011). Neste contexto, MALHEIROS, DAROIT e BRANDELLI (2012) investigaram a eficácia da nisina livre e encapsulada em nanolipossomas para o controle de *Listeria monocytogenes* em queijo minas frescal. Para isso a nisina comercial foi encapsulada em lipossomas de lecitina de soja parcialmente purificada. Os resultados mostraram efeito bactericida com 0,25 mg/mL de nisina livre; efeito bacteriostático para nisina encapsulada em lipossomas e com 0,1 mg/mL de nisina livre. Adicionalmente nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido diversos trabalhos de encapsulação de nisina em lipossomas recobertos com polissacarídeos (LOPES et al., 2017), contendo extrato de alho, (PINILLA et al., 2017) e com a mistura nisina-extrato de alho, (PINILLA et al., 2016), demonstrando assim as diversas aplicações de este sistema para encapsulamento de antimicrobianos naturais.

É importante notar, no entanto, que o uso potencial de lipossomas como portadores de ingredientes ativos alimentares pode às vezes ser limitado por suas instabilidades físicas e químicas em dispersões aquosas, especialmente para armazenamento de longo prazo (CHEN et al., 2010), devido a existirem diversos desafios que atualmente limitam a sua aplicação

generalizada na indústria de alimentos. Primeiro, são de difícil fabricação em larga escala de forma viável e o processo tem um alto custo. Em segundo lugar, muitas vezes eles têm uma fraca estabilidade física nas condições de processamento e armazenamento de muitos produtos alimentares. Terceiro, eles tipicamente têm uma baixa eficiência de encapsulação para bioativos hidrofílicos porque uma fração apreciável permanece fora dos lipossomas durante o processo de encapsulação (MCCLEMENTS, 2015). No entanto, os avanços na tecnologia de ingredientes, operações de processamento e mecanismos de estabilização, podem levar à utilização mais generalizada de lipossomas na indústria de alimentos.

Neste contexto a liofilização, um processo muito comumente usado na indústria alimentícia, também pode ser empregada como método para estabilizar e preservar lipossomas e estender seu prazo de validade. No entanto, a liofilização de lipossomas pode ter uma grande desvantagem, principalmente o enfraquecimento da membrana das vesículas e perda de integridade. Este problema pode ser gerenciado pelo acoplamento de formulações específicas e parâmetros operacionais apropriados durante a liofilização (CHEN et al., 2010).

3.4. Estabilidade e liofilização de lipossomas

Um desafio no uso de lipossomas em alimentos é sua instabilidade em dispersões aquosas. Eles podem sofrer degradação química e física, eventualmente resultando em eficácia reduzida devido à diminuição da qualidade da formulação e, em alguns casos, até mesmo a geração de produtos de degradação. Os principais mecanismos de degradação responsáveis pela limitada estabilidade química dos fosfolípidios utilizados em formulações lipossômicas são a oxidação e hidrólise (GRID & CROMMELIN, 1993). Embora todos os tipos de ácidos graxos sejam suscetíveis à oxidação por meio do mecanismo em cadeia dos radicais livres, os ácidos graxos insaturados são em geral mais propensos à oxidação do que ácidos gordos saturados devido à presença de ligações duplas nas caudas lipídicas (MOHAMMED et al., 2006). Até certo nível, o processo de oxidação pode ser desacelerado com a adição de antioxidantes adequados ou por armazenamento em atmosferas modificadas. A hidrólise de ligações éster, resultando na geração de ácidos graxos livres, lisofosfolípidios e fosfoglicerol compostos, também pode ser problemático em relação à estabilidade em longo prazo dos lipossomas (ZUIDAM et al., 1995).

A desestabilização física dos lipossomas inclui a fusão de bicamadas de membrana, agregação, diminuição da retenção de materiais encapsulados e conversão em, por exemplo, estruturas micelares, e pode ser mais pronunciada após alterações químicas (INGVARSSON et al., 2011). Todos esses fatores afetam a qualidade da formulação final, e é importante prever soluções para esse problema. Como esses processos ocorrem principalmente em um ambiente aquoso, uma opção é liofilizar as formulações de lipossomas. A estabilização é conseguida reduzindo o teor de água empregando a liofilização. Esta estabilidade melhorada elimina a necessidade da "cadeia de frio" durante a distribuição do produto, que é de grande importância para manter os custos baixos e assegurar produtos estáveis, em especial para a distribuição nos países em desenvolvimento (INGVARSSON et al., 2011). Um processo típico de liofilização consiste em três fases, ou seja, congelamento, secagem primária e secagem secundária. A fase de congelamento é um passo de resfriamento onde a maior parte do solvente (por exemplo, água) é separada dos lipossomas e aditivos, resultando na formação de gelo.

Diversos estudos demonstraram a viabilidade do processo de liofilização de lipossomas como uma boa alternativa para superar problemas com a instabilidade físico-química de dispersões aquosas de lipossomas e sua alta suscetibilidade à contaminação microbológica. Não entanto, muitos fatores que afetam este processo, como a seleção de lioprotetores, a composição da bicamada lipossômica e os protocolos de liofilização, que precisam ser melhorados para obter uma alta retenção dos compostos após a liofilização. (CHEN et al., 2010). A relativa novidade desta tecnologia exige maiores esforços para entender melhor os processos de liofilização de lipossomas e encontrar aplicações apropriadas para esta tecnologia muito interessante e promissora, especialmente para bioativos hidrofóbicos, como carotenoides, óleos essenciais, curcuminoides, flavonoides hidrofóbicos, peptídeos hidrofóbicos, bem como lipídios funcionais (TONIAZZO & PINHO, 2016). A exploração de tecnologias adequadas para a produção de lipossomas é muito importante, pois a liofilização já é um processo amplamente conhecido na indústria alimentícia e, portanto, não seria um limitante no desenvolvimento de um sistema de produção de fosfolipídios liofilizados. Além disso, a caracterização dos pós obtidos é necessária não apenas para elucidar os mecanismos físico-químicos da lioproteção, mas também para otimizar processos de secagem por congelamento e para obter lipossomas liofilizados com características únicas, tais como prazo de validade prolongado,

compatibilidade com os requisitos de embalagem de ingredientes alimentares e armazenamento (TANIAZZO & PINHO, 2016).

3.5. Alho (*Allium sativum* L.)

Historicamente o alho tem sido ressaltado como parte de uma dieta saudável. Em textos médicos antigos do Egito, Grécia, Roma, China e Índia o alho é prescrito para uma série de aplicações, incluindo a melhoria do desempenho físico, reduzindo infecções, e protegendo contra toxinas (RIVLIN, 2001). Estas propriedades medicinais, juntamente com suas características de sabor, fizeram do alho um verdadeiro ícone cultural em muitas partes do mundo. Assim, o alho é utilizado tradicionalmente como um intensificador de sabor e tem sido reconhecido não somente como um condimento alimentar, mas também um potente agente terapêutico (YUN et al., 2014).

O alho é originário de zonas temperadas da Ásia Central onde é conhecido popularmente como alho comum. É uma planta herbácea da família *Alliaceae*, de porte baixo, que atinge 0,40-0,70 m de altura. Tem folhas lanceoladas, as quais formam o pseudocaule implantando-se em um caule pequeno e achatado e as gemas do caule formam os bulbilhos (dentes), que em conjunto formam o bulbo (Figura 4). Os bulbilhos têm morfologia ovoide-arqueada e às vezes levemente periforme, que encontram-se envolvidos por uma ou mais folhas protetoras de coloração branca arroxeadada. O bulbo é arredondado, periforme e constituído por aproximadamente 5 a 20 bulbilhos (HARVEY, 1995).



Figura 4. Imagem do alho (*Allium sativum* L.), fonte : EMBRAPA, Hortaliças Folders 2013.

O alho apresenta grande importância socioeconômica no Brasil, com uma produção de 132.1 mil toneladas em 2017 segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Também é importante ressaltar que o Brasil é o segundo consumidor de alho no mundo, alcançando 1,50 Kg de alho/habitante/ano, perdendo somente para a China. Mesmo assim a produção nacional abastece somente 44% do consumo da população e os outros 56% são importados, principalmente da China (40%) e da Argentina (20%), segundo a Associação Nacional de Produtores de Alho (ANAPA 2018).

Do ponto de vista tecnológico, o uso de alho fresco e seus derivados tem sido estudado por muitos autores devido à sua atividade antioxidante e antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica e antiparasitária), (ALORAINY et al., 2011; PÂRVU et al., 2011). A ruptura dos bulbos de alho leva à formação de tiossulfatos, nos quais o composto precursor alliina é transformado em alicina (tiossulfato de dialil) por ação enzimática; A alicina é o composto bioativo mais importante no alho devido à sua ampla atividade funcional e altas concentrações (BOSE et al., 2014). No entanto, a alinase, que catalisa a conversão de alliina em alicina, é termo lábil, assim como a alicina; o último se decompõe em poucas horas para formar compostos de enxofre mais estáveis, com atividade reduzida.

3.6 Compostos bioativos do alho

O alho possui uma variedade de compostos bioativos, incluindo compostos organossulfurados, saponinas, compostos fenólicos e polissacarídeos (SZYCHOWSKI et al., 2018). Os principais componentes ativos do alho (Figura 5) são seus compostos organossulfurados, como dialil tiossulfonato (alicina), dialil sulfeto (DAS), dialil dissulfeto (DADS), dialil trissulfeto (DATS), E / Z-ajoeno, S-alil -cisteína (SAC) e sulfóxido de S-alil-cisteína (alina) (YOO et al., 2014; KODERA et al., 2017). Além disso, o alho contém mais de 20 compostos fenólicos, com conteúdo mais alto do que muitos vegetais comuns (LIU et al., 2018). O principal composto fenólico descrito é o ácido β -resorcílico, seguido pelo pirogalol, ácido gálico, rutina, ácido protocatecúico e quercetina (NAGELLA et al., 2014). Além disso, foi relatado que os polissacarídeos do alho contêm 85% de frutose, 14% de glicose e 1% de galactose (HANG, 2005).

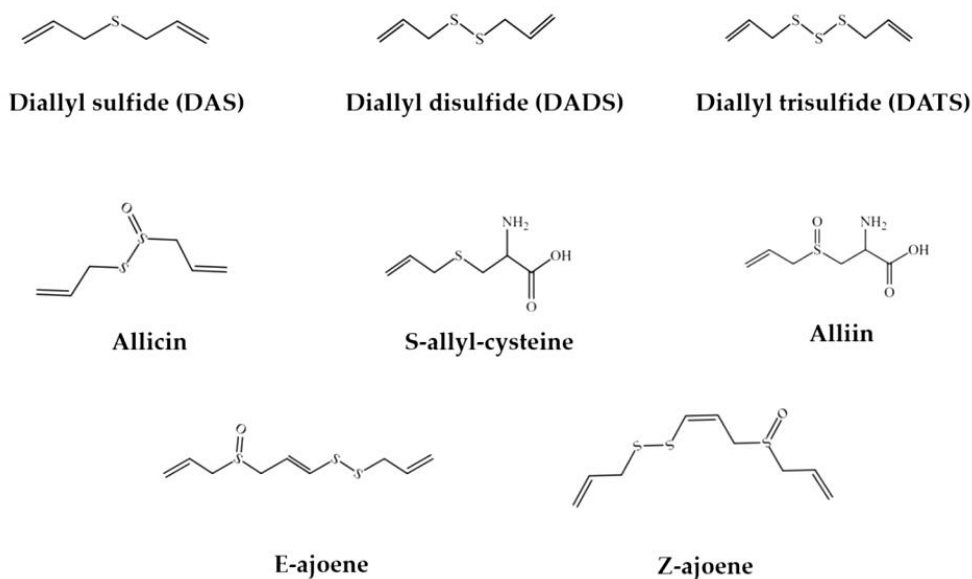


Figura 5. Estruturas químicas dos principais compostos organossulfurados do alho. (SHANG et al., 2019).

3.7 Atividade antioxidante e antimicrobiana do alho

Atividade antioxidante

Diversos estudos tem demonstrado que o alho tem fortes propriedades antioxidantes. Em um recente estudo (LOCATELLI, et al., 2017), foram avaliada as capacidades antioxidantes do alho cru e cozido, pelo ensaio de eliminação do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), eliminação de radicais 2,2'-Azino-bis ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) e ensaio de poder antioxidante redutor de íons férricos (FRAP), onde foi constatado que o alho cru exibia atividade antioxidante mais forte. Em outro estudo, os resultados dos ensaios de DPPH e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) mostraram que o extrato etanólico de brotos de alho exibia atividades antioxidantes mais fortes que o extrato etanólico de alho cru (ZAKAROVA et al., 2014). Por tanto o alho e seus ingredientes ativos (como fenóis e saponinas) têm efeitos antioxidantes demonstrados, mas os diferentes métodos de processamento afetam a atividade antioxidante do alho.

Atividade antimicrobiana

O alho possui um amplo espectro de propriedades antibacterianas e antifúngicas (LIU et al., 2017). Os compostos organossulfurados presentes do alho são responsáveis por sua

atividade antimicrobiana, sendo a alicina o principal composto responsável pela sua atividade antimicrobiana. De entre os mecanismos propostos para a atividade antimicrobiana da alicina, incluem: 1) capacidade de permear a membrana e capacidade de destruir a estrutura celular, (LI et al., 2016; PRAGER-KHOUTORSKY et al., 2007); 2) capacidade de alterar a expressão gênica dos microrganismos, (LI et al., 2016); 3) reatividade com enzimas que contêm grupos tiol, induzindo assim o estresse oxidativo (RABINKOV et al., 1998). De entre as diversas formas de obter os compostos bioativos do alho, o óleo essencial de alho tem sido um dos produtos mais amplamente estudados, demonstrando atividades antibacterianas e bacteriostáticas contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (GUO, 2014). Em outro trabalho, verificou-se que o óleo essencial de alho inibia o fungo *Penicillium funiculosum*, provavelmente penetrando nas células e organelas, destruindo a estrutura celular e induzindo o vazamento de macromoléculas do citoplasma (LI et al., 2014). O alho cru e extratos de alho tem sido objeto de estudo. Em um ensaio clínico, o tratamento com alho cru inibiu o *Helicobacter pylori* no estômago de pacientes com infecção por esta mesma bactéria (ZARDAST et al., 2016) e mais recentemente, foi demonstrado o efeito anti-biofilme de nano partículas carregadas de extrato de alho contra (MRSA) *Staphylococcus aureus* (GIRISH et al., 2019). Adicionalmente, no nosso grupo de pesquisa demonstramos o potencial do extrato de alho livre e encapsulado em lipossomas no controle de *Listeria monocytogenes* (PINILLA et al., 2017).

3.8 Nisina

O antimicrobiano nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, pertencente à família de lantibióticos, na qual contém grupos de lantionina e metil lantionina. A nisina é um peptídeo antimicrobiano catiônico e anfifílico, que possui ponto isoelétrico acima de 8,5 e tem sido utilizado como conservante em alimentos, por ser eficiente em baixo pH e a altas temperaturas (SALMIERI et al., 2014; MEIRA et al., 2015).

A nisina é um polipeptídeo pequeno, com 34 aminoácidos, que se apresenta com as variantes A, Z, M, Q, que são produzidos por *Lactococcus lactis*, enquanto os tipos U e U2 são obtidos a partir de *Streptococcus uberis*, e nisina P é produzida por *Streptococcus suis* e *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (QI et al., 2012; WU et al., 2014). As variantes A e Z se diferem por um único aminoácido na posição 27, sendo histidina em nisina A, e asparagina em nisina Z. Dentre esses tipos, a nisina A é considerado o mais ativo contra patógenos (PROMBUTARA et al., 2012). Quando aplicada em combinação com o

calor e baixo pH, a nisina aumenta sinergicamente a sua atividade contra esporos. AOUADHI et al. (2016) concluíram que os esporos de *Bacillus sporothermodurans* LTS27 submetidos a meio ácido sofrem alterações morfológicas. Estas alterações podem torná-los mais sensíveis à inativação por tratamento térmico em combinação com nisina, o que torna este processo muito eficaz em produtos alimentares de baixa acidez e com tratamento térmico.

A viabilidade do uso da nisina está baseada em que bactérias lácticas (BAL) e seus metabólitos têm sido processados e consumidos em todo o mundo, sem efeitos adversos. Alimentos contendo bacteriocinas, compostos purificados e extrato de cultura de BAL têm sido avaliados (YANG et al., 2012; SIROLI et al., 2016). A nisina é amplamente utilizada em produtos alimentares, incluindo queijo, saladas, sopas enlatadas, gelo para armazenamento de peixe, alimentos para bebês, milk-shakes e produtos de panificação (SAMELIS et al., 2005; DISCHINGER et al., 2014), tendo características ideais para um aditivo alimentício, na medida em que não apresenta efeitos sobre a microbiota normal do intestino, é atóxica, não afeta a cor ou sabor dos alimentos e apresenta estabilidade térmica.

Atualmente a Comissão da FAO/WHO permite uma ingestão diária de até 33.000 unidades de nisina por 70 kg de peso corporal. O limite máximo diário de ingestão de nisina varia de país para país. Na Austrália, Grã-Bretanha e França a nisina é permitida sem limite máximo, enquanto que nos EUA, o limite máximo é de 10.000 UI/g; na Rússia, o limite máximo é de 8000 UI/g. No Brasil, a nisina tem o seu uso permitido pela Legislação Brasileira (DETEN/MS nº 29, de 22 de janeiro de 1996) com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5 mg/kg (500 UI/g). Não entanto seu uso é limitado devido a que a nisina não tem atividade contra bactérias Gram-negativas, fungos filamentosos, células de levedura e vírus, inibindo principalmente os principais géneros bacterianos *Micrococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Listeria* e *Staphylococcus* (GHARSALLAOUI et al., 2016).

De acordo com diferentes estudos, a adsorção de moléculas de nisina produz uma desregulação da superfície da membrana bacteriana, sendo o principal mecanismo da atividade antimicrobiana da nisina (BAHRAMIA et al., 2019). A ligação das moléculas de nisina ao lipídeo II é uma maneira que facilita a infiltração de nisina através da membrana bacteriana (Figura 6). O lipídeo II é um material precursor necessário para a biossíntese de parede bacteriana. A molécula de nisina se liga ao lipídeo II e impede o crescimento da rede

de peptidoglicano. Além disso, a parte N-terminal da nisina se conecta à parte carboidrato-pirofosfato do lipídeo II, o que permite que a seção C-terminal da nisina se infiltre na membrana bacteriana. Em seguida, os complexos nisina-lipídeo II criam um poro na membrana (PUNYAUPPA-PATH et al., 2015).

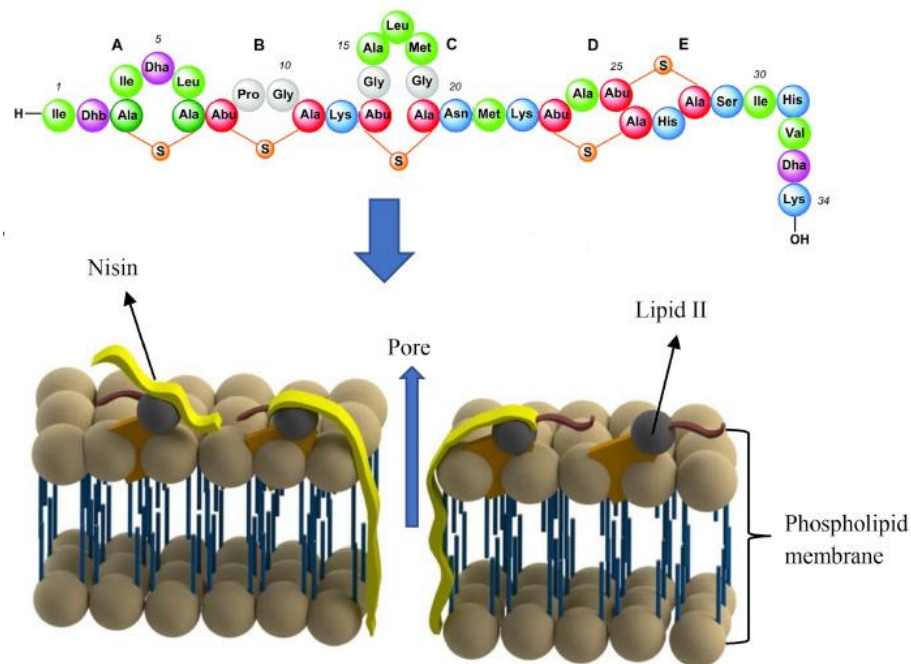


Figura 6. Nisina e seu mecanismo de atividade contra bactérias. (BAHRAMI, et al. 2019).

A capacidade antimicrobiana da nisina contra uma ampla gama de microrganismos e sua rápida atividade levou à extensão de sua aplicação como um agente antimicrobiano popular e natural nos produtos lácteos, sucos, carnes e vegetais (BAPTHO et al., 2017). No entanto, existem alguns desafios que restringem o uso de nisina, incluindo um baixo desempenho antibacteriano durante o armazenamento de alimentos, sensibilidade ao estresse ambiental, suscetibilidade à proteólise e interações indesejáveis com componentes alimentares (BISWARO et al., 2018). Para superar esses desafios, é importante ter uma liberação sustentada de nisina durante o prazo de validade dos alimentos, projetando um sistema de entrega eficiente por meio de técnicas de encapsulamento (BAHRAMI, et al. 2019). Nesse processo, a nisina, como material do núcleo, é revestida com os materiais da parede. Portanto, os materiais das paredes agem como uma barreira contra as tensões ambientais, tanto para proteger a nisina quanto para controlar sua liberação.

Recentemente, novas tecnologias de encapsulamento (incluindo a nanotecnologia) foram usadas para melhorar as propriedades funcionais dos antimicrobianos para alimentos (ARPAGAUS et al., 2018; JAFARI & MCCLEMENTS, 2017). Os sistemas de nano-encapsulação, fornecendo uma área superficial mais alta, podem apresentar várias vantagens, incluindo liberação controlada e alta biodisponibilidade de compostos no alvo (FARIDI et al., 2018). Em alguns casos, o encapsulamento de nisina usando outros materiais GRAS, incluindo quitosana, pectina, alginato / pectina, entre outros, demonstrou potencial para estender a atividade antimicrobiana da nisina quando testada in vitro (MCCLEMENTS, 2018). No entanto, os desenvolvimentos precisam ser avaliados em uma matriz alimentar para demonstrar que o sistema de encapsulamento pode realmente aumentar a atividade antimicrobiana da nisina.

4. Artigo No.1

Effect of oleic acid, cholesterol, and octadecylamine on membrane stability of freeze-dried liposomes encapsulating natural antimicrobials.

Resumo:

Os lipossomas têm sido amplamente estudados como sistemas de transporte de compostos bioativos, embora sua estabilidade relativamente baixa permaneça como limitação para aplicação comercial. Neste estudo, lipossomas de fosfatidilcolina (PC) foram preparados contendo uma mistura de extrato de alho (GE) e nisina (Nis) usando colesterol (CHO), ácido oleico (OA) ou octadecilamina (ODA) como estabilizadores de membrana, para avaliar suas propriedades físicas, químicas, bioativas e de estabilidade, em estado totalmente hidratado e após liofilização. GE / Nis lipossomas apresentaram diâmetro hidrodinâmico abaixo de 200 nm e índice de polidispersividade abaixo de 0.30, típico para pequenas vesículas unilamelares produzidas pelo método de hidratação de filme. Sob oxidação induzida, os lipossomas PC-OA-GE / Nis apresentaram 91% menos de peroxidação lipídica em comparação com os lipossomas de PC não carregados. A análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) revelou um alto nível de ligações de hidrogênio no grupo da cabeça polar do PC após a adição de GE / Nis em todas as formulações de lipossomas, em concordância com os altos valores de atividade da água e higroscopicidade encontrados nas amostras após liofilização. Durante 5 meses armazenamento a 4 ° C, lipossomas totalmente hidratados e liofilizados mostraram um incremento em seu tamanho médio e índice de polidispersividade, mas esses valores foram reduzidos pela adição de trealose como lioprotetor. Todas as preparações de lipossomas mantiveram 100% de atividade contra *Listeria monocytogenes*; no entanto, foi observada uma redução gradual da atividade contra *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, sugerindo uma perda parcial de compostos ativos de GE. Apesar de algumas modificações físicas, lipossomas liofilizados contendo OA como estabilizador apresentaram melhores propriedades antimicrobianas e alta resistência à oxidação lipídica, constituindo uma abordagem promissora estabilizar GE / Nis para armazenamento em longo prazo.

Artigo publicado na revista *Food and Bioprocess Technology* em Fevereiro de 2020.

<https://doi.org/10.1007/s11947-020-02419-8>

5. Artigo No.2

Antifungal properties of phosphatidylcholine-oleic acid liposomes encapsulating garlic extract against environmental fungal in wheat bread

Resumo:

Foram desenvolvidos lipossomas de extrato de alho (GE) encapsulado em fosfatidilcolina (PC) e ácido oleico (OA). Vesículas esféricas com distribuição de tamanho estreita, eficiência de aprisionamento de 79,7% e potencial zeta de -27,9 mV foram obtidas. O teste antifúngico in vitro mostrou atividades inibitórias perceptíveis para GE livre e encapsulado contra cepas de fungos selecionadas. A análise termogravimétrica revelou que a presença de OA e GE na formulação melhorou a estabilidade térmica dos lipossomas, em comparação com os lipossomas de PC puro. A análise DSC mostrou alterações na temperatura de transição principal e na entalpia para lipossomas PC-OA-GE, devido a um forte efeito rigidificante induzido pelo calor. Os testes de vida útil mostraram o potencial biopreservador dos lipossomas PC-OA-GE no pão de trigo. As formulações com GE livre e encapsulado a 1% (V/W de farinha de trigo) foram microbiologicamente estáveis por mais tempo em comparação com o controle, mesmo após o cozimento a 220 ° C. Os lipossomas formulados com OA e GE têm potencial como agente antifúngico em produtos de panificação.

Artigo publicado no *International Journal of Food Microbiology* em março de 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.006>

6. Artigo No.3

Influence of liposome composition on interaction and structural features of surimi protein.

Resumo:

O objetivo do presente estudo é investigar as interações entre lipossomos e proteína muscular de peixe (surimi, SURP), avaliando o papel da composição e concentração lipídica lipossômica nas propriedades dessa proteína. Lipossomas de fosfatidilcolina ultrapura (UPCL) ou fosfatidilcolina de soja parcialmente purificada (PPCL) foram preparados e dispersos em diferentes proporções de peso em (SURP); as mudanças na estabilidade e estrutura da proteína foram determinadas usando espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), fluorescência intrínseca e grupos sulfidril livre. Além disso, as alterações nas características físico-químicas e na morfologia dos lipossomas carregados e descarregados de nisina foram avaliadas por Espalhamento Dinâmico de Luz e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). Como resultado, observou-se que o PPCL promoveu desnaturação e agregação de SURP desdobrada, refletida em perda de estrutura secundária, exposição de resíduos de tirosina e ligeiro incremento de grupos sulfidril livres. A UPCL produziu desdobramento parcial e alterações na estrutura secundária da proteína SURP de α -helicoidal para fita β , essas estruturas foram observadas pelo TEM ao redor da UPCL, que podem resultar de interações hidrofóbicas entre UPCL-SURP e interações proteína-proteína. Além disso, a estabilidade do lipossoma foi afetada pelo SURP, UPCL e PPCL descarregados aumentaram seu tamanho em 40% e também foi mudada sua carga superficial, indicando uma formação de proteína corona, relacionada aos locais de ligação disponíveis nos lipossomas, resultando em morfologia e composição diversa da proteína corona. Portanto, a carga superficial e a composição dos lipossomas são os principais fatores envolvidos na redução da estabilidade da SURP e podem exercer diferentes efeitos na rede de proteínas miofibrilares, o que é importante para determinar as propriedades tecnológicas dos lipossomas em produtos surimi.

7. Artigo No.4

Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 submitted to sublethal concentrations of free and liposome encapsulated nisin.

O crescimento de *Listeria monocytogenes* em alimentos prontos para consumo refrigerados é uma preocupação significativa em segurança alimentar. Antimicrobianos naturais, como a nisina, podem ser usados para controlar esse patógeno, mas os crescentes relatos de tolerância e resistência à nisina tornam necessárias novas abordagens para uma entrega eficaz, como a nanoencapulação. O objetivo deste estudo foi investigar, usando uma estratégia proteômica, como *L. monocytogenes* ATCC7466 regula e molda seu proteoma em resposta a doses subletais de lipossomos de fosfatidilcolina carregados com nisina e fosfatidilcolina (lipo-nisina), comparando com células não tratadas que crescem sob condições ideais. As proteínas totais foram extraídas de células de *L. monocytogenes* tratadas por 1 h com nisina livre e carregada em lipossomas. Como resultado, 805 proteínas foram identificadas inicialmente e a partir dessas, 61 proteínas foram positivamente reguladas para os tratamentos com nisina e lipo-nisina. A regulação positiva de 5 proteínas exclusivas por nisina também foi observada e 1 proteína no tratamento lipo-nisina. A adaptação e modelagem do proteoma de *Listeria* em resposta a ambos os tratamentos contendo nisina estavam principalmente relacionadas ao sistema transportador de cassete de ligação a ATP (ABC), proteínas transmembranares e proteínas de ligação a RNA. Algumas das proteínas detectadas exclusivamente no tratamento com nisina livre foram as proteínas de membrana secD, lmo1539 e a enzima YfhO, que estão relacionadas à translocação de fatores de virulência de *L. monocytogenes*, ativação da defesa do estresse mediada por SigB e glicosilação do ácido tectônico da parede, respectivamente. Esses resultados sugerem que os lipossomas carregados com nisina reduzem resposta ao estresse da *L. monocytogenes* em comparação com a nisina livre, tornando a nisina menos reconhecida pelos sensores de imunidade inata e, portanto, reduzindo os fatores de resposta e resistência à nisina de *L. monocytogenes*. Portanto, o encapsulamento da nisina nos lipossomas pode ser uma estratégia para reduzir o risco de resistência à nisina

Artigo a ser submetido para publicação na revista *Food microbiology*, na versão em inglês.

8. Conclusões

- Os estabilizadores aumentaram a estabilidade física dos lipossomas em termos de tamanho médio de partícula e potencial zeta. As formulações contendo ácido oleico e colesterol apresentaram um efeito sinérgico na redução da oxidação lipídica e também melhoraram as propriedades térmicas dos lipossomas, aumentando a ordem e rigidez da membrana. Considerando a estabilidade do armazenamento, o processo de liofilização aumentou a fusão e a agregação em todas as formulações de lipossomas, mas esse efeito foi reduzido usando a trealose como lioprotetor. Entretanto, apenas os lipossomos preparados com AO apresentaram atividade antimicrobiana melhorada. Portanto o AO tem um grande potencial como estabilizador de lipossomos contendo misturas complexas de compostos bioativos.
- A adição de ácido oleico na composição dos lipossomas contendo extrato de alho melhorou a distribuição tamanho, eficiência de encapsulação e polidispersividade, mediante a estabilização da estrutura lipossomal, resultado do efeito combinado das moléculas de ácido oleico no interior da membrana e polissacarídeos do extrato de alho na superfície. Também, esta estratégia de veiculação do extrato resultou exitosa no controle de bolores em pães de trigo, mantendo ausência de bolores por cinco dias a mais, quando comparado com o controle.
- A capacidade dos lipossomas de se desestabilizar a proteína miofibrilar está relacionada à composição lipídica e carga superficial. A alta polaridade de superfície dos lipossomas feitos com fosfatidilcolina parcialmente purificada aumentou o desdobramento da estrutura da proteína pela exposição de grupos sulfidrila e sítios de ligação hidrofóbicos. Por sua vez, a superfície hidrofóbica e o baixo potencial zeta dos UPCL geram menor nível de desnaturação da proteína e favorecem a formação de estruturas β -strand, com afinidade pela superfície do lipossoma. Além disso, formação da proteína corona foi observada e a ligação da proteína aos lipossomas foi dependente da composição lipossômica e do potencial zeta.

- O encapsulamento de nisina em lipossomas de fosfatidilcolina exerce efeito diferente na expressão de proteínas por *L. monocytogenes*, quando comparado com a nisina livre; reduzindo mecanismos de resposta ao estresse, resistência e virulência. O lipossoma provavelmente altera a maneira como a membrana celular reconhece a nisina, retardando a resposta de defesa inicial. O grupo de 61 proteínas positivamente reguladas pelos tratamentos com nisina livre e encapsulada, indica que o mecanismo de resposta da *L. monocytogenes*, como resultado do estresse imposto às células, envolve diversas funções bioquímicas, como motilidade, aumento dos sistemas de transporte e síntese de metabólitos secundários.

9. Considerações finais

Na atualidade conceitos como saudabilidade, CLEAN LABEL e PLAN-BASED tem sido o foco da indústria de alimentos nos últimos anos e todos giram em torno de alimentos mais seguros e saudáveis para as pessoas, sendo uma tendência mundial.

O conhecimento adquirido na realização deste trabalho, permitiu ter uma visão mais completa de aplicações, estabilidade química, física e da interação lipossoma-alimento. Com isto conseguimos mudar a ideia dos lipossomas, de uma possibilidade *in vitro* de alto custo, para uma alternativa viável, fonte de mais pesquisas e transferência tecnológica.

Esperamos aprofundar nas pesquisas nesta área, para assim, junto com parcerias da indústria de alimentos, trazer alternativas aos conservantes sintéticos e assim aportar à segurança dos alimentos e o bem-estar das pessoas.

10. Referências Bibliográficas.

ADITYA, N. P.; KO, S. Solid lipid nanoparticles (SLNs): delivery vehicles for food bioactives. **RSC Adv.** 5 (39), 30902–30911. 2015.

ALORAINY, M. S. Evaluation of antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*) against *E. coli* O 157:H 7. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, 4, 149–157, 2011.

AOUADHI, C.; ROUISSI, Z.; KMIHA, S.; MEJRIB, S.; MAAROUFI, A. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus sporothermodurans* spores to nisin and heat. **Food Microbiology**. Volume 54, Pages 6–10, 2016.

ARPAGAUS, C., COLLENBERG, A., RÜTTI, D., ASSADPOUR, E., & JAFARI, S. M. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. **International Journal of pharmaceutics**, 546(1–2), 194–214, 2018.

BAHRAMI, A.; DELSHADIB, R.; JAFARIC,S.; WILLIAMS, L. Nanoencapsulated nisin: An engineered natural antimicrobial system for the food industry, **Trends in Food Science & Technology**, 94, 20–31, 2019.

BATPHO, K.; BOONSUPTHIP, W.; & RACHTANAPUN, C. Antimicrobial activity of collagen casing impregnated with nisin against foodborne microorganisms associated with ready-to-eat sausage. **Food Control**, 73, 1342–1352, 2017.

BELFIORE, C., CASTELLANO, P., AND VIGNOLO, G. Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. **Food Microbiology**. 24, 223–229. 2007.

BISWARO, L. S., SOUSA, M. G.D. C., REZENDE, T. M. B., DIAS, S. C., & FRANCO, O. L. Antimicrobial peptides and nanotechnology, recent advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, 9, 855, 2018.

BOSE, S.; LAHA, B.; BANERJEE, S. Quantification of allicin by high performance liquid chromatography-ultraviolet analysis with effect of post-ultrasonic sound and microwave radiation on fresh garlic cloves. **Pharmacogn. Mag.**, 10, 288–293, 2014.

BRANDELLI, A. Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. 12, 731–741, 2012.

BRANDELLI, A.; TAYLOR, T.M. Nanostructured and nanoencapsulated natural antimicrobials for use in food products, in: Taylor, T.M. (Ed), **Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality**. Elsevier, Oxford, pp. 229-257, 2015.

BRASIL, ANAPA 2018.

BRASIL. 2019

BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAM, M. Y.; HAGENS, W. I.; BULDER, A. S.; HEER, C.; VOORDE, S. E. C. G.; WIJNHOFEN, S. W. P.; MARVIN, H. J. P.; SIPS, A. J. A. M. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 53, 52–62, 2009.

CHAU, C.; HUEL, S.; WU S.; YEN, G. The development of regulations for food nanotechnology, **Trends in Food Science & Technology**, 18, 269-280, 2007.

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

CUSHEN, M.; KERRY, J.; MORRIS, M.; CRUZ-ROMERO, M.; CUMMINS, E. Nanotechnologies in the food industry – Recent developments, risks and regulation. **Trends in Food Science & Technology**. 24, 30–46, 2012.

DISCHINGER, J.; CHIPALU, S.B.; BIERBAUM, G. Lantibiotics: Promising candidates for future applications in health care. **International Journal of Medical Microbiology**, 304, 51–62, 2014.

EMBRAPA, Hortalias Folders 2013.

FARIDI, A.; ASSADPOUR, E.; & JAFARI, S. M. Improving the bioavailability of phenolic compounds by loading them within lipid-based nanocarriers. **Trends in Food Science & Technology**, 76, 56–66, 2018.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, DA.; ROCHA, O.G.F.; DEMICHELI, C. Liposomes: physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. **Quim. Nova**. 28, 511–518. 2005.

GÄNZLE, M. G.; HERTEL, C.; AND HAMMES, W. P. Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A. **Int. J. Food Microbiol.** 48 : 217–224. 2003.

GHARSALLAOUI, A.; OULAHAL, N.; JOLY, C.; & DEGRAEVE, P. Nisin as a food preservative: Part 1: Physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 56(8), 1262–1274, 2016.

GIRISH, V.M.; LIANG, H.; AGUILAN, J.T.; NOSANCHUK, J.D.; FRIEDMAN, J.M.; NACHARAJU, P. Anti-biofilm activity of garlic extract loaded nanoparticles. **Nanomedicine**, 2, 102009, 2019.

GRIT, M.; CROMMELIN, D. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. **Chem Phys Lip.** 64(1-3), 3-18. 1993.

GUO, Y.J. Experimental study on the optimization of extraction process of garlic oil and its antibacterial effects. **Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med**, 11, 411–414, 2014.

JAFARI, S. M., & MCCLEMENTS, D. J. Nanotechnology approaches for increasing nutrient bioavailability. **Advances in food and nutrition research**. Academic Press. 2017.

- HANG, X. Isolation and identification of garlic polysaccharide. **Food Sci**, 26, 48–51, 2005.
- HARVEY, M.J. Onion and other cultivated Alliums. In: SMARTT & SIMONDS. **Evolution of Crop Plant**. 2nd ed. p. 445-448. London-England. 1995.
- INGVARSSON, P.T.; YANG, M.; NIELSEN, H. M.; RANTANEN, J.; FOGED, C. Stabilization of liposomes during drying. **Expert Opin Drug Deliv**. 8(3), 375-88. 2011.
- KHAN, I.; KHAN, M.; UMAR, M. N.; OH, D. H. Nanobiotechnology and its applications in drug delivery system: a review. **IET Nanobiotechnology**, 1-5, 2015.
- KHLEBTSOV, N.; KOVLER, L.; ZAGIROVA, S.; KHLEBTSOV, B.; BOGATYREV, V. Spectroturbidimetry of liposome suspensions. **Colloid J**. 63, 491–498, 2001.
- KODERA, Y.; USHIJIMA, M.; AMANO, H.; SUZUKI, J.; MATSUTOMO, T. Chemical and biological properties of S-1-propenyl-L-cysteine in aged garlic extract. **Molecules**, 22, 570, 2017.
- LANZOTTI, V.; SCALA, F.; BONANOMI, G. Compounds from Allium species with cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, 13, 769–791. 2014.
- LOCATELLI, D.A.; NAZARENO, M.A.; FUSARI, C.M.; CAMARGO, A.B. Cooked garlic and antioxidant activity: Correlation with organosulfur compound composition. **Food Chem**, 220, 219–224, 2017.
- LOPES, N. A.; PINILLA, C. M. B.; & BRANDELLI, A. Pectin and polygalacturonic acidcoated liposomes as novel delivery system for nisin: Preparation, characterization and release behavior. **Food Hydrocolloids**, 70, 1–7, 2017.
- LIU, J.; JI, F.; CHEN, F.M.; GUO,W.; YANG, M.L.; HUANG, S.X.; ZHANG, F.; LIU, Y.S. Determination of garlic phenolic compounds using supercritical fluid extraction coupled to supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry. **J. Pharm. Biomed. Anal**, 159, 513–523, 2018.
- LI, W.R.; SHI, Q.S.; LIANG, Q.; HUANG, X.M.; CHEN, Y.B. Antifungal effect and mechanism of garlic oil on penicillium funiculosum. **Appl. Microbiol. Biot**, 98, 8337–8346, 2014.
- LI, W. R.; SHI Q. S.; DAI, H. Q.; et al. Antifungal activity, kinetics and molecular mechanism of action of garlic oil against Candida albicans. **Sci Rep**, 622805, 2016
- LIU, Q.; MENG, X.; LI, Y.; ZHAO, C.N.; TANG, G.Y.; LI, H.B. Antibacterial and antifungal activities of spices. **Int. J. Mol. Sci**, 18, 1283, 2017.
- LAW, B.; & KING, J. Use of liposomes for proteinase addition to Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, 52(1), 1985.

MALHEIROS, P. S.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in minas frescal cheese by free and nanovesicle-encapsulated nisin. **Brazilian Journal of Microbiology**. 1414–1418, 2012.

MAHERANI, B.; ARAB-TEHRANY, E.; MOZAFARI, M.R.; GAIANI, C.; LINDER, M. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. **Current Nanoscience**. 7, 436–452, 2011.

MARSANASCO, M.; MÁRQUEZ, A. L.; WAGNER, J. R.; ALONSO, S. D. V.; CHIARAMONI, N. S. Liposomes as vehicles for Vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer Vitamin C protection after heat treatment. **Food Res. Int.** 44, 3039–3046, 2011.

MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. **Advances in Colloid and Interface Science**. 219, 27–53, 2015.

MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, 253, 1–22, 2018.

MEIRA, S. M. M.; JARDIM, A. I.; BRANDELLI, A. Adsorption of nisin and pediocin on nanoclays. **Food Chem.** 188, 161–169, 2015.

MOHAMMED A, BRAMWELL V, COOMBES A, PERRIE Y. Lyophilisation and sterilisation of liposomal vaccines to produce stable and sterile products. **Methods**. 40(1), 30–8. 2006.

MONTEIRO, N.; MARTINS, A.; Reis, R.L.; Neves, N.M. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. **J. R. Soc. Interface**. 11, 20140459. 2014.

MOZAFARI, M. R.; JOHNSON, C.; HATZIANTONIOU, S.; DEMETZOS, C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **Journal of Liposome Research**. 18, 309–327, 2008.

NAGELLA, P.; THIRUVENGADAM, M.; AHMAD, A.; YOON, J.Y.; CHUNG, I.M. Composition of polyphenols and antioxidant activity of garlic bulbs collected from different locations of Korea. **Asian J. Chem**, 26, 897–902, 2014.

NEETHIRAJAN, S. & JAYAS, D.S. Nanotechnology for the food and bioprocessing industries. **Food and Bioprocess Technology**, 4, 39–47. 2011.

PÂRVU, M.; PÂRVU, A. E.; VLASE, L.; ROSCA-CASIAN, O.; PÂRVU, O.; & PUSCAS, M. Allicin and alliin content and antifungal activity of *Allium senescens* L. ssp. montanum (F. W. Schmidt) Holub ethanol extract. **Journal of Medicinal Plants Research**, 5, 6544–6549, 2011.

PETERS, R.; DAM, G.; BOUWMEESTER, H.; HELSPER, H.; ALLMAIER, G.; KAMMER, F.; RAMSCH, R.; SOLANS, C.; TOMANIOVÁ, M.; HAJŠLOVA, J.

WEIGEL, S. Identification and characterization of organic nanoparticles in food. **Trends in Analytical Chemistry**. 30 (1), 2011.

PINILLA, C.M.B.; NOREÑA, C.P.; BRANDELLI, A. Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles, containing garlic extract, with antilisterial activity in milk. **Food Chem.** 220, 470-476, 2017.

PINILLA, C.M.B.; BRANDELLI, A. Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 36, 287-293. 2016.

POWERS, K. W.; BROWN, S. C.; KRISHNA, V. B.; WASDO, S. C.; MOUDGIL, B. M.; ROBERTS, S. M. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. **Toxicological Sciences**. 90, 296-303, 2006.

PRAGER-KHOUTORSKY, M.; GONCHAROV, I.; RABINKOV, A.; MIRELMAN, D.; GEIGER, B.; BERSHADSKY, A. Allicin inhibits cell polarization, migration and division via its direct effect on microtubules. **Cell Motil Cytoskeleton**, 64, 321-37, 2007.

PROMBUTARA, P.; KULWATTHANASAL, Y.; SUPAKA, N.; SRAMALA, I.; CHAREONPORNWATTANA, S. Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. **Food Control**. 24, 184–190, 2012.

PUNYAUPPA-PATH, S.; PHUMKHACHORN, P.; & RATTANACHAIKUNSOPON, P. Nisin: Production and mechanism of antimicrobial action. **International Journal of Current Research and Review**, 7(2), 47, 2015.

QI, Z.; YU, Y.; VÉLASQUEZ, J. E.; VAN DER DONK, W. A. Evolution of lanthipeptide synthetases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 109 (45), 18361–18366, 2012.

RABINKOV, A.; MIRON, T.; KONSTANTINOVSKI, L.; WILCHEK, M.; MIRELMAN, D.; WEINER, L. The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. **Biochim Biophys Acta**, 1379, 233-244, 1998.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; SARAF, S. Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs. **Biol. Pharm. Bull.** 29, 1790–1798, 2006.

RIVLIN, R. S. Historical perspective on the use of garlic. **Journal of Nutrition**, 31, 951S–954S. 2001.

ROSSI, M.; CUBADDA, F.; DINI, L.; TERRANOVA, M.; AURELI, F.; SORBO, A.; PASSERI, D. Scientific basis of nanotechnology, implications for the food sector and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, 40(2), 127-148, 2014.

SALMIERI, S.; ISLAM, F.; KHAN, R. A.; HOSSAIN, F. M.; IBRAHIM, H. M. M.; MIAO, C.; HAMA, W. Y.; LACROIX, M. Antimicrobial nanocomposite films made of poly(lactic acid)-cellulose nanocrystals (PLA-CNC) in food applications: part A - effect of nisin release on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in ham. **Cellulose**. 21, 1837–1850, 2014.

SAMELIS, J.; BEDIE, G., SOFOS, J.; BELK, K., SCANGA, J.; SMITH, G. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. **LWT-Food Science and Technology**. 38(1), 21-28, 2005.

SEOW, Y.X.; YEO, C.R.; CHUNG, H.L.; YUK, H.-G. Plant essential oils as active antimicrobial agents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 54, 625-644. 2014.

SHANG, A.; CAO, Y.; XU Y.; GAN, Y.; TANG, Y.; CORKE, H.; MAVUMENGWANA, V.; LI, B. Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.). **Foods**. 8. pii: E246, 2019.

SILVESTRE, C.; DURACCIO, D.; CIMMINO, S. Food packaging based on polymer nanomaterials. **Progress in Polymer Science**, 36, 1766–1782, 2011.

SINGH, H.; THOMPSON, A.; CORREDIG, M. Liposomes as food ingredients and nutraceutical delivery systems. In: **Garti N, McClements DJ, editors. Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals**. Oxford, U.K. Woodhead Publishing. 287–318, 2012.

SIROLI, L.; PATRIGNANI, F.; SERRAZANETTI, D.; VANNINI, L.; SALVETTI, E.; TORRIANI, S.; GARDINI, F.; LANCIOTTI, R. Use of a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain, combined with natural antimicrobials, to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples. **Food Microbiology**. 54, 11–19, 2016.

SZYCHOWSKI, K. A.; RYBCZYŃSKA-TKACZYK, K.; GAWEL-BĘBEN, K.; ŚWIECA, M.; KARAŚ, M.; JAKUBCZYK, A. et al. (2018). Characterization of Active Compounds of Different Garlic (*Allium sativum* L.) Cultivars. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, 68(1), 73-81, 2018.

TANG, X.; PIKAL, M. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. **Pharm Res**. 21(2), 191-200. 2004.

TINKLE, S.; MCNEIL, S. E.; MÜHLEBACH, S.; BAWA, R.; BORCHARD, G.; BARENHOLZ, Y.; ET AL. Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1313, 35–56, 2014.

TONIAZZO, T.; BERBEL, I. F.; CHO, S.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; MORAES, I. C. F.; PINHO, S. C. β -carotene-loaded liposome dispersions stabilized with xanthan and guar gums: physicochemical stability and feasibility of application in yogurt. **LWT - Food Science and Technology**. 59, 1265–1273, 2014.

TONIAZZO, T.; PINHO, S, C. Lyophilized liposomes for food applications: Fundamentals, processes, and potential applications, in: **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**. Wiley Blackwell. (2016)

VAN WINDEN, E, C, A. Freeze-drying of liposomes: theory and practice. **Methods Enzym**. 367, 99-110. 2003.

WU, Z.; WANG, W.; TANG, M.; SHAO, J.; DAI, C.; ZHANG, W.; CHEN, D. Comparative genomic analysis shows that *Streptococcus meningitis* isolate SC070731 contains a unique 105K genomic island. **Gene**. 535 (2), 156–164, 2014.

YANG, E.; FAN, L.; JIANG, J.; DOUCETTE, C. Fillmore. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. **AMB Express**, 2, 48, 2012.

YOO, D.Y.; KIM, W.; NAM, S.M.; YOO, M.; LEE, S.; YOON, Y.S.; WON, M.H.; Hwang, I.K.; Choi, J.H. Neuroprotective effects of Z-ajoene, an organosulfur compound derived from oil-macerated garlic, in the gerbil hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia. **Food Chem. Toxicol**, 72, 1–7, 2014.

YUN, H.; BANA, J.; PARK, K.; LEE, C.; JEONG, K.; HAN, S.; HONG, J. Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolate from garlic. **Pharmacology & Therapeutics**. 142, 183–195, 2014.

ZAKAROVA, A.; SEO, J.Y.; KIM, H.Y.; KIM, J.H.; SHIN, J.H.; CHO, K.M.; LEE, C.H.; KIM, J.S. Garlic sprouting is associated with increased antioxidant activity and concomitant changes in the metabolite profile. **J. Agric. Food Chem**, 62, 1875–1880, 2014.

ZARDAST, M.; NAMAKIN, K.; KAHO, J.E.; HASHEMI, S.S. Assessment of antibacterial effect of garlic in patients infected with *Helicobacter pylori* using urease breath test. **Avicenna J. Phytomed**, 6, 495–501, 2016.

ZUIDAM, N.; GOUW, H.; BARENHOLZ, Y.; CROMMELIN, D. Physical (in) stability of liposomes upon chemical hydrolysis: the role of lysophospholipids and fatty acids. **Biochim Biophys Acta Biomembr**. 1240(1), 101–110. 1995.