UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

TAÍSE TONIAZZO

**Dispersões de lipossomas encapsulando β -caroteno:
caracterização, estabilidade físico-química e incorporação em iogurte**

Pirassununga

2013

TAÍSE TONIAZZO

**Dispersões de lipossomas encapsulando β -caroteno:
caracterização, estabilidade físico-química e incorporação em iogurte**

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

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

Pirassununga

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

Toniazzo, Taíse

T665d Dispersões de lipossomas encapsulando β -caroteno:

caracterização, estabilidade físico-química e

incorporação em iogurte / Taíse Toniazzo. --

Pirassununga, 2013.

120f.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.

Departamento de Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de
Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Samantha Cristina de Pinho.

1. β -caroteno 2. Iogurte 3. Lipossoma
4. Microencapsulação. I. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, José Valter e Anelci, por todo amor, apoio, confiança, e incentivo aos estudos, sem vocês nada disso seria possível. Amo vocês.

Aos meus queridos irmãos, Taciane e Glaucer, pelos momentos de alegria e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Samantha Cristina de Pinho, simplesmente por ser você! Obrigada pela orientação, paciência, dedicação, amizade e por ser essa pessoa tão compreensiva. Não tenho palavras que possam demonstrar o tamanho do meu agradecimento por estes dois anos de ensinamentos.

À professora Dr^a. Carmen Sílvia Fávaro Trindade pela co-orientação na etapa de adição dos lipossomas no sistema alimentício.

Ao querido Fábio Baraldi Ribeiro, por todo amor, carinho, comprometimento e por sempre acreditar em mim; e a toda a sua família, Márcia e Sérgio, obrigado pelo apoio e suporte em todas as horas que precisei.

À professora Dr^a. Izabel Cristina Freitas Moraes, pela imensa e essencial ajuda nas análises reológicas.

Ao Marcelo Thomazini, pela sua paciência e a sua disposição a ajudar.

À Ana Mônica Quinta Barbosa Bittante, pelas análises de calorimetria diferencial de varredura.

Ao Carlos Alberto Paula Leite, pela sua ampla experiência na obtenção das imagens da Microscopia Eletrônica de Transmissão.

À Caroline Casagrande Sipoli pela sua ajuda, foi essencial para preparação das amostras para realização da Microscopia Eletrônica de Transmissão.

A todos do Laboratório de Colóides e Funcionalidade de Macromoléculas, principalmente às alunas de graduação Isis Ferreira Berbel e Stefany Cho, pela ajuda nas análises no laboratório. Em especial quero agradecer a Graziela Veiga de Lara Gomes, pelos momentos ótimos que passamos no laboratório e a sua boa vontade em ajudar.

À Camila Marques Bitencourt pela sua ajuda na parte da Análise Sensorial.

A todos os meus colegas da pós-graduação por toda amizade e companheirismo por esse tempo do Mestrado: Mirelle, Talita, Paulinha, Volnei, Fernando, Carol, Daniel, Débora, Keli, Lucas, Mirian e Natali.

Às minhas queridas companheiras da casa, Adja e Diane, por tornarem meus dias mais alegres.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (processo 2009/01087-0) e pela bolsa de Mestrado (processo 2011/03901-3) concedida.

RESUMO

TONIAZZO, T. **Dispersões de lipossomas encapsulando β -caroteno: caracterização, estabilidade físico-química e incorporação em iogurte.** 2013. 120f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

A utilização de bioativos naturais como ingredientes está em constante expansão na indústria alimentícia, devido ao aumento das exigências pelos consumidores por alimentos mais saudáveis. Por isso, há uma busca constante de tecnologias que possibilitem a incorporação de tais substâncias em alimentos. O β -caroteno é uma substância hidrofóbica, cujos benefícios estão relacionados principalmente à sua ação antioxidante. Devido à sua característica hidrofóbica, a utilização deste pigmento implica em desafios tecnológicos para ser incorporado em formulações alimentícias de base aquosa. Por este motivo, a encapsulação em lipossomas pode ser uma ótima alternativa, devido à capacidade de englobar tais substâncias em sua bicamada lipídica. Além da proteção, essas matrizes encapsulantes podem proporcionar a liberação controlada dos ingredientes encapsulados, bem como aumento de sua biodisponibilidade. O objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar dispersões de lipossomas encapsulando β -caroteno estabilizadas com a adição de hidrocolóides (goma xantana ou mistura de goma xantana e goma guar). O diâmetro médio hidrodinâmico, a distribuição de tamanho das partículas e a morfologia foram avaliadas. Os lipossomas produzidos foram vesículas multilamelares (MLV), as distribuições de tamanho dos lipossomas apresentaram-se heterogêneas e as micrografias revelaram a forma esférica dos lipossomas dispersos no meio aquoso, assim como a integridade da sua bicamada lipídica. Foram realizadas análises de quantificação do β -caroteno e colorimetria instrumental, sendo que todas as dispersões mostraram-se eficientes na preservação do β -caroteno ao longo do período de armazenamento. Os hidrocolóides adicionados foram eficazes no aumento da viscosidade da fase contínua, evitando a agregação das vesículas ao longo do tempo, exceto para dispersão estabilizada com a mistura de goma xantana e goma guar, com 0,15% de goma total. Em relação à adição das dispersões de lipossomas em iogurte, as formulações mostraram-se homogêneas, com ausência de grumos ou qualquer tipo de separação de fases, e também foram aprovados por uma parcela de painelistas na análise sensorial.

Palavras-chave: β -caroteno; iogurte; lipossoma; microencapsulação

ABSTRACT

TONIAZZO, T. **Dispersions of liposomes encapsulating beta-carotene: characterization, physico-chemical stability and incorporation in yoghurt.** 2013. 120f. M. Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

The use of natural bioactives as ingredients is in constant expansion in the food industry, due to increasing consumer demands for healthier foods. Therefore, there is a constant search for technologies capable of incorporating such substances in food. β -carotene is a hydrophobic substance, whose benefits are mainly related to its antioxidant action. Because of its hydrophobic characteristics, the use of this pigment implies technical challenges to be incorporated into aqueous-based food formulations. For this reason, encapsulation in liposomes may be a good alternative, because of their ability to incorporate such substances in their lipid bilayer. Besides the protection, these encapsulants matrix can provide controlled release of the encapsulated ingredients, as well as increasing its bioavailability. The objective of this study was to produce and characterize dispersions of liposomes encapsulating β -carotene, which were stabilized with the addition of hydrocolloids: xanthan gum or a mixture of xanthan gum and guar gum. The mean hydrodynamic diameter, distribution of particle size and its morphology were studied. The obtained dispersions were multilamellar vesicles (MLV), the liposomes size distributions were heterogeneous and the micrographs revealed the liposomes spherical shape dispersed in aqueous medium, as well as the integrity of their lipid bilayer. The quantification of β -carotene and instrumental colorimetry analyses indicated the liposomes were efficient in the preservation of β -carotene during the storage period. The hydrocolloids added in the dispersions were highly efficient to increase the viscosity of the continuous phase. Therefore, the hydrocolloids were responsible for the prevention of aggregation of the vesicles during the storage period, except for stabilized dispersion with the mixture of xanthan gum and guar gum, with 0.15% gum total. Regarding the dispersions of liposomes added in yoghurt, the formulations were homogeneous, with absence of lumps or any phase separation, and also have been approved by a significant number of the panelists. .

Keywords: beta-carotene; yoghurt; liposomes; microencapsulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura de uma molécula de fosfolipídio, e da fosfatidilcolina como exemplo.	23
Figura 2: Estruturas das moléculas de fosfolipídios compostos pela cabeça polar e região apolar.	24
Figura 3: Representação da bicamada lipídica.	25
Figura 4: Representação esquemática de um lipossoma unilamelar.	26
Figura 5: Representação esquemática de um lipossoma multilamelar.	26
Figura 6: As principais etapas do processo do <i>spray-drying</i>	32
Figura 7: Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de pró-lipossoma produzido por <i>spray-drying</i>	33
Figura 8: Esquema do método de hidratação do filme lipídico seco.	33
Figura 9: Representação esquemática de um microfluidizador.	34
Figura 10: Representação esquemática de um homogeneizador de alta pressão.	35
Figura 11: Método de produção de lipossoma por evaporação em fase reversa (REV). (1) O fosfolipídio é dissolvido em solvente orgânico. (2) Solução aquosa contendo o bioativo é adicionada. (3) Uma emulsão água- em- óleo é formada através do processo de sonificação. (4) O solvente orgânico é evaporado. (5) Um gel é obtido. (6) Formação da dispersão de lipossoma, através do colapso do gel sob agitação no vórtex.	36
Figura 12: Esquema do aparato experimental utilizado para produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol.	37
Figura 13: Estrutura dos carotenóides, licopeno, zeaxatina, luteína e β -caroteno.	39

Figura 14: Fluxograma do processamento do iogurte: (A) fluxograma do iogurte sem a adição das dispersões de lipossomas; (B) fluxograma do iogurte com a adição das dispersões de lipossomas.....	51
Figura 15: Etapas do processo da produção do iogurte no Laticínio-Escola (planta piloto): (A) tratamento térmico (90° C por 15 min); (B) iogurte após a etapa de incubação; (c) etapa da adição do lipossoma; (D) envase.	52
Figura 16: Ficha de avaliação utilizada pelos consumidores para realização do teste afetivo.	53
Figura 17: Diâmetro médio hidrodinâmico ao longo do tempo de armazenagem para as dispersões de lipossomas estabilizados com goma xantana: (A) 0,20% GX; (B) 0,25%GX e (C) 0,30%GX. Os resultados são expressos com as médias e os desvios padrões de duas amostras.	54
Figura 18: Distribuição de tamanho no dia 0, 20 e 90 para as dispersões de lipossomas estabilizados com goma xantana: (A) 0,20% GX; (B) 0,25%GX e (C) 0,30%GX. As curvas mostradas foram obtidas para uma amostra dentre as duplicatas produzidas e representam o comportamento dos sistemas produzidos.	56
Figura 19: (A) Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão dos lipossomas encapsulando β -caroteno, em dispersões estabilizada com goma xantana: dispersões contendo 20 g/L de lipossomas, dispersos com 0,20% GX . Para realização da análise a amostra foi diluída para 1 mM (concentração final de fosfolipídio). (B) Exemplo de uma dispersão contendo 7,5 g/L de lipossomas, dispersos com 0,20% GX. Para realização da análise a amostra foi diluída para 0,25 mM (concentração final de fosfolipídio). As micrografias foram obtidas utilizando-se lipossomas com dois dias de armazenagem.	57
Figura 20: Comportamento do índice de polidispersidade dos lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com goma xantana, ao longo do tempo de armazenagem. Os resultados são expressos com os valores da polidispersidade de uma amostra.	58

Figura 21: Perfil temporal do potencial zeta dos lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com goma xantana. Os resultados são expressos com os valores do potencial zeta de uma amostra.59

Figura 22: Perfil temporal da concentração de β -caroteno nos lipossomas estabilizados com goma xantana: (A) 0,20% GX; (B) 0,25% GX e (C) 0,30% GX. Os resultados estão expressos com as médias e desvio-padrão de duas amostras.60

Figura 23: Perfil temporal dos parâmetros calorimétricos dos lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com goma xantana: (A) parâmetro a^* e b^* (B) croma (C^*_{ab}) (C) ângulo Hue (h^*_{ab}) (D) parâmetro (L^*) e diferença total de cor (TCD). Os resultados estão expressos com as médias e desvio-padrão de duas amostras.63

Figura 24: Diâmetro médio hidrodinâmico ao longo do tempo de armazenagem para dispersões de lipossomas estabilizadas com goma xantana + goma guar: (A) 10% GX+90% GG; 0,10% goma total; (B) 20% GX+80% GG; 0,10% goma total e (C) 10% GX+90% GG; 0,15% goma total; (D) 20% GX+80% GG; 0,15% goma total. Os resultados são expressos com as médias e os desvios padrões de três amostras.67

Figura 25: Distribuição do tamanho no dia 0 e no dia 95 para dispersões de lipossomas estabilizadas com goma xantana + goma guar: (A) 10% GX+90% GG; 0,10% goma total; (B) 20% GX+80% GG; 0,10% goma total e (C) 10% GX+90% GG; 0,15% goma total; (D) 20% GX+80% GG; 0,15% goma total. As curvas mostradas foram obtidas para uma amostra dentre as triplicatas produzidas e representam o comportamento dos sistemas produzidos. ...68

Figura 26: Microscopia eletrônica de transmissão dos lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com a mistura de goma xantana+goma guar : 10%GG+90%GX, 0,10% goma total. As micrografias foram obtidas a partir dos lipossomas no período de dois dias de armazenagem. Para realização da análise a amostra foi diluída para 0,5 mM (concentração final de fosfolipídio).69

Figura 27: Comportamento do índice de polidispersidade dos lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com goma xantana+goma guar, durante o período de armazenagem.

Os resultados são expressos com os valores da polidispersidade de uma amostra representativa do sistema produzido. 70

Figura 28: Perfil temporal do potencial zeta dos lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com goma xantana + goma guar, durante o período de armazenagem. Os resultados são expressos com os valores do potencial zeta de uma amostra representativa do sistema produzido. 71

Figura 29: Perfil temporal da concentração de β -caroteno nos lipossomas estabilizados com goma xantana: (A) 10% GX+90% GG; 0,10% goma total; (B) 20% GX+80% GG; 0,10% goma total e (C) 10% GX+90% GG; 0,15% goma total; (D) 20% GX+80% GG; 0,15% goma total. Os resultados estão expressos com as médias e desvio-padrão de três amostras. 73

Figura 30: Perfil temporal dos parâmetros calorimétricos dos lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com goma xantana + goma guar: (A) a^* e b^* (B) Cromo C^*_{ab} (C) ângulo de Hue (D) L^* e TCD. Os resultados estão expressos com as médias e desvio-padrão de três amostras. 74

Figura 31: Termogramas das dispersões de lipossomas estabilizadas com goma xantana ou a mistura de goma xantana +goma guar. Os lipossomas foram produzidos e no mesmo dia foi realizada a análise calorimétrica. 79

Figura 32: Comparação do comportamento reológico das dispersões estabilizadas com goma xantana ou goma xantana+goma guar ao longo do tempo de armazenamento: (A) 0,20% GX (B) 10%GX+90%GG, 0,10% goma total (C) 20%GX+80%GG, 0,10% goma total (D) 10%GX+90%GG, 0,15% goma total (E) 20%GX+80%GG, 0,15% goma total. 83

Figura 33: Comparação do comportamento reológico das diferentes dispersões estabilizadas com goma xantana ou goma xantana+goma guar nos diferentes tempos de armazenamento: (A) dia 0 (B) dia 40 (C) dia 95. 84

Figura 34: Comparação do comportamento da viscosidade aparente das dispersões estabilizadas com goma xantana ou a mistura de goma xantana +goma guar durante os 95 dias de armazenamento 85

Figura 35: Parâmetros: (A) n ; (B) K das propriedades reológicas do modelo de Herschel-Bulkley das dispersões estabilizadas com goma xantana ou a mistura goma xantana+goma guar durante os 95 dias de armazenamento.	87
Figura 36: Distribuição de tamanho de partícula dispersões de lipossomas estabilizadas com 0,20% de goma xantana sob diferentes condições de <i>stress</i> : (A) Temperatura de 70°C e (B) Presença de sacarose (C) diferentes níveis de força iônica (concentrações de NaCl) (D) diferentes condições de pH (4,5 e 6,7).	88
Figura 37: Distribuição do tamanho no dia 0 para dispersão de lipossoma estabilizada com 10% GX+90% GG; 0,10% de goma total (A) Temperatura de 35°C (B) Temperatura de 70°C (C) Presença de sacarose (D) diferentes níveis de força iônica (concentrações de NaCl) (E) diferentes condições de pH (4,5 e 6,7).	91
Figura 38: Distribuição do tamanho no dia 0 para dispersão de lipossoma estabilizada com 10% GX+90% GG; 0,15% de goma total (A) Temperatura de 35°C (B) Temperatura de 70°C (C) Presença de sacarose (D) diferentes níveis de força iônica (concentrações de NaCl) (E) diferentes condições de pH (4,5 e 6,7).	92
Figura 39: Imagens das diferentes formulações dos iogurtes. As imagens dois iogurtes foram obtidas após dois dias de armazenamento.	93
Figura 40: Perfil temporal dos parâmetros calorimétricos dos iogurtes adicionados das dispersões de lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com goma xantana ou goma xantana+ goma guar: (A) a^* (B) TCD. Os resultados estão expressos com as médias e desvio-padrão de uma amostra.	95
Figura 41: Comparação do comportamento reológico das formulações de iogurte adicionadas com os lipossomas estabilizados com goma xantana ou goma xantana+goma guar no Dia 2 de armazenamento	95
Figura 42: Curva de calibração para quantificação de β -caroteno em hexano.....	113

Figura 43: Exemplo de curva de calibração para quantificação de fosfato total nos lipossomas. Para cada ensaio fosfato foi obtida uma curva de calibração diferente. 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos lipossomas baseada em parâmetros estruturais	25
Tabela 2: Exemplos de estudos encontrados na literatura empregando lipossomas para encapsulação de bioativos alimentícios.	29
Tabela 3: Vantagens e desvantagens dos métodos convencionais de produção de lipossomas.	38
Tabela 4: Formulação das dispersões de lipossomas produzida no presente projeto de Mestrado. As dispersões foram estabilizadas com goma xantana, ou com a mistura da goma xantana + goma guar.	45
Tabela 5: Ingredientes utilizados nas formulações dos iogurtes.	50
Tabela 6: Médias da concentração de β -caroteno em função do tempo de armazenamento dos lipossomas estabilizados com goma xantana.....	62
Tabela 7: Médias do parâmetro de cor a^* , em função do tempo de armazenamento das amostras estabilizadas com goma xantana.	64
Tabela 8: Médias do parâmetro de cor b^* , em função do tempo de armazenamento das amostras estabilizadas com goma xantana.	64
Tabela 9: Médias do parâmetro de cor L^* , em função do tempo de armazenamento das amostras estabilizadas com goma xantana.	64
Tabela 10: Valores de concentração total de fosfolipídio, porcentagem molar de β -caroteno nos lipossomas e razão molar fosfolipídio/ β -caroteno, para as dispersões estabilizadas com goma xantana.	65

Tabela 11: Quadro-resumo dos valores dos parâmetros obtidos para as dispersões de lipossomas estabilizadas com goma xantana, no início e ao final do período de armazenamento (sob refrigeração).	66
Tabela 12: Médias da concentração de β -caroteno em função do tempo de armazenamento lipossomas estabilizados com a mistura de goma xantana+goma guar.....	72
Tabela 13: Médias do parâmetro de cor a^* , em função do tempo de armazenamento das amostras estabilizadas com a mistura de goma xantana+goma guar	75
Tabela 14: Médias do parâmetro de cor b^* , em função do tempo de armazenamento amostras estabilizadas com a mistura de goma xantana+goma guar.....	75
Tabela 15: Médias do parâmetro de cor L^* , em função do tempo de armazenamento amostras estabilizadas com a mistura de goma xantana+goma guar.....	76
Tabela 16: Valores de concentração total de fosfolípido, porcentagem molar de β -caroteno nos lipossomas e razão molar fosfolípido/ β -caroteno, para as dispersões estabilizadas com misturas de goma guar e goma xantana.....	76
Tabela 17: Quadro-resumo dos valores dos parâmetros obtidos para as dispersões de lipossomas estabilizadas com misturas de goma xantana e goma guar, no início e ao final do período de armazenamento (sob refrigeração).	78
Tabela 18: Dados calorimétricos (DSC) das dispersões de lipossomas estabilizadas com goma xantana ou goma xantana+ goma guar.	80
Tabela 19: Médias dos valores de viscosidade aparente em função do tempo de armazenamento	86
Tabela 20: Parâmetros reológicos das formulações do iogurte no segundo dia de armazenamento.....	96

Tabela 21: Médias das notas atribuídas pelos consumidores por atributo para as diferentes formulações do iogurte	97
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ΔH_m	- entalpia de transição gel-líquido cristalino
CIE	- comissão internacional de iluminação (<i>commission Internationale de l'Eclairage</i>)
DSC	- calorimetria diferencial de varredura (<i>differential scanning calorimetry</i>)
GUV	- vesículas unilamelares gigantes (<i>giant unilamellar vesicles</i>)
LBDD	- <i>Lipid-Based Drug Delivery</i>
LUV	- vesículas unilamelares grandes
MET	- microscopia eletrônica de transmissão
MFGM	- membrana envoltória dos glóbulos de gordura do leite
MLV	- vesículas multilamelares grandes
MVV	- vesículas multivesiculares
OLV	- vesículas oligolamelares
PA	- ácido fosfatídico
PC	- fosfatidilcolina
PCS	- espectroscopia de correlação de fótons (<i>photon correlation spectroscopy</i>)
PE	- fosfatidiletanolamina
PI (3) P	- fosfatidilinositol-3-fosfato
PI	- fosfatidilinositol
Prolipo C and Prolipo S	- pró-lipossoma fabricado pela Lucas Meyer
PS	- fosfatidilserina
REV	- evaporação em fase reversa (<i>reverse evaporation</i>)
SUV	- vesículas unilamelares pequenas (<i>small unilamellar vesicles</i>)
TCD	- diferença total de cor (<i>total difference color</i>)
TGI	- trato gastrointestinal
T_m	- temperatura de transição gel-líquido cristalino
T_{onset}	- temperatura <i>onset</i>
UV	- vesículas unilamelares

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔE^* - diferença total de cor

$\dot{\gamma}$ = taxa de deformação (s^{-1})

a^* - cromaticidade no eixo variando do vermelho/verde

b^* - cromaticidade no eixo variando do amarelo/azul

C_{ab}^* - croma

h_{ab} - ângulo de Hue (graus)

K = índice de consistência ($Pa.s^n$)

L^* - luminosidade

n = índice de comportamento (adimensional)

σ = tensão de cisalhamento (Pa)

σ_0 = tensão de cisalhamento inicial (Pa)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1	LIPOSSOMAS: ESTRUTURA E PROPRIEDADES.....	23
2.2	APLICAÇÃO DOS LIPOSSOMAS EM ALIMENTOS	27
2.3	MÉTODOS DE PRODUÇÃO DOS LIPOSSOMAS	31
2.3.1	Pró-lipossomas.....	31
2.3.2	Método de hidratação do filme lipídico seco.....	33
2.3.3	Métodos de redução de tamanho por alta pressão	34
2.3.4	Evaporação em fase reversa (REV)	35
2.3.5	Método da injeção de etanol	36
2.3.6	Método de remoção de detergente.....	37
2.4	β -caroteno: estrutura e desafios tecnológicos de sua aplicação como ingrediente em alimentos.....	39
3	OBJETIVOS.....	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	MATERIAIS.....	43
4.2	MÉTODOS.....	43
4.2.1	Produção dos pró-lipossomas (partículas secas de fosfolípidios) por atomização 43	
4.2.2	Produção dos lipossomas	44
4.2.3	Caracterização das dispersões de lipossomas	45
4.2.3.1	Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de partícula ...	45
4.2.3.2	Determinação do potencial zeta.....	45
4.2.3.3	Quantificação de β -caroteno encapsulado nos lipossomas.....	46
4.2.3.4	Obtenção dos parâmetros colorimétricos	46
4.2.3.5	Quantificação do fósforo total (ensaio fósforo)	47
4.2.3.6	Análises reológicas	48
4.2.3.7	Análises térmicas por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	48
4.2.3.8	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	49
4.2.4	Estabilidade físico-química das dispersões de lipossomas em diferentes condições de <i>stress</i>	49
4.2.5	Incorporação das dispersões de lipossomas em iogurte	50

4.2.5.1	Produção do iogurte	50
4.2.5.2	Caracterização físico-química do iogurte	52
4.2.5.3	Obtenção de parâmetros reológicos	52
4.2.5.4	Análise sensorial do iogurte.....	53
4.2.6	Análises estatísticas	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DOS LIPOSSOMAS ESTABILIZADOS COM GOMA XANTANA.....	54
5.1.1	Tamanho de partícula e potencial zeta	54
5.1.2	Incorporação e preservação do β -caroteno nos lipossomas	60
5.2	AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DOS LIPOSSOMAS ESTABILIZADOS COM MISTURAS DE GOMA GUAR E GOMA XANTANA.....	66
5.2.1	Tamanho de partícula e potencial zeta.....	66
5.2.2	Incorporação e preservação do β -caroteno	71
5.3	Análises térmicas por calorimetria diferencial de varredura (DSC)	79
5.4	Determinação dos parâmetros reológicos	81
5.5	Estabilidade físico-química dos lipossomas em diferentes condições de stress	87
5.5.1	Estabilidade físico-química dos lipossomas estabilizados com goma xantana ...	87
5.5.2	Estabilidade físico-química dos lipossomas estabilizados com goma xantana+goma guar	90
5.6	Aplicação das dispersões de lipossomas em iogurte.....	93
5.6.1	Avaliação da cor dos iogurtes durante o período de estocagem	94
5.6.2	Avaliação da viscosidade dos iogurtes.....	95
5.6.3	Avaliação da aceitação sensorial dos iogurtes.....	96
6	CONCLUSÕES	99
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	101
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
	APÊNDICES	
	ANEXO	

1 INTRODUÇÃO

O crescimento das exigências dos consumidores por alimentos mais saudáveis faz com que a indústria de alimentos busque inovações nas formulações alimentícias, principalmente alterando os conceitos em relação aos componentes bioativos, como por exemplo, o β -caroteno.

O β -caroteno é um carotenóide precursor da vitamina A e possui função antioxidante no organismo humano; além disso, é um pigmento natural e pode ser utilizado na substituição dos corantes sintéticos dos alimentos. Porém, devido à sua alta hidrofobicidade, torna-se difícil a sua incorporação em soluções aquosas. Para contornar tal dificuldade, são necessários estudos envolvendo técnicas que facilitam sua incorporação em alimentos.

Dessa maneira, utilizando-se os métodos de nano/microencapsulação pode-se ter o melhor controle da microestrutura e da sua funcionalidade, ou seja, tais processos possuem a capacidade de fornecer proteção e estabilização dessas substâncias sensíveis à oxidação, por exemplo. A utilização de matrizes lipídicas para a incorporação de substâncias hidrofóbicas tem duas vantagens associadas: (i) capacidade de dispersar moléculas hidrofóbicas em meios aquosos e (ii) a presença dos lipídios na matriz alimentícia pode ser auxiliar na absorção de tais moléculas pela mucosa intestinal. A escolha dos lipossomas como a matriz encapsulante, é devido a sua composição lipídica, ou seja, vem ao encontro de tais vantagens.

No entanto, há necessidade do desenvolvimento de processos de produção de lipossomas em maior escala. Dentre os processos possíveis de serem empregados com esse objetivo, encontra-se o método de produção de lipossomas por hidratação de pró-lipossomas. Tal método caracteriza-se pelo seu mecanismo relativamente simples e de fácil escalonamento no setor industrial.

O objetivo deste trabalho de Mestrado foi obter e caracterizar dispersões de lipossomas encapsulando o β -caroteno, sendo elas estabilizadas com a adição de hidrocolóides: goma xantana ou a mistura de goma xantana + goma guar. Além da caracterização, foram desenvolvidos ensaios de avaliação da estabilidade dos lipossomas em diferentes condições de *stress* (pH, temperatura, concentração de sal e concentração de açúcar). Finalmente, tais dispersões de lipossomas foram incorporadas no iogurte, avaliando as suas propriedades físicas, assim como a aceitação sensorial por atributos de sabor, textura, cor, aroma e qualidade global.

Os resultados mostraram que os hidrocolóides, em todas as combinações e concentrações testadas, foram efetivos em evitar a desestabilização dos lipossomas por cerca

de 90 dias. Os resultados da microscopia eletrônica de transmissão mostraram que tal efeito foi em devido à formação de uma rede polimérica, que muito provavelmente minimizou a movimentação das vesículas fosfolipídicas, retardando o fenômeno de agregação. Em relação à preservação do β -caroteno encapsulado, as dispersões estabilizadas com goma xantana foram menos efetivas em evitar a degradação do carotenóide encapsulado (em média, 15 a 20% ao final de 90 dias) do que as dispersões estabilizadas com misturas de goma xantana e goma guar (em média, degradação menor que 10% do β -caroteno encapsulado ao final de 90 dias).

Foram realizadas também análises de caracterização da microestrutura das dispersões de lipossomas – calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análises reológicas. Em relação aos termogramas obtidos por DSC, verificou-se que a temperatura de transição gel-líquido cristalino não foi afetada, em nenhuma formulação produzida, pela presença dos hidrocolóides espessantes, indicando que, de fato, a única função das gomas foi como espessantes da fase contínua, não tendo ocorrido incorporação de nenhuma parte de sua estrutura na bicamada lipídica (tal como um possível ancoramento). Por sua vez, as análises reológicas indicaram que as dispersões de lipossomas apresentaram um comportamento de fluido não-newtoniano do tipo pseudoplástico. Os dados reológicos obtidos foram ajustados através do modelo Herschel-Bulkley.

Finalmente, escolheu-se como sistema alimentício para teste das dispersões de lipossomas o iogurte. Foi possível incorporar as dispersões de lipossomas no produto lácteo, e realizou-se análise sensorial para avaliação dos atributos cor, textura, sabor, aroma e qualidade global. Os resultados mostraram que este primeiro teste de incorporação foi relativamente bem-sucedido, e que estudos posteriores podem ser realmente bem-sucedidos se modificações na formulação do iogurte forem implementadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LIPOSSOMAS: ESTRUTURA E PROPRIEDADES

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

A molécula principal que estrutura o lipossoma é o fosfolipídio, sendo este o nome genérico dado a lipídios que contêm um resíduo de ácido fosfórico em sua estrutura (HANAHAN, 1997). Tal molécula possui duas caudas de hidrocarboneto, também chamadas de caudas hidrofóbicas ou apolares, e um grupo hidrofílico, geralmente chamado de cabeça polar. A Figura 1 mostra uma molécula de fosfatidilcolina, um tipo de fosfolipídio cujo grupo polar é a colina:

Figura 1: Representação esquemática da estrutura de uma molécula de fosfolipídio, e da fosfatidilcolina como exemplo (retirado de <http://www.madsci.org/posts/archives/2006-12/1164999854.Bc.r.html>).

Entretanto, a cabeça polar dos fosfolipídios pode ter diversas outras estruturas, sendo as mais comuns mostradas na Figura 2:

Figura 2: Estruturas das moléculas de fosfolipídios compostos pela cabeça polar e região apolar (Fonte: ORIJ et al., 2011).

Os fosfolipídios são moléculas insolúveis em água; contudo, quando em ambientes aquosos, dependendo da concentração e da temperatura, formam dispersões coloidais (LASIC, 1993). Devido às suas propriedades de solubilidade, quando em solução aquosa as estruturas dos fosfolipídios se ordenam em agregados: a parte hidrofílica fica em contato com a água, enquanto a parte hidrofóbica se localiza no interior da estrutura, sem contato com a água, a não ser pelas extremidades do agregado formado. Uma das estruturas agregadas mais frequentemente encontrada é a bicamada lipídica, representada na Figura 3. Na superfície de ambos os lados da bicamada lipídica situam-se as cabeças polares, que protegem as caudas hidrofóbicas do contato com o meio. Em solução aquosa, acima de uma determinada concentração, dependendo da temperatura, tais bicamadas lipídicas curvam-se sobre si mesmas formando os lipossomas, pois as interações das laterais hidrofóbicas expostas à água se tornam muito intensa. Neste processo de formação, os fosfolipídios encapsulam parte do meio aquoso onde estão inseridos (LASIC, 1993).

Figura 3: Representação da bicamada lipídica (retirado de <http://www.freethought-forum.com/forum/showthread.php?t=24978&garp=6>).

No que diz respeito ao tamanho e o número de lamelas, pode-se classificar os lipossomas nas categorias estruturais mostradas na Tabela 1:

Tabela 1: Classificação dos lipossomas baseada em parâmetros estruturais (BARENHOLZ; LASIC, 1996).

Tipo de lipossoma	Diâmetro médio	Abreviatura
Vesículas multilamelares	Maior que 0,5 μm	MLV
Vesículas oligolamelares	0,1 – 1,0 μm	OLV
Vesículas unilamelares	Não especificado	UV
Vesículas unilamelares pequenas	20 – 100 nm	SUV
Vesículas unilamelares grandes	Maior que 100 nm	LUV
Vesículas unilamelares gigantes	Maior que 1,0 μm	GUV
Vesículas multivesiculares	Maior que 1,0 μm	MVV

Todas essas estruturas possuem muitas propriedades físicas e químicas importantes, como atividade osmótica, permeabilidade de membrana para diferentes solutos, solubilidade, interação com vários solutos hidrofílicos e hidrofóbicos, ou comportamento de agregação, que dependem da temperatura, composição química e características de superfície das membranas (LASIC, 1993).

Segundo Lasic (1993) os lipossomas podem encapsular substâncias polares e apolares, sendo capazes de atravessar diferentes barreiras hidrofóbicas e liberar substâncias encapsuladas no ambiente hidrofóbico ou através de outras membranas. Na Figura 4 é retratada a interação de vários tipos de moléculas com um lipossoma unilamelar:

Figura 4: Representação esquemática de um lipossoma unilamelar. (adaptado de JUSTO; MORAES, 2010).

Por sua vez, a Figura 5 mostra esquematicamente um lipossoma multilamelar, que caracteriza-se por ser uma vesícula fechada composta de múltiplas bicamadas lipídicas concêntricas (LASIC, 1993).

Figura 5: Representação esquemática de um lipossoma multilamelar (retirado de <http://www.jpbonline.org/article.asp?issn=09757406;year=2011;volume=3;issue=1;spage=4;epage=14;aulast=Pignatello>).

As propriedades únicas dos lipossomas têm desencadeado inúmeras aplicações de lipossomas para esses agregados anfifílicos, em diversos campos da ciência e tecnologia, desde estudos básicos sobre forma das células, mecanismos de membrana e função de proteínas de membrana, até catálise, suporte para liberação controlada de medicamentos, diagnóstico, entre outros (LASIC, 1993).

É muito importante ressaltar que uma das possíveis vantagens do emprego de lipossomas para microencapsulação de bioativos hidrofóbicos é que, devido à sua composição lipídica, eles podem ser capazes de aumentar a biodisponibilidade de tais bioativos incorporados nos alimentos (PARADA; AGUILERA, 2007; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2007). A utilização de formulações lipídicas é uma abordagem para o aumento da bioacessibilidade, que já é utilizada há algum tempo na área farmacêutica, e é denominada *Lipid-Based Drug Delivery* (LBDD), ou sistemas lipídicos de entrega, utiliza-se de diferentes sistemas com matrizes lipídicas como sistemas autoemulsificantes, emulsões secas, dispersões sólidas, lipossomas, micro e nano partículas lipídicas sólidas (JANNIN; MUSAKHANIAN; MARCHAUD, 2008).

Em relação à questão do aumento da biodisponibilidade oral, os mecanismos pelos quais os lipídios podem aumentá-la são diversos. O primeiro mecanismo é o aumento da secreção de sais biliares e dos lipídios biliares endógenos que é induzida pela presença de lipídios no trato gastrointestinal (TGI), aumentando a formação de micelas mistas intestinais, e, portanto, aumentando a capacidade de solubilização no ambiente do TGI. O segundo mecanismo que pode ser citado é o aumento do tempo de retenção gástrica que os lipídios produzem, resultando em uma liberação lenta no sítio de adsorção e aumento do tempo disponível para absorção do bioativo. Muito embora a absorção passiva intestinal não seja considerada como uma limitação da biodisponibilidade para a maior parte dos bioativos lipofílicos, várias combinações de lipídios, produtos lipídicos de digestão e tensoativos têm demonstrado capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana intestinal. Além disso, os lipídios e tensoativos podem reduzir a atividade de transportadores de efluxo intestinais, como a bomba de efluxo da glicoproteína P, e também o metabolismo baseado em enterócitos. No caso de bioativos altamente hidrofóbicos, os lipídios podem aumentar o transporte linfático e melhorar a biodisponibilidade através da redução do metabolismo de primeira passagem (JEONG et al., 2007).

2.2 APLICAÇÃO DOS 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).

Além disso, os lipossomas podem 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. Portanto, os lipossomas podem, potencialmente, ser utilizados em diferentes aplicações na área alimentícia (TAYLOR et al., 2005).

Diversos exemplos de aplicação envolvendo os lipossomas podem ser encontrados na literatura. Na Tabela 2 são apresentados diversos exemplos da utilização de lipossomas na área de alimentos:

Tabela 2: Exemplos de estudos encontrados na literatura empregando lipossomas para encapsulação de bioativos alimentícios.

Bioativo encapsulado	Tipo de lipossoma	Fosfolipídios utilizados	Referência
Enzimas proteolíticas	LUV	PC ^a ovo + colesterol	(SCOLARI et al., 1993)
Quimosina	MLV	PC soja hidrogenada	(PICON et al., 1993)
Proteinase	LUV	PC soja	(PICON et al., 1995)
Ciprosina	SUV	PC soja	(PICON et al., 1996)
Soroalbumina bovina	SUV	PC ovo + ácido linoléico + triestearina	(HSIEH et al., 2002)
Nisina	MLV	PC soja hidrogenada	(BENECH et al., 2003)
Misturas enzimáticas (proteinasas e lipases, bacterianas e fúngicas)	MLV	VPF 012 ^b	(KHEADR et al., 2003)
Hidrolisado protéico de caseína	MLV	PC soja	(MORAIS et al., 2003)
Compostos de aroma de gorgonzola	SUV	PC soja	(MARTINS, 2003)
Nisina	MLV	PC soja	(WERE et al., 2004)
β -galactosidase	LUV	PC ovo	(RODRIGUEZ-NOGALES; DELGADILLO, 2005)
Sulfato ferroso	SUV	PC soja	(KOSARAJU et al., 2006)
β -galactosidase	MLV, SUV	PC ovo	(RODRIGUEZ-NOGALES et al., 2006)
Nisina	SUV	PC soja, PG	(TAYLOR et al., 2007)
Óleo essencial de <i>Eugenia uniflora</i> L.	MLV	PC soja hidrogenada	(YOSHIDA et al., 2010)
Extrato de <i>ukon</i> (<i>Curcuma longa</i> L.)	SUV, MLV	PC soja	(TAKAHASHI et al., 2008)
Extrato de enzima comercial (Debitrase DBP20)	SUV	Prolipo C and Prolipo S ^b	(NONGONIERMA et al., 2009)
Nisina	MLV, nanovesículas	Lecitina de soja parcialmente purificada	(MALHEIROS et al., 2010)
Polifenóis de chá verde	UV	lecitina de soja +colesterol	(LU et al., 2011)
Vitamina C e vitamina E	MLV	PC soja	(MARANASCO et al., 2011)
Glicinato ferroso	nanovesículas	PC ovo	(DING et al., 2011)

Continuação da Tabela 2:

Luteína	MLV	PC soja	(XIA et al., 2012)
Ácido ascórbico	LUV	DPPC +colesterol	(WECHTERSBACK et al., 2012)
L-carnosina	MLV, LUV	POPC, DOPC, DPPC	(MAHERANI et al., 2012)
Hidrolisado protéico de caseína	MLV	PC soja	(YOKOTA et al., 2012)
Ácido ascórbico	SUV	MFGM ^c	(FARHANG; KAKUDA; CORREDIG, 2012)
β-caroteno	Nano suspensão	PC de soja	(DE PAZ et al., 2012)
β-caroteno	MLV	PC soja hidrogenada	(MORAES et al., 2013)

^a Fosfatidilcolina; ^b Pró-lipossoma fabricado pela Lucas Meyer, Alemanha; ^c Milk fat globule membrane (membrana envoltória dos glóbulos de gordura do leite)

Apesar das vantagens do seu uso como sistema microencapsulante, os grandes desafios a serem vencidos para que o emprego de lipossomas na indústria alimentícia seja vislumbrado como realmente viável são: (i) a dificuldade de produção em grande escala; (ii) o alto custo das matérias-primas; (iii) o pouco conhecimento das interações entre os lipossomas e os componentes dos alimentos (TAYLOR et al., 2005). Porém, o desenvolvimento de métodos de produção possíveis de serem escalonados (como os pró-lipossomas, a injeção de etanol e a microfluidização), bem como o crescente conhecimento das propriedades funcionais dos lipossomas (como suas propriedades físico-químicas, cinéticas, estabilidade termodinâmica e de interação com os componentes dos alimentos), e também o barateamento das matérias-primas, faz com que a encapsulação lipossomal se mostre uma área em franca expansão em alimentos (TAYLOR et al., 2005; MOZAFARI et al., 2006; THOMPSON et al., 2006; THOMPSON et al., 2007).

Existem inúmeras técnicas de produção que podem ser utilizadas para obtenção dos lipossomas. A escolha do método depende principalmente do tipo e do tamanho do lipossoma que se pretende produzir e o objetivo final da aplicação das vesículas (MALMSTEN, 2002).

2.3 MÉTODOS DE PRODUÇÃO DOS LIPOSSOMAS

2.3.1 Pró-lipossomas

O método dos pró-lipossomas baseia-se inicialmente na preparação de uma mistura seca de lipídios, com posterior formação dos lipossomas do tipo MLV por hidratação destas misturas secas de fosfolipídios. Tais partículas secas podem, por exemplo, produzidas por *spray-drying*. Neste caso, a maior vantagem é que são formadas estruturas amorfas, muito mais fáceis de hidratar quando comparado com outros métodos convencionais de formação de lipossomas. Outro fator relevante desse método é que os fosfolipídios secos por atomização mostram-se eficientes protetores, sendo eficazes na proteção da integridade estrutural, estabilidade e funcionalidade do material ativo a ser encapsulado. Após a secagem, ocorre o processo de hidratação das partículas secas de fosfolipídios, e sob condições controladas, formam-se os lipossomas (KIKUCHI et al., 1991; ALVES; SANTANA, 2004).

A vantagem da utilização da secagem de partículas por *spray-drying* em alimentos é devido ao fato de ser um processo bastante conhecido dentro da indústria alimentícia. A principal característica deste processo resulta na diminuição da atividade de água do produto, quando o líquido é convertido em pó. Além disso, esta técnica aumenta a estabilidade de

armazenamento dos produtos, minimiza os riscos de degradação química ou biológica e também reduz os custos de armazenamento e transporte (RÉ et al., 2009).

O processo de secagem das partículas por *spray-drying* envolve quatro principais etapas de produção, como é retratado na Figura 6: atomização do produto em um bico de pulverização, contato das partículas pulverizadas com o ar de secagem, secagem das partículas e coleta das partículas secas (ALVES; SANTANA, 2004).

Figura 6: As principais etapas do processo do *spray-drying* (Adaptado de ALVES; SANTANA, 2004).

Tratando-se da secagem para a obtenção das partículas secas de fosfolipídios, alguns trabalhos sobre as características morfológicas do pó produzido são encontrados na literatura, como por exemplo, Alves e Santana (2004) e Moraes et al. (2013). Foi observado que as partículas formadas foram perfeitamente esféricas, sem nenhuma ruptura, e que a maioria das partículas apresentaram diâmetros menores que 3 μm . Também não foi evidenciada a presença de aglomerados. A ausência de tais aglomerados indica que a matriz obtida pelo processo de *spray-drying* foi homogênea e que todos os componentes foram incorporados nas partículas de pró-lipossomas. Um exemplo de micrografia na qual podem ser visualizadas as partículas secas de fosfolipídios pode ser vista na Figura 7:

Figura 7: Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura de pró-lipossoma produzido por *spray-drying* (ampliação: 5000 x) (MORAES et al., 2013).

2.3.2 Método de hidratação do filme lipídico seco

Esse método envolve a solubilização dos lipídios em um solvente orgânico, seguida da etapa de evaporação desse solvente; como resultado, forma-se no fundo de um balão de vidro um filme lipídico seco. Por último, o filme lipídico seco é hidratado através da adição de um meio aquoso. Essa hidratação é realizada simultaneamente com processo de agitação, objetivando a formação efetiva dos lipossomas. O esquema de produção por este método pode ser visualizado na Figura 8. Apesar de relativamente fácil de ser executado, tal método resulta na formação de lipossomas do tipo MLV com distribuição de tamanhos de partículas muito heterogêneas (LASIC, 1993; MEURE et al., 2008).

Figura 8: Esquema do método de hidratação do filme lipídico seco (adaptado de NAM et al., 2012).

2.3.3 Métodos de redução de tamanho por alta pressão

Este método consiste na utilização de equipamentos que tem como função a redução do tamanho médio dos lipossomas, e que se utiliza de alta pressão para direcionar o fluxo da pré-mistura para uma área de impacto. Na Figura 9 é retratado o esquema de um microfluidizador, que possui como princípio de funcionamento a divisão do fluxo da alimentação em duas partes, sendo que ambas as correntes passam através de orifícios finos, e finalmente o fluxo passa para o interior da câmara de interação. Dentro da câmara de interação ocorre cavitação e cisalhamento, reduzindo o tamanho das partículas, como resultado esperado do processo (BARNADAS-RODRÍGUEZ; SABÉS, 2001; MOZAFARI et al., 2008).

Figura 9: Representação esquemática de um microfluidizador (adaptado de MOZAFARI, et al., 2008)

Segundo Taylor et al. (2005), dentre as maiores vantagens da microfluidização estão: (i) capacidade de diminuição/homogeneização de tamanho de lipossomas que pode processar altas concentrações de fosfolipídio (até 150 mg/mL); (ii) o processo é de extrema reprodutibilidade; (iii) os dados obtidos em escala de laboratório possuem relativa facilidade em serem empregados no escalonamento do processo.

Por sua vez, o esquema do método de homogeneização a alta pressão está retratado na Figura 10. A redução do tamanho do lipossoma no processo de homogeneização a alta pressão ocorre dentro de uma válvula de homogeneização, sendo ela composta por uma parte ajustável e outra parte externa que é fixa. Por isso, a válvula de homogeneização pode possuir

diversas geometrias com tamanho ajustável. Primeiramente, a dispersão de lipossomas é bombeada até o anel de impacto entre pressão de 10-100 MPa (BRANDL et al., 1998), e isso é permitido devido ao recuo do êmbolo conforme o tamanho da sua geometria. Logo, a dispersão escoar por essa folga, colidindo contra o anel de impacto disposto em volta da válvula. Devido à queda brusca na pressão e ao impacto, as vesículas de lipossomas se fracionam em partículas extremamente pequenas (BARNADAS-RODRÍGUEZ; SABÉS, 2001; TAYLOR et al., 2005).

Figura 10: Representação esquemática de um homogeneizador de alta pressão (retirado e adaptado de <http://www.pharmainfo.net/pharma-student-magazine/nanoemulsions-0>).

2.3.4 Evaporação em fase reversa (REV)

O esquema do método de evaporação em fase reversa está retratado na Figura 11. Este método consiste na mistura do fosfolípido em um solvente orgânico. Após isso, é adicionada na fase orgânica uma solução aquosa previamente preparada contendo o bioativo a ser encapsulado. Esta mistura é então homogeneizada (sonificação), para formação de uma emulsão água-em-óleo. Esta emulsão resultante caracteriza-se da seguinte forma: o grupo da cabeça polar (hidrofílica) está em contato com a fase aquosa, onde contém o componente bioativo, enquanto que a cauda hidrofóbica interage com o solvente orgânico. Após isso, o solvente orgânico é evaporado, conseqüentemente, o sistema é convertido para uma dispersão aquosa de vesículas. A evaporação do solvente orgânico resulta na formação de um gel, o qual deve ser submetido à agitação por um vórtex para que sofra um colapso, levando finalmente a

formação da dispersão de lipossomas (SZOKA JR; PAPAHAJIOPOULOS, 1978; TAYLOR et al., 2005).

Figura 11: Método de produção de lipossoma por evaporação em fase reversa (REV). (1) O fosfolípido é dissolvido em solvente orgânico. (2) Solução aquosa contendo o bioativo é adicionada. (3) Uma emulsão água-em-óleo é formada através do processo de sonificação. (4) O solvente orgânico é evaporado. (5) Um gel é obtido. (6) Formação da dispersão de lipossoma, através do colapso do gel sob agitação no vórtex. (adaptado de SZOKA JR; PAPAHAJIOPOULOS, 1978).

2.3.5 Método da injeção de etanol

Neste método uma solução etanólica contendo fosfolípidios é injetada em água pura, ou em uma solução aquosa; durante este processo de injeção, ambas as fases (aquosa e orgânica) entram em contato, ocorrendo imediatamente a diluição do etanol na fase aquosa. Em consequência disso, ocorrem mudanças na solubilidade do lipídio, resultando na obtenção de moléculas de “precipitados”, onde estes formam fragmentos de bicamadas lipídicas. Através do sistema de agitação pertencente ao processo, as bicamadas lipídicas se auto-organizam formando os lipossomas, que são normalmente do tipo unilamelar. Dentre as variáveis operacionais que mais influenciam no rendimento e nas características dos lipossomas produzidos no processo de injeção de etanol estão: (i) concentração de fosfolípidios na solução etanólica; (ii) tipo de fosfolípido; (iii) vazão de injeção; (iv) temperatura e tipo/intensidade de agitação (JUSTO; MORAES, 2011; WAGNER et al., 2002). A Figura 12 mostra um esquema para produção de lipossomas por injeção de etanol:

Figura 12: Esquema do aparato experimental utilizado para produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol (adaptado de TREVISAN, 2011).

2.3.6 Método de remoção de detergente

O método de remoção de detergente é um processo ameno, podendo ser utilizado para a formação de uma grande variedade de tipo de lipossomas. Além disso, possui a capacidade de produção de vesículas fosfolipídicas com distribuição de tamanho homogênea. O método baseia-se na solubilização dos lipídios em detergente, formando micelas mistas de detergente/lipídio. A formação dos lipossomas ocorre quando o detergente é removido da solução micelar, utilizando algumas técnicas, como por exemplo, a diálise (LASIC, 1993). Apesar das suas características importantes, existem algumas desvantagens nesse método: (i) consiste em um processo muito lento; (ii) a concentração final de lipossomas na solução é baixa, devido às baixas concentrações de lipídios que podem ser utilizados no processo (até 20 mM) (MAHERANI et al., 2011; MEURE et al., 2008).

De forma complementar a Tabela 3 são apresentadas vantagens e desvantagens dos métodos de produção de lipossomas descritos:

Tabela 3: Vantagens e desvantagens dos métodos convencionais de produção de lipossomas (adaptado de Maherani et al., 2011).

Métodos de Produção	Vantagens	Desvantagens	Referências
Pró-lipossomas	Componente bioativo previamente incorporado nas partículas de pró-lipossomas; alta eficiência de encapsulação; técnica simples e prática; facilidade para produção em grande escala	Formação de lipossomas com distribuição de diâmetros heterogêneos; somente formação de MLV	(KIKUCHI et al., 1991; MORAES et al., 2013; ALVES; SANTANA, 2004; TURÁNEK et al., 2003)
Hidratação do filme lipídico seco	Processo simples	Longo período na etapa de remoção do solvente; produção em pequena escala; baixa eficiência de encapsulação	(BANGHAM et al., 1965; YOSHIDA et al., 2010; YOKOTA et al., 2012)
Microfluidização	Controle no tamanho das partículas	Não é adequado para produção em grande quantidade; uso de solvente orgânico	(MOZAFARI et al., 2008; NONGONIERMA et al., 2009)
Homogeneização a alta pressão	Projeto simples; adequado para produção em grande quantidade	Alta pressão; produção de lipossoma com tamanhos não homogêneos; resíduo de solvente orgânico	(BARNADAS-RODRÍGUEZ; SABÉS, 2001)
Injeção de Etanol	Processo relativamente simples	Resíduo do solvente orgânico	(DEAMER; BANGHAM, 1976)
Remoção de Detergente	Projeto simples; controle do tamanho das partículas, dispersão homogênea	Resíduo de detergente; longo tempo de processo; baixo rendimento	(BRUNNER et al., 1976)
Evaporação em fase reversa (REV)	Alta eficiência de encapsulação	Resíduo de solvente orgânico	(SZOKA JR; PAPAHAJIOPOULOS, 1978; WAGNER; VORAUER-UHL, 2011)

Neste contexto, dentre os métodos descritos, pode-se dizer que o método dos pró-lipossomas mostra-se adequado para a encapsulação de uma ampla variedade de substâncias bioativas, além de resultar em altas eficiências de encapsulação quando comparado com outros métodos (WAGNER; VORAUER-UHL, 2011; TURÁNEK et al., 2003). Diante disso, nota-se a extrema importância desse método tornando-se uma ótima alternativa para a produção de lipossomas para aplicações na área alimentícia.

2.4 β -caroteno: estrutura e desafios tecnológicos de sua aplicação como ingrediente em alimentos

Os carotenóides são pigmentos naturais encontrados em plantas, algas, bactérias e fungos. Na maioria dos casos, os carotenóides são responsáveis pela cor de muitas frutas e flores (HORNERO-MÉNDEZ; MÍNGUEZ-MOSQUERA, 2007), sendo os mais comuns encontrados em maior quantidade na natureza β -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina (DE PAZ et al., 2012).

Carotenóides são componentes tetraterpenóides de 40 carbonos formados por 8 unidades isoprenóides, unidas por unidades opostas no centro da molécula. Reações de ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de duplas ligações, encurtamento ou alongamento da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de funções com oxigênio ou a combinação destes processos resultam na diversidade de estruturas dos carotenóides. Os carotenóides podem ser classificados como cíclicos ou acíclicos, dependendo ou não da presença de anéis na sua estrutura. Além disso, são denominados carotenos, quando os carotenóides são compostos apenas por carbono e hidrogênio, ou xantofilas, aqueles que contem oxigênio na estrutura (RODRIGUES-AMAYA, 1999).

Na Figura 13 pode ser visualizada a estrutura dos carotenóides mais comuns:

Figura 13: Estrutura dos carotenóides, licopeno, zeaxantina, luteína e β -caroteno (RODRIGUES-AMAYA, 1999).

As principais funções dos carotenóides na dieta humana são como precursores da vitamina A e como agentes antioxidantes. Por isso, são amplamente utilizados como ingredientes em alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica, principalmente como corante natural. A utilização de carotenóides na área industrial encontra-se geralmente na forma de pós cristalinos; contudo, eles são solúveis em óleos e solventes orgânicos, sendo pouco solúvel em água (MARTÍN et al., 2007). O mercado potencial para preparações de carotenóides dispersíveis em água é imenso, e na indústria alimentícia inclui produtos lácteos, sobremesas, sopas, produtos cárneos, bem como alimentação animal (DELGADO-VARGAS et al., 2000; RODRIGUEZ-HUEZO et al., 2004). Estas preparações precisam apresentar boa estabilidade contra a oxidação e isomerização, adequadas propriedades de solubilização dos carotenóides, bem como serem capazes de produzir uma grande variedade de colorações que sejam desejáveis para determinado produto.

Para que a utilização dos carotenóides seja realmente efetiva, as formulações contendo esses bioativos devem ser apropriadas, uma vez que os carotenóides são propensos a processos de degradação pela ação do oxigênio, temperatura e luz. Por isso, técnicas de microencapsulação podem ser utilizadas para proteger esses bioativos contra esses fatores que implicam na degradação desse componente. Além disso, os carotenóides são altamente hidrofóbicos, uma propriedade que reduz a sua biodisponibilidade e dificulta a incorporação desses bioativos em matrizes alimentares. A fim de superar estas limitações, processos para formulações devem ser desenvolvidos a fim de proteger os carotenóides da degradação, melhorar a sua biodisponibilidade, além da produção de dispersões estáveis em água (DE PAZ et al., 2012; DE PAZ; MARTÍN; COCERO, 2012).

Para reduzir esses problemas de formulação e biodisponibilidade, a encapsulação em matrizes lipídicas, como emulsões, partículas sólidas e lipossomas, surge como opção interessante devido ao fato de que materiais lipídicos podem encapsular uma grande quantidade de carotenóides hidrofóbicos, e também por serem conhecidos por sua capacidade de aumentar a absorção de bioativos com tal natureza (McCLEMENTS, 2010; McCLEMENTS et al., 2009; PARADA; AGUILERA, 2007).

Dentro do contexto encontrado na revisão bibliográfica, nota-se a importância da utilização do β -caroteno em formulações alimentícias. Com isso, encontra-se a necessidade de superar as suas limitações de uso em formulações, a fim de protegê-los contra a degradação, além de aumentar a sua biodisponibilidade. Devido a tais fatos, técnicas de encapsulação tornam-se indispensáveis para alcançar tal objetivo, principalmente, quando em conjunto com essas técnicas são utilizados componentes que auxiliem na absorção do bioativo, como é o caso dos lipídios. No entanto, aplicação destas técnicas na área alimentícia vem se desenvolvendo há pouco tempo, e, por esse motivo, torna-se grande a necessidade da realização de estudos que relacionam a estabilidade dessas microestruturas, a preservação do bioativo microencapsulado e o comportamento quando incorporados em sistemas alimentícios.

3 OBJETIVOS

Este trabalho de Mestrado teve como objetivo principal a produção e caracterização de dispersões de lipossomas encapsulando β -caroteno, e posterior aplicação em um sistema alimentício. Para que tal objetivo principal fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram determinados:

- (i) Caracterização físico-química das dispersões de lipossomas encapsulando β -caroteno, produzidas pelo método dos pró-lipossomas, durante o período de armazenagem;
- (ii) Determinação do comportamento reológico das dispersões de lipossomas encapsulando β -caroteno;
- (iii) Avaliação da estabilidade das dispersões de lipossomas encapsulando β -caroteno em diferentes condições de *stress* (temperatura, pH e diferentes concentrações de sal e açúcar);
- (iv) Testes de adição das dispersões de lipossomas encapsulando β -caroteno em um sistema alimentício (iogurte).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Na etapa de atomização para a produção dos pró-lipossomas foram utilizados: β -caroteno na sua forma purificada e cristalina (Sigma-Aldrich, EUA), lecitina de soja purificada hidrogenada (Phospholipon[®] 90H, Lipoid GmbH, Alemanha), sacarose (Synth, Brasil) e álcool etílico anidro (Synth, Brasil). O fosfolipídio utilizado possui 90% de fosfatidilcolina hidrogenada, sendo 98% das cadeias alifáticas compostas por ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0). A composição do fosfolipídio está descrita no Anexo I.

Para produção das dispersões foram utilizados: goma xantana (Grindsted[®] Xanthan 80, doada pela Danisco, Brasil), goma guar (Êxodo Científica, Brasil) e benzoato de sódio (Synth, Brasil). A água deionizada utilizada durante o processo de hidratação foi obtida pelo sistema de ultrapurificação (Direct-Q[®] 3, Millipore, Molsheim, França).

Na análise da quantificação do fósforo total das dispersões de lipossomas foram utilizados: ácido sulfúrico (Synth, Brasil), peróxido de hidrogênio (Synth, Brasil), molibdato de amônio (Synth, Brasil) e ácido ascórbico (Synth, Brasil).

Para a extração do β -caroteno foram utilizados: álcool etílico anidro (Synth, Brasil) e hexano p.a. (Synth, Brasil).

Nos testes da estabilidade físico-química foram utilizados: sacarose (Synth, Brasil), cloreto de sódio (Synth, Brasil), ácido clorídrico 37% (Synth, Brasil) e hidróxido de sódio (Synth, Brasil).

Na produção do iogurte foi utilizado leite bovino (doado pela Prefeitura do campus da Pirassununga), açúcar (Itaquerê, Brasil), cultura láctea- *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* (YC-X11, Chr. Hansen), corante carmim de cochonilha 3% (Chr. Hansen), essência de morango (Arcolor[®], Brasil) e preparo de morango (Borsato, Brasil). A composição do preparo de morango consiste em: açúcar líquido invertido, polpa de morango, aroma de morango, corante (carmim e ponceau), estabilizante (pectina e amido modificado) e conservante (sorbato de potássio).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Produção dos pró-lipossomas (partículas secas de fosfolipídios) por atomização

Para a produção dos pró-lipossomas, foram solubilizados 3,2 g de fosfolipídio, 0,270 g de sacarose e 120 mg de β -caroteno em etanol anidro, através de ultra- agitação a 15.000 rpm

(ultra-agitador IKA T25, IKA, Staufen, Alemanha), durante 15 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, procedeu-se ao processo de atomização (em *spray dryer* (SD 5.0, Labmaq, Ribeirão Preto, Brasil) obtendo-se as partículas secas de fosfolipídios. O processo de atomização ocorreu a $90 \pm 10^\circ \text{C}$ e uma vazão de alimentação de 10 mL/min usando um bico de pulverização de 1 mm de diâmetro. As partículas secas foram recolhidas em um reservatório acoplado a um ciclone e armazenadas sob refrigeração ($7^\circ\text{-}10^\circ \text{C}$), tendo sido protegidas da luz até a sua utilização na produção dos lipossomas. Tal procedimento foi realizado no Laboratório de Produtos Funcionais, ZEA/FZEA/USP.

4.2.2 Produção dos lipossomas

Os lipossomas foram produzidos pelo método de hidratação das partículas secas de fosfolipídios (pró-lipossomas). Tal processo de hidratação ocorreu adicionando-se água deionizada aos pró-lipossomas, e a seguir submetendo-se a mistura resultante à ultra-agitação mecânica (IKA T25, IKA, Staufen, Alemanha), a 13.000 rpm em temperatura de 65°C , por 5 minutos. A adição dos hidrocolóides (goma guar e/ou goma xantana) às dispersões de lipossomas ocorreu lentamente após a etapa de hidratação, sob agitação magnética (3.600 rpm), em temperatura ambiente por 20 minutos. As amostras foram preparadas em triplicata e armazenadas sob refrigeração ($7^\circ\text{-}10^\circ \text{C}$). Benzoato de sódio (0,02%, em massa) foi adicionado para evitar a deterioração das amostras durante a armazenagem.

Na Tabela 4 são apresentadas as formulações das dispersões de lipossomas produzidas durante este projeto de Mestrado:

Tabela 4: Formulação das dispersões de lipossomas produzida no presente projeto de Mestrado. As dispersões foram estabilizadas com goma xantana, ou com a mistura da goma xantana + goma guar.

Formulação	Pró-lipossomas (g)	Goma total (% mássica)	Goma xantana (mg)	Goma guar (mg)	Benzoato de sódio (mg)	Água deionizada
0,20% GX	2,0	0,20	200	---	20	q.s.p. * 100 mL
0,25% GX	2,0	0,25	250	---	20	q.s.p. 100 mL
0,30% GX	2,0	0,30	300	---	20	q.s.p. 100 mL
90% GG+10% GX, 0,10% goma total	2,0	0,10	10	90	20	q.s.p. 100 mL
80% GG+20% GX, 0,10% goma total	2,0	0,10	20	80	20	q.s.p. 100 mL
90% GG+10% GX, 0,15% goma total	2,0	0,15	15	135	20	q.s.p. 100 mL
80% GG+20% GX, 0,15% goma total	2,0	0,15	30	120	20	q.s.p. 100 mL

*q.s.p- quantidade suficiente para atingir

4.2.3 Caracterização das dispersões de lipossomas

4.2.3.1 Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de partícula

A distribuição do tamanho dos lipossomas e o diâmetro médio de partícula (diâmetro hidrodinâmico) foram obtidos por espectroscopia de correlação de fótons (PCS- *photon correlation spectroscopy*) utilizando-se o equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, Holtsville, NY, EUA), com um laser de He-Ne de 627 nm, ângulo de incidência de 90°, na temperatura de 25° C. Antes da análise as amostras foram diluídas com água deionizada (Millipore) para evitar o fenômeno do espalhamento múltiplo de luz. As análises dos dados foram realizadas pelo software incluído no sistema (90Plus).

4.2.3.2 Determinação do potencial zeta

A análise do potencial zeta foi realizada por medidas de mobilidade eletroforética, utilizando o equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, Holtsville, NY, EUA). As amostras foram diluídas e a condutividade ajustada para 50 mS/cm, e a mobilidade

foi calculada utilizando a equação de Helmholtz-Smoluchowski. As análises dos dados foram realizadas pelo software incluído no sistema (ZetaPlus).

4.2.3.3 *Quantificação de β -caroteno encapsulado nos lipossomas*

O β -caroteno foi extraído usando um processo de extração líquido-líquido com álcool etílico e hexano. Em tubos de ensaio adicionou-se 1 mL da amostra de lipossomas diluída previamente em água deionizada (0,25 g de lipossoma/25 g de água), juntamente com 9 mL de álcool etílico e 6 mL de hexano. Após isso, cada tubo foi agitado em um agitador vórtex até a completa homogeneização. Esse processo de agitação foi repetido a cada 20 minutos durante 2 horas, sendo que neste intervalo os tubos foram armazenados a temperatura controlada de 25°C em incubadora (TE-391, Tecnal, Piracicaba, Brasil). Após esse período, uma alíquota da fase hexano contida na amostra foi retirada e a concentração do β -caroteno foi determinada espectrofotometricamente, utilizando-se leituras realizadas na absorbância de 450 nm (Libra S22, Biochrom, Cambridge, Inglaterra). O β -caroteno foi quantificado de acordo com uma curva de calibração de β -caroteno puro em hexano, com um R^2 de 0,996. A curva de calibração obtida com β -caroteno puro em hexano se encontra no Apêndice A.

4.2.3.4 *Obtenção dos parâmetros colorimétricos*

A análise de colorimetria instrumental das dispersões de lipossomas foram realizadas em um colorímetro (Miniscan XE PLUS, Hunterlab, Reston, VA, EUA). A leitura ocorreu com o iluminante D65 e ângulo de visão com abertura de 10°, sendo que o sistema de leitura utilizado foi o CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*). Foram determinados os fatores (L^* , a^* , b^*) e calculados os valores de croma (C^*_{ab}) ângulo de Hue (h_{ab}) e diferença total de cor (TCD, ou ΔE^*).

A determinação do parâmetro C^*_{ab} foi determinada pela Equação (1):

$$C^*_{ab} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (1)$$

onde:

C^*_{ab} : croma (saturação da cor)

b^* : cromaticidade no eixo variando do amarelo/azul

a^* : cromaticidade no eixo variando do vermelho/verde

A tonalidade do sistema, definida como o ângulo de Hue, foi obtida pela Equação (2):

$$h_{ab} = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (2)$$

onde:

h_{ab} : ângulo de Hue (tonalidade definida em graus)

b^* : cromaticidade no eixo variando do amarelo/azul

a^* : cromaticidade no eixo variando do vermelho/verde

Por sua vez, a diferença total de cor (TCD) foi obtida pela Equação (3):

$$TCD = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad (3)$$

onde,

L_0^* , a_0^* e b_0^* são parâmetros obtidos no dia zero de estocagem.

L^* , a^* e b^* são parâmetros obtidos nos dias de amostragem.

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Processos em Engenharia de Alimentos, ZEA/FZEA/USP.

4.2.3.5 *Quantificação do fosfato total (ensaio fosfato)*

A quantificação do fosfato total foi realizada após um processo de digestão ácida, de acordo com o protocolo de Chen et al. (1956) modificado por Ribas (1997). Em tubos de ensaio adicionou-se 500 μ L de solução 10N de H_2SO_4 e 100 μ L de cada amostra, esse mesmo procedimento foi realizado para as soluções padrões (NaH_2PO_4 nas concentrações de 2, 1,4, 1,2, 0,8 e 0,4 mM) e para a solução isenta de amostra. Os tubos foram aquecidos em bloco digestor (Marconi MA 400, Piracicaba, Brasil) por 30 minutos a 280° C, a seguir foram resfriados até a temperatura ambiente, e 165 μ L de H_2O_2 livre de fosfato foram adicionados a cada tubo. Os tubos foram novamente aquecidos por 30 minutos a 280°C e resfriados até a temperatura ambiente. Adicionou-se, então, 500 μ L de solução de molibdato de amônio (2% em massa), 500 μ L de solução de ácido ascórbico (8% em massa) e 4 mL de água deionizada. A seguir, os tubos foram aquecidos a 100° C por 7 minutos, e resfriados imediatamente em água fria para que a reação cessasse por completo. As absorbâncias foram lidas a 830 nm em espectrofotômetro (Libra S22, Biochrom, Cambridge, Inglaterra), e a concentração de fosfolípidios determinada através de curva de calibração feita ao mesmo tempo com amostras de concentração conhecida de fosfato. Um exemplo de curva de calibração se encontra mostrado no Apêndice B.

4.2.3.6 *Análises reológicas*

As análises reológicas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (FZEA-USP), utilizando-se um reômetro rotacional de tensão controlada (AR 2000 Rheometer, TA Instruments, New Castle, EUA), com uma geometria de placa paralela de 2°. Todas as amostras foram analisadas sob temperatura controlada de 10° C e o período de relaxamento das amostras antes do início de cada processo foi de 2 minutos.

Os testes estacionários determinaram a tensão de cisalhamento a uma determinada taxa de cisalhamento variando de 0,01 a 100 s⁻¹. Através das curvas de escoamento foi possível determinar a viscosidade das amostras e a tensão de escoamento, ou seja, a tensão mínima necessária para iniciar o escoamento da amostra. Os dados obtidos foram tratados através do modelo Herschel-Bulkley através da Equação 4:

$$\sigma - \sigma_0 = K \dot{\gamma}^n \quad (4)$$

onde,

K= índice de consistência (Pa.sⁿ)

n= índice de comportamento (adimensional)

σ= tensão de cisalhamento (Pa)

σ₀= tensão de cisalhamento inicial (Pa)

γ̇= taxa de deformação (s⁻¹)

4.2.3.7 *Análises térmicas por calorimetria diferencial de varredura (DSC)*

As análises de calorimetria foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (FZEA-USP), através do equipamento DSC-TA2010 (TA Instruments, New Castle, EUA). Uma alíquota de 10 mg de amostra foi colocada em uma cápsula de alumínio, pesada em uma balança de precisão, sendo a seguir a cápsula hermeticamente fechada. As amostras foram aquecidas de 10° a 100° C utilizando-se uma rampa de aquecimento de 10° C/min. Uma cápsula de alumínio vazia foi usado como o padrão. O aquecimento foi realizado sob atmosfera inerte (45 mL/min N₂). As entalpias de transição de fases e as temperaturas de transição de fases foram calculadas utilizando o software do equipamento, Universal Analyses V.7 (TA Instruments, New Castle, EUA). O equipamento foi calibrado com índio como padrão.

4.2.3.8 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia das dispersões de lipossomas foi determinada por microscopia eletrônica de transmissão (Carl Zeiss CEM 902), operando com a aceleração de elétrons de 80 kV, equipado com filtro de energia Castaing-Henry-Ottensmeyer, sendo as imagens adquiridas através de câmera CCD (Proscan). As amostras foram diluídas para 1 mM (concentração total de fosfolipídio). O reagente utilizado como corante foi o acetato de uranila (Eléctron Microscopy Sciences, EUA) sendo preparado previamente a 1% (p/v) em água deionizada. O reagente foi filtrado com o auxílio de uma seringa de plástico acoplada com um filtro de tamanho dos poros de 0,22 μ .

Na realização da análise utilizou-se uma grade recoberta com um filme plástico de parlódio e carbono evaporado, na sua superfície foi adicionada uma gota da amostra e após 5 minutos (tempo necessário para fixação da amostra), o excesso da amostra na grade foi seca com papel de filtro (Whatman nº 1). Após isso, adicionou-se uma gota do corante acetato de uranila, aguardou-se um minuto, o excesso do corante foi retirado com papel de filtro e aguardou-se a temperatura ambiente a secagem na grade antes de se proceder a microscopia. A microscopia foi realizada no Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

4.2.4 Estabilidade físico-química das dispersões de lipossomas em diferentes condições de stress

Foram realizados testes de estabilidade nas dispersões de lipossomas, em que elas foram submetidas a várias condições de *stress*: temperatura, variação da concentração de sacarose, variação da concentração de sal (diferentes forças iônicas) e pH. Os protocolos utilizados foram baseados nos estudos realizados por Ding et al. (2011) e Perrechil (2012).

A estabilidade das dispersões de lipossomas foi avaliada pela distribuição do tamanho de partículas. As análises foram realizadas dentro de 24 horas após a produção das amostras denominado o (dia zero). As dispersões submetidas aos diferentes meios foram comparadas com as dispersões controle àquelas que não sofreram nenhum tipo de *stress*.

As dispersões foram submetidas às diferentes condições de stress da seguinte forma:

Temperatura: Alíquotas de 10 ml de lipossomas foram submetidas às temperaturas de 35° C e 70° C por 5, 15 e 30 minutos.

pH: Alíquotas de 10 ml de lipossomas tiveram seu pH ajustado para 4,5 e 6,8, utilizando-se soluções de 0,1M de NaOH e 0,1M de HCl.

Sacarose: Diferentes concentrações de sacarose (1,5%; 7,5%; 10%; 20%) foram acrescentadas a 10 ml de amostra de lipossomas.

Sal: Diferentes concentrações de NaCl (0,025M; 0,1M; 0,25M; 0,5M e 1M) foram acrescentadas a 10 ml de amostra de lipossomas.

4.2.5 Incorporação das dispersões de lipossomas em iogurte

4.2.5.1 *Produção do iogurte*

O sistema alimentício utilizado na aplicação das dispersões de lipossomas foi o iogurte, e as formulações para sua produção encontram-se descritas na Tabela 5:

Tabela 5: Ingredientes utilizados nas formulações dos iogurtes.

Formulação	Iogurte (kg)	Açúcar (g)	Preparo de morango (g)	Essência de morango (g)	Corante (g)	Lipossomas com GX (g de dispersão)	Lipossomas com GX+GG (g de dispersão)
A	3,5	350	70	2,6	0,875	--	--
B	3,3	350	--	2,6	--	274,6	--
C	3,3	350	--	2,6	--	--	274,6
D	3,3	350	70	2,6	--	142,5	--
E	3,3	350	70	2,6	--	--	142,5

Os iogurtes foram produzidos no Laticínio-Escola (planta piloto), localizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP). Na Figura 14 pode-se visualizar o fluxograma do processo:

Figura 14: Fluxograma do processamento do iogurte: (A) fluxograma do iogurte sem a adição das dispersões de lipossomas; (B) fluxograma do iogurte com a adição das dispersões de lipossomas.

Após produzidos, os iogurtes foram acondicionados em garrafas de plástico (polietileno de alta densidade) fechadas com uma tampa plástica e armazenadas a 5° C em incubadora (MA-415, Marconi, Piracicaba, Brasil). Na Figura 15 são apresentadas algumas etapas do processo da produção do iogurte no Laticínio-Escola.

Figura 15: Etapas do processo da produção do iogurte no Laticínio-Escola (planta piloto): (A) tratamento térmico (90° C por 15 min); (B) iogurte após a etapa de incubação; (c) etapa da adição do lipossoma; (D) envase.

4.2.5.2 Caracterização físico-química do iogurte

O iogurte produzido foi analisado em termos de parâmetros colorimétricos e propriedades reológicas. As análises de cor instrumental do iogurte foram realizadas em um colorímetro (Miniscan XE PLUS, Hunterlab, EUA). As leituras ocorreram nos dias 0, 5, e 28 dias de armazenamento dos iogurtes. O sistema de leitura utilizado foi o CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*) com um iluminante D65 e ângulo de visão com abertura de 10°. Foram determinados os fatores (L^* , a^* , b^*) e calculados os valores de croma (C^*_{ab}), ângulo de Hue (h_{ab}) e diferença total de cor (TCD). Tais análises foram realizadas no Laboratório de Processos em Engenharia de Alimentos, ZEA/FZEA/USP.

4.2.5.3 Obtenção de parâmetros reológicos

A viscosidade dos iogurtes foi obtida através de ensaios reológicos em reômetro rotacional de tensão controlada (AR 2000 Rheometer, TA Instruments, EUA), utilizando geometria de cone-placa (4°, $\phi = 60$ mm, material aço inoxidável). As amostras (~ 6 ml) foram analisadas sob temperatura controlada de 10° C e o período de relaxamento das amostras antes do início do processo foi de 2 minutos. Os testes estacionários determinaram a tensão de cisalhamento a uma determinada taxa de cisalhamento variando de 0,01 a 300 s⁻¹. Tais análises foram feitas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos, ZEA/FZEA/USP.

4.2.5.4 Análise sensorial do iogurte

A avaliação sensorial dos iogurtes produzidos foi realizada através de testes afetivos, com o objetivo de avaliar a aceitação pelos consumidores. Os testes foram realizados no Laboratório Multiusuário de Análise Sensorial (ZEA/FZEA/USP) em cabines individuais com luz fluorescente branca. Os ensaios foram realizados nas amostras com 2 dias de armazenamento. As amostras foram avaliadas usando escala estruturada de 9 pontos (1 - "detestei" e 9 – "adorei") para os atributos de sabor, textura, cor, aroma e qualidade global, como mostrado na Figura 16. Sessenta provadores não-treinados, de ambos os sexos e diferentes grupos etários participaram do teste. Os provadores foram selecionados em função de serem consumidores habituais de iogurte e disponibilidade de participar do ensaio, entre os alunos, funcionários e professores da FZEA/USP. O iogurte foi servido em copos plásticos de forma monádica e devidamente codificados. Entre as amostras foram servidos aos consumidores água e biscoito *cream cracker*, para evitar qualquer tipo de interferência entre uma amostra e outra. A ficha de avaliação utilizada pelos provadores durante o processo de análise sensorial está mostrada na Figura 16:

Nome: _____			Data: _____			Ficha: _____		
Você está recebendo uma amostra de iogurte. Por favor, avalie o produto e marque na escala o quanto você gostou ou desgostou das seguintes características: NÚMERO DA AMOSTRA: _____								
Escala 1-Detestei 2-Desgostei muito 3-Desgostei moderadamente 4-Desgostei ligeiramente 5-Nem gostei/Nem desgostei 6-Gostei ligeiramente 7-Gostei moderadamente 8-Gostei muito 9-Adorei	Aroma		Comentários:					
	Textura		Comentários:					
	Cor		Comentários:					
	Sabor		Comentários:					
	Qualidade global		Comentários:					

Figura 16: Ficha de avaliação utilizada pelos consumidores para realização do teste afetivo.

4.2.6 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e, em caso de resultados significativos, foram realizados testes de Tukey para comparação das médias dos tratamentos. O nível de significância utilizado para todos os testes foi de 5%, utilizando-se o software SAS versão 9,2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DOS LIPOSSOMAS ESTABILIZADOS COM GOMA XANTANA

5.1.1 Tamanho de partícula e potencial zeta

As análises realizadas para o monitoramento da vida de prateleira das amostras foram efetuadas durante 90 dias de armazenamento. Na Figura 17 é apresentado o comportamento do diâmetro médio hidrodinâmico ao longo do período de armazenamento considerado:

Figura 17: Diâmetro médio hidrodinâmico ao longo do tempo de armazenagem para as dispersões de lipossomas estabilizados com goma xantana: (A) 0,20% GX; (B) 0,25% GX e (C) 0,30% GX. Os resultados são expressos com as médias e os desvios padrões de duas amostras.

As características dos lipossomas, como o tamanho médio e o número de lamelas, dependem de qual método de produção é utilizado. Uma das características do método dos

pró-lipossomas é obter vesículas multilamelares (MLV), sendo que, para este tipo de lipossoma, o tamanho pode variar de 1 até 4 μm (LASIC, 1988). Nas dispersões de lipossomas produzidas nesta etapa, o diâmetro médio hidrodinâmico variou aproximadamente entre 2000 e 3000 nm, valores característicos de dispersões de lipossomas multilamelares.

Hidrocolóides, como a goma xantana, são comumente adicionadas em emulsões com o objetivo de controlar e aumentar a estabilidade dos sistemas, aumentando a viscosidade da fase aquosa (McCLEMENTS, 2004). Da mesma forma, esta estratégia foi empregada neste trabalho visando aumentar a estabilidade das dispersões de lipossomas, uma estratégia não encontrada na literatura para lipossomas. As dispersões contendo 0,20%, 0,25% e 0,30% de goma xantana foram mantidas sob refrigeração, e, de acordo com os perfis temporais da Figura 17, permaneceram estáveis em relação ao diâmetro médio hidrodinâmico, bem como em relação à aparência macroscópica ao longo dos 90 dias de armazenamento.

Por sua vez, analisou-se também a distribuição de tamanho de partícula das amostras (em termos de número), cujo comportamento é mostrado na Figura 18. Verificou-se que as amostras frescas de lipossomas estabilizadas com 0,20% e 0,25% de GX apresentaram partículas com o tamanho entre 1000-1500 nm; já no dia 90, de armazenamento apresentaram maior número de partículas com o tamanho entre 500-1000 nm. A dispersão contendo 0,30% de goma xantana apresentou no início e no final do armazenamento o tamanho das partículas entre 400-600 nm.

Nota-se, através das curvas de distribuição de tamanho, que a goma xantana foi capaz de estabilizar os sistemas lipossomais multilamelares. Esse comportamento é devido à característica da goma xantana em interagir com as vesículas fosfolipídicas, formando uma rede, sendo que as concentrações de goma empregadas foram suficientes para reter as partículas na estrutura formada e diminuir o número de colisões entre as vesículas durante o armazenamento. Desta forma, a agregação dos lipossomas em grande extensão foi evitada, alcançando o objetivo pretendido.

Entretanto, os comportamentos das distribuições de tamanho dos lipossomas em termos de número mostraram-se incoerentes em termos de valores em relação às médias do diâmetro médio hidrodinâmico das dispersões. Tal fato se justifica por dois motivos: primeiro pela característica das dispersões multilamelares, em que a distribuição de tamanho das partículas nesse sistema é, por natureza, mais heterogênea (bi ou multimodal). O segundo motivo é devido à intensidade do espalhamento de luz das partículas; sabe-se que o espalhamento de luz aumenta conforme o tamanho das partículas, ou seja, nas dispersões

analisadas as partículas grandes espalharam muito mais luz do que as partículas pequenas, justificando os altos valores do diâmetro médio hidrodinâmico.

Figura 18: Distribuição de tamanho no dia 0, 20 e 90 para as dispersões de lipossomas estabilizados com goma xantana: (A) 0,20% GX; (B) 0,25% GX e (C) 0,30% GX. As curvas mostradas foram obtidas para uma amostra dentre as duplicatas produzidas e representam o comportamento dos sistemas produzidos.

No entanto, pode-se considerar corretos os valores da distribuição de tamanho em número das vesículas, uma vez que, as características dos lipossomas puderam ser visualizadas através da microscopia eletrônica de transmissão, sendo as micrografias retratadas na Figura 19:

(A)

(B)

Figura 19: (A) Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão dos lipossomas encapsulando β -caroteno, em dispersões estabilizada com goma xantana: dispersões contendo 20 g/L de lipossomas, dispersos com 0,20% GX. Para realização da análise a amostra foi diluída para 1 mM (concentração final de fosfolípido). (B) Exemplo de uma dispersão contendo 7,5 g/L de lipossomas, dispersos com 0,20% GX. Para realização da análise a amostra foi diluída para 0,25 mM (concentração final de fosfolípido). As micrografias foram obtidas utilizando-se lipossomas com dois dias de armazenagem.

As micrografias também revelam a forma esférica dos lipossomas dispersos no meio aquoso. Percebe-se também através das micrografias a heterogeneidade da distribuição de tamanho dos lipossomas, sendo tal característica intrinsecamente associada com as dispersões de vesículas multilamelares que foram formadas.

Além disso, pode-se notar nas micrografias da Figura 19, a existência da estrutura da rede polimérica formada pela goma xantana para a estabilização dos sistemas. A título de ilustração da rede de polissacarídeos formada, a Figura 19 (B) mostra uma micrografia obtida de um lipossoma também estabilizado com goma xantana, porém contendo uma concentração menor de lipossoma (7,5 g de lipossoma/L). Aparentemente, a goma xantana adicionada ao sistema não adsorveu, em absoluto, na superfície dos lipossomas. A rede polimérica formada foi responsável, desta forma, por diminuir a intensidade e a frequência das colisões entre os lipossomas, diminuindo então a possibilidade de agregação das vesículas. Tal fato é muito claro ao se analisar tanto os dados de diâmetro hidrodinâmico quanto de distribuição de tamanho de partícula.

Por sua vez, o valor da polidispersidade é um indicador da homogeneidade da distribuição do diâmetro médio das partículas, ou seja, quanto menor for seu valor, a dispersão apresentará maior uniformidade do diâmetro médio das partículas (RUOZI et al., 2005). O comportamento da polidispersidade das dispersões é mostrado na Figura 20. Nota-se que os valores alternaram entre 0,15 e 0,22, indicando uma ótima estabilidade das dispersões durante os 90 dias de armazenamento.

Figura 20: Comportamento do índice de polidispersidade dos lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com goma xantana, ao longo do tempo de armazenagem. Os resultados são expressos com os valores da polidispersidade de uma amostra.

O potencial zeta é outro parâmetro relacionado com a estabilidade das dispersões durante a vida de prateleira, sendo um valor líquido das cargas superficiais das partículas (HEURTAULT et al., 2003). Na Figura 21 é mostrada a variação do potencial zeta ao longo do tempo de armazenamento das amostras produzidas com GX; pode-se observar que os valores variaram no intervalo de -20 mV até -40 mV. A partir destes valores do potencial zeta, pode-se perceber que as dispersões mostraram uma boa estabilidade ao longo do tempo de armazenamento. Sugere-se que dispersões coloidais que mantêm com um valor grande negativo ou um valor grande positivo de potencial zeta (menor que -30 mV ou maior que + 30 mV) tendem a se repelirem mais fortemente uma das outras, fato que contribui significativamente para sua estabilidade.

A carga da superfície dos lipossomas varia dependendo do tipo e da composição do fosfolípido que é utilizado para formação do lipossoma. O tipo de fosfolípido utilizado neste projeto, a fosfatidilcolina, é considerada neutra. Na verdade, trata-se de uma molécula zwitteriônica, que possui tanto cargas negativas quanto positivas; no caso da fosfatidilcolina, entretanto, as cargas se equilibram, resultando em uma carga líquida próxima de zero (LASIC, 1993). Além do fosfolípido, o potencial zeta dos lipossomas é influenciado pela composição e as características do meio onde os mesmos estão dispersos (MAHERANI et al., 2011). Os valores do potencial zeta das dispersões foram negativos; apesar de fosfolípidos possuírem uma carga líquida próxima de zero, quando estão dispersos no meio aquoso, são capazes de interagir com os íons hidroxila (OH^-) provenientes da própria água). Os íons hidroxila (OH^-) contribuem para formação de cargas negativas na superfície dos lipossomas, resultando em um potencial zeta negativo apesar da neutralidade das moléculas de fosfolípido que os compõem (HSU; NACU, 2003).

Figura 21: Perfil temporal do potencial zeta dos lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com goma xantana. Os resultados são expressos com os valores do potencial zeta de uma amostra.

5.1.2 Incorporação e preservação do β -caroteno nos lipossomas

Após os 90 dias de armazenagem, as amostras de lipossomas estabilizadas com 0,20%, 0,25% e 0,30% GX perderam 21,1%, 14,5% e 12,3% de massa inicial de β -caroteno respectivamente (Figura 22). Essas perdas de bioativo podem ser consideradas relativamente baixas, fato que é considerado importante, uma vez que o β -caroteno possui baixa estabilidade à oxidação. A oxidação do β -caroteno por fatores como a alta temperatura e a absorção da luz, foram evitadas, uma vez que as amostras foram armazenadas sob refrigeração ($\sim 7^{\circ}\text{C}$) e protegidas na ausência de luz, contribuindo para a sua estabilidade (SILVA et al., 2011; MORAES et al., 2013). Outro fator relevante consiste na composição do fosfolípido utilizado na produção das dispersões, contendo 98% de fosfolípido hidrogenado, impedindo a peroxidação das suas cadeias de hidrocarboneto. A presença de menos de 2% de cadeias insaturadas levou provavelmente, a uma taxa de peroxidação muito baixa.

Figura 22: Perfil temporal da concentração de β -caroteno nos lipossomas estabilizados com goma xantana: (A) 0,20% GX; (B) 0,25% GX e (C) 0,30% GX. Os resultados estão expressos com as médias e desvio-padrão de duas amostras.

Portanto, o único fator que pode ter contribuído para o desencadeamento do processo de oxidação do β -caroteno nos lipossomas foi a etapa de ultra-agitação mecânica, processo realizado durante a hidratação das partículas secas de fosfolipídios. Nesta etapa, na formação das vesículas lipídicas utiliza-se a temperatura de 65° C, que pode ter causado a formação de agentes pró-oxidantes no meio, devido à oxidação do próprio β -caroteno nesta condição. É perceptível a diminuição da concentração de bioativo a partir do 40° dia de armazenamento, e tal comportamento pode ser devido à baixa taxa de difusão do oxigênio através da bicamada lipídica dos lipossomas, levando a uma lenta taxa de degradação do bioativo encapsulado antes deste período.

Por esses fatores, podemos considerar que a auto-oxidação foi à fonte principal para iniciar o processo de oxidação dos sistemas, sendo que ocorreu a uma taxa muito baixa, retardando o processo de degradação do bioativo. Além disso, polissacarídeos como a goma xantana são capazes de proteger lipídios contra a oxidação em emulsões do tipo óleo-em-água, devido à habilidade de quelar metais (SHIMADA et al., 1992; McCLEMENTS; DECKER, 2000). No caso deste trabalho, a goma xantana pode também ter agido da mesma forma, auxiliando na preservação do β -caroteno, evitando a ocorrência de reações que iniciariam o processo de oxidação ocasionada devido a impurezas eventualmente presentes no meio aquoso, devido às matérias-primas utilizadas.

A análise estatística da variação da concentração do β -caroteno encapsulado ao longo do tempo nos lipossomas estabilizados com goma xantana é apresentada na Tabela 6. Pode-se notar que houve diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey, somente no sistema estabilizado com 0,30% de goma xantana, entre o início e o final do tempo de armazenagem. Os altos valores do desvio padrão da concentração de β -caroteno das amostras influenciaram para tal resultado. Essa alta variação é explicada devido à característica das dispersões de MLV, ou seja, são sistemas heterogêneos, e isso influenciou no momento da quantificação do β -caroteno.

Tabela 6: Médias da concentração de β -caroteno em função do tempo de armazenamento dos lipossomas estabilizados com goma xantana

Formulação	Dia 0	Dia 6	Dia 20	Dia 27	Dia 46	Dia 90
0,20% GX	359,23 ^{a±}	402,30 ^{a±}	391,91 ^{a±}	358,87 ^{a±}	268,55 ^{a±}	284,33 ^{a±}
	40,64	47,30	82,03	6,22	13,66	5,09
0,25% GX	324,90 ^{a±}	356,07 ^{a±}	398,96 ^{a±}	355,47 ^{a±}	280,49 ^{a±}	277,82 ^{a±}
	54,73	10,67	63,80	27,79	8,02	13,25
0,30% GX	329,05 ^{ab±}	369,06 ^{ab±}	383 ^{a±}	382,96 ^{ab±}	275,77 ^{b±}	288,55 ^{b±}
	81,39	7,52	70,38	54,29	6,28	18,08

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha, não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5%.

Por sua vez, a cor nos alimentos é um fator essencial e deve ser mantida durante a vida de prateleira do produto ou insumo. Nas dispersões lipossomais produzidas, a cor poderia sofrer alterações devido à degradação do β -caroteno. Os parâmetros colorimétricos das dispersões lipossomais são apresentados na Figura 23; nota-se um pequeno aumento da luminosidade (L^*) ao longo do tempo, caracterizando as dispersões como mais claras, fato relacionado com a degradação do β -caroteno encapsulado. As amostras com 0,20% e 0,25% de goma xantana apresentaram um aumento maior de L^* quando comparado com a amostra de 0,30% de goma xantana, e tal resultado está de acordo com o comportamento de a^* e b^* , visto que a amostra de 0,30% de goma xantana manteve seus parâmetros a^* e b^* praticamente constantes ao longo do tempo.

A alteração da cor pode ser melhor visualizada quando os três parâmetros L^* , a^* e b^* são relacionados através do cálculo da diferença total de cor (TCD). Os valores de TCD variaram de 0 a 5. Durante o período de avaliação, as amostras de 0,20% e 0,25 % de GX apresentaram um aumento do valor de TCD, em relação à amostra de 0,30% de GX. Essa variação pode ser melhor analisada em termos da porcentagem de variação. Percebe-se um aumento dos valores de TCD no final do período de armazenagem de 150,76% e 153,76% para as dispersões de 0,20% e 0,25% de GX, comparada com a dispersão de 0,30% de GX. Pode-se considerar uma alta variação em termos de porcentagem, fato que não é visualizado, quando os valores de TCD são analisados somente em termos de valores absolutos. Por outro lado, a amostra de 0,30% de GX foi a que se manteve mais estável, e tal comportamento está de acordo com os perfis de concentração do β -caroteno (Figura 22), uma vez que a preservação do bioativo encapsulado foi mais eficiente nos lipossomas contendo 0,30% de goma xantana.

Figura 23: Perfil temporal dos parâmetros colorimétricos dos lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com goma xantana: (A) parâmetro a^* e b^* (B) croma (C^*_{ab}) (C) ângulo Hue (h^*_{ab}) (D) parâmetro (L^*) e diferença total de cor (TCD). Os resultados estão expressos com as médias e desvio-padrão de duas amostras.

Também foram calculados os valores de C^*_{ab} e h_{ab} , também mostrados na Figura 23. Os valores do ângulo de Hue entre 0° e 90° representam a cor vermelha, amarela e laranja, ou seja, os valores do ângulo Hue para as dispersões variaram de 20° a 24° indicando que as dispersões apresentaram do ponto de vista instrumental, a cor vermelha. Os valores de C^*_{ab} mantiveram-se estáveis ao longo do tempo, ou seja, a intensidade da cor e sua pureza não e alteraram durante o tempo, mantendo-se entre os valores de 20 e 22.

Os comportamentos dos parâmetros colorimétricos indicam uma pequena perda da cor devido à degradação do bioativo, porém pode-se considerar que, também de acordo com essas análises, os lipossomas foram efetivos na preservação do β -caroteno, devido às mínimas variações nos parâmetros de cor durante os 90 dias de armazenamento. Tal comportamento pode ser reforçado pela análise estatística apresentada nas Tabelas 7, 8 e 9. Os dados mostram que não houve diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey em relação aos

parâmetros a^* , b^* e L^* das amostras dos lipossomas estabilizados com goma xantana ao longo do tempo de armazenamento.

Tabela 7: Médias do parâmetro de cor a^* , em função do tempo de armazenamento das amostras estabilizadas com goma xantana.

Formulação	Dia 0	Dia 6	Dia 20	Dia 27	Dia 46	Dia 90
0,20% GX	20,14 ^a ±0,04	19,78 ^a ±0,13	19,12 ^a ±0,52	18,69 ^a ±0,37	18,82 ^a ±1,25	18,56 ^a ±0,99
0,25% GX	19,30 ^a ±0,81	18,81 ^a ±0,90	18,35 ^a ±0,64	18,00 ^a ±0,49	18,11 ^a ±0,42	16,99 ^a ±0,71
0,30% GX	20,30 ^a ±0,05	19,82 ^a ±0,56	19,21 ^a ±0,27	19,30 ^a ±1,30	19,56 ^a ±1,02	19,19 ^a ±0,27

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha, não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 8: Médias do parâmetro de cor b^* , em função do tempo de armazenamento das amostras estabilizadas com goma xantana.

Formulação	Dia 0	Dia 6	Dia 20	Dia 27	Dia 46	Dia 90
0,20% GX	7,81 ^a ±0,06	8,75 ^a ±0,08	8,06 ^a ±0,35	7,23 ^a ±0	7,96 ^a ±0,54	8,25 ^a ±0,82
0,25% GX	7,50 ^a ±0,33	7,80 ^a ±0,47	7,19 ^a ±0,49	6,50 ^a ±0,08	7,29 ^a ±0,23	6,94 ^a ±0,47
0,30% GX	8,18 ^a ±0,11	8,38 ^a ±0,15	8,06 ^a ±0,15	7,70 ^a ±0,52	7,65 ^a ±0,55	8,12 ^a ±0,37

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha, não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 9: Médias do parâmetro de cor L^* , em função do tempo de armazenamento das amostras estabilizadas com goma xantana.

Formulação	Dia 0	Dia 6	Dia 20	Dia 27	Dia 46	Dia 90
0,20% GX	36,15 ^a ±0,52	35,92 ^a ±1,27	36,43 ^a ±0,71	38,40 ^a ±1,52	37,75 ^a ±2,95	39,59 ^a ±2,29
0,25% GX	35,72 ^a ±1,12	35,36 ^a ±1,4	35,43 ^a ±1,19	38,45 ^a ±2,25	37,46 ^a ±3,05	40,21 ^a ±1,36
0,30% GX	36,28 ^a ±0,27	35,92 ^a ±0,24	36,69 ^a ±0,24	38,77 ^a ±0,92	37,19 ^a ±1,94	38,23 ^a ±0,61

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha, não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5%.

Outra análise realizada para caracterização das dispersões de lipossomas foi a quantificação de fosfato total. Os resultados de tais análises permitiram determinar, além da concentração de fosfolípido total, a porcentagem de β -caroteno nos lipossomas e a razão fosfolípido/ β -caroteno, que são mostradas na Tabela 10:

Tabela 10: Valores de concentração total de fosfolipídio, porcentagem molar de β -caroteno nos lipossomas e razão molar fosfolipídio/ β -caroteno, para as dispersões estabilizadas com goma xantana.

Formulação	Concentração inicial de β -caroteno (mol. L ⁻¹)	Concentração total de fosfolipídio (mol. L ⁻¹)	% molar de β -caroteno	Razão molar
				fosfolipídio/ β -caroteno (%)
0,20% GX	$6,7 \times 10^{-4} \pm 40,63$	$18,9 \times 10^{-3} \pm 0,84$	3,54	28,20
0,25% GX	$6,05 \times 10^{-4} \pm 54,73$	$21,7 \times 10^{-3} \pm 6,13$	2,78	35,87
0,30% GX	$6,13 \times 10^{-4} \pm 81,39$	$22,8 \times 10^{-3} \pm 2,95$	2,68	37,19

Os valores de porcentagem molar de β -caroteno estão de acordo com a literatura, demonstrando a boa capacidade de incorporação do β -caroteno em lipossomas multilamelares (SOCACIU et al., 2002; MORAES et al., 2013). A produção de lipossomas pelo método de pró-lipossomas destaca-se, então, pela vantagem de introduzir anteriormente (na etapa de atomização) o bioativo na matriz lipídica, diferentemente de outros métodos de produção, nos quais a incorporação do bioativo ocorre somente no momento da formação da bicamada. No caso do presente estudo, mostraram que não houve perdas de β -caroteno na etapa de hidratação dos pró-lipossomas, uma vez que o carotenóide estava firmemente incorporado na matriz dos pós (MORAES et al., 2013).

A Tabela 11 resume os valores dos parâmetros investigados para as dispersões de lipossomas estabilizadas com goma xantana, no início e ao final do tempo de armazenagem analisado:

Tabela 11: Quadro-resumo dos valores dos parâmetros obtidos para as dispersões de lipossomas estabilizadas com goma xantana, no início e ao final do período de armazenamento (sob refrigeração).

Parâmetro	Formulação/tempo					
	0,20% GX		0,25% GX		0,30% GX	
	Dia 0	Dia 90	Dia 0	Dia 90	Dia 0	Dia 90
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	1790±71	2363±86,85	2409±111,25	2525±74,2	2396±102,35	2964±69,05
Potencial zeta (mV)	-29,12±4,21	-33,53±2,04	-37,45±0,75	-24,60±1,82	-32,02±6,33	-35,81±2,11
PDI	0,298±0,043	0,348±0,017	0,376±0,033	0,358±0,017	0,424±0,022	0,380±0,011
β-caroteno (mg/L)	359,23±40,63	284,33±5,08	324,90±54,73	277,82±13,25	329,09±81,39	288,54±18,08
a*	20,03±0,13	17,88±0,09	19,60±0,25	17,56±0,07	20,09±0,22	19,37±0,12
b*	7,84±0,17	7,82±0,14	7,82±0,07	7,23±0,07	8,07±0,014	8,10±0,21
L*	36,65±0,13	41,23±0,05	36,65±0,10	41,30±0,21	36,68±0,18	38,56±0,10
C* _{ab}	21,51±0,07	19,52±0,08	21,10±0,21	19,00±0,07	21,65±0,15	21,00±0,19
h* _{ab}	21,38±0,52	23,61±0,39	21,74±0,42	22,38±0,22	21,88±0,48	22,70±0,53
TCD	--	5,05±0,17	--	5,11±0,21	--	2,01±0,36

5.2 AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DOS LIPOSSOMAS ESTABILIZADOS COM MISTURAS DE GOMA GUAR E GOMA XANTANA

5.2.1 Tamanho de partícula e potencial zeta

As análises realizadas para o monitoramento do comportamento físico-químico das amostras de lipossomas estabilizados com misturas de gomas foram efetuadas durante 95 dias de armazenamento. A Figura 24 apresenta o comportamento do diâmetro médio hidrodinâmico ao longo desse período:

Figura 24: Diâmetro médio hidrodinâmico ao longo do tempo de armazenagem para dispersões de lipossomas estabilizadas com goma xantana + goma guar: (A) 10% GX+90% GG; 0,10% goma total; (B) 20% GX+80% GG; 0,10% goma total e (C) 10% GX+90% GG; 0,15% goma total; (D) 20% GX+80% GG; 0,15% goma total. Os resultados são expressos com as médias e os desvios padrões de três amostras.

Nos sistemas lipossomais estabilizados com a mistura de hidrocolóides, pode-se perceber que foi possível diminuir pela metade a concentração de goma necessária para estabilizar as dispersões, sem ocorrer separação de fases, em comparação às amostras estabilizadas somente com goma xantana.

Além disso, a Figura 24 mostra que, em todos os sistemas lipossomais estabilizados com a mistura de gomas, o diâmetro médio hidrodinâmico variou entre 1700 a 2500 nm, ocorrendo um pequeno aumento após o 40º dia de armazenamento. Assim como no caso dos lipossomas estabilizados com goma xantana, tais valores podem ser considerados adequados para dispersões de vesículas fosfolipídicas multilamelares (MLV) (MALMSTEN, 2002).

Também analisou-se a distribuição de tamanho das amostras em termos de número de partículas, cujo comportamento é apresentado na Figura 25. Pelas curvas obtidas, pode-se claramente perceber que as amostras estabilizadas com 0,10% goma total foram mais efetivas na preservação do tamanho dos lipossomas ao longo do tempo de armazenamento.

Figura 25: Distribuição do tamanho no dia 0 e no dia 95 para dispersões de lipossomas estabilizadas com goma xantana + goma guar: (A) 10% GX+90% GG; 0,10% goma total; (B) 20% GX+80% GG; 0,10% goma total e (C) 10% GX+90% GG; 0,15% goma total; (D) 20% GX+80% GG; 0,15% goma total. As curvas mostradas foram obtidas para uma amostra dentre as triplicatas produzidas e representam o comportamento dos sistemas produzidos.

Por sua vez, para os sistemas contendo 0,15% de goma total, as curvas de distribuição de tamanho indicam que ocorreram diferenças significativas na distribuição de tamanho de partícula, em relação ao seu número, do início para o final de sua vida de prateleira. A utilização da mistura de gomas guar e xantana nas dispersões interfere na viscosidade da solução aquosa, pela capacidade de aumentar significativamente a viscosidade do meio,

mesmo em baixas concentrações (CASAS et al., 2000). Este aumento da viscosidade pode acontecer devido à formação de uma rede polimérica, da mesma forma que nos lipossomas estabilizados somente com goma xantana. Tal rede pode ser visualizada nas micrografias obtidas por MET, mostradas na Figura 26.

Figura 26: Microscopia eletrônica de transmissão dos lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com a mistura de goma xantana+goma guar : 10%GG+90%GX, 0,10% goma total. As micrografias foram obtidas a partir dos lipossomas no período de dois dias de armazenagem. Para realização da análise a amostra foi diluída para 0,5 mM (concentração final de fosfolipídio).

A rede polimérica formada pela mistura de gomas foi capaz, assim como no caso das dispersões contendo somente goma xantana, de retardar a agregação dos lipossomas por longos períodos de tempo, principalmente nos sistemas estabilizados com 0,10% de goma no total. Em contrapartida, as amostras estabilizadas com 0,15% de goma total apresentaram um aumento do tamanho das partículas ao longo do período de armazenamento. Apesar da maior porcentagem de goma no total, a rede polimérica não foi forte suficientemente para manter as dispersões estabilizadas até o final dos 90 dias de armazenamento, tendo ocorrido uma desestruturação da rede polimérica, favorecendo o processo de agrupamento das vesículas. A utilização da mistura das gomas pode favorecer a formação de um gel resistente, porém quando a goma xantana é substituída por percentuais maiores de goma guar pode haver uma diminuição da força do gel (MORRIS, 2006). Tal fato certamente contribuiu para que, mesmo

havendo a presença de 50% a mais de polissacarídeos espessantes, os lipossomas fossem mais suscetíveis à agregação nas dispersões estabilizadas com 0,15% de goma total.

Em comparação com as dispersões de lipossomas estabilizadas goma xantana, as dispersões estabilizadas com a mistura de gomas apresentaram melhor uniformidade no tamanho, devido à distribuição de tamanho ser mais estreita. Com isso, o valor da polidispersidade manteve-se baixo, como é apresentado na Figura 27. O índice de polidispersidade é um indicador da uniformidade de distribuição de tamanho; como os valores variaram, neste caso, entre 0,20-0,35, pode-se considerar que os sistemas apresentaram boa uniformidade do tamanho das dispersões.

Figura 27: Comportamento do índice de polidispersidade dos lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com goma xantana+goma guar, durante o período de armazenagem. Os resultados são expressos com os valores da polidispersidade de uma amostra representativa do sistema produzido.

Por sua vez, na Figura 28, pode-se observar a variação do potencial zeta das dispersões de lipossomas estabilizados com as misturas de goma guar e goma xantana durante o tempo de armazenagem:

Figura 28: Perfil temporal do potencial zeta dos lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com goma xantana + goma guar, durante o período de armazenagem. Os resultados são expressos com os valores do potencial zeta de uma amostra representativa do sistema produzido.

Os valores variaram de -20 mV até -150 mV, sendo que durante todo o período os valores mantiveram-se abaixo de -25 mV, indicando uma ótima estabilidade das dispersões.

5.2.2 Incorporação e preservação do β -caroteno

Na Figura 29 são mostrados os valores da concentração do β -caroteno durante os 95 dias de armazenamento. Os valores das concentrações do β -caroteno em todas as dispersões no final do armazenamento permaneceram em torno de 200 mg/L.

Pode-se considerar baixas as perdas de bioativo encapsulado apresentadas ao final da armazenagem. Também no caso da estabilização das dispersões com a mistura de gomas, as mesmas condições de armazenamento foram adotados para diminuir a oxidação, uso de refrigeração e envolvimento dos frascos de armazenamento com material laminado de forma a evitar o contato com a luz. Assim pode-se considerar que praticamente não houve oxidação do β -caroteno por tais motivos. A pequena perda de β -caroteno encapsulado, portanto, pode ser explicada, assim como no caso dos lipossomas estabilizados com goma xantana, por dois fatores: (i) a lenta peroxidação do fosfolípido e (b) a lenta difusão de agentes oxidantes através da membrana fosfolipídica (MORAES et al., 2013). A presença dos agentes oxidantes provavelmente ocorreu, assim como no caso do uso da goma xantana como espessante, devido ao uso da temperatura de 65° C durante etapa de hidratação dos pró-lipossomas. Além disso, na própria matriz obtida por atomização já havia a presença de agentes pró-oxidantes do β -caroteno, pois o processo de *spray-drying* ocorre a alta temperatura (MORAES et al., 2013).

A análise estatística da concentração do β -caroteno dos lipossomas estabilizados com a mistura de goma xantana+goma guar é apresentada na Tabela 12. Pode-se perceber que não houve diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey, demonstrando a pequena perda de β -caroteno ao longo do tempo de armazenamento:

Tabela 12: Médias da concentração de β -caroteno (mg/L) em função do tempo de armazenamento lipossomas estabilizados com a mistura de goma xantana+goma guar

Formulação	Dia 0	Dia 6	Dia 20	Dia 27	Dia 46	Dia 95
10%GX+90%GG,	245,34 ^a	225,48 ^a	236,94 ^a	172,99 ^a	156,18 ^a	202,02 ^a
0,10% goma total	±1,79	±11,10	±13,94	±1,51	±0,88	±2,57
20%GX+80%GG,	244,97 ^a	215,28 ^a	233,16 ^a	175,04 ^a	162,66 ^a	210,15 ^a
0,10% goma total	±1,78	±4,98	±11,03	±1,03	±30,54	±3,73
10%GX+90%GG,	241,21 ^a	233,32 ^a	212,04 ^a	188,18 ^a	172,29 ^a	194,87 ^a
0,15% goma total	±1,67	±10,77	±15,73	±5,85	±12,97	±19,01
20%GX+80%GG,	237,31 ^a	210,70 ^a	229,15 ^a	223,94 ^a	185,81 ^a	251,63 ^a
0,15% goma total	±0,82	±1,33	±4,79	±44,71	±1,17	±21,20

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha, não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 29: Perfil temporal da concentração de β -caroteno nos lipossomas estabilizados com goma xantana: (A) 10% GX+90% GG; 0,10% goma total; (B) 20% GX+80% GG; 0,10% goma total e (C) 10% GX+90% GG; 0,15% goma total; (D) 20% GX+80% GG; 0,15% goma total. Os resultados estão expressos com as médias e desvio-padrão de três amostras.

Do ponto de vista da cor instrumental, na Figura 30 são apresentados os valores das coordenadas a^* e b^* ao longo do tempo de armazenamento para as amostras de lipossomas estabilizadas com mistura de goma guar e goma xantana. Para todas as dispersões estabilizadas com misturas de gomas os valores dos parâmetros a^* e b^* mantiveram-se positivos ao longo do tempo de armazenagem, e praticamente constantes ao longo do tempo, indicando perdas mínimas da cor que caracteriza o β -caroteno, e, confirmando assim os resultados obtidos pela extração do β -caroteno encapsulado.

Da mesma forma, os valores da luminosidade L^* , mantiveram-se constante durante os 95 dias de armazenagem, assim como os parâmetros de pureza da cor C^*_{ab} e o ângulo de Hue. Para os valores da diferença total de cor, a amostra 20% GX+80% GG; 0,15% goma total,

observou-se o maior valor; no entanto, as outras amostras se mantiveram com os valores de TCD menor que 4, mostrando, mais uma vez, que a preservação do β -caroteno foi efetiva ao longo do tempo de armazenamento, de acordo com os perfis temporais de concentração de β -caroteno apresentados na Figura 30.

Figura 30: Perfil temporal dos parâmetros colorimétricos dos lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com goma xantana + goma guar: (A) a^* e b^* (B) Cromo C^*_{ab} (C) ângulo de Hue (D) L^* e TCD. Os resultados estão expressos com as médias e desvio-padrão de três amostras.

A análise estatística dos parâmetros colorimétricos é apresentada nas Tabelas 13, 14 e 15. Novamente, não houve diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey para os parâmetros a^* e L^* ao longo do tempo de armazenamento. Para o parâmetro b^* houve diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey para o lipossoma contendo 10%GX+90%GG, 0,15% goma total. No entanto, pode-se considerar que essa diferença foi

mínima, uma vez que, os valores de $F_{\text{calculado}}$ para os parâmetros foram muito baixos, (por exemplo, para L^* o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi de 2,47). Os parâmetros colorimétricos apresentaram uma baixa variação entre as médias; com isso, a perda de cor ao longo do tempo foi mínima, mostrando a eficiência das dispersões na preservação do β -caroteno do ponto de vista instrumental.

Tabela 13: Médias do parâmetro de cor a^* , em função do tempo de armazenamento das amostras estabilizadas com a mistura de goma xantana+goma guar

Formulação	Dia 0	Dia 6	Dia 20	Dia 27	Dia 46	Dia 90
10%GX+90%GG, 0,10% goma total	21,73 ^a ±0,54	21,84±0,58	19,89 ^a ±1,47	20,32 ^a ±0,39	22,04 ^a ±1,12	21,80 ^a ±0,55
20%GX+80%GG, 0,10% goma total	21,76 ^a ±0,32	21,90 ^a ±0,11	19,79 ^a ±0,56	20,32 ^a ±0,46	22,57 ^a ±1,38	21,49 ^a ±1,05
10%GX+90%GG, 0,15% goma total	21,66 ^a ±0,17	21,50 ^a ±0,61	19,45 ^a ±0,29	20,38 ^a ±0,05	22,06 ^a ±1,48	21,76 ^a ±1,38
20%GX+80%GG, 0,15% goma total	21,95 ^a ±0,16	21,30 ^a ±0,1	19,57 ^a ±0	20,64 ^a ±0,66	22,20 ^a ±2,87	21,18 ^a ±0,8

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha, não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 14: Médias do parâmetro de cor b^* , em função do tempo de armazenamento amostras estabilizadas com a mistura de goma xantana+goma guar

Formulação	Dia 0	Dia 6	Dia 20	Dia 27	Dia 46	Dia 90
10%GX+90%GG, 0,10% goma total	8,63 ^a ±0,25	8,39 ^a ±0,11	7,17 ^a ±0,19	6,55 ^a ±0,13	8,52 ^a ±0,46	7,32 ^a ±0,3
20%GX+80%GG, 0,10% goma total	8,46 ^a ±0	8,08 ^a ±0,24	7,25 ^a ±0,12	6,61 ^a ±0,16	8,61 ^a ±0,35	7,78 ^a ±0,01
10%GX+90%GG, 0,15% goma total	8,70 ^{ab} ±0,37	8,23 ^{ab} ±0,27	7,23 ^{ab} ±0,56	6,93 ^b ±0,31	9,21 ^a ±0,44	8,36 ^{ab} ±0,27
20%GX+80%GG, 0,15% goma total	8,09 ^a ±1,07	7,41 ^a ±1,23	7,21 ^a ±0,55	6,70 ^a ±0,09	7,76 ^a ±1,47	7,35 ^a ±0,97

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha, não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 15: Médias do parâmetro de cor L*, em função do tempo de armazenamento amostras estabilizadas com a mistura de goma xantana+goma guar

Formulação	Dia 0	Dia 6	Dia 20	Dia 27	Dia 46	Dia 90
10%GX+90%GG, 0,10% goma total	31,66 ^a ±0,84	31,92 ^a ±0,8	29,38 ^a ±9,24	35,11 ^a ±0,97	34,65 ^a ±3,17	32,92 ^a ± 0,27
20%GX+80%GG, 0,10% goma total	32,69 ^a ±0,11	32,78 ^a ±0	29,94 ^a ±9,54	35,49 ^a ±0,94	35,98 ^a ±0,92	33,02 ^a ± 1,27
10%GX+90%GG, 0,15% goma total	32,95 ^a ±0,18	32,71 ^a ±0,25	36,75 ^a ±1,17	34,63 ^a ±0,75	32,81 ^a ±0,03	30,05 ^a ± 0,35
20%GX+80%GG, 0,15% goma total	32,49 ^a ±0,39	32,63 ^a ±0,26	36,67 ^a ±0,88	34,52 ^a ±0,32	34,11 ^a ±0,34	32,06 ^a ± 0,43

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha, não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5%.

A análise de quantificação de fosfolípido total foi realizada também para as dispersões de lipossomas espessadas com as misturas de gomas. As porcentagens molares de β -caroteno e as razões fosfolípido/ β -caroteno estão apresentadas na Tabela 16. Assim como no caso dos lipossomas estabilizados com goma xantana, tais valores estão de acordo com a literatura, (SOCACIU et al., 2002; MORAES et al., 2013), demonstrando o alto valor de incorporação do β -caroteno nos lipossomas multilamelares produzidos.

Tabela 16: Valores de concentração total de fosfolípido, porcentagem molar de β -caroteno nos lipossomas e razão molar fosfolípido/ β -caroteno, para as dispersões estabilizadas com misturas de goma guar e goma xantana.

Formulação	Concentração de β - caroteno (mol. L ⁻¹)	Concentração total de fosfolípido (mol. L ⁻¹)	% molar de β -caroteno	Razão molar fosfolípido/ β - caroteno
10%GX+90%GG, 0,10% goma total	4,5×10 ⁻⁴ ±2,73	17,3×10 ⁻³ ±0,76	2,60	38,44
20%GX+80%GG, 0,10% goma total	4,4×10 ⁻⁴ ±11,73	18,2×10 ⁻³ ±0,35	2,42	41,35
10%GX+90%GG, 0,15% goma total	4,6×10 ⁻⁴ ±12,19	17,9×10 ⁻³ ±1,70	2,57	38,91
20%GX+80%GG, 0,15% goma total	4,3×10 ⁻⁴ ±7,53	17,6×10 ⁻³ ±0,83	2,44	40,93

A Tabela 17 resume os valores dos parâmetros importantes para as dispersões de lipossomas estabilizadas com goma xantana e a goma guar, no início e ao final do tempo de armazenagem considerado:

Tabela 17: Quadro-resumo dos valores dos parâmetros obtidos para as dispersões de lipossomas estabilizadas com misturas de goma xantana e goma guar, no início e ao final do período de armazenamento (sob refrigeração).

Parâmetro	Formulação/tempo							
	10% GX+90% GG		20% GX+80% GG		10% GX+890% GG		20% GX+80% GG	
	0,10% goma total		0,10% goma total		0,15% goma total		0,15% goma total	
	Dia 0	Dia 95	Dia 0	Dia 95	Dia 0	Dia 95	Dia 0	Dia 95
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	2126±61,23	2302±99,16	1993±96,26	2203±80,46	1977±76,6	2465±100	1975±88,86	2317±134,23
Potencial zeta (mV)	-40,67±8,04	-48,42±1,76	-59,33±20,59	-44,93±2,33	-74,1±31,87	-48,82±1,2	-55,86±22,99	-38,44±5,56
PDI	0,222±0,036	0,220±0,028	0,304±0,015	0,335±0,014	0,245±0,020	0,248±0,037	0,299±0,022	0,325±0,020
β-caroteno (mg/L)	243,93±2,73	215,47±23,37	238,23±11,73	225,23±26,25	248,21±12,19	219,38±44,54	232,97±7,53	223,50±13,13
a *	21,87±0,37	21,46±0,57	21,88±0,24	21,48±0,61	21,77±0,19	22,19±0,10	22±0,11	21,55±0,70
b *	8,17±0,67	7,43±0,23	8,46±0,004	7,66±0,16	8,38±0,50	7,95±0,60	8,27±0,67	7,64±0,69
L *	31,90±0,59	32,68±0,38	32,12±0,81	32,51±1,02	33,06±0,18	31,47±2,02	32,23±0,43	32,70±0,94
C* _{ab}	23,35±0,57	22,71±0,59	23,45±0,23	22,81±0,58	23,33±0,30	23,57±1,13	23,50±0,33	22,87±1,45
h° _{ab}	20,45±1,25	19,09±0,40	21,14±0,21	19,64±0,63	21,03±1,10	19,68±0,58	20,58±0,87	19,47±1,15
TCD	--	1,52±1,04	--	1,32±0,29	--	2,60±0,75	--	1,52±0,87

Após este estudo da vida de prateleira das dispersões, foram escolhidas cinco amostras para realização das análises posteriores, como o DSC, a reologia, a estabilidade físico-química e a incorporação ao sistema alimentício. Foram submetidas para tais testes as seguintes dispersões: com 0,20% de GX; 10% GX+90%GG, 0,10% goma total; 20% GX+80%GG, 0,10% goma total; 10% GX+90%GG, 0,15% goma total; 20% GX+80%GG, 0,15% goma total. Tais amostras foram escolhidas, devido algumas apresentarem boa estabilização dos lipossomas em relação a evitar agregação das vesículas durante a sua vida de prateleira, assim como, a boa preservação do β -caroteno encapsulado.

5.3 Análises térmicas por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varredura (DSC) para os lipossomas estabilizados com goma xantana e com a mistura de goma xantana e goma guar estão apresentados na Figura 31.

Figura 31: Termogramas das dispersões de lipossomas estabilizadas com goma xantana ou a mistura de goma xantana +goma guar. Os lipossomas foram produzidos e no mesmo dia foi realizada a análise calorimétrica.

Os termogramas obtidos mostram que todas as dispersões de lipossomas apresentaram picos de transição endotérmica. Os resultados da temperatura *onset* (T_{onset}), temperatura de transição (T_m) e a entalpia (ΔH_m) estão apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18: Dados calorimétricos (DSC) das dispersões de lipossomas estabilizadas com goma xantana ou goma xantana+ goma guar.

Formulação	T_{onset} (°C)	T_c (°C)	ΔH_m (J/g)
0,20% GX	50,77	52,54	0,984
90% GG+10% GX, 0,10% goma total	50,77	52,42	0,942
80% GG+20% GX, 0,10% goma total	51,10	52,90	1,00
90% GG+10% GX, 0,15% goma total	51,29	53,30	0,979
80% GG+20% GX, 0,15% goma total	50,97	52,92	0,925

Nota-se que as dispersões apresentaram somente um pico, endotérmico e que foram semelhantes para todos os sistemas, apresentando uma temperatura de transição em torno de 53 °C. Este valor da temperatura indica a temperatura de transição de fase das vesículas de fosfolípidios, ou seja, conforme o aumento da temperatura elas passam do estado gel, onde as cadeias de hidrocarboneto apresentam-se mais ordenadas e com baixa movimentação, para o estado líquido-cristalino, onde as cadeias apresentam-se menos ordenadas e com maior mobilidade. Geralmente a T_m , depende da natureza do grupo da cabeça polar, o comprimento e o grau de insaturação da cadeia de hidrocarboneto (LASIC, 1993).

A presença de um único pico sinaliza que os lipossomas formados não apresentaram heterogeneidade estrutural e sua bicamada, sem formação de subdomínios. Tal comportamento era esperado, já que a matéria prima constitui de Phospholipon 90H, uma fosfatidilcolina de soja hidrogenada. O fato de o pico de transição gel-líquido cristalino ser estreito também indica que tal fenômeno foi altamente cooperativo.

Além disso, o fato de a T_m , para todos os casos, se localizar muito próximo a 53° C, indica que a presença do β -caroteno não deteriorou significativamente a estrutura (fluidez) da bicamada lipossoma. Tal afirmação baseia-se no valor de $T_m = 51,8^\circ\text{C}$ obtida para lipossomas multilamelares produzidos com a mesma matéria prima em trabalho anterior do grupo de pesquisa (YOSHIDA et al., 2010).

A presença de somente um pico referente à transição de fase das vesículas indica também, que os hidrocolóides realmente formaram a rede polimérica na fase contínua, e de fato não foram adsorvidos nas superfícies dos lipossomas.

Outro fator importante é que a T_m em torno de 53° é uma temperatura muito maior do que a temperatura de refrigeração, onde as dispersões foram mantidas durante o período de armazenamento. Portanto, pode-se garantir que nesta condição não ocorreu transição de fase gel-líquido cristalino nos lipossomas.

5.4 Determinação dos parâmetros reológicos

Devido ao fato de a estabilização dos lipossomas em relação a evitar agregação das vesículas ter sido satisfatória com a adição de polissacarídeos espessantes, tornou-se necessária uma avaliação do comportamento reológico das dispersões produzidas.

As curvas de fluxo obtidas podem ser visualizadas na Figura 32, e é possível verificar que as amostras de goma xantana e as da mistura de goma xantana+goma guar apresentaram um comportamento de fluido não-newtoniano do tipo pseudoplástico. As curvas de fluxo de cada amostra foram obtidas em duplicatas, de modo a aumentar a confiabilidade das análises, e garantir uma repetibilidade dos resultados gerados. Os dados reológicos obtidos foram ajustados através do modelo Herschel-Bulkley, que foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais.

Pode-se notar que há um aumento da tensão de cisalhamento conforme ocorre aumento da taxa de deformação, ou seja, com o aumento da taxa de deformação as moléculas dos hidrocolóides tendem a se orientar no sentido do escoamento, reduzindo a viscosidade do sistema, o que justifica uma menor taxa de crescimento da tensão de cisalhamento para valores mais altos da taxa de deformação.

Nota-se que as dispersões apresentaram uma tensão inicial de escoamento (τ_0), ou seja, para valores de tensão de cisalhamento (τ) menor do que τ_0 , as amostras possuem resistência ao escoamento. Ao atingir o valor da τ maior que τ_0 , inicia-se o escoamento das dispersões.

Na Figura 33 é retratada a comparação do comportamento reológico das diferentes dispersões estabilizadas com goma xantana ou goma xantana+goma guar nos diferentes tempos de armazenamento. Verificou-se que, na medida em que se aumenta a concentração de goma, ocorre um aumento da tensão de cisalhamento do sistema analisado, uma vez que as gomas utilizadas (goma xantana e mistura goma xantana + goma guar) possuem a capacidade de aumentar a viscosidade de um sistema mesmo em

baixas concentrações (CASAS et al., 2000). No dia 0 a dispersão lipossomal estabilizada com a mistura de gomas (20% GX: 80% GG), contendo 0,15% de goma total, apresentou comportamento semelhante à dispersão estabilizada somente com goma xantana, demonstrando a semelhança da viscosidade entre as amostras.

Figura 32: Comparação do comportamento reológico das dispersões estabilizadas com goma xantana ou goma xantana+goma guar ao longo do tempo de armazenamento: (A) 0,20% GX (B) 10%GX+90%GG, 0,10% goma total (C) 20%GX+80%GG, 0,10% goma total (D) 10%GX+90%GG, 0,15% goma total (E) 20%GX+80%GG, 0,15% goma total.

Figura 33: Comparação do comportamento reológico das diferentes dispersões estabilizadas com goma xantana ou goma xantana+goma guar nos diferentes tempos de armazenamento: (A) dia 0 (B) dia 40 (C) dia 95.

Na Figura 34 é apresentado o comportamento da viscosidade aparente durante 95 dias de armazenamento. Verifica-se que o aumento da concentração de goma aumentou a viscosidade do sistema, como era esperado. A goma xantana sozinha teve a capacidade de proporcionar uma maior viscosidade às dispersões em relação à mistura das gomas, pois foi a maior concentração de goma adicionada nos sistemas estudados neste projeto de Mestrado. Outro fator que pode ter influenciado no maior valor da viscosidade é o maior peso molecular da goma xantana em relação à goma guar.

O sinergismo da mistura de gomas poderia também ter ocasionado a ocorrência de valores maiores de viscosidade devido à sua capacidade de proporcionar alta viscosidade mesmo em baixas concentrações de gomas; porém, a viscosidade da mistura de goma xantana + goma guar depende das propriedades operacionais, tais como, a temperatura de dissolução das gomas, a concentração de polissacarídeo e a relação da proporção entre a goma xantana + goma guar (CASAS et al., 2000).

Figura 34: Comparação do comportamento da viscosidade aparente das dispersões estabilizadas com goma xantana ou a mistura de goma xantana +goma guar durante os 95 dias de armazenamento

Por sua vez, na Tabela 19 é apresentada a análise estatística dos dados de viscosidade das amostras, e pode-se perceber que houve uma diminuição da viscosidade em todas as dispersões estudadas ao longo do tempo de armazenamento. Porém, a partir do dia 15 de armazenamento até o final da vida de prateleira, a dispersão de lipossomas estabilizada com 0,20% GX não apresentou diferença estatística ($p \leq 0,05$) nos seus valores da viscosidade. Verifica-se comportamento semelhante para as os lipossomas estabilizados com misturas de gomas, contendo 0,10% goma total. (tanto com na proporção 10% GX+90% GG quanto 20% GX+80% GG), a partir do dia 5 de armazenamento. Tais resultados indicam que esses sistemas mantiveram a viscosidade aparente praticamente constante ao longo do tempo de armazenamento, corroborando com os resultados da estabilidade da distribuição do tamanho das partículas, sendo que, a rede polimérica formada foi capaz de evitar agregação dos lipossomas nesses sistemas estudados ao longo do período de armazenamento.

No entanto, as amostras estabilizadas com 0,15% de goma total apresentaram maior diferença na viscosidade aparente ao longo do tempo de armazenamento, fato que

também está de acordo com os resultados de estabilidade da distribuição do tamanho das partículas. Foi possível observar que ocorreram alterações significativas na distribuição do tamanho de partículas (Figuras 24(C) e 24(D)), fato que pode estar relacionado com a desestruturação da rede polimérica devido ao movimento constante dos lipossomas. Tal desestruturação favoreceu o processo de agregação das vesículas, e a consequência em termos reológicos foi a diminuição da viscosidade das dispersões.

Tabela 19: Médias dos valores de viscosidade aparente em função do tempo de armazenamento

Formulação	Dia 0	Dia 5	Dia 15	Dia 40	Dia 95
0,20% GX	0,156 ^a ±0,05	0,160 ^a ±0,01	0,128 ^b ±0,02	0,129 ^b ±0,009	0,130 ^b ±0,009
10% GX+90% GG; 0,10% goma total	0,095 ^a ±0,02	0,065 ^b ±0,001	0,061 ^b 0,0004	0,069 ^b ±0,02	0,051 ^b 0,005
20% GX+80% GG; 0,10% goma total	0,107 ^a 0,002	0,081 ^b ±0,006	0,073 ^b ±0,003	0,07 ^b ±0,003	0,074 ^b ±0,001
10% GX+90% GG; 0,15% goma total	0,124 ^a 0,003	0,093 ^b ±0,002	0,075 ^{cd} ±0,005	0,08 ^{bc} ±0,001	0,06 ^d ±0,005
20% GX+80% GG; 0,15% goma total	0,176 ^a 0,005	0,129 ^b 0,0003	0,107 ^c ±0,001	0,107 ^c ±0,003	0,09 ^c ±0,002

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha, não diferem, estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5%

Por sua vez, na Figura 35 são apresentados os parâmetros reológicos obtidos através do ajuste do modelo de Herschel-Bulkley das dispersões de lipossomas estabilizadas com goma xantana ou a mistura goma xantana+goma guar, ao longo do tempo de armazenamento. Nota-se que a dispersão com a maior concentração de goma apresentou maior caráter pseudoplástico, conforme era esperado. Em fluidos do tipo pseudoplástico, o grau de pseudoplasticidade de uma amostra pode ser relacionado com o índice de comportamento de escoamento (n), isto é, quando menor o valor de n , maior o grau de pseudoplasticidade. Da mesma maneira, a amostra de 0,20% de GX apresentou um maior índice de consistência (K), sendo que tal valor aumentou conforme o aumento da concentração de goma nas dispersões, também conforme esperado.

Figura 35: Parâmetros: (A) n ; (B) K das propriedades reológicas do modelo de Herschel-Bulkley das dispersões estabilizadas com goma xantana ou a mistura goma xantana+goma guar durante os 95 dias de armazenamento.

5.5 Estabilidade físico-química dos lipossomas em diferentes condições de stress

5.5.1 Estabilidade físico-química dos lipossomas estabilizados com goma xantana

A estabilidade coloidal caracteriza-se, primeiramente, pela capacidade dos lipossomas em manter a distribuição de tamanho das partículas sob várias condições ambientais (pH, temperatura, força iônica, por exemplo) ou de armazenamento (MAHERANI et al., 2011). Tal característica não foi observada na dispersão contendo 0,20% de goma xantana, exceto nas condições em que houve adição da sacarose nas dispersões, fato que pode ser verificado na Figura 36. Os lipossomas foram instáveis em praticamente todas as condições de *stress* a que foram submetidos. A distribuição do tamanho das partículas na condição de 35°C não foi apresentada, pois, a dispersão foi instável em todas as condições.

Em geral, a distribuição do tamanho das partículas na condição de 70 °C, também mostra que os lipossomas foram instáveis, exceto, na condição de 70° C por 5 minutos.

(A)

(B)

(C)

(D)

Figura 36: Distribuição de tamanho de partícula dispersões de lipossomas estabilizadas com 0,20% de goma xantana sob diferentes condições de *stress*: (A) Temperatura de 70°C e (B) Presença de sacarose (C) diferentes níveis de força iônica (concentrações de NaCl) (D) diferentes condições de pH (4,5 e 6,7).

Houve um aumento do tamanho das partículas ao serem submetidas às diferentes concentrações de sal. Em concentrações relativamente baixas ($\leq 0,1M$), os íons se ligaram à superfície da partícula com cargas opostas, conseqüentemente o potencial zeta foi reduzido, com isso, ocorreu uma redução na força de repulsão eletrostática, resultando na agregação entre elas (McCLEMENTS, 2004).

Quando adicionado em concentrações intermediárias ($\leq 0,25M$), o sal comportou-se como uma barreira, atuando na redução das interações eletrostáticas do sistema, alterando a magnitude e a distância das interações repulsivas entre as partículas, contribuindo dessa forma, para a agregação dos lipossomas (McCLEMENTS, 2004).

No entanto, em concentrações elevadas de sal ($\geq 5M$), ocorreu o efeito “salting - out”. Neste caso, os íons competem com as vesículas fosfolipídicas pela água que está disponível para hidratação, o que favorece o aumento do tamanho dos íons. Sabe-se que os íons hidratados são maiores que as moléculas de água; com isso, há uma região em torno da superfície da partícula, onde as moléculas de água podem entrar, ao contrário dos íons hidratados. Isto gera um gradiente de concentração de soluto entre a região com pouco soluto e a maior parte da solução aquosa, que é termodinamicamente desfavorável, gerando uma força de atração entre as partículas das dispersões (McCLEMENTS, 2004).

Por sua vez, nas diferentes concentrações da sacarose, percebe-se que em níveis elevados de concentração de açúcar, por exemplo, a 20% houve uma diminuição do processo de agregação dos lipossomas. Isso pode ter ocorrido devido ao fato que, através do aumento das concentrações de sacarose no meio, ocorreu aumento da viscosidade da fase líquida, incorrendo numa redução da frequência de colisão entre as vesículas (KIM et al., 2003).

Finalmente, em ambas as condições de pH os lipossomas se mostraram instáveis. Thompson, Haisman e Singh (2006) estudaram a estabilidade física de lipossomas preparados de membrana envoltória dos glóbulos de gordura do leite (MFGM) e de fosfolipídio da soja. Verificaram que houve um aumento do tamanho das partículas à medida que o pH diminuía. Através de imagens de microscopia eletrônica de transmissão entre os pHs 4-7, os lipossomas produzidos com lecitina de soja resultaram na perda significativa da sua estrutura, ou seja, eles concluíram que a instabilidade do lipossoma não foi somente devido a diminuição da repulsão eletrostática entre as partículas, o que resultaria em uma agregação das partículas, mas sim, os lipossomas

sofreram alterações morfológicas. No caso deste trabalho, a instabilidade do lipossoma pode ter ocorrido da mesma maneira.

5.5.2 Estabilidade físico-química dos lipossomas estabilizados com goma xantana+goma guar

O comportamento da estabilidade físico-química das dispersões coloidais de 10% GX+90%GG, 0,10% de goma total e 10% GX+90%GG, 0,15% de goma total podem ser verificado na Figura 37 e 38. Os lipossomas foram instáveis em praticamente todas as condições de *stress* em que foram submetidos, principalmente a dispersão contendo 0,10% de goma total. Já para a dispersão contendo 0,15% de goma total, observa-se uma maior estabilidade nas condições estudadas, exceto na condição do pH.

Figura 37: Distribuição do tamanho no dia 0 para dispersão de lipossoma estabilizada com 10% GX+90% GG; 0,10% de goma total (A) Temperatura de 35°C (B) Temperatura de 70°C (C) Presença de sacarose (D) diferentes níveis de força iônica (concentrações de NaCl) (E) diferentes condições de pH (4,5 e 6,7).

(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

Figura 38: Distribuição do tamanho no dia 0 para dispersão de lipossoma estabilizada com 10% GX+90% GG; 0,15% de goma total (A) Temperatura de 35°C (B) Temperatura de 70°C (C) Presença de sacarose (D) diferentes níveis de força iônica (concentrações de NaCl) (E) diferentes condições de pH (4,5 e 6,7).

5.6 Aplicação das dispersões de lipossomas em iogurte

A aparência dos iogurtes produzidos é apresentada na Figura 39:

Figura 39: Imagens das diferentes formulações dos iogurtes. As imagens dos iogurtes foram obtidas após dois dias de armazenamento.

Visualmente as formulações dos iogurtes mostraram-se bem homogêneas, inclusive os iogurtes adicionados com os lipossomas. Não foi observado durante a adição das dispersões a presença de grumos ou qualquer tipo de separação de fases. Todos apresentaram uma cor característica ao tipo do ingrediente adicionado, o odor foi característico de iogurte, e por sua vez, os iogurtes adicionados com os lipossomas apresentaram uma textura muito semelhante ao iogurte controle. Através disso, pode-se concluir que a adição de lipossomas encapsulando o β -caroteno em formulações de iogurte pode ser uma ótima opção, devido às baixas alterações das características visuais do produto.

5.6.1 Avaliação da cor dos iogurtes durante o período de estocagem

Os parâmetros de cor das formulações dos iogurtes são mostrados na Figura 40. Em todas as formulações os valores do parâmetro a^* foram positivos, ou seja, tenderam para o vermelho, conforme desejado para um iogurte sabor morango. A formulação controle apresentou valores maiores para a^* , certamente devido à presença do preparo de morango comercial e do corante carmim de cochonilha. Porém, o iogurte controle apresentou uma diminuição nos valores de a^* , ao contrário das formulações com adição das dispersões que mantiveram os valores praticamente constantes ao final do tempo de armazenamento. Quando analisado a TCD, verificou-se uma maior variação nas formulações incorporadas com as dispersões de β -caroteno, isso pode ter ocorrido devido à influência de outros componentes que compõem a formulação do iogurte.

Figura 40: Perfil temporal dos parâmetros calorimétricos dos iogurtes adicionados das dispersões de lipossomas encapsulando β -caroteno, estabilizados com goma xantana ou goma xantana+ goma guar: (A) a^* (B) TCD. Os resultados estão expressos com as médias e desvio-padrão de uma amostra.

5.6.2 Avaliação da viscosidade dos iogurtes

A avaliação do comportamento reológico (curva de fluxo) das formulações dos iogurtes produzidas pode ser observada na Figura 41. Verifica-se que todas as formulações apresentaram um comportamento de fluido não-newtoniano do tipo pseudoplástico. Os dados obtidos foram tratados através do modelo Herschel-Bulkley.

Figura 41: Comparação do comportamento reológico das formulações de iogurte adicionadas com os lipossomas estabilizados com goma xantana ou goma xantana+goma guar no Dia 2 de armazenagem

Verificou-se que, nos sistemas adicionados com as dispersões de lipossomas, ocorreu um aumento da tensão de cisalhamento. Pode-se considerar que o fator que contribui para esse aumento foi a adição das gomas utilizadas (goma xantana e mistura goma xantana + goma guar) nas dispersões, elas influenciaram nos sistemas, devido a capacidade dos hidrocolóides em aumentar a viscosidade de um sistema mesmo em baixas concentrações.

Por sua vez, na Tabela 20 são apresentados os parâmetros reológicos obtidos através do ajuste do modelo de Herschel-Bulkley dos sistemas, no dia 2 de armazenamento.

Tabela 20: Parâmetros reológicos das formulações do iogurte no segundo dia de armazenamento.

Formulações	Parâmetros		
	Viscosidade aparente		
	Pa.s (13 s ⁻¹)	n	K
Controle	0,59	0,50	1,56
Adição: dispersão com GX	0,52	0,49	1,41
Adição: dispersão com GX+GG	0,57	0,54	1,33
Adição : dispersão com GX e preparo de morango	0,60	0,44	1,93
Adição: dispersão com GX+GG e preparo de morango	0,57	0,48	1,62

5.6.3 Avaliação da aceitação sensorial dos iogurtes

Na Tabela 21 são apresentados as médias dos atributos aroma, textura, cor, sabor e qualidade global das formulações dos iogurtes avaliados por 60 painelistas:

Tabela 21: Médias das notas atribuídas pelos consumidores por atributo para as diferentes formulações do iogurte

Formulações	Aroma	Textura	Cor	Sabor	Qualidade Global
Controle	7,28 ^a ±1,30	7,40 ^a ±1,22	7,83 ^a ±1,19	7,53 ^a ±1,26	7,52±1,11 ^a
Adição: dispersão com GX	5,25 ^c ±1,68	6 ^b ±1,69	4,33 ^c ±1,88	5,20 ^c ±2,18	5,2±1,83 ^c
Adição: dispersão com GX+GG	5,38 ^c ±1,71	6,17 ^b ±1,88	4,32 ^c ±1,97	5 ^c ±2,37	5,18±1,97 ^c
Adição: dispersão com GX e preparo de morango	6,37 ^b ±1,64	6,88 ^a ±1,47	6,45 ^b ±1,60	6,67 ^b ±1,72	6,63±1,39 ^b
Adição: dispersão com GX+GG e preparo de morango	6,5 ^b ±1,72	6,87 ^a ±1,43	6,73 ^b ±1,52	6,93 ^{ab} ±1,49	6,82±1,24 ^b

^{a,b,c} As médias das amostras seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey. N=60

Houve diferença significativa ao nível de 5% pelo Teste de Tukey em todos os atributos avaliados das formulações do iogurte. Foi atribuído ao iogurte controle as maiores médias para todos os atributos estudados, correspondendo a “gostei moderadamente”.

Em relação ao aroma, a maior média 7,28 foi atribuída para o iogurte controle, correspondendo a “gostei moderadamente”. Já para os iogurtes adicionados com as dispersões de lipossomas, as médias correspondem a “nem gostei/nem desgostei”. Para as formulações adicionadas com dispersões mais a mistura de gomas e o preparo de morango a média atribuída corresponde a “gostei ligeiramente”. Verifica-se que as notas atribuídas para esse atributo foi influenciado por algum outro fator (provavelmente a cor) já que a quantidade de essência de morango adicionada foi igual para todas as formulações.

Já no caso da textura dos iogurtes, não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) para o iogurte controle e as formulações contendo a dispersão com GX mais o preparo de morango e a dispersão com GX+GG mais o preparo de morango. Portanto, pode-se inferir que a substituição parcial do corante pelas dispersões de lipossomas não influenciou na textura do iogurte, o que é um fator bastante positivo para um primeiro teste de aplicação dos sistemas lipossomais produzidos. Já para as formulações contendo a dispersão com GX e a dispersão com GX+GG houve diferença na textura; no entanto, foi avaliada com uma nota que corresponde a “gostei ligeiramente”; pode-se

considerar uma avaliação satisfatória, visto que o corante foi substituído totalmente das formulações.

Por sua vez, para o atributo cor, os iogurtes adicionados somente com as dispersões de lipossomas, foram, logicamente, prejudicados devido à ausência do corante adicionado na formulação controle, adquirindo uma média correspondente a “desgostei ligeiramente”.

Para o atributo sabor, os iogurtes adicionados com as dispersões de lipossomas foram avaliados com uma média correspondente a “Nem gostei/nem desgostei”; tal imparcialidade dos consumidores pode ser explicada pela não adição do preparo de morango ao produto. A aceitação dos consumidores poderia aumentar no caso da adição de uma polpa natural, atribuindo um sabor de morango ao produto.

Finalmente, em relação à aceitação global do produto (que engloba todas as características avaliadas), os iogurtes adicionados com as dispersões de lipossomas foram avaliados com uma média correspondente a “Nem gostei/nem desgostei”. Pode-se considerar uma avaliação satisfatória, sendo que a polpa de morango e o corante do iogurte foram substituídos totalmente pelos lipossomas.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados experimentais obtidos no seguinte trabalho de Mestrado, foi possível concluir que:

- A produção de lipossomas pelo método de pró-lipossoma permitiu a obtenção de vesículas multilamelares, encapsulando efetivamente o β -caroteno;
- Todas as dispersões foram eficazes na preservação do β -caroteno, principalmente as formulações possuindo 0,15% de goma total. Esse comportamento foi comprovado tanto pelo método espectrofotométrico quanto por colorimetria instrumental;
- A goma xantana proporcionou alta viscosidade às dispersões, que se manteve constante durante aos 90 dias de armazenamento, provavelmente devido à rede polimérica formada pelos polissacarídeos, que foi capaz de evitar agregação dos lipossomas, garantindo a estabilidade das dispersões;
- A mistura das gomas (goma xantana e goma guar) nas dispersões de 0,15% de goma total apresentou uma maior diferença nos valores da viscosidade, fato que está relacionado com a desestruturação da rede polimérica e tal fato favoreceu o processo de agregação das vesículas em maior proporção que no caso da goma xantana usada isoladamente;
- Os lipossomas formados não apresentaram heterogeneidade estrutural em sua bicamada e todos apresentaram uma T_m próxima a 53° C, ou seja, o β -caroteno não deteriorou a estrutura (fluidez) da bicamada lipossomal, fato verificado pela análise de DSC.
- As dispersões foram instáveis em praticamente todas as condições ambientais em que foram submetidas (pH, temperatura, sal e açúcar). Exceto nas concentrações elevadas de sacarose, notou-se uma diminuição do processo de aglomeração dos lipossomas. Fato que é considerando importante para a incorporação dessas dispersões em sistemas alimentícios que possuem sacarose;

- As formulações dos iogurtes incorporados com as dispersões de lipossomas mostraram-se homogêneas, ausência de grumos ou qualquer tipo de separação de fases e foram aprovados por uma parcela de painelistas na análise sensorial.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Variar as concentrações da mistura de gomas (goma xantana e goma guar), nas dispersões de lipossomas, a fim de evitar a agregação das vesículas lipossomais ao longo do período de armazenamento;
- Modificar e melhorar o processo da incorporação das dispersões no iogurte;
- Estudar outros métodos de produção de lipossoma, a fim de reproduzir o processo em escala industrial;
- Investigar a absorção do β -caroteno encapsulado nos lipossomas em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G.; P.; SANTANA, M.; H.; A. Phospholipid dry powder produced by spray drying processing: structural, thermodynamic and physical properties. **Powder Technology**, v. 145, 139–148, 2004.

BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, 13(1), 238-252, 1965.

BARENHOLZ, Y.; LASIC, D.D. An overview of liposome scaled-up production and quality control. In: Barenholz, Y.; Lasic, D.D. (Eds). **Handbook of non-medical applications of liposomes: from design to microreactors**. CRC Press, v. 3, pp.23-41, 1996.

BARNADAS-RODRÍGUEZ, R.; SABÉS, M. Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 213, 175–186, 2001.

BENECH, R. O.; KHEADR, E. E.; LACROIX, C.; FLISS, I. Impact of nisin producing culture and liposome-encapsulated nisin on ripening of Lactobacillus added-cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86, N° 6, 1895, 2003.

BRANDL, M.; DRECHSLER, M.; BACHMANN, D.; TARDI, C.; SCHMIDTGEN, M.; BAUER, KH. Preparation and characterization of semi-solid phospholipid dispersions and dilutions thereof. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 170, 187–199, 1998.

BRUNNER, J.; SKRABAL, P.; HAUSER, H. Single bilayer vesicles prepared without sonication: physico chemical properties. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 455(2), 322-331, 1976.

CASAS, J.A.; MOHEDANO, A.F.; GARCÍA-OCHOA, F. Viscosity of guar gum and xanthan/guar gum mixture solutions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80, 1722-1727, 2000.

CHEN PS.; TORIBARA, TY.; WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. **Analytical Chemistry**, v. 28, 1756-1758, 1956.

DE PAZ, E.; MARTÍN, A.; COCERO, M. J. Formulation of β -carotene with soybean lecithin by PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions)-drying. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 72, 125– 133, 2012.

DE PAZ, E.; MARTÍN, A.; ESTRELLA, A.; RODRÍGUEZ-ROJO, S.; MATIAS, A.A.; DUARTE, C.M.M.; COCERO, M.J. Formulation of β -carotene by precipitation from pressurized ethyl acetate-onwater emulsions for application as natural colorant. **Food Hydrocolloids**, v. 26, 17-27, 2012.

DEAMER, D.; BANGHAM, A.D. Large volume liposomes by an ether vaporization method. **Biochimica et Biophysica Acta –Biomembranes**, 443 (3), 629-634, 1976.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMENÉZ, A.R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains – characteristics, biosynthesis, processing and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, 173-189, 2000.

DING, B.; ZHANG, X.; HAYAT, K.; XIA, S.; JIA, C.; XIE, M.; LIU, C. Preparation, characterization and the stability of ferrous glycinate nanoliposomes. **Journal of Food Engineering**, v. 102, 202-208, 2011.

FARHANG, B.; KAKUDA, Y.; CORREDIG, M. Encapsulation of ascorbic acid in liposomes prepared with milk fat globule membrane-derived phospholipids. **Dairy Science Technology**, v. 92, 353–366, 2012.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Changes in composition of the lipid matrix produce a differential incorporation of

carotenoids in micelles. Interaction effect of cholesterol and oil. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, 379–384, 2007.

HANAHAHAN, D.J. A guide to phospholipid chemistry. Oxford University Press, Oxford, 1997.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J-E.; BENOIT, J-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, 4283–4300, 2003.

HORNERO-MENDEZ, D., & MINGUEZ-MOSQUERA, M. I. Bioaccessibility of carotenes from carrots: effect of cooking and addition of oil. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 8, 407e412, 2007.

HSIEH, YF; CHEN, TL, WANG, YT; CHANG, JH; CHANG, HM. Properties of Liposomes Prepared with Various Lipids. **journal of food science**. v. 67, Nr. 8, 2808-2813, 2002.

HSU, J-P.; NACU, A. Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 259, p.374–381, 2003.

<http://www.freethought-forum.com/forum/showthread.php?t=24978&garpg=6>. Acesso em: 15 fev. 2013.

<http://www.jpbonline.org/article.asp?issn=09757406;year=2011;volume=3;issue=1;page=4;epage=14;aualast=Pignatello>. Acesso em: 20 fev. 2013.

<http://www.madsci.org/posts/archives/2006-12/1164999854.Bc.r.html>). Acesso em: 10 fev. 2013.

<http://www.pharmainfo.net/pharma-student-magazine/nanoemulsions-0>. Acesso em: 3 fev. 2013.

JANNIN, V.; MUSAKHANIAN, J.; MARCHAUD, D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, 734-746, 2008.

JEONG, S.H.; PARK, J.H.; PARK, K. Formulation issues around lipid-based oral and parenteral delivery systems. In: WASAN, K.M. (Ed). **Role of lipid excipients in modifying oral and parenteral drug delivery**, Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, EUA, 2007.

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

JUSTO, O.R.; MORAES, A.M. Economical Feasibility Evaluation of an Ethanol Injection Liposome Production Plant. **Chemical Engineering and Technology**, v. 33, p.15-20, 2010.

KHEADR, E.E.; VUILLMEMARD, J.C.; EL-DEEB, S.A. Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. **Food Research International**, v. 36, 241-252, 2003.

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

KIM, H-J.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Influence of Sucrose on Droplet Flocculation in Hexadecane Oil-in-Water Emulsions Stabilized by β -Lactoglobulin, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, 766-772, 2003.

KOSAJARU, S.L.; TRAN, C.; LAWRENCE, A. Liposomal delivery systems for encapsulation of ferrous sulfate: preparation and characterization. **Journal of Liposome Research**, v.16, 347–358, 2006.

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

LASIC, DD. The mechanism of vesicle formation. **Journal of Biochemistry**, v. 256, 1-11, 1988.

LU, Q.; LI, DI-CAI.; JIANG, JIAN-GUO. Preparation of a Tea Polyphenol Nanoliposome System and Its Physicochemical Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, 13004–13011, 2011.

MAHERANI, B.; ARAB-TEHRANY, E.; KHEIROLOMOOM, A. CLEYMAND, F.; LINDER, M. Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant L-carnosine. **Food Chemistry**, v. 134, 632–640, 2012.

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

MALHEIROS, P.S.; DAROIT, D.J.; SILVEIRA, N.P.; BRANDELLI, A. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. **Food Microbiology**, v. 27, 175–178, 2010.

MALMSTEN, M. **Surfactants and Polymers in Drug Delivery**. New York: Marcel Dekker, 2002.

MARANASCO, M.; MÁRQUEZ, A.L.; WAGNER, J.R.; ALONSO, S.V.; CHIARAMONI, N.S. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: an alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection against heat treatment. **Food Research International**, 44, 3039–3046, 2011.

MARTÍN, A., MATTEA, F., GUTIÉRREZ, L., MIGUEL, F., & COCERO, M. J. Co-precipitation of carotenoids and bio-polymers with the supercritical anti-solvent process. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 41, 138, p. 147, 2007.

MARTINS, F. Estudo do processo de encapsulação do bioaroma de gorgonzola em beta-ciclodextrina e em lipossomas. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

McCLEMENTS D.J. **Food emulsions: principles, practice, and techniques**. 2^a ed. Washington: CRC Press, 2004.

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

McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. **Journal of Food Science**, v. 65, 1270–1282, 2000.

McCLEMENTS, D.J.; LI, Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 159, p. 213–228, 2010.

MEURE, L.; A.; FOSTER, N. R.; DEHGHANI, F. Conventional and Dense Gas Techniques for the Production of Liposomes: A Review. **Pharmaceutical Science Technology**, v. 9, n°. 3, 2008.

MORAES, M.; CARVALHO, J.M.P.; SILVA, C.R.; CHO, S.; SOLA, M.R.; PINHO, S.C. Liposomes encapsulating beta-carotene produced by the proliposomes method: characterisation and shelf life of powders and phospholipid vesicles. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n°. 2, 274-282, 2013.

MORAIS, H.A.; BARBOSA, C.M.S.; DELVIVO, F.M. et al. Stability and sensory evaluation of casein hydrolysates entrapped in liposomes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, 213–220, 2003.

MORRIS, J. V. Bacterial Polysaccharides. In: STEPHEN, M. A; PHILLIPS, O. G; WILLIAMS, A.P. **Food Polysaccharides and Their Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006.

MOZAFARI, M. R.; JOHNSON, C.; HATZIANTONIOU, s.; DEMETZOS, c. Nanoliposomes and Their Applications in Food Nanotechnology, **Journal of Liposome Research**, v. 18, 309–327, 2008.

MOZAFARI, M.R.; FLANAGAN, J.; MATIA-MERINO, L.; AWATI, A.; OMRI, A.; E SUNTRES, Z.; SINGH, H. Review Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, 2038–2045. 2006.

NAM, J.; WON, N.; BANG, J.; JIN, H.; PARK, J.; JUNG, S.; JUNG, S. PARK, Y.; KIM, S. Surface engineering of inorganic nanoparticles for imaging and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.015>, 2012.

NONGONIERMA, A.B.; ABRLOVA, M.; FENELON, M.A.; KILCAWLEY, K.N. Evaluation of two food grade proliposomes to encapsulate an extract of a commercial enzyme preparation by microfluidization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, 3291–3297, 2009.

ORIJ, R.; BRUL, S.; SMITS, G.J.; Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, 933–944, 2011.

PARADA, J.; AGUILERA, JM. **Journal of Food Science**, v. 72, 21-32, 2007.

PERRECHIL, F.A. **Produção de microgéis para encapsulação de compostos hidrofóbicos**. 2012. 167 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 2012.

PICON, A.; GAYA, M.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. The effect of liposome-encapsulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, v.78, 1238-1247, 1995.

PICON, A.; GAYA, M.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. The effect of liposome encapsulation of chymosine derived by fermentation on Manchego cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 77, 16-23, 1993.

PICON, A.; SERRANO, C.; GAYA, M.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. The effect of liposome-encapsulated cryprosins on manchego cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 79, 1699-1705, 1996.

RÉ, M. I.; SANTANA, M. H. A.; D'ÁVILA, M. A. Encapsulation Technologies for Modifying Food Performance. In: PASSOS, M. L.; RIBEIRO, C. P. **Innovation in Food Engineering: New Techniques and Products**. Boca Raton: CRC Press, 2009.

RIBAS, AM. Estudo da estabilidade de bicamadas lipídicas em presença de tensoativos. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1997.

RODRIGUEZ- AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington: ILSI Press, 1999.

RODRIGUEZ-HUEZO, M.E. PEDROZA-ISLAS, L.A. PRADO-BARRAGAN, C.I. BERISTAIN, E.J. Vernon-Carter, Microencapsulation by spray-drying of multiple emulsions containing carotenoids, **Journal Food Science**, v. 69 E351–E359, 2004.

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

RODRIGUEZ-NOGALES, J.M.; DELGADILLO-LÓPEZ, A. Stability and catalytic kinetics of microencapsulated β -galactosidase in liposomes prepared by dehydration-hydration method. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 33, 15-21, 2005.

RUOZI, B.; TOSI, G.; FORNI, F.; FRESTA, M.; VANDELLI, A. M. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid

characterization of liposomes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, 81–89, 2005.

SCOLARI, G.; VESCOVO, M.; SARRA, P.G.; BOTTAZZI, V. Proteolysis in cheese made with liposome-entrapped proteolytic enzymes. **Lait**, v. 73, 281–292, 1993.

SHIMADA K.; FUJIKAWA K.; YAHARA K.; NAKAMURA, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 40, 945– 948, 1992.

SILVA, H.D.; CERQUEIRA, M.A.; SOUZA, B.W.S.; RIBEIRO, C.; AVIDES, M.C.; QUINTAS, M.A.C.; COIMBRA, J.S.R.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; VICENTE, A.A. Nanoemulsions of b-carotene using high-energy emulsification–evaporation technique. **Journal of Food Engineering**, v. 102, 130–135, 2011.

SOCACIU, C.; BOJARSKI, P.; ABERLE, L.; DIEHL, H.A. Different ways to insert carotenoids into liposomes affect structure and dynamics of the bilayer differently. **Biophysical Chemistry**, v. 99, 1–15, 2002.

SZOKA, F. JR.; PAPAHA DJOPOULOS, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences-USA**, v. 75, n° 9, 4194–4198, 1978.

TAKAHASHI, M.; KITAMOTO, D.; IMURA, T.; OKU, H.; TAKARA, K.; WADA, K. Characterization and Bioavailability of Liposomes Containing a Ukon Extract. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 72 (5), 1199–1205, 2008.

TAYLOR, T. M.; WEISS, J.; DAVIDSON, P. M.; BRUCE, B. D. Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture. **Food Science and Nutrition**, v. 45, 587–605, 2005.

TAYLOR, T.M.; GAYSINSKY, S.; DAVIDSON, P.M.; BRUCE, B.D.; WEISS, J. Characterization of Antimicrobial-bearing Liposomes by z-Potential, Vesicle Size, and Encapsulation Efficiency. **Food Biophysics**, v.2, 1–9, 2007.

THOMPSON A, SINGH H. Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a microfluidizer. **Journal Dairy Science**, v. 89:410–419, 2006.

THOMPSON, A.K.; HAISMAN, D.; SINGH, H. Physical stability of liposomes prepared from milk fat globule membrane and soy phospholipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, 6390-6397, 2006.

THOMPSON, A.K.; MOZAFARI, M.R.; SINGH, H. The properties of liposomes produced from milk fat globule membrane material using different techniques. **Lait**, v. 87, 349-360, 2007.

TREVISAN, J.E.; CAVALCANTI, L.P.; OLIVEIRA, C.L.P.; DE LA TORRE, L.G.; SANTANA, M.H.A. Technological Aspects of Scalable Processes for the Production of Functional Liposomes for Gene Therapy. In Yuan, X. Non-viral gene therapy, In Tech, 2011.

TURÁNEK, J.; KASNÁ, A.; ZÁLUSKÁ, D. NECA, J. Preparation of sterile liposomes by proliposome-liposome Method. In: DUZGUNES, N. **Methods in Enzymology**. San Diego: Elsevier, 2003.

WAGNER, A.; VORAUER-UHL, K. Liposome technology for industrial purposes. **Journal of Drug Delivery**, doi:10.1155/2011/ 591325, 2011.

WAGNER, A.; VORAUER-UHL, K.; KREISMAYR, G.; KATINGER, H. The crossflow injection technique: an improvement of the ethanol injection method. **Journal of Liposome Research**, v. 12, 259-270, 2002.

WECHTERSBAACH, L.; ULRIH, N.; P.; CIGIC, B. Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices. **Food Science and Technology**, v.45 43-49, 2012.

WERE, L.M.; BRUCE, B.; DAVIDSON, P.M.; WEISS, J. Encapsulation of nisin and lysozyme in liposomes enhances efficacy against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 67, 922–927, 2004.

XIA, F.; HU, D.; JIN, H.; ZHAO, Y; LIANG, J. Preparation of lutein proliposomes by supercritical anti-solvent technique. *Food Hydrocolloids*, v.26, 456–463, 2012.

YOKOTA, D.; MORAES, M.; PINHO, S.C. Characterization of lyophilized liposomes produced with non-purified soy lecithin: a case study of casein hydrolysate microencapsulation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.29, n.2, p.325-335, 2012.

YOSHIDA, P.A.; YOKOTA, D.; FOGLIO, M.A.; RODRIGUES, R.A.F.; PINHO, S.C. Liposomes incorporating essential oil of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): characterization of aqueous dispersions and lyophilized formulations. **Journal of Microencapsulation**. v.27, n.5, p.416-425, 2010.

APÊNDICE A

Figura 42: Curva de calibração para quantificação de β-caroteno em hexano

APÊNDICE B

Figura 43: Exemplo de curva de calibração para quantificação de fosfato total nos lipossomas. Para cada ensaio fosfato foi obtida uma curva de calibração diferente.

ANEXO I Laudos das matérias-primas utilizadas neste trabalho de Mestrado
(fornecidos pelos fabricantes)

Lipoid

ANALYTICAL DATA

Product: PHOSPHOLIPON 90 H

Date of production: 03/2011
Retest date: 03/2014
recommended storage
temperature: 2°C - 8°C
Delivery: 20.07.2011
Quantity: 3.0 kg

Lot No.: 294037-10

	<u>Specification</u>	<u>Result</u>	<u>Method</u>
Identity	complies	complies	FT-IR
Phosphatidylcholine	n.l.t. 90.0 %	92.7 %	HPLC-PLH
Lysophosphatidylcholine	n.m.t. 4.0 %	3.3 %	HPLC-PLH
Triglycerides	n.m.t. 2.0 %	0.3 %	ADC5
Water (KF)	n.m.t. 2.0 %	0.5 %	USP<921>Ia
Ethanol	n.m.t. 0.5 %	0.1 %	ET
Iodine value	n.m.t. 1	0.4	JZ
Consistency	powder	powder	
Color	white - whitish	whitish	
Heavy metals	n.m.t. 10 ppm	l.t. 10 ppm	USP<231>II
Sum (C16:0, C18:0)	n.l.t. 98 %	99.1 %	GC-FS
Sum (C18:1, C18:2, C18:3)	n.m.t. 2 % l.t.	0.1 %	GC-FS

-2-

Lipoid

ANALYTICAL DATA

-2-

Product: PHOSPHOLIPON 90 H

Lot No.: 294037-10

				<u>Specification</u>	<u>Result</u>	<u>Method</u>
<u>Bacteriological account</u>						USP<61>/ USP<62>
C.F.U.	/	g	n.m.t. 100		1.t. 10	
Yeasts+Moulds	/	g	n.m.t. 10		1.t. 10	
E. Coli	/	g	negative		negative	
Staphyloc. aureus	/	g	negative		negative	
Pseudomon. aerug.	/	g	negative		negative	

D-67065 Ludwigshafen, July 22, 2011

Dr. R.-O. Quinkert
Quality Control Dr. Dirk Bruns
Quality Control

GUMS & SYSTEMS DIVISION
Gums
gumsandsystems@danisco.com
www.danisco.com

Página 1 / 3

Válido a partir de: 26 de setembro de 2006

DANISCO

First you add knowledge...

DESCRIÇÃO DE PRODUTO - PD 208488-7.6PT

Código do material A45100

GRINDSTED® Xanthan 80

Descrição

GRINDSTED® Xanthan 80 é uma goma xantana granulada de grau alimentício que é particularmente usada como espessante e estabilizante. O tamanho da partícula é de 80 mesh e assegura um grau rápido de hidratação, fácil manipulação e aplicação em produções normais de alimentos.

Áreas de aplicação

É uma goma solúvel a frio e apresenta sinergia com goma guar e goma jataí.

Benefícios potenciais

- Agente de suspensão para sólidos e gotas de azeite
- Emulsão efetiva e estabilização da espuma
- Alta viscosidade em baixas concentrações com comportamento pseudoplástico (diluição)
- Efeito anti-sinerese
- Ausência de tixotropia
- Estável tanto em soluções ácidas como alcalinas
- Altamente resistente a temperatura
- Compatível com soluções que contêm altas concentrações de vários sais.

Dosagens

As seguintes diretrizes gerais podem ser dadas:

Molhos para salada	0,15 - 0,50 %
Mistura para bolos	0,05 - 0,25 %
Molhos	0,10 - 0,30 %
Relish	0,10 - 0,25 %
Recheios de fruta	0,03 - 0,15 %
Bebidas de frutas	0,05 - 0,15 %
Molho "cole slaw"	0,15 - 0,25 %
Sopas instantâneas (secas)	0,30 - 0,50 %

Instruções de uso

Formulações específicas e informações sobre o processamento podem ser obtidas se requisitadas.

Especificações físico-químicas

(Métodos de análise disponíveis se requisitados)

Cor	Creamy - white
Umidade	6 - 12 %
pH (solução 1%)	6,0 - 8,0
Tamanho de partícula	mín. 95 % passa através de 180 µm (mesh 80)
Tamanho de partícula	mín. 99,5 % passa através de 250 µm (mesh 60)
Viscosidade	1.200 - 1.600 mPa's
24°C, 1% KCl (Brookfield LVT, 60 rpm, spindle 3)	

Especificações microbiológicas

Contagem total em placa	máx. 2.000 UFC/g
Bolores e leveduras	100 UFC/g
Salmonela	ausente em 25 g
E. coli	ausente em 5 g

Especificações de metais pesados

Metais pesados (como Pb)	máx. 20 mg/Kg
Chumbo (Pb)	máx. 2 mg/Kg
Arsênico (As)	máx. 1 mg/Kg

As informações contidas nesta publicação baseiam-se em nosso próprio trabalho de pesquisa e de desenvolvimento e são de nossa total confiança. Entretanto, os usuários devem realizar seus próprios testes para determinar a adequação de nossos produtos a seus fins específicos e as situações jurídicas de uso do produto. As declarações aqui contidas não devem ser consideradas como garantia de qualquer tipo, expressa ou implícita, e não assumimos nenhuma responsabilidade legal pela infração de qualquer patente.

GUMS & SYSTEMS DIVISION
Gums
gumsandsystems@danisco.com
www.danisco.com

Página 2 / 3

Válido a partir de: 26 de setembro de 2006

DANISCO

First you add knowledge...

DESCRIÇÃO DE PRODUTO - PD 208488-7.6PT

Código do material A45100

GRINDSTED® Xanthan 80

Dados nutricionais

(Valores aproximados para rotulagem nutricional por 100g)

Energia (kcal)	176
Proteína	6 g
Carboidrato	0 g
- dos quais açúcares	0 g
Gordura	0 g
- das quais saturadas	0 g
Fibra	76 g
Sódio	4 g

(Calculado de acordo com os regulamentos atuais de NLEA)

Estocagem

Armazenar em local fresco e seco.

A validade é de 24 meses a partir da data de fabricação.

Embalagem

Caixas multi-camada de 25 kg (55.1 lbs.)

Pureza e legislação

GRINDSTED® Xanthan 80 está em conformidade com as edições atuais do Food Chemical Codex, FAO/WHO e EU e está coberto pela referência INS 415 e CFR 172.695.

Legislação local em relação ao status do produto deve ser sempre consultada, já que pode haver variações em relação ao uso em alimento dependendo do país. Direccionamento quanto ao status legal deste produto pode ser obtido caso requisitado.

Segurança e manuseio

Uma Ficha de Segurança de Produto Químico (FISPQ) pode ser obtida caso requisitada.

País de origem

França

Status Kosher

Esse produto possui o certificado Kosher. Um Certificado Kosher está disponível sob solicitação.

Status Halal

Este produto é certificado Halal, um certificado Halal esta disponível quando requisitado.

Status GMO

De acordo com os regulamentos da CE Nos. 1829/2003 e 1830/2003: os microorganismos utilizados na produção de GRINDSTED® Xanthan 80 são desenvolvidos pela técnica tradicional não-GM. Substratos e veículos são produzidos a partir de fonte denominada Identidade Preservada. GRINDSTED® Xanthan 80 é grau IP.

As informações contidas nesta publicação baseiam-se em nosso próprio trabalho de pesquisa e de desenvolvimento e são de nossa total confiança. Entretanto, os usuários devem realizar seus próprios testes para determinar a adequação de nossos produtos a seus fins específicos e as situações jurídicas de uso do produto. As declarações aqui contidas não devem ser consideradas como garantia de qualquer tipo, expressa ou implícita, e não assumimos nenhuma responsabilidade legal pela infração de qualquer patente.

GUMS & SYSTEMS DIVISION
Gums
gumsandsystems@danisco.com
www.danisco.com

Página 3 / 3

Válido a partir de: 26 de setembro de 2006

DANISCO

First you add knowledge...

DESCRIÇÃO DE PRODUTO - PD 208488-7.6PT

Código do material A45100

GRINDSTED® Xanthan 80

Alergênicos

A tabela abaixo indica a presença (como componente adicionado) dos seguintes alergênicos e produtos destes:

Sim	Não	Alergênicos	Descrição dos componentes
	X	Cereais que contêm glúten	Amido de trigo é usado como nutriente na fermentação *
	X	Crustáceos	
	X	Ovos	
	X	Peixe	
	X	Amendoim	
	X	Soja	Proteína de soja é usada como nutriente na fermentação *
	X	Leite (incluindo lactose)	
	X	Castanhas	
	X	Alpino	
	X	Mostarda	
	X	Gergelim	
	X	Dióxido de enxofre e sulfitos (> 10 mg/kg)	
	X	Tremçoço	
	X	Moluscos	

* Testes avançados de alergênicos não revelaram nenhum nível detectável (< 10 ppm) destes alergênicos em sua forma original.

As informações contidas nesta publicação baseiam-se em nosso próprio trabalho de pesquisa e de desenvolvimento e são de nossa total confiança. Entretanto, os usuários devem realizar seus próprios testes para determinar a adequação de nossos produtos a seus fins específicos e as situações jurídicas de uso do produto. As declarações aqui contidas não devem ser consideradas como garantia de qualquer tipo, expressa ou implícita, e não assumimos nenhuma responsabilidade legal pela infração de qualquer patente.

GOMA GUAR

05/2013

Documento emitido eletronicamente sob responsabilidade do Controle de Qualidade.

Edinilson Barros de Alexandria

Químico Responsável - CRQ. nº 04414108 – 4ª Região