UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GUILHERME DE SOUSA SILVA

**Obtenção de prolipossomas por recobrimento de sacarose micronizada,
produção de lipossomas multilamelares encapsulando curcumina e
incorporação das vesículas em iogurte**

Pirassununga

2018

GUILHERME DE SOUSA SILVA

**Obtenção de prolipossomas por recobrimento de sacarose micronizada,
produção de lipossomas multilamelares encapsulando curcumina e
incorporação das vesículas em iogurte**

Versão corrigida

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

Área de concentração: Ciências da
Engenharia de Alimentos

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

Pirassununga

2018

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

de Sousa Silva, Guilherme
ds725o Obtenção de prolipossomas por recobrimento de
sacarose micronizada, produção de lipossomas
multilamelares encapsulando curcumina e incorporação
das ve / Guilherme de Sousa Silva ; orientador
Samantha Cristina de Pinho. -- Pirassununga, 2018.
99 f.

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

1. vesículas fosfolipídicas. 2. curcuminóide. 3.
iogurte. 4. microencapsulação. 5. prolipossomas. I.
Cristina de Pinho, Samantha, orient. II. Título.

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais,
minha esposa e todos meus familiares.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

Aos meus pais,

À professora e amiga Samantha Cristina de Pinho

Aos amigos de laboratório

Aos funcionários do departamento de Engenharia de Alimentos, Marcelo Thomazini, Carla Monaco Lourenço, Camila Velludo Molina, Tatiana Sanches, Alan Borrin, Fabiana Michelin, Henrique Ortiz e Fábio Gallo. Obrigada pelo apoio na realização de análises e pelos conhecimentos ensinados.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), por todo apoio e ensinamentos recebidos.

RESUMO

SILVA, G.S. Obtenção de prolipossomas por recobrimento de sacarose micronizada, produção de lipossomas multilamelares encapsulando curcumina e incorporação das vesículas em iogurte. 2018. 99 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

O maior interesse dos consumidores por alimentos que tragam benefícios à saúde faz necessário o constante desenvolvimento de métodos de tecnologias que tornem possível a sua produção em grande escala. Dentre tais tecnologias, destaca-se a microencapsulação de componentes bioativos. Lipossomas têm sido amplamente estudados para diversos fins, dentre eles, a encapsulação e a veiculação de bioativos, pois permitem maior proteção dos bioativos encapsulados, bem como podem promover a liberação controlada dos mesmos. Dentre os bioativos de interesse da indústria de alimentos está a curcumina, que além de ser um poderoso antioxidante, pode ser uma ótima alternativa para substituição de corantes amarelos. Tais corantes amarelos possuem diversos efeitos colaterais conhecidos, como a alergenicidade. A fabricação de iogurtes no Brasil vem crescendo de maneira considerável, e a este fato pode-se atribuir o consumo por indivíduos que buscam suas características funcionais, tendo seu consumo associado a uma imagem positiva e aos benefícios que traz ao organismo. Tal produto se torna, portanto, bastante atrativo para utilização de curcumina encapsulada em lipossomas e sua utilização vai ao encontro dos interesses dos consumidores. Neste trabalho de Doutorado foram produzidos lipossomas multilamelares encapsulando curcumina, através do método inovador de hidratação de prolipossomas obtidos por recobrimento de sacarose micronizada. Os prolipossomas foram caracterizados, e constatou-se através de microscopia eletrônica de varredura que a sacarose foi completamente recoberta pelos fosfolipídios. Além disso, o pó obtido se mostrou amorfo e com solubilidade de 98% em água, fatores extremamente importantes para a etapa posterior de hidratação dos prolipossomas para formação das vesículas em dispersão. Também se mostraram com baixíssima capacidade de retenção de umidade, característica importante para aumentar sua vida de prateleira durante o armazenamento. Por sua vez, os lipossomas foram efetivos em preservar a curcumina encapsulada (70% da curcumina foi preservada após 30 dias de armazenagem sob refrigeração), com diâmetro médio aproximado de 700-800 nm. A incorporação dos lipossomas encapsulando curcumina em iogurte não alterou nenhum parâmetro físico-químico do produto, como composição centesimal, pH, acidez titulável e comportamento reológico. Os resultados da análise sensorial mostraram que o produto teve alta aceitação por parte dos panelistas, sendo que a apenas a adição de pedaços de fruta não foi bem aceito por parte dos consumidores.

Palavras-chave: curcumina; iogurte; lipossomas; microencapsulação; produtos funcionais

ABSTRACT

SILVA, G.S. Production of proliposomes by coating of micronized sucrose to obtain multilamellar liposomes encapsulating curcumin and incorporation of the vesicles in yogurt. 2018. 99 p. Ph.D. Thesis – School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2018.

The increased consumer interest in food products that produces health benefits requires constant development of methods and technologies to make possible their production on a large scale. Among these technologies, there are the processes of microencapsulation of bioactive components. Liposomes have been extensively studied for a variety of purposes, including the encapsulation and delivery of bioactives, as they allow greater protection of encapsulated bioactive substances as well as promote the controlled release of bioactive substances. Among the bioactives of interest in the food industry is curcumin, which in addition to being a powerful antioxidant, can be a great alternative for yellow dye substitution. Such yellow dyes have several known side effects, such as allergenicity. The production of yogurt in Brazil has been growing considerably, and this fact can be attributed consumption by individuals seeking their functional characteristics, having its consumption associated with a positive image and the benefits it brings to the body. Such a product, therefore, becomes quite attractive for use to test the incorporation of curcumin-loaded liposomes, to verify if their characteristics would meet the interests of consumers. In the present PhD, multilamellar liposomes were produced to encapsulate curcumin, through the innovative method of hydration of proliposomes obtained by coating of micronized sucrose. The proliposomes were characterized, and it was found by scanning electron microscopy that the sucrose was completely covered by the phospholipids. In addition, the powder obtained showed to be amorphous and with solubility of 98% in water, factors extremely important for the subsequent hydration of the proliposomes to form the vesicles in dispersion. They were also shown to have very low moisture retention capacity, an important feature to increase shelf life during storage. In turn, liposomes were effective in preserving encapsulated curcumin (70% of curcumin was preserved after 30 days of storage under refrigeration), with an approximate mean diameter of 700-800 nm. The incorporation of the liposomes encapsulating curcumin into yogurt did not change significantly any relevant physicochemical parameters of the dairy product, such as proximate composition, pH, titratable acidity and rheological behavior. The results of the sensorial evaluation showed that the product had high acceptance by the panelists, and that only the addition of pieces of fruit was not well accepted by the consumers.

Keywords: curcumin; yogurt; liposomes; microencapsulation; functional products

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de diferentes métodos utilizados para a produção de sistemas microencapsulados: (A) spray chilling; (B) spray dryer; (C) extrusão; (D) leite fluidizado.....	16
Figura 2 – Representação esquemática da estrutura de uma molécula de fosfolipídio, e da fosfatidilcolina como exemplo	19
Figura 3 – Representação esquemática de um lipossoma unilamelar	19
Figura 4 – Estrutura de um fosfolipídio e mecanismo de formação dos lipossomas após sua dispersão em meio aquoso. (a) Representação esquemática do lipossoma demonstrando as áreas hidrofílica e hidrofóbica; (b) Representação esquemática da interação entre duas moléculas de fosfolipídio acomodadas em uma bicamada lipídica.....	21
Figura 5 – Exemplos de diferentes tipos de lipossomas: SUV (vesículas unilamelares pequenas), LUV (vesículas unilamelares grandes), MLV (vesículas multilamelares) e MVV (vesículas multivesiculares).....	21
Figura 6 – (a) Representação esquemática de diferentes tipos de lipossomas; (b) microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas multilamelares; (c) lipossomas unilamelares pequenos; (d) lipossomas multivesiculares	22
Figura 7 – Esquema do método de hidratação do filme lipídico seco: (1) adição da fase aquosa a um filme lipídico seco (anteriormente obtido por evaporação de solvente orgânico); (2) agitação e desprendimento do filme da parede do balão; (3) suspensão de MLV	23
Figura 8 – Micrografia eletrônica de varredura de prolipossomas obtidos por atomização.....	25
Figura 9 – Representação esquemática do método de produção de lipossomas pela hidratação de partículas secas de fosfolipídios (prolipossomas produzidos por atomização).....	26
Figura 10 – Esquema de produção de prolipossomas pelo recobrimento de carreadores micronizados.....	26
Figura 11 – Rizomas e curcumina em pó extraída de rizomas.....	31
Figura 12 – Estruturas químicas dos principais curcuminoides extraídos do rizoma da planta <i>Curcuma longa</i> L.....	32
Figura 13 – (a) Estrutura molecular geral de azocorantes; (b) estrutura molecular da tartrazina.....	39
Figura 14 – Esquema do sistema de produção dos prolipossomas.....	43
Figura 15 - Aspecto visual dos prolipossomas produzidos incorporando curcumina	51
Figura 16 – Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das amostras: (A) fosfolipídio (Phospholipon 90H); (B) sacarose micronizada; (C) prolipossomas.....	53

Figura 17 – Espectros de infravermelho obtidos para as amostras de prolipossomas produzidas, bem como para a curcumina, sacarose e fosfolipídios puros	54
Figura 18 – Difrátogramas de raios-X das amostras de matérias-primas e prolipossomas	55
Figura 19 – Isotermas de sorção de umidade obtidas para os prolipossomas	57
Figura 20 – Aspecto visual dos lipossomas produzidos com gomas xantana e guar como espessantes.....	57
Figura 21 – Potencial zeta em função do tempo de estocagem para as formulações de lipossomas produzidas com espessantes	59
Figura 22 – Perfil temporal da concentração de curcumina para os lipossomas multilamelares produzidos	60
Figura 23 – Valores de pH dos iogurtes produzidos ao longo do período de armazenagem ...	63
Figura 24 – Valores de acidez titulável dos iogurtes ao longo do tempo de armazenagem	64
Figura 25 – Parâmetros colorimétricos L*, a* e b* obtidos para as amostras de iogurte produzidos, ao longo do tempo de armazenagem.....	65
Figura 26 – Valores dos parâmetros Croma e ângulo de Hue obtidos para as amostras de iogurte produzidos, ao longo do tempo de armazenagem	65
Figura 27 – Diagrama CieLab com sequência de nuances de cores e orientação do ângulo de Hue	66
Figura 28 – Curvas de fluxo do iogurte contendo lipossomas encapsulando curcumina ao longo do tempo de armazenamento	67
Figura 29 – Distribuição da intenção de compra dos provadores em relação as amostras de iogurte de abacaxi com lipossoma encapsulando curcumina	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Algumas características de diversas tecnologias utilizadas para encapsulação	17
Tabela 2 – Classificação dos lipossomas baseada em parâmetros estruturais (diâmetro médio e lamelaridade)	22
Tabela 3 – Exemplos de aplicações de lipossomas para encapsulação de bioativos de interesse em alimentos	29
Tabela 4 – Soluções salinas saturadas e suas respectivas atividades de água determinadas experimentalmente.....	45
Tabela 5 – Formulações empregadas na produção dos lipossomas multilamelares encapsulando curcumina.....	46
Tabela 6 – Solubilidade, higroscopicidade e teor de umidade dos prolipossomas.....	56
Tabela 7 – Diâmetros médios em função do tempo de estocagem para as formulações de lipossomas encapsulando curcumina.....	58
Tabela 8 – Valores de diâmetro hidrodinâmico médio, concentração de curcumina, porcentagem de curcumina preservada e parâmetros colorimétricos para os lipossomas encapsulando curcumina (25 mg de curcumina em solução etanólica), estabilizados com gomas xantana e guar	61
Tabela 9 – Composição mássica em gordura e proteínas, e valores de umidade e densidade dos iogurtes.....	62
Tabela 10 – Porcentagem de sinérese do iogurte adicionado com lipossomas, ao longo do tempo de armazenagem	64
Tabela 11 – Parâmetros reológicos obtidos para os iogurtes incorporando lipossomas. Parâmetros do modelo de Herschel-Bulkley: τ_0 (tensão de cisalhamento inicial), k (índice de consistência), n (índice de comportamento de fluido), bem como a tixotropia.....	67
Tabela 12 – Contagem de bolores e leveduras e bactérias lácticas nos iogurtes produzidos.....	68
Tabela 13 – Médias atribuídas às características sensoriais para as amostras de iogurtes de abacaxi, contendo curcumina encapsulada em lipossomas	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFA – Academia da Força Aérea
ANOVA – Análise de Variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CIE – *Commission Internationale de l’Eclairage*
DRX – Difração de Raios X
E – Aprovado para uso na União Europeia
FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FDA – *Food and Drug Administration*
FIESP – Federação das Indústrias do Estado de São Paulo
FZEA – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
GUV – *Giant unilamellar vesicles* (Vesículas unilamelares gigantes)
INS – Sistema Internacional de Numeração
ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos
LBDD – *Lipid-Based Drug Delivery*
LUV – *Large unilamellar vesicles* (Vesículas unilamelares grandes)
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MLV – *Multilamellar large vesicles* (Vesículas multilamelares grandes)
MRS – Man Rogosa e Sharpe
OTC – *Over-the-counter*
PCS – *Photon correlation spectroscopy*
PDA – *Potato Dextrose Agar*
pH – Potencial hidrogeniônico
SAS – *Statistical Analysis System*
SAXS – Espalhamento de raios-X a baixos ângulos
SUV – *Small unilamellar vesicles* (Vesículas unilamelares pequenas)
TCD – Diferença total de cor
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC – Unidades formadoras de colônia
UR – Umidade relativa
USP – Universidade de São Paulo
ZEA – Departamento de Engenharia de Alimentos

LISTA DE SÍMBOLOS

nm – nanômetros

cm – centímetros

mV – milivolt

p/p – peso/peso

°C – graus Celsius

C16:0 – ácido palmítico

C18:0 – ácido esteárico

g – gramas

h – horas

rpm – rotações por minuto

mL – mililitro

mg – miligramas

min – minuto

kV – kilovolt

mA – miliampere

° – graus

U_{eq} – umidade de equilíbrio

$m_{\text{água}}$ – massa de água total

m_s – massa seca da amostra

L^* – luminosidade

a^* – teor de vermelho

b^* – teor de amarelo

C^* – intensidade de cor (Croma)

h^{ab} – ângulo de Hue

s – segundos

T – tensão de cisalhamento

T_0 – tensão de cisalhamento inicial

K – índice de consistência

γ – taxa de deformação

n – índice de comportamento adimensional

Pa – Pascal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 MICROENCAPSULAÇÃO: DEFINIÇÃO E PROCESSOS	15
2.1.1 Microencapsulação em Sistemas Lipídicos	18
2.2 LIPOSSOMAS: ESTRUTURA E PROPRIEDADES	18
2.2.1 Prolipossomas e produção de lipossomas pelo método de hidratação dos prolipossomas	23
2.3 APLICAÇÃO DOS LIPOSSOMAS EM ALIMENTOS	28
2.4 CURCUMINA: ESTRUTURA, PROPRIEDADES E MICROENCAPSULAÇÃO EM MATRIZES LIPÍDICAS	30
2.5 IOGURTES	34
2.6 CORANTES ARTIFICIAIS VS. NATURAIS	36
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 MATERIAIS	41
4.2 MÉTODOS	42
4.2.1 Produção e caracterização dos lipossomas	42
4.2.1.1 Produção dos prolipossomas por recobrimento de sacarose micronizada	42
4.2.2 Caracterização dos prolipossomas	42
4.2.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	42
4.2.2.2 Espectroscopia de infravermelho	44
4.2.2.3 Difractometria de raios-X (DRX)	44
4.2.2.4 Isotermas de sorção de umidade	44
4.2.2.5 Teor de umidade	45
4.2.2.6 Solubilidade	45
4.2.2.7 Higroscopicidade	45
4.2.3 Produção e caracterização das dispersões de lipossomas	46
4.2.3.1 Produção dos lipossomas por hidratação dos prolipossomas	46
4.2.3.2 Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de vesícula	46
4.2.3.3 Determinação do potencial zeta	47
4.2.3.4 Avaliação da estabilidade físico-química dos lipossomas	47
4.2.4 Produção e caracterização dos iogurtes com dispersões de lipossomas	47
4.2.4.1 Incorporação das dispersões de lipossomas em iogurte	47
4.2.4.2 Determinação da composição centesimal, acidez titulável e pH	47

4.2.4.3 Obtenção de dados colorimétricos	48
4.2.4.4 Obtenção de parâmetros reológicos	48
4.2.4.5 Análise da sinérese dos iogurtes	48
4.2.4.6 Análise sensorial dos iogurtes	49
4.2.4.7 Análises microbiológicas dos iogurtes	49
4.2.4.7.1 Contagem de fungos filamentosos e leveduras	49
4.2.4.7.2 Contagem de bactérias lácticas	49
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA PRODUÇÃO DOS PROLIPOSSOMAS	51
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PROLIPOSSOMAS.....	52
5.2.1 Morfologia das partículas de prolipossomas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	52
5.2.2 Espectroscopia na região de infravermelho	52
5.2.3 Difratometria de raios-X.....	54
5.2.4 Solubilidade e sorção de umidade	56
5.3 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS ENCAPSULANDO CURCUMINA.....	57
5.3.1 Avaliação da estabilidade físico-química dos lipossomas	57
5.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS IOGURTES.....	62
5.4.1 Determinação da composição centesimal	62
5.4.2 Determinação de acidez em ácido láctico e pH	62
5.4.3 Determinação de parâmetros colorimétricos	64
5.4.4 Determinação de parâmetros reológicos	66
5.4.5 Análises microbiológicas	67
5.4.6 Análise sensorial	68
6 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	72
APÊNDICE A	87
APÊNDICE B.....	88
ANEXO A.....	90

1 INTRODUÇÃO

Recentemente a indústria alimentícia tem feito grandes esforços para disponibilizar alimentos que, além da sua função nutricional, possam também apresentar uma vertente funcional. Outra tendência corresponde à utilização, cada vez maior, de ingredientes naturais em substituição aos sintéticos. Exemplos de tais tendências incluem a incorporação de curcumina, carvacrol, retinol, α -tocoferol, resveratrol, quercetina, β -caroteno e minerais diversos em alimentos. No entanto, as tecnologias e os processos utilizados pela indústria de alimentos para a incorporação desses compostos nem sempre são eficazes, e precisam estar em constante aperfeiçoamento. Tais tecnologias apresentam muitas vezes problemas relacionados com solubilidade, degradação, agregação, coalescência e interação dos compostos bioativos com as matrizes alimentícias, que fazem com que o seu efeito funcional seja diminuído, ou até mesmo perdido, antes de chegar ao consumidor.

A microencapsulação tem sido apresentada nos últimos anos como uma forma de solucionar alguns desses problemas envolvendo a produção, o processamento e a aplicação de bioativos em sistemas alimentícios. O termo “microencapsulação” compreende um conjunto de diversas técnicas que permitem o desenvolvimento de formulações, em que o seu conteúdo é protegido e sua liberação pode ser modificada com o objetivo de atuar num determinado local, por um determinado período de tempo e uma velocidade específica. Esta técnica viabiliza a proteção de compostos, sendo empregada em diversas áreas, como na indústria farmacêutica, de alimentos e de cosméticos, sendo o seu principal objetivo proteger o material encapsulado das condições adversas do meio e liberá-lo em seu sítio de ação em quantidade e no momento adequado para exercer a função desejada.

Dentre as diversas técnicas de microencapsulação, pode-se citar os lipossomas, que são vesículas fosfolipídicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, dispersas em meio aquoso. Tais vesículas podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas na membrana fosfolipídica. Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não-imunogênicos, os lipossomas são altamente versáteis para pesquisa, terapêutica e aplicações em diversas áreas, entre elas a de produção de alimentos. No que respeita à utilização de corantes, existem diferentes técnicas que podem conduzir à sua estabilização e modificação da solubilidade de forma a proporcionar uma correta compatibilidade com a matriz alimentar onde vão ser incorporados.

A hidrofobicidade típica de diversos de bioativos com características corantes, como os carotenoides e diversos flavonoides, dificulta a adição direta de tais compostos em alimentos, sobretudo aqueles de base aquosa, o que difuculta a substituição dos corantes que vem sendo utilizados atualmente. Uma alternativa ao uso de corantes sintéticos, a curcumina, diante do grande número de aplicações, aliadas à crescente demanda por tal tipo de insumo, é possível evidenciar um grande potencial da cultura da *Curcuma longa* como fonte de matéria-prima para as indústrias dos mais diversos setores econômicos. A incorporação de curcumina em lipossomas é uma alternativa para sua efetiva incorporação dos mesmos em sistemas alimentícios. A técnica de hidratação de prolipossomas é um método relativamente simples em termos operacionais, facilmente escalonável e possível de ser aplicado na indústria de alimentos.

O consumo de alimentos com características funcionais está relacionado à prevenção de doenças e ao auxílio no tratamento delas, enfim, na busca de uma melhor qualidade de vida, ou, em outros casos, da necessidade dela, uma vez que a perda da saúde justifica a produção de alimentos funcionais. Entre os alimentos com essas propriedades os iogurtes, onde seu consumo está em constante crescimento, e a inserção de substâncias funcionais nesses produtos é bem recebida pelos consumidores. Sendo assim, o objetivo desta Tese foi produzir lipossomas multilamelares encapsulando curcumina, pelo método da hidratação de prolipossomas produzidos pelo método de recobrimento de sacarose micronizada e aplicação em iogurtes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROENCAPSULAÇÃO: DEFINIÇÃO E PROCESSOS

Microencapsulação é definido classicamente como “o processo de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas extremamente pequenas, as quais podem liberar o conteúdo de forma controlada e sob condições específicas” (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008). Na verdade, atualmente o termo microencapsulação abrange um conjunto de tecnologias que têm sido empregadas com êxito na indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentícia. Várias técnicas têm sido empregadas na obtenção de sistemas de microencapsulação, tais como: *spray drying*, *spray cooling*, coacervação, extrusão, extrusão centrífuga, recobrimento em leito fluidizado, lipossomas, emulsificação e complexação por inclusão molecular. Essas técnicas têm colaborado para solucionar limitações no emprego de diversos ingredientes alimentícios, visto que podem suprimir ou atenuar *flavors* indesejáveis, reduzir a volatilidade e a reatividade de determinadas substâncias, bem como aumentar a estabilidade destas em condições ambientais adversas, como na presença de luz, oxigênio e pH (COOK et al., 2012; GOUIN, 2004).

De modo geral, os ingredientes são encapsulados por três grandes motivos: proteger o ingrediente em si, melhorar o produto acabado como um todo, ou facilitar o processo de produção de alimentos e também para alteração do padrão/cinética de liberação de um ingrediente (especialmente bioativos), bem como aumentar a bioacessibilidade/ biodisponibilidade de determinados bioativos (RIBEIRO; BIAGIONI; SMITH, 2014).

Diferentes métodos são utilizados para a produção de sistemas microencapsulados (Figura 1), que, em geral, podem ser divididos em três grupos (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008):

- a) métodos físico-químicos: coacervação simples ou complexa, emulsificação, lipossomas ;
- b) métodos físicos: *spray drying*, *spray coating*, *spray chilling*, gelificação iônica, leito fluidizado, extrusão, centrifugação com múltiplos orifícios, co-cristalização, liofilização;
- c) métodos químicos: polimerização interfacial, inclusão molecular

Figura 1 – Representação esquemática de diferentes métodos utilizados para a produção de sistemas microencapsulados: (A) spray chilling; (B) spray dryer; (C) extrusão; (D) leito fluidizado

Fontes: ALVIM, I. D. et al. Use of the spray chilling method to deliver hydrophobic components: physical characterization of microparticles. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, p. 34–39, 2013.

ANJANI, K.; KAILASAPATHY, K.; PHILLIPS, M. Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 1, p. 79–86, 2007.

BRIENS, L.; BOJARRA, M. Monitoring Fluidized Bed Drying of Pharmaceutical Granules. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 4, p. 1612–1618, 2010.

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 104, n. 4, p. 467–483, 2011.

A seleção da técnica de microencapsulação adequada depende, principalmente, da aplicação que será dada ao sistema produzido, do mecanismo de liberação e das propriedades físico-químicas, tanto do material ativo, quanto dos agentes encapsulantes (ASSUNÇÃO, 2014; COOK et al., 2012). A Tabela 1 apresenta algumas características de diversas tecnologias utilizadas para encapsulação.

Tabela 1 – Algumas características de diversas tecnologias utilizadas para encapsulação

Método de encapsulação	Estado físico do material encapsulado	Faixa de tamanho médio das estruturas formadas (µM)
Métodos físicos		
Extrusão estacionária	Líquido/sólido/gas	1000 – 6000
Bocal submerso	Líquido/sólido/gas	700 – 6000
Extrusão centrífuga	Líquido/sólido/gas	125 – 3000
Bocal vibrante	Líquido/sólido/gas	500 – 200
<i>Spray drying</i>	Líquido/sólido	5 – 150
<i>Pan coating</i>	Líquido/sólido	>500
Suspensão por ar	Sólido	50 – 10000
<i>Spray chilling/spray cooling</i>	Sólido	20 – 200
Leito fluidizado	Sólido	>100
Co-cristalização	Líquido/sólido	-
Liofilização	Líquido	-
Métodos químicos		
Polimerização interfacial	Líquido/sólido	1 – 500
Inclusão molecular	Líquido	5 – 50
Polimerização <i>in situ</i>	Líquido/sólido	1 – 500
Métodos físico-químicos		
Coacervação simples	Líquido/sólido	20 – 500
Coacervação complexa	Líquido/sólido	1 -500
Lipossomas	Líquido/sólido	0,02 – 3
Lipoesferas	Líquido/sólido	0,02 – 10
Evaporação de solvente	Líquido/sólido	1 – 5000

Fontes: DESAI, K. G. H.; JIN PARK, H. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying Technology**, New York, v. 23, n. 7, p. 1361–1394, jul. 2005.

SOUTHWEST RESEARCH INSTITUTE. **A Capability Statement for Microencapsulation**. San Antonio, 1991. 31 p.

MADENE, A. et al. Flavour encapsulation and controlled release - a review. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 1–21, 2006.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 33, n. 6, p. 501–547, 1993.

2.1.1 Microencapsulação em sistemas lipídicos

Os sistemas lipídicos de microencapsulação são bastante utilizados devido às inúmeras vantagens que podem ter quando se trata de bioativos hidrofóbicos. Dentre tais vantagens, estão o aumento da solubilidade do bioativo em meio aquoso, melhoria da atividade biológica, aumento da estabilidade, liberação controlada, redução da degradação por influência de fatores físico-químicos e aumento da bioacessibilidade e da biodisponibilidade (CORTÉS-ROJAS, 2015; PARADA; AGUILERA, 2007). Estes sistemas lipídicos podem ser estruturados de diferentes maneiras, como, por exemplo: sistemas auto-emulsificantes, emulsões secas, dispersões sólidas, lipossomas, micro e nano partículas lipídicas sólidas, dentre outras (ASSIS et al., 2012).

Em particular, a encapsulação em lipossomas têm sido amplamente estudada há muitos anos por pesquisadores na área de saúde, devido ao seu uso potencial como carreadores de fármacos. O uso de lipossomas pela indústria de alimentos tem sido estudado mais intensamente nos últimos dez anos, principalmente devido à capacidade que tais vesículas fosfolipídicas possuem de aumento da eficiência de encapsulação e de liberação de bioativos *in vivo*. Dentre as vantagens do uso dos lipossomas, destacam-se a boa eficiência de encapsulação, a baixíssima toxicidade e a proteção ao ativo encapsulado contra fatores degradantes como pH e exposição à luz. Ademais, os lipossomas fazem parte da categoria denominada *Lipid-Based Drug Delivery (LBDD)*, que podem promover aumento da bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos funcionais hidrofóbicos, pois suas matrizes são lipídicas (PARADA; AGUILERA, 2007; PORTER; TREVASKIS; CHARMAN, 2007).

2.2 LIPOSSOMAS: ESTRUTURA E PROPRIEDADES

Lipossomas são sistemas lipídicos dispersos constituídos majoritariamente por fosfolipídios, que em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas, que, por sua vez, se fecham sobre si mesmas formando vesículas. Formam-se, então, vesículas esféricas, cujas bicamadas (denominadas também de *lamelas*) circundam uma cavidade aquosa interna (TAYLOR et al., 2005). Segundo Lasic (1993), os lipossomas podem encapsular substâncias polares e apolares, sendo capazes de atravessar diferentes barreiras e liberar substâncias encapsuladas no ambiente hidrofóbico, ou através de outras membranas. Na Figura 2 estão ilustradas as interações de vários tipos de

moléculas com um lipossoma unilamellar. Moléculas hidrofílicas são encapsuladas na sua cavidade interna, onde estão presentes os grupos polares dos fosfolipídios. Por sua vez, as substâncias lipofílicas são acomodadas na região apolar da bicamada, e as anfifílicas por toda sua estrutura, interagindo com as regiões apolares e polares do lipossoma. A Figura 3 faz uma representação esquemática de um lipossoma unilamellar.

Figura 2 – Representação esquemática da estrutura de uma molécula de fosfolipídio, e da fosfatidilcolina como exemplo

Fonte: RYDBERG, E. **Re: How does the structure of the head of a phospholipid give it polarity?** 2006. Disponível em: <<http://www.madsci.org/posts/archives/2006-12/1164999854.Bc.r.html>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

Figura 3 – Representação esquemática de um lipossoma unilamellar

Fonte: Adaptado de JUSTO, O. R.; MORAES, Â. M. Economical feasibility evaluation of an ethanol injection Liposome production plant. **Chemical Engineering and Technology**, Weinheim, v. 33, n. 1, p. 15–20, 2010.

A estrutura química dos fosfolipídios possui um esqueleto de glicerol. A posição 3 da molécula de glicerol é esterificada. Os grupos hidroxila nas posições 1 e 2 do glicerol geralmente são esterificados com ácidos graxos de cadeia longa, sendo tais cadeias devida a natureza lipídica do fosfolipídio. Um dos grupos de oxigênio restantes de ácido fosfórico pode ainda esterificar uma variedade de moléculas orgânicas, incluindo glicerol, colina, etanolamina, serina e inositol. A unidade de fosfato ligada ao álcool formando grupo de “cabeça polar” do fosfolipídio.

Os fosfolipídios mais abundantes em plantas e animais são a fosfatidilcolina (também conhecida como lecitina) e a fosfatidiletanolamina. Estes dois lipídios constituem a parte estrutural principal da maioria das membranas biológicas (CEVC, 1993).

A estruturação dos fosfolipídios em meio aquoso é dependente da concentração e da temperatura, e ocorre, principalmente, devido ao efeito hidrofóbico, tal efeito é responsável pela estruturação dos fosfolipídios pois leva a minimização das interações desfavoráveis entre os grupos acila (hidrofóbicos) e o meio aquoso circundante. Este efeito é estabelecido por uma série de forças intermoleculares, como as interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, bem como forças de Van der Waals e de dispersão, formando, assim, dispersões coloidais (LAOUINI et al., 2012; LASIC, 1993). A Figura 4 apresenta a estrutura de um fosfolipídio e o mecanismo de formação dos lipossomas após sua dispersão em meio aquoso.

Os lipossomas podem ser classificados tanto pelo método da sua preparação quanto pelo número de bicamadas (lamelas) presentes na vesícula, ou mesmo por seu tamanho. Quando os lipossomas são descritos com base no número de bicamadas são classificados, geralmente, como vesículas unilamelares pequenas (SUV, *small unilamellar vesicles*), vesículas unilamelares grandes (LUV, *large unilamellar vesicles*), vesículas unilamelares gigantes (GUV, *giant unilamellar vesicles*) e vesículas multilamelares grandes (MLV, *multilamellar large vesicles*). Na Figura 5 está apresentada a classificação de lipossomas segundo o número de bicamadas de fosfolipídio. A Figura 6 mostra uma representação esquemática de diferentes tipos de lipossomas. As vesículas unilamelares, formadas por uma bicamada única, são denominadas SUV quando possuem diâmetro compreendido entre 25-150 nm, e LUV, quando são maiores que 100 nm. Os lipossomas multilamelares são formados por bicamadas sucessivas, separadas por compartimentos aquosos, com diâmetro

compreendido entre 100-1000 nm (NEW, 1990; SAHOO; LABHASETWAR, 2003). A Tabela 2 apresenta a classificação de lipossomas baseada em seu tamanho estrutural.

Figura 4 – Estrutura de um fosfolípido e mecanismo de formação dos lipossomas após sua dispersão em meio aquoso. (a) Representação esquemática do lipossoma demonstrando as áreas hidrofílica e hidrofóbica; (b) Representação esquemática da interação entre duas moléculas de fosfolípido acomodadas em uma bicamada lipídica

Fonte: Adaptado de:

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 167–194, 2006.
 LAOUINI, A. et al. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 1, p. 147–168, 2012.

Figura 5 – Exemplos de diferentes tipos de lipossomas: SUV (vesículas unilamelares pequenas), LUV (vesículas unilamelares grandes), MLV (vesículas multilamelares) e MVV (vesículas multivesiculares)

Fonte: Adaptado de TAYLOR, T. M. et al. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 45, n. 7–8, p. 587–605, 2005.

Figura 6 – (a) Representação esquemática de diferentes tipos de lipossomas; (b) microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas multilamelares; (c) lipossomas unilamelares pequenos; (d) lipossomas multivesiculares

Fonte: Adaptado de DE LA TORRE, L. G.; PINHO, S. C. Lipid Matrices for Nanoencapsulation in Food: Liposomes and Lipid Nanoparticles. In: HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. (Eds.). **Food Nanoscience and Nanotechnology. Food Engineering Series**. Springer, 2015. p. 99–143.

Tabela 2 – Classificação dos lipossomas baseada em parâmetros estruturais (diâmetro médio e lamellaridade)

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

Fonte: 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, 1996. p. 23–41.

O diâmetro das partículas é uma propriedade de fundamental relevância em relação à estabilidade e segurança dos nanossistemas lipídicos empregados para administração parenteral. Uma população de partículas de diâmetro elevado pode

indicar decréscimo de estabilidade da formulação mediante agregação/fusão das vesículas, ou mesmo indicar processo de produção inadequado ou não-otimizado dos nanossistemas (KLANG et al., 2012).

2.2.1 Prolipossomas e produção de lipossomas pelo método de hidratação dos prolipossomas

Banghan, Standish e Watkins (1965) foram os primeiros pesquisadores a sistematizar o fenômeno da formação de estruturas fechadas em bicamadas, resultando em lipossomas. Tal observação pioneira permitiu que a pesquisa sobre os lipossomas percorresse um longo caminho, convertendo-os de simples objetos de pesquisa biofísica em carreadores terapêuticos para numerosas aplicações clínicas e em alimentos (TORCHILIN, 2005). Esse método envolve a solubilização dos lipídios em um solvente orgânico, seguida da etapa de evaporação desse solvente, formando, como resultado, um filme lipídico seco. O filme lipídico seco é hidratado através da adição de um meio aquoso, sob condições controladas. A hidratação é realizada simultaneamente com processo de agitação, objetivando a formação efetiva dos lipossomas. Uma representação esquemática da produção por este método pode ser visualizada na Figura 7. Apesar de relativamente fácil de ser executado, este método resulta na formação de lipossomas do tipo MLV com distribuição de tamanhos de partículas muito heterogêneas (LASIC, 1993; MEURE; FOSTER; DEHGHANI, 2008).

Figura 7 – Esquema do método de hidratação do filme lipídico seco: (1) adição da fase aquosa a um filme lipídico seco (anteriormente obtido por evaporação de solvente orgânico); (2) agitação e desprendimento do filme da parede do balão; (3) suspensão de MLV

Fonte: LASCH, J.; WEISSIG, V.; BRANDL, M. Preparation of liposomes. In: TORCHILIN, V. P.; WEISSIG, V. (Eds.). **Liposomes: a Practical Approach**. New York: Oxford University Press, 2003. p. 24–25.

Para a formação de lipossomas multilamelares com melhor controle do tamanho médio de vesícula, pode-se utilizar o método da hidratação de prolipossomas. O conceito de prolipossomas foi apresentado pela primeira vez por Payne et al. (1986), e foram descritos como um produto granular, seco, de escoamento livre. Tais pós seriam constituídos por lípidios, por um bioativo e um material transportador solúvel em água (um açúcar, por exemplo). Os prolipossomas, ao serem hidratados, permitem a formação de vesículas lipossomais multilamelares (MLV) (PAYNE et al., 1986).

Os prolipossomas podem ser obtidos por processos variados, e dentre eles pode-se citar: *spray drying* (JIN; LU; JIANG, 2016; KIKUCHI; YAMAUCHI; HIROTA, 1991; MORAES et al., 2013; TONIAZZO et al., 2014; ZHENG et al., 2015); liofilização (FEI et al., 2009; GUAN et al., 2012), sublimação (ZHANG; ZHU, 1999) e precipitação por uso de fluido supercrítico (LIAO; ZHANG; HE, 2012; LIU et al., 2015).

De forma geral, ao longo da armazenagem, as dispersões aquosas de lipossomas podem sofrer uma variedade de fenômenos adversos à sua estabilidade, incluindo agregação das vesículas, oxidação e hidrólise dos fosfolípidios, o que limita o seu tempo de vida útil e torna questionável a sua utilidade como um produto comercializável. Neste caso, um sistema capaz de transportar o bioativo, concebido para minimizar potenciais problemas de estabilidade física e química seria interessante (PAYNE et al., 1986). Assim, os prolipossomas surgem como uma potencial alternativa às formulações aquosas de lipossomas, pois permitem evitar muitos dos problemas de instabilidade por elas apresentadas. Os prolipossomas são partículas sólidas e secas, cujo propósito é serem hidratadas e transformadas em lipossomas apenas imediatamente antes do uso. São sistemas ideais para bioativos lipofílicos, sendo que depois da sua hidratação eles se concentram na membrana lipídica dos lipossomas formados (MOREIRA, 2015).

A seleção de um material transportador adequado é um importante fator a considerar. Este deve ser escolhido com base na sua porosidade e capacidade de acomodar os lípidios em sua superfície, de modo a que eles fiquem homogeneamente dispersos. Tais materiais transportadores são normalmente dissacarídeos, como sacarose ou trealose.

O método da hidratação dos prolipossomas baseia-se, inicialmente, na preparação de uma mistura seca de lípidios, os prolipossomas, com posterior formação dos lipossomas do tipo MLV por hidratação destas misturas. Este método é um dos poucos que permitem uma produção massiva de lipossomas e foi utilizado neste

trabalho. Tais partículas secas podem, por exemplo, ser produzidas por *spray-drying*. Uma grande vantagem deste método é que as misturas secas são normalmente estruturas amorfas, muito mais fáceis de hidratar quando comparado com outros métodos convencionais de formação de lipossomas por hidratação de filme seco, por exemplo (ALVES; SANTANA, 2004; KIKUCHI; YAMAUCHI; HIROTA, 1991).

Outro fator relevante desse método é que os fosfolipídios secos se mostram protetores eficientes, 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; YAMAUCHI; HIROTA, 1991; MORAES et al., 2013; TONIAZZO et al., 2014). A Figura 8 apresenta uma micrografia de prolipossomas obtidos por atomização, e a Figura 9 representa esquematicamente o processo de produção de lipossomas multilamelares por hidratação dos prolipossomas.

Figura 8 - Micrografia eletrônica de varredura de prolipossomas obtidos por atomização

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

Outro método para obtenção dos prolipossomas foi proposto por Elhissi et al. (2006), através do recobrimento de carreadores micronizados. Este método consiste no gotejamento da solução etanólica de fosfolipídios sobre sacarose micronizada, por exemplo, sob evaporação rotativa, o que permite a retirada de etanol da mistura logo

após o recobrimento da sacarose. Na Figura 10 está apresentado um esquema de produção de prolipossomas pelo recobrimento de carreadores.

Figura 9 – Representação esquemática do método de produção de lipossomas pela hidratação de partículas secas de fosfolipídios (prolipossomas produzidos por atomização)

Fonte: Própria autoria

Figura 10 – Esquema de produção de prolipossomas pelo recobrimento de carreadores micronizados

Fonte: Própria autoria

Em outro estudo utilizando a mesma técnica, Elhissi et al. (2011) produziram prolipossomas por recobrimento de lactose monohidratada, sacarose e sorbitol, com fosfatidilcolina. Prolipossomas hidratados sem agitação geraram vesículas esféricas, enquanto as vesículas geradas a partir de prolipossomas baseados em lactose monohidratada eram ricas em estruturas alongadas à base de sacarose. O efeito da formulação do prolipossoma no tamanho do lipossoma foi mínimo. Por outro lado, o tipo de suporte e de processo de hidratação de prolipossomas teve um efeito importante na morfologia dos lipossomas.

Khan et al. (2015) modificaram o método de recobrimento de carreadores micronizados, produzindo uma espécie de “pasta” (*slurry*) contendo o carreador e a fase etanólica (em que os lipídios, fosfatidilcolina de soja e colesterol, e o bioativo se encontravam solubilizados). O carreador testado foi a sacarose e o bioativo, o dipropionato de beclometasona. Foram utilizadas diferentes proporções mássicas de carreador/fosfolípido durante o processo. Os lipossomas obtidos após a hidratação dos prolipossomas se mostraram eficientes para retenção do bioativo, e menores em diâmetro médio que o método original desenvolvido por Elhissi et al. (2006).

Khan et al. (2018), produziram prolipossomas utilizando diferentes carreadores micronizados (sorbitol, lactose monohidratada e d-manitol) e fosfatidilcolina de soja/colesterol como lipídios. Os autores avaliaram a capacidade de incorporação de um esteroide (antiasmático, dipropionato de beclometasona) nos lipossomas obtidos a partir dos prolipossomas. Os resultados mostraram que o tipo de carreador micronizado teve influência decisiva na capacidade de encapsulação e retenção do fármaco nos lipossomas obtidos.

Finalmente, Chaves et al. (2018) produziram lipossomas multilamelares coencapsulando curcumina e vitamina D₃ através da hidratação de prolipossomas obtidos pelo recobrimento de sacarose micronizada. A coencapsulação dos dois bioativos foi possível, resultado comprovado pelo alto teor de retenção de ambos os bioativos ao longo do tempo de armazenagem. As análises de espalhamento de raio X a baixos ângulos (SAXS) mostraram que os lipossomas se mostraram mais estáveis na presença de curcumina e que não há grandes mudanças na conformação da vesícula com a adição de vitamina D₃, mesmo em maiores concentrações.

2.3 APLICAÇÃO DOS LIPOSSOMAS EM ALIMENTOS

Os lipossomas podem ser utilizados para proteger bioativos de interesse em alimentos, bem como modificar o perfil de liberação de ingredientes nos alimentos. As vesículas fosfolipídicas são também capazes de aumentar a bioacessibilidade, a biodisponibilidade e a absorção de compostos bioativos no trato gastrointestinal. Além disso, as vesículas de fosfolipídios podem ser utilizadas para produzir novos materiais de embalagem de alimentos com propriedades de barreira e propriedades antimicrobianas, bem como alguns tipos de nanossensores de rastreabilidade e monitoramento do estado de conservação dos alimentos durante o transporte e armazenamento (CHAUDHRY et al., 2008; DE LA TORRE; PINHO, 2015; TAYLOR et al., 2005).

Um dos primeiros relatos de aplicações de lipossomas em produtos alimentícios foi na fabricação de queijos (LAW; KING, 1985; PICON et al., 1996; SCOLARI et al., 1993). O objetivo principal foi diminuir o tempo e custo da maturação do queijo, adicionaram-se proteinases encapsuladas em lipossomas. Os pesquisadores demonstraram que as enzimas encapsuladas em lipossomas puderam melhorar a estabilidade e atividade de enzimas e controlar seu tempo de liberação, além de melhorar o sabor de queijo e reduzir o custo de produção.

Desde os citados primeiros estudos, diversos outros bioativos, como vitaminas, flavonoides, carotenoides, curcuminoides, e outros compostos como óleos essenciais e hidrolisados proteicos, tem sido também encapsulados em lipossomas para uso em alimentos. A Tabela 3 mostra diversos estudos que podem ser encontrados na literatura sobre encapsulação de bioativos (lipossomas) de interesse na área de alimentos.

Tabela 3 – Exemplos de aplicações de lipossomas para encapsulação de bioativos de interesse em alimentos

Bioativos (ou classes de bioativos)	Referência(s)
Proteases (quimosinas, proteinases, cipsosina)	Scolari et al. (1993)
	Picón, Gaya e Nuñez (1993)
	Picón et al. (1995)
	Picón et al. (1996)
Soroalbumina bovina	Hsieh et al. (2002)
	Haidar, Hamdy e Tabrizian (2008)
Nisina	Benech et al. (2003)
	Were et al. (2003)
	Taylor et al. (2007)
	Malheiros et al. (2010)
Sulfato ferroso	Xia e Xu (2005)
	Kosaraju, Tran e Lawrence (2006)
Glicinato ferroso	Ding et al. (2011)
Hidrolisado de caseína	Morais et al. (2005)
	Yokota, Moraes e Pinho (2012)
Beta-galactosidase	Rodriguez-Nogales e Delgadillo (2005)
	Rodriguez-Nogales e López (2006)
Salidroside	Fan et al. (2007); Peng et al. (2014)
Extrato de rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.	Takahashi et al. (2008)
Resveratrol	Isailovic et al. (2013)
Óleo essencial de orégano	Gortzi et al. (2007)
	Gortzi et al. (2008)
Óleo essencial de <i>Eugenia uniflora</i> L.	Yoshida et al. (2010)
Óleo essencial de trevo	Sebaaly et al. (2015)
Óleo de peixe	Ghorbanzade et al. (2017)
Extratos enzimáticos (Debitrase DPB20)	Nongonierma et al. (2009)
Vitamina E	Zhao et al. (2018)
Vitamina C	Liu et al. (2016)
Vitaminas C e E	Marsanasco et al. (2011)
Polifenóis de chá verde	Lu, Li e Jiang (2011)
Ácido ascórbico	Wechtersbach, Ulrich e Cigic (2012)
	Farhang, Kakuda e Corredig (2012)
Eugenol	Sebaaly et al. (2016)
Beta-caroteno	De Paz, Martín e Cocero (2012)
	De Paz, Martín e Cocero (2013)
	Moraes et al. (2013)
	Toniazzo et al. (2014)
	Zômpero et al. (2015)
	Carvalho et al. (2015)
	Michelon et al. (2016)
Luteína	Xia et al. (2012)
	Tan et al. (2013)
Luteína, beta-caroteno, licopeno, cantaxantina	Tan et al. (2016)
Extratos de hibiscus (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	Gibis, Zeeb e Weiss (2014)
L-carnosina	Maherani et al. (2012)
Quercetina	Toniazzo et al. (2017)
Quercetina + óleo de peixe	Frenzel, Steffen-Heins (2015)
Ácido docosahexaenóico e ácido eicosapentaenóico	Sahari et al. (2017)

Continua

Tabela 3 – Exemplos de aplicações de lipossomas para encapsulação de bioativos de interesse em alimentos

Continuação

Bioativos (ou classes de bioativos)	Referência(s)
Curcumina	Jin, Lu e Jiang (2016) Silva et al. (2017)
Ergocalciferol	Bohicchio et al. (2016)
Vitamina B ₁₂	Bohicchio et al. (2016)
Catequina e galato de epigallocatequina	Rashidinejad et al. (2014)
Vitamina D ₃ e curcumina	Chaves et al. (2018)
Fitoesteróis	Zhao et al. (2015)
Beta-caroteno e vitamina C	Hudiyanti, Fawrin e Siahaan (2018)

Fonte: Adaptado de:

CHAVES, M. A. Coencapsulação de curcumina e vitamina D₃ em lipossomas multilamelares. 2017. 112 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

DE LA TORRE, L. G.; PINHO, S. C. Lipid Matrices for Nanoencapsulation in Food: Liposomes and Lipid Nanoparticles. In: HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. (Eds.). **Food Nanoscience and Nanotechnology. Food Engineering Series**. Springer, 2015. p. 99–143.

2.4 CURCUMINA: ESTRUTURA, PROPRIEDADES E MICROENCAPSULAÇÃO EM MATRIZES LIPÍDICAS

Nutracêutico, uma combinação das palavras "nutrição" e "farmacêutico", refere-se ao alimento ou ingrediente alimentício que possui ação bioativa, proporcionando benefícios para a saúde além da nutrição básica (ZLOTOGORSKI et al., 2013). Existem diversas evidências que o consumo de nutraceuticos está associado à diminuição dos riscos de doenças crônicas (BERNAL et al., 2011; PINHEIRO; COIMBRA; VICENTE, 2016; YAO et al., 2016). Compostos nutraceuticos podem ser incorporados em sistemas alimentícios para o desenvolvimento de alimentos funcionais (BERNAL et al., 2011; GÓMEZ-ESTACA; GAVARA; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, 2015). No entanto, diversos nutraceuticos possuem pouca solubilidade em fase aquosa, baixa estabilidade e baixa biodisponibilidade oral, o que reduz significativamente a eficácia como agentes de prevenção de doenças (GÓMEZ-ESTACA; GAVARA; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, 2015; PINHEIRO; COIMBRA; VICENTE, 2016; YAO et al., 2016).

Compostos derivados da cúrcuma são considerados seguros pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO). O uso de cúrcuma como corante, aromatizante e conservante em alimentos é conhecido mundialmente, e, de acordo com a FAO, mais de 2400 toneladas de cúrcuma são importadas anualmente para consumo nos EUA (SHARMA; GESCHER;

STEWART, 2005). A cúrcuma é preparada por moagem de rizomas secos, principalmente da *Curcuma longa* L., uma planta pertencente à família do gengibre. A curcumina, um dos principais polifenóis da cúrcuma, está disponível como um suplemento *over-the-counter* (OTC) em todo o mundo (BASNET; SKALKO-BASNET, 2011; ZLOTOGORSKI et al., 2013). Caracteriza-se como uma pequena erva aromática, anual, composta de um rizoma principal com várias ramificações menores (Figura 11), todas marcadas com anéis de brácteas secas. Cada rizoma mede até 10 cm de comprimento e quando cortados mostram uma superfície de cor vermelha alaranjada, proveniente da presença do pigmento curcumina. Possui cheiro forte agradável e sabor aromático e picante. É originária da Índia, mas é muito cultivada nos países tropicais como planta medicinal ou condimentar (DA SILVA FILHO et al., 2009; MAJOLO et al., 2014; MATOS, 2000).

Figura 11 – Rizomas e curcumina em pó extraída de rizomas

Fonte: **DEZ Benefícios da Cúrcuma e da Curcumina Para a Saúde**. Disponível em: <<https://engenhariafitness.com.br/10-beneficios-da-curcuma-e-da-curcumina-para-saude/>>. Acesso em: 10 maio. 2018.

A *Curcuma longa* L. é comumente usada como um tempero, e também bastante estudada por suas propriedades medicinais, e sempre foi amplamente utilizada para o tratamento de várias doenças na medicina tradicional (popular), em certas culturas (ARAÚJO; LEON, 2001). Os efeitos biológicos da cúrcuma têm sido atribuídos aos seus componentes, especialmente a curcumina, que tem sido largamente estudada devido aos seus efeitos antioxidantes, que podem levar por sua vez a ação anti-inflamatória, antiangiogênica e anticancerígena. Entretanto, a curcumina comercialmente disponível consiste numa mistura de curcuminoides, a curcumina (77 %), a demetoxicurcumina (18 %) e a bisdemetoxicurcumina (5%) (BASNET;

SKALKO-BASNET, 2011; IM et al., 2015; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014; ZLOTOGORSKI et al., 2013). A Figura 12 mostra os principais curcuminoides extraídos do rizoma da *Curcuma longa* L.

Figura 12 – Estruturas químicas dos principais curcuminoides extraídos do rizoma da planta *Curcuma longa* L.

Fonte: Adaptado de MAHESHWARI, R. K. et al. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sciences*, v. 78, n. 18, p. 2081–2087, 2006.

O *stress* oxidativo desempenha um papel importante na patogênese de várias doenças, incluindo a isquemia miocárdica, cerebral, hemorragia e choque, lesão neuronal, a hipoxia e câncer. A curcumina exibe uma forte atividade antioxidante, comparável às vitaminas C e E (TODA et al., 1985). Foi demonstrado que ela é um potente captador de uma variedade de espécies reativas de oxigênio, incluindo radicais de ânion superóxido, radicais hidroxila (PULLA REDDY; LOKESH, 1996) e dióxido de enxofre (SREEJAYAN et al., 1997; UNNIKRISHNAN; RAO, 1995). Além disto, demonstrou também inibição da peroxidação lipídica em diferentes tipos de animais (PULLA REDDY; LOKESH, 1996; SREEJAYAN et al., 1997). A curcumina protegeu também células renais (células LLC-PK1) contra lesão celular oxidativa por inibição da degradação de lipídios, a peroxidação de lipídios e de citólise (COHLY et al., 1998).

A curcumina, entretanto, apresenta baixa estabilidade à luz e baixa solubilidade em água, limitando suas aplicações em formulações alimentícias. A utilização de técnicas de microencapsulação da curcumina pode ser, portanto, útil para aumentar a estabilidade do curcuminoide, bem como sua dispersabilidade em formulações aquosas, e ainda aumentar sua biodisponibilidade, caso seja utilizada, por exemplo, uma matriz lipídica como encapsulante, como emulsões, nanoemulsões, partículas lipídicas sólidas e lipossomas.

Através da técnica de infusão do etanol, Hong et al. (2009) obtiveram lipossomas contendo curcumina com tamanho de 136 nm, eficiência de encapsulação em torno de 88% e estabilidade por 30 dias. Nesta técnica, os lipídeos são dissolvidos no solvente e então injetados em solução aquosa aquecida, seguido de evaporação do solvente.

Karewicz et al. (2011) prepararam lipossomas contendo curcumina pela técnica de hidratação do filme lipídico. Através da utilização de sondas fluorescentes, os autores demonstraram que, em função da sua lipofilia, a curcumina estava localizada na bicamada lipídica. Observaram também que a curcumina exercia impacto de forma significativa sobre o tamanho e a estabilidade dos lipossomas. Quando a bicamada do lipossoma era composta por fosfatidilcolina de gema de ovo, fosfato de dihexadecil e colesterol, a curcumina estabilizava o sistema proporcionalmente ao seu conteúdo. Porém, quando a bicamada não continha colesterol, era desestabilizada na presença de curcumina. Sendo assim, a composição lipídica composta por três componentes foi o sistema mais promissor carreador de curcumina.

No estudo de Lin et al. (2012), foram preparados lipossomas catiônicos contendo curcumina pela técnica de hidratação do filme lipídico e obtiveram tamanho médio inferior a 270 nm, um potencial zeta de cerca de 40 mV e eficiência de encapsulamento de cerca de 45%. A atividade citotóxica da curcumina associada aos lipossomas foi cinco vezes maior que a curcumina livre quando testado em células sensíveis a curcumina e 20 vezes mais ativa contra células resistentes à curcumina. Desse modo, demonstraram que os lipossomas contendo curcumina poderão ser utilizados na terapia do câncer, especialmente para o câncer resistente aos medicamentos.

Chaves et al. (2018) produziram lipossomas multilamelares coencapsulando dois bioativos hidrofóbicos, a curcumina e a vitamina D₃, que apresentam propriedades antioxidantes e nutracêuticas. Os lipossomas foram produzidos por hidratação de prolipossomas e estabilizados com uma mistura de goma xantana e guar. Os

prolipossomas foram produzidos por revestimento do método de sacarose micronizada. A curcumina e o colecalciferol foram carregados nas mesmas vesículas, com eficiências de preservação variando de 89,6 a 93,3% e de 88,3 a 91,3%, respectivamente, após 42 dias de armazenamento.

2.5 IOGURTES

O iogurte é definido como um produto coagulado obtido por fermentação láctica devido à ação exclusiva de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e de *Streptococcus thermophilus* sobre o leite e produtos lácteos devendo a microbiota específica estar viva e ser abundante no produto final (ESTEVES; BARBOSA, 2013). Acredita-se que o iogurte exista desde 10.000 a.C., e provavelmente se originou da fermentação do leite pelos microrganismos naturalmente nele presentes. Os primeiros iogurtes produzidos em larga escala surgiram após a Segunda Guerra Mundial (1920-1930), e foi nesta época que se começou a adicionar sabores ao produto (SARON; SGARBIERI; LERAYER, 2005).

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2007), iogurte “é o produto obtido por meio da adição ou não de outras substâncias alimentícias, produzidos por coagulação e diminuição do pH do leite ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, através de fermentação láctica mediante ação de cultivos de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, aos quais se podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-láticas, que por sua atividade, contribuam para a determinação das características do produto final. Pode conter um máximo de 30% (p/p) de ingredientes não-lácteos” (BRASIL, 2007). Por outro lado, bebidas lácteas, segundo a legislação brasileira vigente, precisam conter pelo menos 51% de leite (p/p), soro de leite ou derivados de leite reconstituídos ou não, fermentados ou não, e podem conter aditivos ou micro-organismos (BRASIL, 2005).

Foi realizada uma pesquisa no Brasil, em 2010, pela Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP)/Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) sobre o perfil do consumo de alimentos no Brasil (FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2010) e para avaliar o grau de aderência do consumidor brasileiro às tendências internacionais. A Fiesp encomendou ao Ibope Inteligência pesquisa qualitativa e quantitativa, tendo como principal objetivo validar a aderência do Brasil às tendências globais sobre o consumo de alimentos. Com base em alguns fatores

de demanda, como crescimento e envelhecimento da população no Brasil e no Mundo; aumento do poder de compra; redução do número de filhos por família; participação das mulheres no mercado de trabalho; maior acesso à informação, entre outros, chegou-se a 5 grupos de tendências (atitudinais), validadas por estudos elaborados por centros de referência internacionais: sensorialidade e prazer; saudabilidade e bem-estar; conveniência e praticidade; qualidade e confiabilidade; sustentabilidade e ética. Dentre os produtos que mais despertaram interesse do consumidor quando são lançados, os iogurtes lideram com 32% dos entrevistados. Mais de 80% dos consumidores entrevistados acreditam que estes alimentos trazem benefício à saúde ou podem até mesmo substituir medicamentos.

Na última década, o consumo de iogurtes aumentou no Brasil, segundo dados do Sistema Brasileiro do Agronegócio (SISTEMA BRASILEIRO DO AGRONEGÓCIO, 2015). Apenas entre 2010 a 2015, o mercado de iogurtes quase dobrou: a receita saiu de R\$ 7,7 bilhões para R\$ 14,5 bilhões (COCO; PALAZZO, 2016). Com a gradativa estabilização do cenário econômico, com a taxa da inflação em queda, e também com a melhoria da safra do gado leiteiro, espera-se que a partir de 2017 o mercado de iogurtes comece a se estabilizar. Segundo a Mintel, apesar de continuar em queda pelos próximos anos, a categoria vem apresentando uma reação, tendo quedas cada vez menores (MINTEL, 2017). Neste período, o consumidor brasileiro, principalmente da classe C, passou a incrementar os itens da alimentação, e no topo da lista estão os produtos lácteos, e deste modo os iogurtes entraram para o carrinho de compras. O resultado é que, desde o ano 2000, o consumo de iogurte alimento quase triplicou no país. No último ano, o consumo per capita continuou estável em seis quilos de iogurte/ano.

Além disso, o iogurte é um produto que atrai a população por características que vão além do sabor, sendo por isso um sistema ideal para aplicação de sistemas de microencapsulação de bioativos nutracêuticos.

Os hábitos saudáveis estão tendo maior importância na vida dos consumidores. Apesar de uma conjuntura econômica desfavorável, a demanda por produtos mais saudáveis está crescendo. Entre janeiro e agosto de 2016, de acordo com a Nielsen (COSTA, 2016), empresa especializada em tendências e comportamentos de consumo, a procura por esses produtos subiu, em média, 67% em relação ao mesmo período do ano de 2015. E os consumidores não medem esforços para manter esse padrão alimentar. A instituição estima que 66% dos brasileiros estão dispostos a gastar mais por alimentos e

bebidas que não contenham na fórmula ingredientes considerados prejudiciais. Outros fatores que justificam o consumo de saudáveis estão ligados a problemas de saúde. Um estudo da Nielsen aponta que 30% das famílias alegam ter algum familiar que sofre de alergia alimentar ou intolerância, seja a lactose, produtos lácteos, s frutos do mar e a trigo (glúten). Há também preocupações em manter dietas equilibradas: 31% adotam dieta com baixo teor de gordura, 28% privilegiam o uso consciente do açúcar e 22% optam por alimentos com baixo teor de sódio.

A fase mais apropriada do processo para a adição de aditivos, incluindo corantes, depende do tipo de iogurte a fabricar. No iogurte batido, a fermentação ocorre em fermentadoras ou incubadoras seguida de quebra do coágulo por agitação mecânica. De uma forma mais detalhada, o leite utilizado para fabricação de iogurte, que deve apresentar boa qualidade físico-química, é submetido, numa primeira fase, a tratamento térmico para destruir microrganismos patogênicos e outros que possam competir com o fermento do iogurte, para além de promover a desnaturação das proteínas do soro e favorecer o crescimento das bactérias do iogurte. Seguidamente, procede-se ao resfriamento (42-43°C), para adição de 1-2% de fermento láctico homogeneizado (cultura). Esta fase poderá ser utilizada para adicionar o corante no caso dos iogurtes sólidos. Após a adição da cultura, o leite permanece em repouso aproximadamente 4 horas para que ocorra a fermentação. No final deste processo o coágulo deve apresentar pH entre 4,5-4,7 (ponto isoelétrico da caseína); o gel deve ser liso, brilhante, sem desprendimento de soro ou gases (DOMINGOS et al., 2014; REIS et al., 2000).

2.6 CORANTES ARTIFICIAIS vs. NATURAIS

A utilização de aditivos alimentares é uma prática comum em todo o mundo. Entretanto, o perfil atual do consumidor tende cada vez mais a consumir alimentos que tragam algum benefício à saúde, e possui o desejo de consumir produtos considerados naturais, e evitam cada vez mais o consumo de produtos cujos componentes podem trazer prejuízos a sua saúde. Ao encontro deste perfil de consumidor, é de grande interesse da indústria em substituir tais aditivos por outros que possam trazer benefícios ao consumidor sem que haja perda de propriedades organolépticas. Dentre estes ingredientes que mais possuem desvantagens em seu consumo estão os corantes artificiais, especialmente os que possuem o grupo azo (denominados de “corantes azo”).

Corantes sintéticos são o grupo mais interessante de aditivos alimentares utilizados na indústria alimentar porque a cor de um produto é importante para a sua atratividade para o consumidor (KUCHARSKA; GRABKA, 2010). No entanto, a sua gama de uso e dosagem são estritamente limitados ao redor do mundo (SUN et al., 2013).

No Brasil, o limite máximo de uso de corantes em alimentos é controlado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com base em uma Resolução Legislativa (BRASIL, 1999).

Os alimentos podem ser coloridos com corantes naturais ou sintéticos. Substâncias corantes naturais alimentícias podem ser isoladas a partir de plantas adequadas, fungos ou insetos (ZENG et al., 1993). Corantes sintéticos também são amplamente utilizados para coloração de alimentos, não só para melhorar o aspecto e cor, mas também para manter a cor natural durante o processamento ou armazenamento (GHOREISHI; BEHPOUR; GOLESTANEH, 2012; LLAMAS et al., 2009).

Corantes sintéticos são compostos orgânicos com uma estrutura química que contém ligações duplas que alternam com ligações simples, anéis aromáticos simples ou conjugados e compostos azo. Os seguintes azo corantes sintéticos são permitidos em alimentos no Brasil: tartrazina (INS102), amarelo crepúsculo (INS110), azorubina (INS122), amaranto (INS123), ponceau 4R (INS124) e vermelho allura (INS129). Os corantes alimentares autorizados que não são azo são: eritrozina (INS127), azul patenteado V (INS131), carmina (INS132), azul brilhante FCF (INS133) e verde FCF (INS143). A Figura 13 apresenta a estrutura molecular geral dos azocorantes e a tartrazina que é um dos azocorantes mais conhecidos e utilizados. Os grupos (OH), SO_3Na e NaOOC conferem as características próprias deste corante. Quando presente nos alimentos, a tartrazina proporciona a cor amarelo.

Corantes sintéticos são geralmente adicionados aos gêneros alimentícios e bebidas não-alcoólicas, não só para melhorar a aparência, cor e textura, mas também para manter a cor natural que pode ser perdida durante o processo ou armazenamento (LLAMAS et al., 2009).

Figura 13 – (a) Estrutura molecular geral de azocorantes; (b) estrutura molecular da tartrazina

Fonte: adaptado de ALVES, L. **Azocorantes**. Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/quimica/azocorantes.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

Entretanto, os azocorantes, os mais usados em alimentos, são capazes de serem reduzidos por enzimas azoredutases em bactérias intestinais e em células do fígado com a liberação de aminas aromáticas para o organismo (HUANG; KOTULA; ADAMS, 2003; RAFII; HALL; CERNIGLIA, 1997). Tal fato pode causar dores de cabeça frequentes em adultos, enquanto as crianças muitas vezes podem se tornar hiperativas ou distraídas (HAWLEY; BUCKLEY, 1976; MOUTINHO, 1987). Estes efeitos tornam o conhecimento sobre componentes alimentares uma questão importante para a detecção e informações sobre os corantes sintéticos em alimentos e bebidas. A presença e o conteúdo desses corantes deve ser controlada devido à sua nocividade potencial para os seres humanos (ZHANG et al., 2009). Os estudos, por exemplo, mostram que tartrazina pode causar o aparecimento de alergias e asma (BERZAS NEVADO; RODRIGUEZ FLORES; VILLASEÑOR LLERENA, 1997) e hiperatividade na infância (SILVA et al., 2007). Portanto, as restrições na utilização desse corante e a grande dificuldade de se encontrar substâncias com características semelhantes e que, em substituição a esta não irão conferir características diferentes àquelas que são desejadas para os alimentos de maneira geral, tornam bastante atrativas a substituição de corantes amarelos artificiais, como a tartrazina ou o amarelo crepúsculo, pela curcumina, que além da cor pode conferir propriedades funcionais aos alimentos. Entretanto, devido à sua instabilidade e hidrofobicidade, a encapsulação em matrizes lipídicas como os lipossomas podem ser uma alternativa interessante para aumentar sua estabilidade à oxidação, bem como aumentar sua absorção no intestino delgado.

Os principais desafios na aplicação de corantes prendem-se com a sua solubilidade e preservação da sua estabilidade. No caso particular do iogurte, uma matriz proteica que apresenta água e gordura na sua composição, há que adicionar o fato de ser um produto ácido que passa por variações de temperatura durante seu

processamento. Assim, para que seja escolhido o corante ideal deve-se analisar se o mesmo é estável às variações de pH e temperatura, de forma a que a cor se mantenha uniforme em todo o produto durante o processamento e no seu tempo de prateleira.

Especificamente em relação aos corantes utilizados para coloração do iogurte, eles devem ter a finalidade de identificar/recordar o sabor escolhido, relacionando-o, por exemplo, com a fruta (REIS et al., 2000). Quanto aos corantes artificiais utilizados, alguns exemplos incluem o amarelo crepúsculo (E110), a tartrazina (E102) e o vermelho 40 (E129). Já em relação aos corantes naturais, é possível encontrar exemplos de uso de antocianinas (E163), betalaína (E162), curcumina (E100), carmin de cochonilha (E120), carotenoides, dentre outros. Como exemplos de utilização de tais corantes naturais, pode-se citar: autores

- Wallace e Giusti (2008), que analisaram a aplicação de antocianina (E163) extraída de *Berberis boliviana* L. em iogurte com diferentes teores de gordura, comparando com as antocianinas aciladas de extratos de cenoura roxa, betalaína (E162) da beterraba e corante sintético vermelho 40 (E129);

- Coisson et al. (2005) incorporaram sumo de *Euterpe oleracea*, fonte de antocianina (E163), em iogurtes;

- Nontasan, Moongngarm e Deeseenthum (2012) que estudaram a extração de antocianina do farelo de arroz preto e incorporação do pigmento em iogurtes;

- Gomes et al. (2014) prepararam complexos de pigmentos extraídos de pimentão (*Capsicum annuum*), os carotenoides capsantina e capsorubina (E160c) com β -ciclodextrina para incorporação em iogurtes;

- Domingos et al. (2014) estudaram a utilização do corante luteína (E161b), um carotenoide, e sua estabilidade oxidativa em iogurtes;

- Toniazzi et al. (2014) utilizaram beta-caroteno encapsulado em lipossomas para coloração exclusiva de iogurtes de morango, tendo estudado suas características físico-químicas e aceitação sensorial.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A indústria alimentícia tem feito grandes esforços para disponibilizar alimentos que, para além da sua função vital, possam também apresentar uma vertente funcional. Outra tendência corresponde à utilização, cada vez maior, de ingredientes naturais em substituição dos sintéticos, aliado a isso a formação de hábitos mais saudáveis por parte dos consumidores, bem como o surgimento de restrições a alguns aditivos cria um cenário ideal para produtos naturais. A produção de prolipossomas encapsulando curcumina pode ser uma alternativa factível para substituição do corante amarelo em alimentos, podendo ainda, além de substituir o referido corante, trazer benefícios a saúde.

Dentro deste contexto, a presente Tese teve como objetivo principal a produção de prolipossomas pelo recobrimento de sacarose micronizada para produção de lipossomas multilamelares, encapsulando curcumina, para posterior incorporação destas vesículas em iogurte.

Para que fosse possível atingir este objetivo geral, as seguintes etapas foram realizadas:

- (a) Desenvolvimento do método de produção de prolipossomas pelo método do recobrimento de sacarose micronizada;
- (b) Caracterização físico-química dos prolipossomas produzidos;
- (c) Produção e caracterização físico-química de lipossomas multilamelares produzidos a partir da hidratação dos prolipossomas obtidos;
- (d) Produção e caracterização físico-química e microbiológica de iogurtes incorporando lipossomas encapsulando curcumina;
- (e) Avaliação sensorial dos iogurtes incorporando lipossomas encapsulando curcumina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Na etapa de preparação de prolipossomas para a produção dos prolipossomas foram utilizados: curcumina na sua forma purificada e cristalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), lecitina de soja purificada hidrogenada (Phospholipon® 90H, Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemanha), sacarose (Synth, Diadema, SP, Brasil) e álcool etílico anidro (Synth, Diadema, SP, Brasil). O fosfolípido utilizado possui 90% de fosfatidilcolina hidrogenada, sendo 98% das cadeias alifáticas compostas por ácido palmítico (C16: 0) e ácido esteárico (C18:0).

Para produção das dispersões de lipossomas foram utilizados: goma xantana (Grindsted® Xanthan 80, doada pela Du Pont, Cotia, SP, Brasil) e benzoato de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil). A água deionizada utilizada durante o processo de hidratação foi obtida pelo sistema de ultrapurificação (Direct-Q 3, Millipore, Billerica, MA, EUA).

O iogurte integral adoçado utilizado foi da marca ACANTUS, produzido na Fazenda da Aeronáutica (AFA), em Pirassununga –SP, que foi doado sem nenhum tipo de aditivo. Foi utilizado abacaxi desidratado obtido por desidratação osmótica, adquirido no Armazém Villa Brasil (Pirassununga, SP), bem como aroma natural de abacaxi (Kerry, Campinas, SP).

Para a análise sensorial foram empregadas bandejas para servir as amostras, guardanapos, copo com água, bolachas do tipo água e sal, torradas e também os brindes oferecidos aos provadores.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Produção e caracterização dos lipossomas

4.2.1.1 Produção dos prolipossomas por recobrimento de sacarose micronizada

Os prolipossomas foram produzidos conforme protocolo de recobrimento da sacarose micronizada, descrito por Silva et al. (2017). Foram adicionados 20 g de sacarose em frascos com tampa contendo 40 g de bolas de zircônio. Este sistema foi levado a um moinho de bolas (Modelo CE500, CIENLAB, Campinas, SP, Brasil), e após 10 h de constante agitação a 100 rpm, foi obtida a sacarose micronizada.

Um volume de 100 mL de solução etanólica contendo 3,2 g de fosfolípido e 60 mg de curcumina (quando presente) foram injetados em 2 g de sacarose previamente micronizada. O processo de injeção da solução etanólica foi feito em um rotaevaporador, de forma contínua, com o auxílio de bomba peristáltica (modelo Masterflex 7528-30, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA) em uma vazão de 4 mL/min. O balão rotativo foi mantido a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ para evaporação do etanol.

A Figura 14 mostra o esquema experimental montado para a produção dos prolipossomas.

4.2.2 Caracterização dos prolipossomas

4.2.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das partículas de prolipossomas foi visualizada por meio de um microscópio eletrônico de varredura (modelo TM 3000, Hitachi, Tóquio, Japão), equipado com o software TM3000. Para a realização das análises de MEV as amostras foram acondicionadas em fita de carbono dupla face e estas foram fixadas em *stubs* de alumínio. As imagens foram capturadas com aceleração da voltagem de 5 KV com corrente de 1750 mA.

Figura 14 – Esquema do sistema de produção dos prolipossomas

Da esquerda para a direita: (a) Bomba de deslocamento positivo: bombeamento da solução etanólica para a coluna de condensação e, na sequência, para o balão contendo sacarose microparticulada; (b) Bomba de vácuo; (c) Coluna de condensação; (d) Balão receptor de condensado (etanol); (e) Balão contendo sacarose recoberta com fosfolipídio e curcumina; (f) Banho termostático acoplado ao rotaevaporador, cuja função é promover a evaporação do solvente etanol; (g) Banho de gelo, utilizado para controle da temperatura de condensação do solvente etanol evaporado em (e) que retorna a coluna (c), a fim de ser extraído e retornado ao balão receptor de condensado (d).

Fonte: Própria autoria

4.2.2.2 Espectroscopia de infravermelho

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

4.2.2.3 Difractometria de raios-X (DRX)

As análises de difratometria de raios-X foram realizadas em equipamento de MiniFlex600 (Rigaku, Tóquio, Japão) com tubo de ânodo de cobre com $\lambda=1,5418$ ângstrons e monocromador de grafite para feixe difratado. A varredura foi feita no intervalo de 2θ de 5 a 40° , em passos de $0,02^\circ$, na velocidade de $2^\circ/\text{min}$.

4.2.2.4 Isotermas de sorção de umidade

As umidades de equilíbrio das amostras em pó foram determinadas pelo método gravimétrico estático (LABUZA, 1984), utilizando-se soluções salinas saturadas em água destilada, para uma determinada faixa de umidade relativa. As soluções salinas utilizadas bem como as atividades de água correspondentes, que foram determinadas experimentalmente por um equipamento AQUALAB (modelo Series 3 TE, Decagon Devices, Pullman, WA, EUA).

Uma massa conhecida das amostras foi colocada em pesa-filtros limpos e secos em estufa, e em seguida estes foram armazenados em dessecadores com as respectivas soluções salinas para cada valor de umidade relativa desejada (conforme Tabela 4), a 25°C . As amostras foram pesadas em balança analítica em intervalos regulares de tempo, até atingirem o equilíbrio. Depois desse período, a umidade de equilíbrio das amostras foi calculada pela relação entre a massa de água total na amostra pela massa seca de amostra.

$$U_{eq} = \frac{m_{\text{Água}}}{m_s} \times 100 \quad (1)$$

Em que : U_{eq} é a umidade de equilíbrio (% em base seca); $m_{\text{água}}$ é a massa de água total (massa de água inicial + massa de água adsorvida) na amostra (g); e m_s é a massa seca da amostra (g).

Tabela 4 – Soluções salinas saturadas e suas respectivas atividades de água determinadas experimentalmente.

Solução salina concentrada	Atividade de Água
Cloreto de lítio	$0,313 \pm 0,002$
Acetato de potássio	$0,431 \pm 0,001$
Carbonato de potássio	$0,604 \pm 0,001$
Cloreto de magnésio	$0,683 \pm 0,001$
Cloreto de potássio	$0,848 \pm 0,001$
Nitrato de magnésio	$0,909 \pm 0,001$

Fonte: Própria autoria

4.2.2.5 Teor de umidade

O teor de umidade das amostras de prolipossomas foi determinado em um analisador de umidade (modelo MB35, Ohaus, Nova Jersey, NJ, EUA) utilizando-se radiação infravermelho de uma fonte de halogênio. O resultado foi expresso em base seca.

4.2.2.6 Solubilidade

A solubilidade dos prolipossomas foi determinada de acordo com o método de Eastman e Moore (1984). O método consistiu na adição de 0,5 g de amostra em um recipiente contendo 50mL de água destilada e agitação a 100 rpm (mesa orbital TE420, Tecnal, Campinas, SP, Brasil), por 30 minutos, seguida por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, uma alíquota de 25 ml do sobrenadante foi retirada e levada para estufa a 105 °C até o peso constante. A solubilidade foi calculada com base no peso inicial de amostra que foi solubilizada nessa alíquota do sobrenadante. O resultado foi expresso em porcentagem de pó solubilizado.

4.2.2.7 Higroscopicidade

Os prolipossomas foram caracterizados em termos de higroscopicidade de acordo com o procedimento descrito por Cai e Corke (2000). Triplicatas contendo 0,2 g

de cada amostra de prolipossoma obtida foram dispostas em pesa-filtros e posteriormente acondicionadas por sete dias em dessecador contendo solução saturada de cloreto de sódio (UR 75,3%). A higroscopicidade foi medida através da massa de água adsorvida pela amostra e expressa em (g água adsorvida/ 100 mg matéria seca).

4.2.3 Produção e caracterização das dispersões de lipossomas

4.2.3.1 Produção dos lipossomas por hidratação dos prolipossomas

Para a produção das dispersões de lipossomas, os prolipossomas foram hidratados na proporção de 2 g de prolipossomas para 100 mL de água deionizada através de ultra-agitação mecânica (IKA T25, IKA, Staufen, Alemanha) a 13000 rpm a 65 °C por 5 minutos (SILVA et al., 2017). Na sequência, resfriou-se o sistema até 25 °C para a adição dos espessantes e benzoato de sódio (0,02%). A Tabela 5 mostra as formulações de espessantes que foram testadas nesse trabalho de Doutorado, baseadas no estudo conduzido por Toniazzi et al. (2014).

Tabela 5 – Formulações empregadas na produção dos lipossomas multilamelares encapsulando curcumina.

Formulação	Prolipossomas (g)	Goma xantana (% mássica)	Goma guar (% mássica)
1	2	0,015	0,135
2	2	0,030	0,120

Fonte: Própria autoria

4.2.3.2 Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de vesícula

A distribuição do tamanho dos lipossomas e o diâmetro hidrodinâmico médio de vesícula foram obtidas 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 para evitar o fenômeno do espalhamento múltiplo

de luz. As análises dos dados serão realizadas pelo software incluído no sistema (90Plus).

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

4.2.3.4 Avaliação da estabilidade físico-química dos lipossomas

A produção de lipossomas das formulações 1 e 2 foi efetuada em triplicata. Adicionalmente a essas formulações, foram produzidas, também em triplicata, amostras sem adição de gomas. As amostras foram armazenadas sob refrigeração e monitoradas ao longo de 30 dias de armazenagem para quantificação de curcumina encapsulada, determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanho de vesícula, bem como do potencial zeta.

4.2.4 Produção e caracterização dos iogurtes com dispersões de lipossomas

4.2.4.1 Incorporação das dispersões de lipossomas em iogurte

Após produzidos, os iogurtes foram acondicionados em garrafas de plástico (polietileno de alta densidade) fechadas com uma tampa plástica em cabine de segurança biológica (PA410, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil). e armazenadas a 5 °C em incubadora (MA-415, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil).

4.2.4.2 Determinação da composição centesimal, acidez titulável e pH

Determinou-se nos iogurtes o teor de lipídios, proteínas, pH, teor de água, cinzas, sólidos solúveis totais e acidez total titulável através dos métodos descritos no manual do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.2.4.3 Obtenção de dados colorimétricos

As análises de cor instrumental do iogurte foram realizadas em um colorímetro (Miniscan XE PLUS, Hunterlab, Reston, VA, EUA). As leituras ocorreram nos dias 0, 15, e 30 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).

4.2.4.4 Obtenção de parâmetros reológicos

As análises reológicas de pequena deformação dos iogurtes foram realizadas utilizando-se um reômetro rotacional de tensão controlada (AR 2000 Rheometer, TA Instruments, New Castle, DE, USA), com geometria do tipo cilindros concêntricos. Todas as amostras foram analisadas sob temperatura controlada de 10 °C (TONIAZZO et al., 2014) e o período de relaxamento de tensões na amostra antes do início de cada processo foi de dois minutos. Os testes estacionários para determinação das curvas de fluxo foram realizados em taxas de cisalhamento variando de 0,01 a 100 s^{-1} . Através destas foi possível determinar a viscosidade das amostras e a tensão de escoamento. Os dados obtidos foram tratados através do modelo Herschel-Bulkley através da equação:

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (2)$$

Em que: τ = tensão de cisalhamento (Pa)

τ_0 = tensão de cisalhamento inicial (Pa)

K = índice de consistência (Pa.Sⁿ)

$\dot{\gamma}$ = taxa de deformação (S⁻¹)

n = índice de comportamento adimensional

4.2.4.5 Análise da sinérese dos iogurtes

A sinérese das amostras de iogurtes foi medida de acordo com (TAMIME; BARRANTES; SWORD, 1996). As amostras de iogurte (25 mL) foram centrifugadas a

2200 rpm durante 10 min. A suscetibilidade a sinérese será calculada como a porcentagem em massa de sobrenadante após a centrifugação.

4.2.4.6 Análise sensorial dos iogurtes

A avaliação sensorial dos iogurtes produzidos foi realizada através de testes afetivos, com o objetivo de avaliar as diferenças de preferência 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 - "desgostei muitíssimo" e 9 – "gostei muitíssimo") para os atributos de sabor, textura, cor, aroma e qualidade global. Cem provadores não-treinados, de ambos os sexos e diferentes grupos etários participaram do teste. O iogurte foi servido em copos plásticos de forma monádica e devidamente codificados. Entre as amostras foi servido aos consumidores água e biscoito cream cracker, para evitar qualquer tipo de interferência entre uma amostra e outra. O termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A) foi entregue aos provadores antes de realizar a análise sensorial.

Pesquisa de intenção de compra dos provadores em relação as amostras de iogurte. Foi distribuída ficha onde o provador poderia assinalar sua intenção de compra entre as opções estavam:

- certamente não compraria o produto;
- provavelmente não compraria o produto;
- tem dúvidas se compraria ou não o produto;
- provavelmente compraria o produto;
- certamente compraria o produto.

4.2.4.7 Análises microbiológicas dos iogurtes

4.2.4.7.1 Contagem de fungos filamentosos e leveduras

Para determinação de fungos e leveduras foram realizadas diluições 10^{-2} e 10^{-3} , e 0,1 mL das diluições selecionadas foram inoculados em placas de Petri contendo o ágar PDA acidificado já solidificado. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky espalhou-se

cuidadosamente o inóculo na placa até sua completa absorção. As placas foram incubadas, sem inverter, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, por 5 dias. Transcorrido o período de incubação, considerou-se para contagem somente as placas que apresentaram de 15 a 150 colônias.

4.2.4.7.2 Contagem de bactérias lácticas

Pipetou-se 1 mL de iogurte em 9 mL de diluente água peptonada. Foram feitas diluições de 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Foi feito plaqueamento por profundidade (colocando-se 1 mL da amostra e vertendo-se o meio MRS (Man, Rogosa e Sharpe) sobre a amostra). Após o meio solidificado, as placas foram colocadas invertidas na estufa, a 37°C por 48 horas em condição de anaerobiose.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As análises estatísticas serão conduzidas a partir de Análise de Variância de fator duplo e sem repetição (ANOVA) seguida de Teste de Tukey, ambos a um nível de significância de 5%, utilizando-se o software SAS 9.3 (Statistical Analysis System, Cary, NC, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA PRODUÇÃO DOS PROLIPOSSOMAS

As condições operacionais foram estabelecidas como a injeção de 100 mL de solução etanólica (contendo 3,2 g de fosfolipídio e curcumina, tendo sido testadas massas de 60 ou 25 mg) em 2 g de sacarose previamente micronizada. O processo de injeção da solução etanólica foi feito em um rotaevaporador, de forma contínua, com o auxílio de bomba peristáltica E o balão rotativo foi mantido a 45 ± 2 °C para evaporação do etanol. Estas condições operacionais foram baseadas nos trabalhos realizados por Elhissi et al. (2006; 2012), sendo o processo ajustado de forma que após a entrada de solução etanólica de fosfolipídio por injeção, no rotaevaporador, ocorresse o gotejamento sobre a sacarose micronizada em uma vazão baixa o suficiente que tornasse possível a saída de etanol por evaporação, mantendo o sistema sempre com baixa quantidade de etanol. Desta forma, a taxa de injeção de solução etanólica teria que ser similar à taxa de evaporação de etanol após o gotejamento sobre a sacarose micronizada. A temperatura de evaporação também influenciou diretamente no sistema, tendo sido realizados testes variando de 45 a 50 °C, e a temperatura onde o processo apresentou um comportamento satisfatório (sem arraste) foi a temperatura mais baixa (45 °C). Quando o sistema injetado continha curcumina foi necessário protegê-lo da luz, utilizando-se uma barreira (recobrimento do balão rotativo com papel alumínio). A Figura 15 mostra a característica visual dos prolipossomas obtidos em uma formulação contendo curcumina.

Figura 15 - Aspecto visual dos prolipossomas produzidos incorporando curcumina

Fonte: Própria autoria

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PROLIPOSSOMAS

5.2.1 Morfologia das partículas de prolipossomas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias obtidas por MEV dos prolipossomas estão mostradas na Figura 16. Observa-se claramente que o aspecto visual dos prolipossomas é bem diferente dos componentes puros (fosfolipídio e sacarose micronizada). A sacarose micronizada mostrou um aspecto cristalino, ao passo que o fosfolipídio puro mostrou um aspecto amorfo, e o prolipossoma se assemelha, então, a uma estrutura recoberta (sendo possível perceber alterações na superfície do material comparando-se as micrografias 16(A) e 16(B)). Este tipo de morfologia foi observado na maior parte dos campos analisados durante as análises de microscopia eletrônica de varredura, o que levou a crer que a quantidade de material fosfolipídico e de sacarose utilizados foram adequados, levando a um recobrimento bem sucedido.

5.2.2 Espectroscopia na região de infravermelho

Os resultados obtidos pelas análises de espectroscopia na região do infravermelho estão mostrados na Figura 17. Os espectros de absorbância dos prolipossomas (tanto com quanto sem curcumina) são idênticos, mostrando que a presença da curcumina não modificou quimicamente a estrutura dos prolipossomas obtidos. Além disso, os espectros mostram que houve um recobrimento da sacarose pelos fosfolipídios, e não houve interação química entre estes dois componentes da formulação. O fenômeno que tipicamente evidenciaria uma formação de uma interação forte entre os fosfolipídios e a sacarose seria a diminuição, ou eventual eliminação, dos picos a aproximadamente 1235 e 1735 cm^{-1} , o que não ocorreu (YOSHIDA et al., 2010). Estes picos estão relacionados com o estiramento do grupo P=O e C=O , respectivamente, dos grupos ésteres, presentes nas cabeças polares dos fosfolipídios.

Figura 16 – Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das amostras: (A) fosfolipídio (Phospholipon 90H); (B) sacarose micronizada; (C) prolipossomas

Fonte: Própria autoria

Figura 17 – Espectros de infravermelho obtidos para as amostras de prolipossomas produzidas, bem como para a curcumina, sacarose e fosfolipídios puros

Fonte: Própria autoria

5.2.3 Difratometria de raios-X

Os resultados das análises de difratometria de raios-X estão mostrados na Figura 18. Os difratogramas de raios-X indicam que os prolipossomas são uma mistura física dos seus componentes, pois são encontrados picos (Figura 18) típicos de fosfolipídios (a

21.4°, o único no difratograma do fosfolípido puro), bem como da sacarose e da curcumina. Os valores de intensidade de difração indicam que os prolipossomas são estruturas mais amorfas que a sacarose e a curcumina puras, o que é de importância fundamental para a sua posterior hidratação e formação das dispersões aquosas de vesículas lipossomais (ALVES; SANTANA, 2004; MORAES et al., 2013). Tal característica amorfa pode ser deduzida pela subida da linha de base a partir de 2θ igual a 15° nos difratogramas do fosfolípido puro e dos prolipossomas.

Figura 18 – Difratogramas de raios-X das amostras de matérias-primas e prolipossomas

Fonte: Própria autoria

5.2.4 Solubilidade e sorção de umidade

É de fundamental importância que os prolipossomas apresentem um alto valor de solubilidade, uma vez que a ideia é que sejam hidratados para obtenção dos lipossomas em dispersão aquosa. A Tabela 6 mostra os dados obtidos em relação à solubilidade e capacidade de absorção de água pelos prolipossomas produzidos. O valor de solubilidade, pela metodologia testada, foi de praticamente 100% do pó utilizado, fato de extrema importância para a etapa posterior de produção dos lipossomas por hidratação dos prolipossomas.

Tabela 6 – Solubilidade, higroscopicidade e teor de umidade dos prolipossomas

Parâmetro	Valor (%)
Solubilidade	98,6± 1,30
Higroscopicidade	5,68± 0,46
Umidade (dia 0)	2,10± 0,03

Fonte: Própria autoria

Por sua vez, os valores de higroscopicidade mostram que os pós de prolipossomas absorvem muito pouca umidade, mesmo quando em condições de alta atividade de água, fato confirmado pelas isotermas de sorção obtidas e mostradas na Figura 19.

Tanto nos prolipossomas sem curcumina quanto nos prolipossomas contendo curcumina, a sorção de umidade pelos pós foi baixa, e praticamente idêntica nos dois casos. Tais resultados são muito interessantes, pois mostram que os prolipossomas poderão ser armazenados em diferentes condições de umidade, sem grandes prejuízos à sua integridade.

Figura 19 – Isotermas de sorção de umidade obtidas para os prolipossomas

Fonte: Própria autoria

5.3 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS ENCAPSULANDO CURCUMINA

5.3.1 Avaliação da estabilidade físico-química dos lipossomas

A Figura 20 mostra o aspecto visual das dispersões de lipossomas produzidas com gomas guar e goma xantana como espessantes, contendo 60 mg de curcumina inicialmente solubilizada na solução etanólica utilizada para produção dos prolipossomas.

Figura 20 – Aspecto visual dos lipossomas produzidos com gomas xantana e guar como espessantes

Fonte: Própria autoria

As formulações produzidas sem espessantes e as espessadas por 0,015% de goma xantana + 0,135% de goma guar (Lipossoma 1) e 0,03% de goma xantana + 0,120% de goma guar (Lipossoma 2) foram avaliadas em um período de 30 dias, conforme mostrado pela Tabela 7.

Tabela 7 – Diâmetros médios em função do tempo de estocagem para as formulações de lipossomas encapsulando curcumina

Formulação	Dia 0	Dia 03	Dia 07	Dia 14	Dia 30
Lipossoma 1	648±112	623±114	618±114	621±114	877±116
Lipossoma 2	581±71,5	561±68,9	666±73,4	644±72	739±71
Sem espessante	622±69,5	*	---	---	---

*A amostra sem espessante desestabilizou no terceiro dia de análise.

Fonte: Própria autoria

Observando-se o comportamento dos diâmetros médios dos lipossomas ao longo dos dias, percebe-se que a amostra sem adição de espessante, analisada apenas até o terceiro dia, por conta de desestabilização, apresentou um comportamento discrepante das amostras como espessantes, as quais mantiveram diâmetros médios na faixa de 600 a 900 nm. Toniazzi et al. (2014) produziu lipossomas compreendendo uma faixa de diâmetro médio hidrodinâmico entre 2000 e 3000 nm. A diferença entre as faixas obtidas pode ser originária do método de produção, uma vez que Toniazzi et al. (2014) produziram prolipossomas com o auxílio de um *spray dryer*, além do fato de as proporções entre fosfolípido e bioativo serem diferentes.

No caso da amostra sem espessante foi possível a mensuração do perfil hidrodinâmico até o terceiro dia de armazenagem, uma vez que após esse período houve desestabilização da amostra. Já as amostras acrescidas de goma puderam ser analisadas até o trigésimo dia, sendo que nos dias subsequentes desestabilizaram. Ainda assim, mesmo com o relativo curto período de estabilidade, foi possível presumir a importância da adição de espessantes, permitindo prolongamento da vida de prateleira das dispersões e evitando processos de agregação prematuros, como os evidenciados nas replicatas das dispersões de lipossomas grupo sem uso de espessante.

Por sua vez, a Figura 21 mostra a evolução do potencial zeta ao longo do tempo de armazenagem.

Figura 21 – Potencial zeta em função do tempo de estocagem para as formulações de lipossomas produzidas com espessantes

Fonte: Própria autoria

É importante enfatizar que o potencial zeta não é o fator determinante para garantir análises conclusivas diante da estabilidade do sistema. No entanto, segundo McClements (2005), partículas em suspensão, cujos valores de potencial zeta, em módulo, sejam elevados (> 30 mV), tendem a apresentar interações repulsivas que inviabilizam tendências de floculação, coalescência ou agregação. Sendo assim, em análise concomitante com o perfil de distribuição de tamanho, pode-se entender a desestabilização do sistema Lipossoma 2 no trigésimo dia de armazenamento.

Por sua vez, as análises de quantificação de curcumina encapsulada têm seus resultados mostrados na Figura 22.

Figura 22 – Perfil temporal da concentração de curcumina para os lipossomas multilamelares produzidos

Fonte: Própria autoria

A perda de curcumina ao longo do processo de produção dos prolipossomas, pode ser devido a presença de agentes oxidantes no álcool etílico, e, apesar da maximização de cuidados ao longo dos procedimentos operacionais, pode haver oxidação do bioativo, tendo em vista também a sua alta sensibilidade quando exposto à luz

A grande perda de curcumina ao longo da armazenagem, entretanto, provavelmente ocorreu também devido ao fato da concentração de curcumina inicial acrescida ao prolipossoma ser muito elevada. Naksuriya et al. (2014) demonstraram que a estabilização do sistema lipossomal é dependente da concentração de curcumina adicionada ao sistema. Sendo assim, sistemas com elevada concentração tendem a facilitar migração parcial da curcumina para a parte periférica e hidrofóbica da vesícula, gerando, possivelmente, instabilidade durante o processo de quantificação e contribuindo, também, para a rápida desestabilização do sistema lipossomal. No caso de beta-caroteno, um ativo altamente hidrofóbico que se situa profundamente inserido nas bicamadas lipídicas dos lipossomas multilamelares, Socaciu et al. (2002) e Pintea et al. (2005) relatam valores de aproximadamente 2 a 2.5% molar (de beta-caroteno no lipossoma) como máximo aceitável para incorporação deste ativo. Toniazzo et al. (2014) também relataram valores próximos a este para lipossomas multilamelares

obtidos através da hidratação de prolipossomas na encapsulação de beta-caroteno. Para curcumina, não há valores na literatura para este tipo de processo de obtenção de MLV, mas como se trata de um bioativo menos hidrofóbico que o beta-caroteno, provavelmente sua capacidade de interferir na estabilidade das vesículas seja maior, pois os grupos hidroxila presentes na molécula de curcumina produzirão interações com a parte polar dos fosfolipídios. Dessa forma, pode-se deduzir que uma menor quantidade de curcumina seja mais adequada para a produção de lipossomas multilamelares estáveis no presente trabalho de Doutorado, pois a quantidade utilizada, inicialmente, aproximou-se de 7% molar.

A quantidade de curcumina nos lipossomas foi então diminuída (para 25 mg em 100 mL de solução etanólica utilizada para produção dos prolipossomas) e foi utilizada a formulação do lipossoma 1. Os resultados obtidos para a estabilidade das vesículas podem ser, então, sintetizados na Tabela 8. Não foi possível, entretanto, medir o potencial zeta dos lipossomas, pois o equipamento se encontrava quebrado.

Tabela 8 – Valores de diâmetro hidrodinâmico médio, concentração de curcumina, porcentagem de curcumina preservada e parâmetros colorimétricos para os lipossomas encapsulando curcumina (25 mg de curcumina em solução etanólica), estabilizados com gomas xantana e guar

Parâmetro	Tempo de armazenagem		
	Dia 1	Dia 15	Dia 30
Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	686 ^a ±22	846 ^b ±26	804 ^b ±21
Concentração de curcumina (mg/L)	20,77 ^a ±0,79	14,16 ^b ±1,57	15,15 ^b ±0,96
% curcumina preservada	--	--	72.3
Ângulo de Hue	91,3 ^a ±0,01	91,4 ^a ±0,02	91,3 ^a ±0,01
Croma	35,7 ^a ±1,72	37,2 ^a ±0,04	35,3 ^a ±1,50

Fonte: Própria autoria

Como os parâmetros obtidos foram satisfatórios, os lipossomas com esta formulação foram utilizados para a etapa seguinte desta Tese, que consistiu na incorporação das vesículas fosfolipídicas em iogurte de abacaxi.

5.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS IOGURTES

5.4.1 Determinação da composição centesimal

A Tabela 9 mostra os valores de concentração mássica de gordura e proteínas, bem como de umidade e densidade dos iogurtes produzidos nesta Tese.

Tabela 9 – Composição mássica em gordura e proteínas, e valores de umidade e densidade dos iogurtes

Iogurte	Parâmetro			
	Densidade (g/mL)	Gordura (% mássica)	Proteína (% mássica)	Umidade (% mássica)
Iogurte sem curcumina ("branco")	1,03 ± 0,005	3,06 ± 0,2	4,02 ± 0,04	80,2% ± 0,01
Iogurte com curcumina encapsulada	1,03 ± 0,005	3,11 ± 0,2	4,35 ± 0,04	80,3% ± 0,01

Fonte: Própria autoria

Os resultados mostrados na Tabela 9 foram obtidos no dia de produção dos iogurtes. A partir da análise dos valores, é evidente que a adição dos lipossomas não alterou significativamente nenhum dos parâmetros físico-químicos mensurados, o que é um resultado interessante.

5.4.2 Determinação de acidez em ácido láctico e pH

Em relação à estabilidade ao longo do período de estocagem dos iogurtes, foram monitorados os seguintes parâmetros: pH, acidez titulável, cor instrumental e características reológicas. As Figura 23 e 24 mostram o comportamento do pH e da acidez titulável, respectivamente, dos iogurtes ao longo deste período, que foi de 30 dias. É possível concluir que a adição de lipossomas não interferiu significativamente no pH ao longo do período de estocagem, quando comparado com a amostra à qual não foram adicionados os lipossomas.

Os valores de pH e acidez, expressa em ácido láctico, foram bastante semelhantes para as ambos os iogurtes, indicando mais uma vez que a adição dos

lipossomas contendo curcumina não afetou significativamente propriedades físico-químicas importantes para garantir a qualidade do produto.

A sinérese é um importante defeito no iogurte (TAMIME; BARRANTES; SWORD, 1996), pois é indesejável, levando à deterioração da sua aparência e contração da massa, e pode afetar adversamente a aceitação pelo consumidor do produto (PURWANDARI; SHAH; VASILJEVIC, 2007).

Figura 23 – Valores de pH dos iogurtes produzidos ao longo do período de armazenagem

Fonte: Própria autoria

Valores de pH menores do que 4 podem promover a sinérese do iogurte em função da excessiva repulsão de cargas, alterando suas características reológicas. Tal fato não foi observado nos iogurtes avaliados, pois a porcentagem de sinérese nos iogurtes adicionados com lipossomas (Tabela 10) foi muito baixa, podendo-se concluir que, neste caso, o pH e a acidez não promoveram diferenças no comportamento reológico. O iogurte sem adição de lipossomas não sofreu praticamente sinérese ao longo do tempo de armazenagem.

Figura 24 – Valores de acidez titulável dos iogurtes ao longo do tempo de armazenagem

Fonte: Própria autoria

Tabela 10 – Porcentagem de Sinérese do iogurte adicionado com lipossomas, ao longo do tempo de armazenagem

Sinérese (%)		
Dia 1	Dia 15	Dia 30
1,09 ± 0,1	1,09 ± 0,1	1,8 ± 0,6

Fonte: Própria autoria

5.4.3 Determinação de parâmetros colorimétricos

Os parâmetros colorimétricos obtidos para o iogurte contendo curcumina, estão mostrados nas Figuras 25 e 26.

A cor é um atributo importante em alimentos; é a primeira característica percebida pelos consumidores e, com frequência, influencia a preferência do consumidor. Em relação a cor os parâmetros são apresentados na Figura 27. Os valores de ângulo de Hue estão em torno de 90 graus, na região da percepção da cor amarela pelos consumidores. Os valores de croma, que indicam a intensidade (“vivacidade ou palidez”) da cor, também não se alteraram.

Figura 25 – Parâmetros colorimétricos L*, a* e b* obtidos para as amostras de iogurte produzidos, ao longo do tempo de armazenagem.

Fonte: Própria autoria

Figura 26 – Valores dos parâmetros Croma e ângulo de Hue obtidos para as amostras de iogurte produzidos, ao longo do tempo de armazenagem

Fonte: Própria autoria

A diferença total de cor para a amostra de iogurte encapsulando curcumina foi de $2,2 \pm 0,3$ apresentando valores positivos que correspondem a mesma cor.

Figura 27 – Diagrama CieLab com sequência de nuances de cores e orientação do ângulo de Hue

Fonte: ADRIANO, E.; LEONEL, S.; EVANGELISTA, R. M. Qualidade de fruto de aceroleira Cv. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2011.

Dessa forma, foi possível observar pelos resultados instrumentais que não houve alteração significativa na cor nos iogurtes contendo lipossomas encapsulando curcumina, indicando que é possível usar estes sistemas de microencapsulação como único ingrediente para conferir cor ao iogurte de abacaxi.

5.4.4 Determinação de parâmetros reológicos

O conhecimento de propriedades reológicas é de grande importância no processamento, manuseio, controle de qualidade e desenvolvimento de produtos alimentícios. No caso do iogurte, sua consistência e a viscosidade estão entre os principais fatores envolvidos na qualidade e aceitação do produto. Os parâmetros reológicos obtidos para os iogurtes incorporando lipossomas estão apresentados na Tabela 11.

O modelo de Herschel-Bulkley apresentou a melhor adequação às curvas de fluxo e viscosidade ($r > 0,99$) e confirmou a característica pseudoplástica para a amostra de iogurte avaliada (Figura 28).

Tabela 11 – Parâmetros reológicos obtidos para os iogurtes incorporando lipossomas.

Parâmetros do modelo de Herschel-Bulkley: τ_0 (tensão de cisalhamento inicial), k (índice de consistência), n (índice de comportamento de fluido), bem como a tixotropia

Tempo de armazenagem (d)	τ_0 (Pa)	k (Pa.s ⁿ)	n	Tixotropia (Pa/s)
0	$2,17 \pm 0,05$	$1,89 \pm 0,08$	$0,635 \pm 0,004$	9228 ± 285
30	$2,13 \pm 0,18$	$1,47 \pm 0,23$	$0,649 \pm 0,022$	9041 ± 996

Fonte: Própria autoria

Figura 28 – Curvas de fluxo do iogurte contendo lipossomas encapsulando curcumina ao longo do tempo de armazenamento

Fonte: Própria autoria

5.4.5 Análises microbiológicas

No iogurte a presença de agentes deteriorantes, como bolores e leveduras, que são os responsáveis pelas alterações de sabor, cor e estufamento das embalagens (ARAÚJO; ARAÚJO; SAMPAIO, 2011; DA SIVA et al., 2012). Segundo Tebaldi et al. (2007), altas contagens de bolores e leveduras indicam sanitização pobre no

processamento do alimento ou uma seleção malfeita na matéria prima introduzindo produtos contaminados. Eles são indicadores de uma má técnica de processamento e falha na higiene da planta processadora. A alta contagem pode indicar possível presença de micotoxinas que podem apresentar riscos à saúde.

Por sua vez, as bactérias láticas são os micro-organismos responsáveis pela produção do iogurte, os quais são adicionados no produto na forma de culturas starter. A Tabela 12 mostra as contagens de bactérias láticas nos tempos 1 e 30 dias de armazenamento das amostras de iogurte, realizado no intervalo de 2°C a 8 °C.

Tabela 12 – Contagem de bolores e leveduras e bactérias láticas nos iogurtes produzidos

		Bolores e leveduras		Bactérias láticas	
		(UFC/mL)		(UFC/mL)	
Iogurte sem curcumina	Dia 1	0	0	7×10^7	2×10^5
	Dia 30	8×10^6	7×10^6	7×10^7	2×10^4
Iogurte com curcumina encapsulada	Dia 1	0	0	7×10^7	2×10^5
	Dia 30	8×10^6	7×10^6	7×10^7	2×10^4

Fonte: Própria autoria

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2007), a contagem de bactérias láticas totais (UFC/mL) deve apresentar um mínimo de 10^7 , caracterizando assim o iogurte produzido como probiótico. O iogurte é um alimento altamente perecível que deve ser conservado em condições ideais de armazenamento, possibilitando a conservação dos nutrientes, das características físico-químicas e organolépticas, e da viabilidade e vitalidade das bactérias probióticas láticas presentes no mesmo (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN, 2006).

5.4.6 Análise sensorial

A cor e aparência representam os primeiros atributos nos quais o consumidor terá contato (TEIXEIRA, 2009), fornecendo a impressão imediata, refletindo diretamente no julgamento e na opinião sobre o alimento analisado. Na Tabela 13 estão apresentadas as médias atribuídas às características sensoriais para as amostras de

iogurtes de abacaxi, contendo curcumina encapsulada em lipossomas. As duas formulações testadas obtiveram médias acima de sete, o que é considerado muito bom. Segundo Biedrzycki (2008), o aroma é um importante atributo sensorial que correlaciona o olfato ao paladar, não se restringindo apenas ao nariz, mas sim a todo o sistema nasal, incluindo a boca. Assim, o consumidor tende a relacionar o aroma do produto diretamente à matéria-prima utilizada em sua fabricação. Neste aspecto as formulações obtiveram a nota 8,0. Com relação à textura, a formulação que teve adição de abacaxi desidratado obteve piores notas, mas com média superior a 6,0 o que é considerado aceitável. Com relação ao sabor, a maior média apresentou-se para a formulação onde não se adicionou pedaços de fruta.

Tabela 13 – Médias atribuídas às características sensoriais para as amostras de iogurtes de abacaxi, contendo curcumina encapsulada em lipossomas

Atributo	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Aceitação global
Amostra 1	7,6 ± 1,4 ^a	7,9±1,1 ^a	8,2 ± 1,0 ^a	7,7 ± 1,4 ^a	8,0 ± 0,9 ^a
Amostra 2	6,9 ± 1,6 ^b	7,3±1,5 ^b	6,6 ± 2,0 ^b	5,6 ± 2,3 ^b	6,4 ± 1,9 ^b

Média ± desvio padrão (n=121). Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (p < 0,01).

Amostra 1 – iogurte natural com adição de curcumina, aroma e sabor de abacaxi.

Amostra 2 – iogurte natural com adição de curcumina, aroma e pedaços de abacaxi desidratado.

Fonte: Própria autoria

Em relação ao atributo aroma apesar do iogurte de abacaxi sem adição de pedaços de fruta apresentar maior média, o iogurte

Foi realizado também o teste de intenção de compra por parte dos provadores, e o resultado é apresentado na Figura 29.

Figura 29 – Distribuição da intenção de compra dos provadores em relação as amostras de iogurte de abacaxi com lipossoma encapsulando curcumina.

Podemos observar na Figura 29, que a amostra sem adição de pedaços de abacaxi apresentou a melhor aceitação, sendo que 50% provadores responderam que “provavelmente Compraria”. De acordo com os resultados mostrados na Figura 29, verificou-se que a amostra de iogurte com adição de pedaços de abacaxi a soma dos provadores que estão entre aqueles que tem duvida ou não comprariam o produto é superior a 40%.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtido nesta Tese, foi possível concluir que o processo desenvolvido para a produção de prolipossomas por recobrimento de sacarose micronizada com fosfolipídio solubilizado em etanol foi eficiente. Foi possível observar que o açúcar foi completamente recoberto pelo fosfolipídio, através de microscopia eletrônica de varredura. Além disso, o pó obtido se mostrou amorfo e com solubilidade de 98% em água, fatores extremamente importantes para a etapa posterior de hidratação dos prolipossomas para formação das vesículas em dispersão. Os prolipossomas também se mostraram com baixíssima capacidade de retenção de umidade, característica importante para aumentar sua vida de prateleira durante o armazenamento.

Em relação aos lipossomas produzidos pela hidratação dos prolipossomas, foi possível inferir que há grande relevância do efeito da utilização de espessantes na estabilidade das dispersões. A quantidade de curcumina encapsulada se mostrou adequada para preservação de mais de 70% do bioativo ao longo de 30 dias. O tamanho médio dos lipossomas foi preservado ao longo desse tempo, e se mostrou na faixa de lipossomas multilamelares, conforme esperado.

Em relação à incorporação dos lipossomas nos iogurtes, se mostrou viável do ponto de vista tecnológico. Os valores de pH e acidez, expressa em ácido láctico, foram bastante semelhantes para as amostras de iogurte branco e contendo lipossomas, ao longo do tempo. Além disso, também não houve diferenças no comportamento reológico entre os dois iogurtes.

Os resultados da análise afetiva sensorial mostraram que os iogurtes foram bem aceitos pelos panelistas, já que as formulações testadas tiveram boa aceitação. A adição de pedaços de fruta mostrou-se, entretanto, uma decisão mais importante do que inicialmente imaginado, já que parte dos consumidores não gostou da presença do ingrediente no produto.

Resumidamente, os resultados obtidos nesta Tese mostram que é possível viabilizar a produção de lipossomas por um método escalonável (hidratação de prolipossomas produzidos por recobrimento de sacarose micronizada), sem utilização de solventes orgânicos de grau não-alimentício, bem como a incorporação das vesículas fosfolipídicas em iogurtes.

REFERÊNCIAS

ADRIANO, E.; LEONEL, S.; EVANGELISTA, R. M. Qualidade de fruto de aceroleira Cv. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2011.

ALVES, G. P.; SANTANA, M. H. A. Phospholipid dry powders produced by spray drying processing: structural, thermodynamic and physical properties. **Powder Technology**, Lausanne, v. 145, n. 2, p. 139–148, jul. 2004.

ALVES, L. **Azocorantes**. Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/quimica/azocorantes.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

ALVIM, I. D. et al. Use of the spray chilling method to deliver hydrophobic components: physical characterization of microparticles. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, p. 34–39, fev. 2013.

ANJANI, K.; KAILASAPATHY, K.; PHILLIPS, M. Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 1, p. 79–86, jan. 2007.

ARAÚJO, C. C.; LEON, L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 723–8, 2001.

ARAÚJO, N. G.; ARAÚJO, P. M. A. G.; SAMPAIO, S. B. Análise Microbiológica de Iogurte Comercializado na Cidade de Campina Grande-PB. **Ciência do Leite**, 2011.

ASSIS, L. M. DE et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 99–109, 2012.

ASSUNÇÃO, L. S. Estudo prospectivo sobre encapsulamento de compostos bioativos. **Revista Geintec - Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 4, p. 1382–1391, 2014.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 13, n. 1, p. IN26-IN27, 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, 1996. p. 23–41.

BASNET, P.; SKALKO-BASNET, N. Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4567–4598, 2011.

BENECH, R.-O. et al. Impact of Nisin Producing Culture and Liposome-encapsulated Nisin on Ripening of Lactobacillus added-Cheddar Cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 6, p. 1895–1909, jun. 2003.

BERNAL, J. et al. Advanced analysis of nutraceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 55, n. 4, p. 758–774, 2011.

BERZAS NEVADO, J. J.; RODRIGUEZ FLORES, J.; VILLASEÑOR LLERENA, M. J. Adsorptive stripping voltammetry of Tartrazine at the hanging mercury drop electrode in soft drinks. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 357, p. 989–994, 1997.

BIEDRZYCKI, A. Aplicação da avaliação sensorial no controle de qualidade em uma indústria de produtos cárneos. p. 10–64, 2008.

BOCHICCHIO, S. et al. Vitamin delivery: Carriers based on nanoliposomes produced via ultrasonic irradiation. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 69, p. 9–16, jun. 2016.

BRASIL. Instrução Normativa/MAPA nº 16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. **Diário Oficial de União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 ago. 2005.

BRASIL. Instrução Normativa/MAPA nº 46, de 23 de outubro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial de União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 out. 2007, Seção I.

BRASIL. Resolução ANVISA nº 388, de 5 de agosto de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para categoria de alimentos 19. **Diário Oficial de União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 ago. 1999.

BRIENS, L.; BOJARRA, M. Monitoring Fluidized Bed Drying of Pharmaceutical Granules. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 4, p. 1612–1618, 2010.

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 104, n. 4, p. 467–483, jun. 2011.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and Properties of Spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments Production and Properties of Spray-dried. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 65, n. 6, p. 1248–1252, 2000.

CARVALHO, C. A. DE et al. Consumo alimentar e adequação nutricional em crianças brasileiras: revisão sistemática. **Revista Paulista de Pediatria**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 211–221, 2015.

CEVC, G. **Phospholipids handbook**. 1. ed. CRC Press, 1993.

CHAUDHRY, Q. et al. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, Abingdon, v. 25, n. 3, p. 241–258, 2008.

- CHAVES, M. A. Coencapsulação de curcumina e vitamina D3 me lipossomas multilamelares. 2017. 112 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.
- CHAVES, M. A. et al. Structural characterization of multilamellar liposomes coencapsulating curcumin and vitamin D3. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 549, p. 112–121, 2018.
- COCO, D.; PALAZZO, A. **O mercado de iogurtes no Brasil: crescendo além da crise**. Disponível em: <<http://www.canaonline.com.br/conteudo/o-mercado-de-iogurtes-no-brasil-crescendo-alem-da-crise.html#.WwWnJu4vzIV>>. Acesso em: 15 abr. 2018.
- COHLY, H. H. . et al. Effect of Turmeric, Turmerin and Curcumin on H₂O₂-Induced Renal Epithelial (LLC-PK1) Cell Injury. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 24, n. 1, p. 49–54, jan. 1998.
- COÏSSON, J. D. et al. *Euterpe oleracea* juice as a functional pigment for yogurt. **Food Research International**, Barking, v. 38, n. 8–9, p. 893–897, 2005.
- COOK, M. T. et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 162, n. 1, p. 56–67, ago. 2012.
- CORTÉS-ROJAS, D. F. Encapsulação de compostos bioativos de *Syzygium aromaticum* em carreadores lipídicos sólidos. p. 138, 2015.
- COSTA, R. **Estudo: brasileiros estão dispostos a gastar mais com alimentos saudáveis**. Disponível em: <https://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/economia/2016/11/14/internas_economia,557133/estudo-brasileiros-estao-dispostos-a-gastar-mais-com-alimentos-saudav.shtml>. Acesso em: 15 abr. 2018.
- DA SILVA FILHO, C. R. M. et al. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., *Zingiberaceae*) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 919–923, 2009.
- DA SIVA, L. et al. Aspectos microbiológicos, pH e acidez de iogurtes de produção caseira comparados aos industrializados da região de Santa Maria-RS. **Disc. Scientia**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 111–120, 2012.
- DE LA TORRE, L. G.; PINHO, S. C. Lipid Matrices for Nanoencapsulation in Food: Liposomes and Lipid Nanoparticles. In: HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. (Eds.). **Food Nanoscience and Nanotechnology. Food Engineering Series**. Springer, 2015. p. 99–143.
- DE PAZ, E.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J. Formulation of β -carotene with soybean lecithin by PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions)-drying. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 72, p. 125–133, 2012.

DE PAZ, E.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J. Production of water-soluble b-carotene formulations by high pressure processes. **III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids**, n. 2008, p. 1–6, 2013.

DESAI, K. G. H.; JIN PARK, H. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying Technology**, New York, v. 23, n. 7, p. 1361–1394, jul. 2005.

DEZ Benefícios da Cúrcuma e da Curcumina Para a Saúde. Disponível em: <<https://engenhariafitness.com.br/10-beneficios-da-curcuma-e-da-curcumina-para-saude/>>. Acesso em: 10 maio. 2018.

DING, B. et al. **Preparation, characterization and the stability of ferrous glycinate nanoliposomes.** v. 102, n. 2, p. 202–208, 2011.

DOMINGOS, L. D. et al. Oxidative stability of yogurt with added lutein dye. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 2, p. 616–623, fev. 2014.

EASTMAN, J. E.; MOORE, C. O. **Cold Water Soluble Granular Starch for Gelled Food Composition.** United States. U.S. Patent, , 1984.

ELHISSI, A. et al. Vibrating-mesh nebulization of liposomes generated using an ethanol-based proliposome technology. **Journal of Liposome Research**, New York, v. 21, n. 2, p. 173–180, jun. 2011.

ELHISSI, A. M. A. et al. A calorimetric study of dimyristoylphosphatidylcholine phase transitions and steroid-liposome interactions for liposomes prepared by thin film and proliposome methods. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 320, n. 1–2, p. 124–130, 2006.

ELHISSI, A. M. A. et al. A Study of Size, Microscopic Morphology, and Dispersion Mechanism of Structures Generated on Hydration of Proliposomes. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 33, n. 8, p. 1121–1126, 2012.

ESTEVEZ, R.; BARBOSA, M. **O iogurte: para saber mais.** n. 28 ed. Associação Portuguesa dos Nutricionistas, 2013.

FAN, M. et al. Effect of different preparation methods on physicochemical properties of salidroside liposomes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 8, p. 3089–3095, 2007.

FARHANG, B.; KAKUDA, Y.; CORREDIG, M. Encapsulation of ascorbic acid in liposomes prepared with milk fat globule membrane-derived phospholipids. **Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 92, n. 4, p. 353–366, 2012.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C. DE; ROCHA, G. A. Revisão : Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, p. 103–112, 2008.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. Instituto de Tecnologia de Alimentos. **Brasil FoodTrends 2020**. São Paulo: FIESP/ITAL, 2010. Disponível em: <http://brasilfoodtrends.com.br/Brasil_Food_Trends/index.html>. Acesso em: 10 abr. 2018.

FEI, X. et al. Preparation, characterization, and biodistribution of breviscapine proliposomes in heart. **Journal of Drug Targeting**, v. 17, n. 5, p. 408–414, jun. 2009.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 167–194, 2006.

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

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

GHOREISHI, S. M.; BEHPOUR, M.; GOLESTANEH, M. Simultaneous determination of Sunset yellow and Tartrazine in soft drinks using gold nanoparticles carbon paste electrode. **Food Chemistry**, London, v. 132, n. 1, p. 637–641, 2012.

GIBIS, M.; ZEEB, B.; WEISS, J. Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 38, p. 28–39, jul. 2014.

GOMES, L. M. M. et al. Inclusion complexes of red bell pepper pigments with β -cyclodextrin: Preparation, characterisation and application as natural colorant in yogurt. **Food Chemistry**, London, v. 148, p. 428–436, 2014.

GÓMEZ-ESTACA, J.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 29, p. 302–307, 2015.

GORTZI, O. et al. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of *Origanum dictamnus* extracts before and after encapsulation in liposomes. **Molecules**, v. 12, n. 5, p. 932–945, 2007.

GORTZI, O. et al. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 226, n. 3, p. 583–590, 2008.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 15, n. 7–8, p. 330–347, jul. 2004.

- GUAN, B. et al. A Performance Study of Solid Oxide Fuel Cells With BaZr_{0.1}Ce_{0.7}Y_{0.2}O_{3-δ} Electrolyte Developed by Spray-Modified Pressing Method. **Fuel Cells**, v. 12, n. 1, p. 141–145, 2012.
- HAIDAR, Z. S.; HAMDY, R. C.; TABRIZIAN, M. Protein release kinetics for core-shell hybrid nanoparticles based on the layer-by-layer assembly of alginate and chitosan on liposomes. **Biomaterials**, Surrey, v. 29, n. 9, p. 1207–1215, 2008.
- HAWLEY, C.; BUCKLEY, R. E. Hyperkinesis and sensitivity to the aniline food dyes. **Journal of Orthomolecular Psychiatry**, v. 5, n. 2, p. 129–137, 1976.
- HONG, S.-J. et al. Angiogenic effect of saponin extract from *Panax notoginseng* on HUVECs in vitro and zebrafish in vivo. **Phytotherapy Research**, London, v. 23, n. 5, p. 677–686, maio 2009.
- HSIEH, Y.-F. et al. Properties of Liposomes Prepared with Various Lipids. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 67, n. 8, p. 2808–2813, out. 2002.
- HUANG, Y.; KOTULA, L.; ADAMS, M. C. The in vivo assessment of safety and gastrointestinal survival of an orally administered novel probiotic, *Propionibacterium jensenii* 702, in a male Wistar rat model. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 41, n. 12, p. 1781–1787, 2003.
- HUDIYANTI, D.; FAWRIN, H.; SIAHAAN, P. Simultant encapsulation of vitamin C and beta-carotene in sesame (*Sesamum indicum* L.) liposomes. **IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering**, v. 349, 2018. In The 12th Joint Conference on Chemistry.
- IM, K. et al. Improved blood–brain-barrier permeability and tissue distribution following the oral administration of a food-grade formulation of curcumin with fenugreek fibre. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 215–225, abr. 2015.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: ANVISA, 2008.
- ISAILOVIĆ, B. D. et al. Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 19, p. 181–189, jul. 2013.
- JIN, H.-H.; LU, Q.; JIANG, J.-G. Curcumin liposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids and soybean lecithin. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 3, p. 1780–1790, mar. 2016.
- JUSTO, O. R.; MORAES, Â. M. Economical feasibility evaluation of an ethanol injection Liposome production plant. **Chemical Engineering and Technology**, Weinheim, v. 33, n. 1, p. 15–20, 2010.
- KAREWICZ, A. et al. Interaction of curcumin with lipid monolayers and liposomal bilayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 231–239, 2011.

KHAN, I. et al. Proliposome powders prepared using a slurry method for the generation of beclometasone dipropionate liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 496, n. 2, p. 342–350, 2015.

KHAN, I. et al. Proliposome Powders for the Generation of Liposomes: the Influence of Carbohydrate Carrier and Separation Conditions on Crystallinity and Entrapment of a Model Antiasthma Steroid. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 1, p. 262–274, jan. 2018.

KIKUCHI, H.; YAMAUCHI, H.; HIROTA, S. A Spray-Drying Method for Mass Production of Liposomes. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 39, n. 6, p. 1522–1527, 1991.

KLANG, V. et al. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, New York, v. 43, n. 2–3, p. 85–103, 2012.

KOSARAJU, S. L.; TRAN, C.; LAWRENCE, A. Liposomal Delivery Systems for Encapsulation of Ferrous Sulfate: Preparation and Characterization. **Journal of Liposome Research**, New York, v. 16, n. 4, p. 347–358, jan. 2006.

KUCHARSKA, M.; GRABKA, J. A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. **Talanta**, London, v. 80, n. 3, p. 1045–1051, 2010.

LABUZA, T. P. **Moisture Sorption: practical aspects of isotherm measurement and use**. St Paul: American Association of cereal chemists, 1984.

LAOUINI, A. et al. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 1, p. 147–168, dez. 2012.

LASCH, J.; WEISSIG, V.; BRANDL, M. Preparation of liposomes. In: TORCHILIN, V. P.; WEISSIG, V. (Eds.). **Liposomes: a Practical Approach**. New York: Oxford University Press, 2003. p. 24–25.

LASIC, D. D. **Liposomes: from physics to applications**. Universidade de Michigan: Elsevier, 1993. 575 p.

LAW, B. A.; KING, J. S. Use of liposomes for proteinase addition to Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 52, n. 01, p. 183, fev. 1985.

LIAO, X.; ZHANG, H.; HE, T. Preparation of porous biodegradable polymer and its nanocomposites by supercritical CO₂ foaming for tissue engineering. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, 2012.

LIN, Y.-L. et al. A Lipo-PEG-PEI complex for encapsulating curcumin that enhances its antitumor effects on curcumin-sensitive and curcumin-resistance cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 318–327, abr. 2012.

LIU, M. et al. Vitamin C increases viral mimicry induced by 5-aza-2'-deoxycytidine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 37, p. 10238–44, set. 2016.

LIU, W. et al. Supercritical CO₂ cleaning of carbonaceous deposits on diesel engine valve. **Procedia CIRP**, v. 29, p. 828–832, 2015.

LLAMAS, N. E. et al. Second order advantage in the determination of amaranth, sunset yellow FCF and tartrazine by UV-vis and multivariate curve resolution-alternating least squares. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 655, n. 1–2, p. 38–42, 2009.

LU, Q.; LI, D. C.; JIANG, J. G. Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 24, p. 13004–13011, 2011.

MADENE, A. et al. Flavour encapsulation and controlled release - a review. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 1–21, jan. 2006.

MAHERANI, B. et al. Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant l-carnosine. **Food Chemistry**, London, v. 134, n. 2, p. 632–640, set. 2012.

MAHESHWARI, R. K. et al. Multiple biological activities of curcumin: A short review. **Life Sciences**, v. 78, n. 18, p. 2081–2087, 2006.

MAJOLO, C. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 505–512, 2014.

MALHEIROS, P. DA S. et al. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 1, p. 175–178, 2010.

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

MATOS, F. J. DE A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária da UFC, 2000.

MCCLEMENTS, D. J. Theoretical Analysis of Factors Affecting the Formation and Stability of Multilayered Colloidal Dispersions. **Langmuir**, Washington, v. 21, n. 21, p. 9777–9785, out. 2005.

MEURE, L. A.; FOSTER, N. R.; DEHGHANI, F. Conventional and Dense Gas Techniques for the Production of Liposomes: A Review. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 3, p. 798–809, 2008.

MICHELON, M. et al. Structural characterization of β -carotene-incorporated nanovesicles produced with non-purified phospholipids. **Food Research International**, Barking, v. 79, n. November 2017, p. 95–105, 2016.

MINTEL. Disponível em: <<http://brasil.mintel.com/>>. Acesso em: 10 dez. 2017.

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

MORAIS, H. A. et al. Casein Hydrolysates using Papain: Peptide Profile and Encapsulation in Liposomes . **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 34, n. 1, p. 59–69, 2005.

MOREIRA, A. R. S. **Development of proliposomes as a vehicle to deliver new molecules with antitumor activity**. 2015. 134 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2015.

MOUTINHO, L. Consumer Behaviour in Tourism. **European Journal of Marketing**, Bradford, v. 21, n. 10, p. 5–44, out. 1987.

NAKSURIYA, O. et al. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. **Biomaterials**, Surrey, v. 35, n. 10, p. 3365–3383, mar. 2014.

NEW, R. R. C. **Liposomes: A Practical Approach**. 2.ed. Oxford: IRL Press, 1990.

NONGONIERMA, A. B. et al. Evaluation of two food grade proliposomes to encapsulate an extract of a commercial enzyme preparation by microfluidization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 8, p. 3291–3297, 2009.

NONTASAN, S.; MOONGNGARM, A.; DEESEENTHUM, S. Application of Functional Colorant Prepared from Black Rice Bran in Yogurt. **AP APCBEE Procedia**, v. 2, p. 62-67, 2012.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. **Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación**. Rome: FAO/WHO, 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>>. Acesso em 20 fev. 2018.

PARADA, J.; AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 72, n. 2, 2007.

PAYNE, N. I. et al. Proliposomes: A Novel Solution to an Old Problem. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 75, n. 4, p. 325–329, abr. 1986.

PENG, C. et al. Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation. **Food Chemistry**, London, v. 165, p. 560–568, 2014.

PICON, A. et al. The Effect of Liposome-Encapsulated *Bacillus subtilis* Neutral Proteinase on Manchego Cheese Ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 6, p. 1238–1247, jun. 1995.

PICON, A. et al. The Effect of Liposome-Encapsulated Cyprosins on Manchego Cheese Ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 10, p. 1699–1705, 1996.

PICÓN, A.; GAYA, P.; NUÑEZ, M. Quantitative determination of chymosin activity by thrombelastography. **Food Chemistry**, London, v. 47, n. 2, p. 209–212, 1993.

PINHEIRO, A. C.; COIMBRA, M. A.; VICENTE, A. A. In vitro behaviour of curcumin nanoemulsions stabilized by biopolymer emulsifiers - Effect of interfacial composition. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 52, p. 460–467, 2016.

PINTEA, A. et al. Incorporation of carotenoid esters into liposomes. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 118, n. 1, p. 7–14, out. 2005.

PORTER, C. J. H.; TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W. N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 6, n. 3, p. 231–48, 2007.

PRASAD, S.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. **Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association**, v. 46, n. 1, p. 2–18, jan. 2014.

PULLA REDDY, A. C.; LOKESH, B. R. Effect of curcumin and eugenol on iron-induced hepatic toxicity in rats. **Toxicology**, Limerick, v. 107, n. 1, p. 39–45, 1996.

PURWANDARI, U.; SHAH, N. P.; VASILJEVIC, T. Effects of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yoghurt. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 11, p. 1344–1352, nov. 2007.

RAFII, F.; HALL, J. D.; CERNIGLIA, C. E. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by clostridium species from the human intestinal tract. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 35, n. 9, p. 897–901, 1997.

RASHIDINEJAD, A. et al. Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. **Food Chemistry**, London, v. 156, p. 176–183, 2014.

REIS, J. S. et al. **Fabricação de derivados do leite como uma alternativa de renda ao produtor rural**. UFLA, 2000. 37 p.

RIBEIRO, A. R.; BIAGIONI, R. C.; SMITH, W. S. Estudo da dieta natural da ictiofauna de um reservatório centenário, São Paulo, Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 104, n. 4, p. 404–412, 2014.

RODRÍGUEZ-NOGALES, J. M.; LÓPEZ, A. D. A novel approach to develop β -galactosidase entrapped in liposomes in order to prevent an immediate hydrolysis of lactose in milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 4, p. 354–360, abr. 2006.

RODRIGUEZ NOGALES, J.; DELGADILLO, A. Stability and catalytic kinetics of microencapsulated β -galactosidase in liposomes prepared by the dehydration–rehydration method. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 15–21, 2005.

RYDBERG, E. **Re: How does the structure of the head of a phospholipid give it polarity?** Disponível em: <<http://www.madsci.org/posts/archives/2006-12/1164999854.Bc.r.html>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

SAHARI, M. A. et al. Physicochemical properties and antioxidant activity of α -tocopherol loaded nanoliposome's containing DHA and EPA. **Food Chemistry**, London, v. 215, p. 157–164, jan. 2017.

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 24, p. 1112–1120, 2003.

SARON, M. L. G.; SGARBIERI, V. C.; LERAYER, A. L. S. Prebióticos: efeitos benéficos à saúde humana. **Nutrire**, São Paulo, v. 30, p. 117–130, 2005.

SCOLARI, G. et al. Proteolysis in cheese made with liposome-entrapped proteolytic enzymes. **Le Lait**, v. 73, p. 281–292, 1993.

SEBAALY, C. et al. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. **Food Chemistry**, London, v. 178, p. 52–62, 2015.

SEBAALY, C. et al. Large-scale preparation of clove essential oil and eugenol-loaded liposomes using a membrane contactor and a pilot plant. **Journal of Liposome Research**, New York, v. 26, n. 2, p. 126–138, abr. 2016.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 33, n. 6, p. 501–547, jan. 1993.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: The story so far. **European Journal of Cancer**, New York, v. 41, n. 13, p. 1955–1968, 2005.

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

SILVA, M. L. S. et al. Voltammetric determination of food colorants using a polyallylamine modified tubular electrode in a multicommutated flow system. **Talanta**, London, v. 72, n. 1, p. 282–288, abr. 2007.

SISTEMA BRASILEIRO DO AGRONEGÓCIO. **Consumo de iogurte aumenta no Brasil e laticínios investem na produção**. 2015. Disponível em: <<http://www.sba1.com/>>. Acesso em: 04 fev. 2018.

SOCACIU, C. et al. Different ways to insert carotenoids into liposomes affect structure and dynamics of the bilayer differently. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 1–15, set. 2002.

SOUTHWEST RESEARCH INSTITUTE. **A Capability Statement for Microencapsulation**. San Antonio, 1991. 31 p.

SREEJAYAN, N. et al. Inhibition of radiation-induced lipid peroxidation by curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 127–130, 1997.

SUN, H. et al. Development of Multiresidue Analysis for 21 Synthetic Colorants in Meat by Microwave-Assisted Extraction–Solid-Phase Extraction–Reversed-Phase Ultrahigh Performance Liquid Chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 5, p. 1291–1299, out. 2013.

TAKAHASHI, M. et al. Characterization and Bioavailability of Liposomes Containing a Ukon Extract. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 72, n. 5, p. 1199–1205, 2008.

TAMIME, A. Y.; BARRANTES, E.; SWORD, A. M. The effect of starch based fat substitutes on the microstructure of set-style yogurt made from reconstituted skimmed milk powder. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 49, n. 1, p. 1–10, 1996.

TAN, C. et al. Liposomes as Vehicles for Lutein: Preparation, Stability, Liposomal Membrane Dynamics, and Structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 34, p. 8175–8184, ago. 2013.

TAN, T. B. et al. Forming a lutein nanodispersion via solvent displacement method: The effects of processing parameters and emulsifiers with different stabilizing mechanisms. **Food Chemistry**, London, v. 194, p. 416–423, mar. 2016.

TAYLOR, T. M. et al. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 45, n. 7–8, p. 587–605, 2005.

TAYLOR, T. M. et al. Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by ζ -potential, vesicle size, and encapsulation efficiency. **Food Biophysics**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2007.

TEBALDI, V. M. R. et al. Avaliação microbiológica de bebidas lácteas fermentadas adquiridas no comércio varejista do sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1085–1088, 2007.

TEIXEIRA, L. V. Análise Sensorial Na Indústria De Alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 64, n. 366, p. 12–21, 2009.

TODA, S. et al. Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 33, n. 4, p. 1725–1728, 1985.

TONIAZZO, T. et al. β -carotene-loaded liposome dispersions stabilized with xanthan and guar gums: Physico-chemical stability and feasibility of application in yogurt. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 59, n. 2P2, p. 1265–1273, 2014.

TONIAZZO, T. et al. Encapsulation of quercetin in liposomes by ethanol injection and physicochemical characterization of dispersions and lyophilized vesicles. **Food Bioscience**, v. 19, p. 17–25, set. 2017.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 4, n. 2, p. 145–160, 2005.

UNNIKRISHNAN, M. K.; RAO, M. N. A. Curcumin inhibits nitrogen dioxide induced oxidation of hemoglobin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 146, n. 1, p. 35–37, 1995.

WALLACE, T. C.; GIUSTI, M. M. Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nonacylated anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as compared to other natural/synthetic colorants. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 73, n. 4, 2008.

WECHTERSBAACH, L.; ULRIH, N.; CIGIC, B. Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 45, n. 1, p. 43–49, 2012.

WERE, L. M. et al. Size, Stability, and Entrapment Efficiency of Phospholipid Nanocapsules Containing Polypeptide Antimicrobials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 27, p. 8073–8079, 2003.

XIA, F. et al. Preparation of lutein proliposomes by supercritical anti-solvent technique. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 456–463, mar. 2012.

XIA, S.; XU, S. Ferrous sulfate liposomes: Preparation, stability and application in fluid milk. **Food Research International**, Barking, v. 38, n. 3, p. 289–296, 2005.

YAO, Y. et al. Curcumin Exerts its Anti-hypertensive Effect by Down-regulating the AT(1) Receptor in Vascular Smooth Muscle Cells. **Scientific Reports**, v. 6, p. 25579, maio 2016.

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**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 325–335, 2012.

YOSHIDA, P. A. et al. Liposomes incorporating essential oil of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): Characterization of aqueous dispersions and lyophilized formulations. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 27, n. 5, p. 416–425, 2010.

ZENG, W. et al. Qualitative and quantitative analyses of synthetic pigments in foods by using the branch and bound algorithm. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 284, n. 2, p. 445–451, 1993.

ZHANG, J. H.; ZHU, J. B. A novel method to prepare liposomes containing amikacin. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 16, n. 4, p. 511–516, 1 jan. 1999.

ZHANG, W. et al. Surface-enhanced oxidation and detection of Sunset Yellow and Tartrazine using multi-walled carbon nanotubes film-modified electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 28–31, nov. 2009.

ZHAO, H. et al. Evaluation of dietary vitamin E supplementation on growth performance and antioxidant status in hybrid snakehead (*Channa argus* × *Channa maculata*). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 625–632, 2018.

ZHAO, L. et al. Preparation of liposomes using supercritical carbon dioxide technology: Effects of phospholipids and sterols. **Food Research International**, Barking, v. 77, p. 63–72, 2015.

ZHENG, X. et al. Intranasal H102 Peptide-Loaded Liposomes for Brain Delivery to Treat Alzheimer's Disease. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 32, n. 12, p. 3837–3849, 2015.

ZLOTOGORSKI, A. et al. Nutraceuticals as new treatment approaches for oral cancer: II. Green tea extracts and resveratrol. **Oral Oncology**, Oxford, v. 49, n. 6, p. 502–506, 2013.

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

APÊNDICE

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Consentimento formal de participação no projeto de pesquisa intitulado “Obtenção de prolipossomas por recobrimento de sacarose micronizada, produção de lipossomas multilamelares encapsulando curcumina e incorporação das vesículas em iogurte”

Nome: _____ Idade: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ CEP: _____ Fone: _____

Justificativa: A produção de prolipossomas encapsulando curcumina pode ser uma grande alternativa para substituir o corante amarelo em alimentos, podendo ainda, além de substituir o corante trazer benefícios a saúde.

Objetivos: Produção de prolipossomas pelo recobrimento de sacarose micronizada para produção de lipossomas multilamelares, encapsulando curcumina, para posterior incorporação destas vesículas em iogurte.

Procedimento: Os procedimentos para execução da análise sensorial nesta pesquisa serão feitos da seguinte forma: Serão recrutados, entre alunos e funcionários da FZEA, 120 provadores que realizarão avaliação sensorial do iogurte. - Os provadores receberão as amostras de iogurte e avaliarão as características das bebidas em uma ficha que será fornecida junto com a respectiva amostra.

- Os provadores avaliarão as amostras individualmente em diferentes sessões.

- A duração aproximada de cada sessão será de 5 minutos.

Outras informações:

- O provador pode se recusar a continuar com a avaliação sensorial a qualquer momento, sem penalização alguma.

- Os provadores não terão qualquer tipo de despesas em decorrência da participação dessa pesquisa.

- As bebidas serão processadas dentro das normas de boas práticas de fabricação e serão servidas na análise sensorial após a realização das análises microbiológicas, garantindo a segurança dos provadores após o consumo. No entanto, há riscos como qualquer outro produto disponível no mercado.

- Em caso de desconforto ou mal-estar após a ingestão das amostras, o participante deve procurar o pesquisador responsável para tomar as devidas providências.

- Os testes para avaliação sensorial do iogurte serão acompanhados pelo aluno proponente Guilherme de Sousa Silva.

- Qualquer outro esclarecimento poderá ser solicitado antes, durante e após a pesquisa.

Eu _____ RG _____

CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Obtenção de prolipossomas por recobrimento de sacarose micronizada, produção de lipossomas multilamelares encapsulando curcumina e incorporação das vesículas em iogurte”, proposto pelo doutorando Guilherme de Sousa Silva. Tenho pleno conhecimento da justificativa, objetivos, benefícios esperados e dos procedimentos a serem executados, bem como da possibilidade de receber esclarecimentos sempre que considerar necessário. Será mantido sigilo quanto à identificação de minha pessoa e zelo pela minha privacidade. Ao mesmo tempo de assumo o compromisso de seguir as recomendações estabelecidas pelos pesquisadores.

Eu li e entendi todas as informações contidas nesse documento.

Pirassununga, ____ de _____ de _____.

Assinatura do Provador: _____

Assinatura do Pesquisador: _____

Guilherme de Sousa Silva

gssilva@usp.br

APÊNDICE B – Ficha Avaliação Sensorial.

FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

Nome: _____

Data: 19/04/2018

Código da Amostra: _____

Prove a amostra e indique sua opinião em relação à aparência, aroma, sabor, textura e impressão global, de acordo com a escala abaixo:

9	gostei muitíssimo
8	gostei muito
7	gostei moderadamente
6	gostei ligeiramente
5	nem gostei/ nem desgostei
4	desgostei ligeiramente
3	desgostei moderadamente
2	desgostei muito
1	desgostei muitíssimo

Aparência	
Aroma	
Sabor	
Textura	
Impressão Global	

Assinale qual seria sua atitude em relação à compra do produto.

- () eu certamente compraria este produto
- () eu provavelmente compraria este produto
- () tenho dúvidas se compraria ou não este produto
- () eu provavelmente não compraria este produto
- () eu certamente não compraria este produto

Comentários: _____

ANEXO

ANEXO A – Artigo publicado contendo dados da presente Tese

772 International Journal of Food Science and Technology 2017, 52, 772–780

Original article

Characterisation of curcumin-loaded proliposomes produced by coating of micronised sucrose and hydration of phospholipid powders to obtain multilamellar liposomes

Guilherme S. Silva, Camila G. Jange, Juliana S.S. Rocha, Matheus A. Chaves & Samantha C. Pinho*

Department of Food Engineering, School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo (USP), 13635-900 Pirassununga, Brazil

(Received 11 August 2016; Accepted in revised form 17 November 2016)

Summary The objective of this study was to obtain and characterise curcumin-loaded proliposomes by the method of coating of micronised sucrose. Proliposomes incorporating curcumin were characterised in terms of coating, morphology, crystallinity, solubility and water sorption. The powders showed a good capacity to preserve curcumin, as after 60 days of storage about 80% of the initial amount of curcumin was preserved. The water adsorption on the proliposomes was very low, as was the hygroscopicity (3.4%). The evaluation of the capacity of the multilamellar liposomes produced by the hydration of phospholipid powders to preserve encapsulated curcumin was assessed. Liposome dispersions were produced with different thickeners, and the best results of average size (around 800 nm) and curcumin preservation (72% after 30 days of storage) were obtained with xanthan gum and guar gum. These results evidenced the coating of micronised sucrose is a promising technique to produce liposomes to be incorporated into food.

Keywords Curcuminoid, encapsulation, liposome production, phospholipid vesicles

Introduction

Natural products with functional properties have received much attention from both researchers and the food industry. Within this context, curcumin appears as an interesting alternative for the replacement of yellow artificial dyes and substances with high allergen potential, and also for having high, extensively studied antioxidant power (Naksuriya & Okonogi, 2015). Curcumin is a yellow, hydrophobic phenolic compound extracted from the rhizome of *Curcuma longa* L., whose antioxidant activity is comparable to that of vitamins C and E (Khalil & Ali, 2011). Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of several diseases, including brain ischaemia, neuronal injury, hypoxia and cancer. Curcumin, however, is very sensitive to oxidation when exposed to light, as well as having low solubility in water, two drawbacks that can limit its application in food formulations. Microencapsulation systems can be useful to increase the stability of the referred curcuminoid as well as to increase its dispersibility in aqueous formulations (Ezhilarasi *et al.*, 2013). Moreover, microencapsulation

systems for curcumin can be engineered to enhance its bioavailability if a lipid-based matrix is used. The use of lipid formulations is an approach to increasing bioaccessibility (Parada & Aguilera, 2007) that has already been used for some time in the pharmaceutical field and is called *lipid-based drug delivery* (Porter *et al.*, 2007). These lipid-based microencapsulation systems include emulsions, nanoemulsions, solid lipid particles and liposomes (Ghosh & Murthy, 2006; Khan *et al.*, 2006; Berginc *et al.*, 2014; Borin *et al.*, 2016).

Liposomes are dispersed lipid systems consisting mainly of phospholipids, which, in an aqueous medium, organise themselves spontaneously in bilayers and close themselves to form vesicles (Taylor *et al.*, 2005). According to Lasic (1993), liposomes can encapsulate polar and nonpolar substances and are capable of crossing different barriers and releasing substances encapsulated in a hydrophobic environment, or through other membranes. Among the advantages of the use of liposomes can be highlighted good encapsulation efficiency, extremely low toxicity and the protection of functional bioactives against degrading factors such as pH and exposure to light (Naksuriya & Okonogi, 2015). Several studies in the literature show the interest of food researchers in the encapsulation of bioactives in liposomes, most of them with hydrophobic compounds

*Correspondent: Fax: +55 19 3565 4284;
e-mail: samantha@usp.br

such as carotenoids, curcuminoids, lipophilic vitamins and essential oils (Marsanasco *et al.*, 2011; Toniazzo *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2015; Michelon *et al.*, 2016). Several processes have been developed for liposome production and among the most common are the high pressure homogenisation, microfluidisation, ethanol injection and proliposome hydration methods (Xia *et al.*, 2012; Toniazzo *et al.*, 2014; Zompero *et al.*, 2015).

The use of the proliposome hydration method allows a major problem to be overcome in the production of liposomes: controlled and reproducible scale-up production; moreover, it avoids the use of organic solvents other than ethanol (Toniazzo *et al.*, 2014). This method relies on preparing a dry mixture of phospholipids (the proliposomes) with subsequent formation of the MLV liposomes by the hydration of these phospholipid powders (Kikuchi *et al.*, 1991). These powders can be, for example, produced by spray drying, coating of carriers and supercritical methods (Xia *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2013). After the drying process, there is the step of hydration of the dried phospholipid particles, and under controlled conditions, liposomes are formed (Kikuchi *et al.*, 1991; Moraes *et al.*, 2013; Toniazzo *et al.*, 2014).

A major advantage of the method of proliposome hydration is that the phospholipid powders are usually amorphous structures, which are very easy to hydrate. Another important factor in this method is that the dry phospholipids are shown to have a high ability to protect the structural integrity, stability and functionality of the active material to be encapsulated (Moraes *et al.*, 2013). However, powder production is a critical step in the proliposome hydration method, particularly in food processes, which require massive amounts. Several studies about spray drying are found in the literature, and its scale-up is extensively studied, but the atomisation of lipid-rich mixtures is known to be difficult and, particularly in laboratory-scale production, it can result in low yields of phospholipid powders. Other alternatives to obtain the proliposomes, therefore, have been investigated such as supercritical methods (Xia *et al.*, 2012) and coating of micronised carriers (Elhissi *et al.*, 2006). Some advantages attributed to the process of coating of micronised carriers over others include the use of low temperatures and higher yields of phospholipid powders.

In this study, the proliposomes incorporating curcumin were produced by the method of coating of micronised sucrose, the phospholipid powders were hydrated under controlled temperature and stirring conditions, and curcumin-loaded multilamellar liposomes were obtained. However, due to the instability of the dispersions produced, it was necessary to thicken the continuous phase with a mixture of polysaccharides (xanthan gum, guar gum, locust bean

gum or inulin). The primary objective of this study was to investigate the feasibility of producing curcumin-loaded proliposomes by coating micronised sucrose and to characterise them in terms of their ability to protect the incorporated curcumin, as well as its morphology, the (possible) interactions among the components of the formulation (sucrose, curcumin and phospholipids), crystallinity, solubility and behaviour under different relative moisture conditions. As for the multilamellar liposomes obtained, the main goal was to evaluate their stability and also their ability to protect the encapsulated curcumin over time in storage against chemical degradation.

Materials and methods

Materials

Curcumin was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and purified hydrogenated soya phosphatidylcholine (Phospholipon 90H, minimum of 94% total phospholipids) from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Phospholipon 90H consists of a minimum of 98% palmitic and stearic acids and a maximum of 2% unsaturated aliphatic chains (information obtained from the supplier). Guar gum (Êxodo Científica, Hortolândia, SP, Brazil), xanthan gum (Du Pont, Cotia, SP, Brazil), locust bean gum (Cargill, Campinas, SP, Brazil) and inulin (Frutafit, IQ, Sensus, Roosendaal, the Netherlands) were used as thickeners in the liposome dispersions while sodium benzoate (Synth, Diadema, SP, Brazil) was added as a preservative. Ultra-pure water (from a Direct Q3 system; Millipore, Billerica, MA, USA) was used throughout the experiments, and all other chemicals employed were of reagent grade.

Production of proliposomes

Proliposomes were produced by coating of micronised sucrose, using a protocol adapted from Elhissi *et al.* (2006). Firstly, 20 g of sucrose was added to flasks containing 40 g of zirconia balls. The system was micronised in a ball mill (CE500; CIENLAB, Campinas, SP, Brazil), after 10 h of constant stirring at 100 rpm.

A volume of 100 mL of anhydrous ethanol containing 3.2 g of phospholipid and 25 mg of curcumin was dropped onto 2 g of previously micronised sucrose (50–100 µm average diameter). The injection process of the ethanol solution was conducted in a rotary evaporator with the aid of a peristaltic pump (Masterflex 7528-30; Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) at a flow rate of 4 mL min⁻¹. The rotating flask was maintained at 45 ± 2 °C to evaporate the ethanol. The proliposomes produced were stored in a vacuum

desiccator in the dark and kept at room temperature (25 °C).

Scanning electron microscopy of the proliposomes

The particle morphology was studied using a scanning electron microscope (model 3000 TM; Hitachi, Tokyo, Japan) equipped with TM3000 software. For the analyses, the samples were placed in double-sided carbon tape and fixed onto aluminium stubs. The images were captured with an acceleration voltage of 5 kV and a 1750 mA current.

Infrared spectroscopy of proliposomes

The spectra in the infrared region for proliposomes were obtained in the region of wavenumbers of 4000–400 cm⁻¹ using a Perkin Elmer FT-IR Spectrometer (Waltham, MA, USA) with the aid of the software Spectrum One version 5.3.1 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA).

Wide-angle X-ray diffraction of the proliposomes

Wide-angle X-ray diffraction analyses were performed with a MiniFlex600 (Rigaku, Tokyo, Japan) with a copper anode tube with $\lambda = 1.5418$ angstroms and graphite monochromator in the diffracted beam. The scans were made in the 2θ range of 5–40° in steps of 0.02° at a speed of 2° min⁻¹.

Solubility of the proliposomes

The solubility of the proliposomes was determined according to the method of Eastman & Moore (1984). The method consists of adding 0.5 g of the sample to a vessel containing 50 mL of distilled water and stirring the resultant solution at 100 rpm for 30 min, followed by centrifugation at 1200 g for 5 min. Subsequently, a 25 mL sample of the supernatant was removed and baked in an oven at 105 °C until it reached a constant weight. The solubility was calculated on the basis of the initial weight of the solubilised sample contained in the supernatant. The result was expressed as a percentage of solubilised powder.

Hygroscopicity of the proliposomes

The proliposomes were characterised in terms of hygroscopicity according to the procedure described by Cai & Corke (2000). Samples containing 0.2 g of proliposomes were placed in weighed filter and then stored for 7 days in a desiccator containing saturated sodium chloride (RH 75.3%). Hygroscopicity was measured by the mass of water adsorbed by the sample and was expressed in g adsorbed water/100 g dry matter.

Determination of the moisture content of proliposomes

The moisture content of the proliposomes was determined using a moisture analyser (Model MB35; Ohaus, New Jersey, NJ, USA) using infrared radiation from a halogen source. The result was expressed in terms of dry base.

Moisture adsorption isotherms of the proliposomes

The equilibrium moisture content of powder samples of proliposomes was determined by a gravimetric static method, using saturated salt solutions in distilled water within a specified range of relative humidity (water activity; Labuza, 1984). Samples of previously known masses were placed in clean weighing filters, dried in an oven and then stored in desiccators with their respective salt. The samples were weighed on an analytical balance at regular intervals until they reached equilibrium. Thereafter, the equilibrium moisture content of the samples was calculated by the ratio of the total water mass to the dry mass of the sample:

$$H_{eq} = \frac{m_{water}}{m_{dry}} \times 100,$$

where H_{eq} is the equilibrium moisture content (% dry basis), m_{water} is the total water mass (initial mass water + mass of water adsorbed) on the sample (g), and m_{dry} is the dry weight of sample (g).

Liposome production

A mass of 2 g of proliposomes was hydrated in 100 mL of deionised water by ultra-agitation (IKA T25; IKA, Staufen, Germany) at 13 000 rpm for 5 min at 65 °C (Morais *et al.*, 2013; Toniazzi *et al.*, 2014). Afterwards, the dispersions were cooled to 25 °C for the addition of the thickeners (polysaccharides) and sodium benzoate (0.02% w/w). Table 1 shows the liposome formulations, which were chosen according to previous results obtained by Morais *et al.* (2013) and Toniazzi *et al.* (2014).

Table 1 Formulations used for the production of curcumin-loaded multilamellar liposomes (% w/w) (100 mL of total volume dispersion)

Liposome	Proliposomes (g)	Xanthan gum (XG)	Guar gum (GG)	Inulin (I)	Locust bean gum (LBG)
XG + GG	2	0.01	0.09	–	–
XG + LBG	2	0.01	–	–	0.09
XG + GG + I	2	0.01	0.09	0.25	–

Determination of size distribution and average particle diameter

The size distribution and the mean hydrodynamic diameter of the phospholipid vesicles were obtained by photon correlation spectroscopy using a ZetaPlus equipment (Brookhaven Instrument Company, Holtsville, NY, USA) with a 627-nm He-Ne laser at an incident angle of 90 and 25 °C. Before the analyses, the samples were diluted with deionised water to avoid the multiple scattering of light phenomenon. Data analyses were performed using the equipment own software (90Plus; Brookhaven Instrument Company).

Determination of the colorimetric parameters of curcumin-loaded liposomes

The degradation of encapsulated curcumin was also monitored by instrumental colorimetry. The parameters of the tristimulus colour system ($L^*a^*b^*$) were obtained using a colorimeter (Miniscan XE; HunterLab, Reston, VA, USA); by reflectance, an illuminator D65 with the observer at 10°, and the total colour difference, chroma (C^*) and hue angle (h°) parameters were calculated. Dispersions of liposomes were placed in a transparent, flat-faced cuvette, and the measurements were obtained after the colorimeter had been pressed against the cuvette surface. All measurements were repeated three times.

Determination of curcumin content in proliposomes and liposomes

For the quantification of curcumin in proliposomes, 9 mg of phospholipid powder was diluted in 10 mL of anhydrous ethanol. Liposomes were diluted (10×) in anhydrous ethanol. In both cases, the curcumin concentration was calculated from absorbance readings taken at 424 nm in a spectrophotometer (Libra S22; Biochrom, Cambridge, UK). The bioactive was quantified according to a calibration curve of pure curcumin in ethanol, with a R^2 of 0.9984.

Statistical analyses

Tukey's tests were performed to compare different statistical treatment methods. The significance level for all tests was 5% ($\alpha = 0.05$), which was calculated using the SAS Software version 9.2 (Statistical Analysis Systems, Cary, NC, USA).

Results and discussion

Production and characterisation of proliposomes

The coating of micronised sucrose by phospholipids produced a fine powder whose morphological characteristics are shown in the scanning electron micrograph illustrated in Fig. 1. In these SEM micrographs, it is possible to distinguish a layer of phospholipid around

Figure 1 Micrographies obtained by scanning electron microscopy: (a) and (b) Micronised sucrose; (c) and (d) proliposomes obtained by coating of micronised sucrose with phospholipid.

the micronised sucrose granules. The coated material presented very irregular and different shapes, with many agglomerates in the visual fields.

Figure 2 shows the spectra obtained by infrared spectroscopy analyses of the proliposomes. According to Lewis & McElhancy (1996), the asymmetrical stretching mode of a P=O group is identified by a peak in the range 1200–160 cm^{-1} , depending on the phospholipid used. In the case of Phospholipon 90H, this peak was identified as located in the wavenumber near 1235 cm^{-1} (Yoshida *et al.*, 2010), which suggests in the case of this study that it was the peak at 1235 cm^{-1} in Fig. 2b. Popova & Hinch (2003) state that this peak increases its position with hydrogen bonding; this fact was not observed in the IR spectra of proliposomes or curcumin-loaded proliposomes. Also, the intensity of the referred peak did not change significantly when the spectrum of pure phospholipid (Fig. 2b) was compared with the spectra of proliposomes (Fig. 2c, d), which is an indication that there was not an intense interaction among the polar heads of phosphatidylcholine and

sucrose. Such a decrease is observed in lyophilised liposomes, when sucrose is used as cryoprotector, and interactions among polar heads (more specifically, P=O and C=O groups in the ester groups of the polar head of the phospholipid with the OH groups of sucrose) occur in the liposome bilayer (Doxastakis *et al.*, 2005). These interactions cause a decrease in the peak related to P=O, but also in a peak related to stretching of the C=O group, which is located at 1735 cm^{-1} in the pure phospholipid, which did not occur either in the spectra of proliposomes (Fig. 2c, d). These data indicate the structure formed during the process was just a coating of the sucrose crystals.

The peaks at 2917 and 2950 cm^{-1} , very intense in the spectrum of pure phospholipid, also appeared with almost no modifications (in localisation of the peak or intensity), in the spectra of proliposomes. These peaks are related to $\nu(\text{CH}_2)$, and the higher its intensity, the more ordered are the acyl chains of the phospholipids. The presence of curcumin and sucrose in the proliposomes, therefore, did not seem to have altered such a characteristic, reinforcing the idea that the process of proliposome production did not lead to a higher level of structuration than the coating of the micronised sucrose.

The proliposome powders were also characterised by wide-angle X-ray diffraction, and the results are shown in Fig. 3. It is clear there is a significant difference among the diffractograms of pure phospholipid, pure sucrose, pure curcumin and both proliposomes analysed. The spectra of the proliposomes are clearly a superposition of the spectra of Phospholipon 90H and sucrose, as shown by the peaks at 2θ of 19° and 19.76° , characteristic of the disaccharide spectrum, and the peak at approximately 21.4° , characteristic of the phospholipid. Such superposition emphasises the idea that a coating of the sucrose crystals occurred, differently from the proliposomes produced by Moraes *et al.* (2013), in which a complete mixture of the components of the proliposome occurred. In addition, the increase in the curve at 2θ around 15° is typical of amorphous materials, and such an increase occurs in the pure phospholipid and also in the proliposomes. Amorphous regions in the proliposome is an important characteristic, as the less crystalline the structure, the easier its hydration (Moraes *et al.*, 2013).

The hygroscopicity of proliposomes and proliposomes with curcumin was $3.41 \pm 0.02\%$ and $3.24 \pm 0.01\%$, respectively, which can be considered very low. This is a highly desirable characteristic, as the powder will probably show an extended shelf life, maintaining its physicochemical characteristics unaltered even in high-relative humidity environments. The solubility of both proliposomes and proliposomes with curcumin was approximately 98%, which is also a good characteristic, as the phospholipid powders are

Figure 2 Infrared spectra of the pure components of the formulations and the proliposomes.

Figure 3 Diffractograms obtained by wide-angle X-ray diffraction for the pure components of the formulations and proliposomes.

supposed to be hydrated to form liposomes. Such a result indicated that the proliposomes are highly water-dispersible powders, which is an outstanding characteristic that would facilitate significantly the formation of liposomes at the hydration step. The experimental data obtained for the water adsorption isotherms are shown in Fig. 4, and they reinforce the evidence about the low capacity of the proliposomes to adsorb water even at conditions of high water activities.

The capacity of proliposomes to preserve the incorporated curcumin over the storage period is illustrated in Fig. 5. This evaluation is extremely important, as one of the advantages of proliposomes is that they can be stored for the liposomes to be produced just before use. Considering that curcumin is a molecule highly sensitive to degradation, the results shown in Fig. 5 can be considered quite interesting, as approximately 80% of the curcumin initially present in the powder was preserved after 60 days of storage. Considering that no modifications of the storage atmosphere were made, this means that if such a process were to be adopted, the ability of the proliposomes to protect the

Figure 4 Water sorption isotherms (at 25 °C): (■) proliposomes and (○) proliposomes with curcumin.

Figure 5 Curcumin incorporated in the proliposome powder over storage period, stored under desiccation and protected from light.

curcumin over the storage period could be improved even further.

Stability of curcumin-loaded multilamellar liposomes

Data shown in Table 2 indicate that it was possible to obtain multilamellar liposomes by hydration of proliposomes produced by coating of micronised sucrose, but it was necessary to add thickeners to the colloidal systems. The stability of the phospholipid vesicles produced in the absence of thickeners was extremely low, as the average diameter reached a value of 4000 nm on the third day of storage, and on the fourth day, the dispersions destabilised completely, in a similar result as shown by Moraes *et al.* (2013) and Toniazzi *et al.* (2014). In both cases, the authors concluded that the

Table 2 Summary of physico-chemical characteristics of the multilamellar liposome dispersions produced by hydration of the proliposomes obtained by coating of micronised sucrose, with different combinations of thickeners

Parameter	Formulation/time								
	XG + GG			XG + LBG			XG + GG + I		
	Fresh sample	Day 15	Day 30	Fresh sample	Day 15	Day 30	Fresh sample	Day 15	Day 30
Average hydrodynamic diameter (nm)	686 ^A ± 22	846 ^B ± 28	804 ^A ± 21	2545 ^A ± 224	2700 ^A ± 109	2897 ^A ± 181	1032 ^A ± 32.8	1225 ^A ± 167	Unstable
Curcumin concentration (mg L ⁻¹)	20.77 ^A ± 0.79	14.16 ^B ± 1.57	15.15 ^B ± 0.96	23.89 ^A ± 1.03	13.73 ^B ± 0.56	11.03 ^B ± 0.21	29.7 ^A ± 5.54	15.7 ^B ± 3.74	Unstable
Remaining curcumin (%)	-	-	72.3	-	-	46.1	-	-	Unstable
Hue angle	91.34 ^A ± 0.01	91.35 ^A ± 0.02	91.34 ^A ± 0.01	91.35 ^A ± 0.03	91.35 ^A ± 0.05	91.35 ^A ± 0.01	90.08 ^A ± 0.06	90.08 ^A ± 0.07	Unstable
Chroma	35.73 ^A ± 1.72	37.18 ^A ± 0.04	35.28 ^A ± 1.50	44.90 ^A ± 2.23	42.00 ^A ± 0.84	42.65 ^A ± 2.63	27.81 ^A ± 1.75	27.51 ^A ± 0.95	Unstable

The averages of the samples followed by the same letters in the same line (for each formulation) do not differ at the 5% significance level based on Tukey's test. The values showed are averages calculated from the measurements of three different samples of liposome dispersions.

addition of gums-xanthan gum and mixtures of xanthan and guar gums—was useful to stabilise the dispersions of beta-carotene-loaded multilamellar liposomes, also produced by hydration of proliposomes. In the case of the present research work, the same concentrations and compositions of the thickening system used by Toniazzo *et al.* (2014) were used, but other systems were tested as thickeners other than xanthan gum with guar gum, as a mixture of xanthan gum and locust bean gum (XG + LBG) and a mixture of xanthan gum, guar gum and inulin (XG + GG + I). The physico-chemical characteristics of the multilamellar liposomes are shown in Table 2.

Data in Table 2 indicate that the thickening of the liposomal dispersions with the mixture XG + GG (0.10% total gum, with 90% guar gum and 10% xanthan gum of this total mass) was the most effective to stabilise the multilamellar liposomes. This thickening mixture also resulted in the lowest mean liposome hydrodynamic average among the three thickener systems tested. The mixture of xanthan gum and locust bean gum (XG + LBG), in the same mass amount (0.10% total gum, being 10% XG + 90% LBG), resulted in a much higher average hydrodynamic diameter, which may be a result of interactions among the LBG chains and the surface of liposomes, which is known to be absent in the case of the mixture XG + GG (Toniazzo *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2015). Surface activity of LBG has been already reported in the literature (Dickinson, 2003), which can lead to the hypothesis some gum molecules may have interacted or been adsorbed on the surface of the liposomes, increasing their average size up to 2500 nm. In addition, LBG is a nonionic polysaccharide with a linear chain where the fourth mannose group is substituted by (1,6)- α -D-galactose and the groups OH of this branch group may have interacted with the polar groups of phospholipids on the external part of the lipid bilayer of the liposomes, causing the increase in the average vesicle size.

In the case of the formulation containing inulin (XG + GG + I), the liposomal dispersions did not remain stable for more than 15 days. Such an instability is likely to be due to the capacity of inulin molecules to form aggregates at low concentrations (Dan *et al.*, 2009) and also to the negative interactions they could have had with the gums, as the three polysaccharides have a high affinity for water.

Regarding the ability to preserve curcumin, the liposome dispersions thickened with the mixture of xanthan gum and guar gum also presented a higher capacity to protect the curcumin against degradation after 30 days of storage. The stability of the curcumin encapsulated in such a formulation of liposomes was considerably higher than in other studies in the literature with lipid-based nanoencapsulation systems,

which are not very numerous. Kakkar *et al.* (2011) produced curcumin-loaded solid lipid nanoparticles by a microemulsification technique and reached a total curcumin content of 92% after a storage period of 12 months under refrigeration. Tikekar *et al.* (2013) produced Pickering emulsions in which the half-life of curcumin was 100 min (<2 h), an extremely short time for any application in food. Borrin *et al.* (2016) reached a better result in the protection of curcumin in nanoemulsions obtained by emulsion inversion point method, produced with soya bean oil and polysorbate 80 as surfactants. The nanoemulsions were capable of preserving up to 75% of the initial mass of encapsulated curcumin, but the amount of surfactant was quite high in order to obtain a very tight interface.

Regarding liposomes encapsulating curcumin, the number of studies is also scarce (Chen *et al.*, 2012; Karczewicz *et al.*, 2013; Barui *et al.*, 2014; Bergine *et al.*, 2014), and the majority of them are related not to food applications but to pharmaceutical applications. Hao *et al.* (2016), in the only study found in the literature about the production of curcumin-loaded liposomes for food applications, produced nanoliposomes by ultrasonication. The liposomes produced with MFGM (milk fat globule membrane) phospholipids had an encapsulation efficiency of approximately 74% and an average particle size of approximately 210 nm. The MFGM liposomes showed higher encapsulation efficiency, smaller particle size, higher absolute value of ζ -potential and slower *in vitro* release than soya bean liposomes. Therefore, although theoretically highly applicable for use in food applications, the encapsulation of curcumin in liposomes is still a field to be explored, particularly with respect to the issues involving scalable processes.

Conclusions

The experimental data indicate that it is possible to produce proliposomes containing curcumin in which the powder is able to preserve the curcuminoid. The method of coating micronised sucrose was shown to be quite simple to execute, and the process of coating with phospholipid and curcumin was efficient. The proliposomes were stable even under conditions of high water activity, which is very important for food powders. On the other hand, they were extremely soluble and easy to hydrate, which is a desired characteristic for proliposomes. After hydration, they produced multilamellar liposomes, which were more stable if stabilised with xanthan gum and guar gum as thickening agents. The results show it is possible to produce proliposomes incorporating curcumin by a new scalable method, free of harmful organic solvents, and the data obtained can be used for further improvement of the process and for the enhancement of the liposomes' stability.

Acknowledgments

The authors are grateful to FAPESP for the fellowships awarded (grants 2014/23376-9, Camila G. Jange, and 2015/03362-6, Matheus A. Chaves). The authors also thank Du Pont and Cargill for the donation of xanthan gum and locust bean gum, respectively.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests. The authors alone are responsible for the content and writing of the manuscript.

References

- Barui, S., Saha, S., Mondal, G., Hasena, S. & Chaudhri, A. (2014). Simultaneous delivery of doxorubicin and curcumin encapsulated in liposomes of pegylated RGDK-lipopeptide to tumor vasculature. *Biomaterials*, 35, 1643–1656.
- Bergine, K., Suljakovic, S., Skalko-Basnet, N. & Kristl, A. (2014). Mucoadhesive liposomes as new formulation for vaginal delivery of curcumin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87, 40–46.
- Borin, T.R., Georges, E.L., Moraes, I.C.F. & Pinho, S.C. (2016). Curcumin-loaded nanoemulsions produced by the emulsion inversion point (EIP) method: an evaluation of process parameters and physico-chemical stability. *Journal of Food Engineering*, 169, 1–9.
- Cui, Y.Z. & Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried *Anarathus betacyanin* pigments. *Journal of Food Science*, 65, 419–428.
- Carvalho, J.M.P., Tomiazzi, T., Cavalcanti, L.P., Oliveira, C.L.P., Moraes, I.C.F. & Pinho, S.C. (2015). Physico-chemical stability and structural characterization of thickened multilamellar beta-carotene-loaded liposome dispersions produced using a proliposome method. *Colloid and Polymer Science*, 293, 2171–2179.
- Chen, Y., Wu, Q., Zhang, Z., Yuan, L., Liu, X. & Zhou, L. (2012). Preparation of curcumin-loaded liposomes and evaluation of their skin permeation and pharmacodynamics. *Molecules*, 17, 5972–5987.
- Dan, A., Ghosh, S. & Moulik, S.P. (2009). Physicochemical studies on the biopolymer inulin: a critical evaluation of its self-aggregation, aggregate-morphology, interaction with water, and thermal stability. *Biopolymers*, 91, 687–699.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25–39.
- Doxastakis, M., Sum, A.K. & de Pablo, J.J. (2005). Modulating membrane properties: the effect of trehalose and cholesterol on a phospholipid bilayer. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109, 24173–24181.
- Eastman, J. E. & Moore, C.O. (1984). Cold water soluble granular starch for gelled food composition. U. S. Patent 4465702.
- Elhissi, A.M.A., O'Neill, M.A.A., Roberts, S.A. & Taylor, K.M.G. (2006). A calorimetric study of dimyristoylphosphatidylcholine phase transitions and sterol-liposome interactions for liposomes prepared by thin film and proliposome methods. *International Journal of Pharmaceutics*, 320, 124–130.
- Ezhilarasi, P.N., Karthik, P. & Chanwal, N. (2013). Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *Food Bioprocess Technology*, 6, 628–647.
- Ghosh, P.K. & Murthy, R.S.R. (2006). Microemulsions: a potential drug delivery system. *Current Drug Delivery*, 3, 167–180.
- Hao, H., Qun, L. & Jiang, J.G. (2016). Curcumin liposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids and soybean lecithin. *Journal of Dairy Science*, 99, 1780–1790.

- Kakkar, V., Singh, S., Singla, D. & Kaur, I.P. (2011). Exploring solid lipid nanoparticles to enhance the oral bioavailability of curcumin. *Molecular Nutrition and Food Research*, **55**, 495-503.
- Karewicz, A., Bielecka, D., Loboda, A. et al. (2013). Curcumin-containing liposomes stabilized by thin layers of chitosan derivatives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **109**, 307-316.
- Khalil, P.A. & Ali, N.H. (2011). Protective effect of dietary antioxidants curcumin, vitamin C and ginkgo biloba on oxidative stress in colonic rats induced by butylated hydroxyanisole. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **5**, 1489-1495.
- Khan, Y.A., Talegaonkar, S., Iqbal, Z., Ahmed, F.J. & Khar, R.K. (2006). Multiple emulsions: an overview. *Current Drug Delivery*, **3**, 429.
- Kikuchi, H., Yamauchi, H. & Hirota, S. (1991). A spray drying method for the mass production of liposomes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **39**, 1522-1527.
- Labuza, T. (1984). *Moisture Sorption: Practical Aspects of Isotherm Measurement and Use*. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
- Lasic, D.D. (1993). *Liposomes: From Physics to Applications*, 1st edn. Amsterdam: Elsevier.
- Lewis, R.N.A.H. & McElhaney, R.N. (1996). Fourier transform infrared spectroscopy in the study of hydrated lipids and lipid bilayer membranes. In: *Infrared spectroscopy of biomolecules*, (edited by H.H. Mantsch & D. Chapman). New York: Wiley-Liss.
- Marsanasco, M., Márquez, A.L., Wagner, J.R., Alonso, S.V. & Chiaramoni, N.S. (2011). 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.
- Michelon, M., Mantovani, R.A., Sinigaglia-Coimbra, R., La Torre, L.G. & Cunha, R.L. (2016). Structural characterization of β -carotene-incorporated nanovesicles produced with non-purified phospholipids. *Food Research International*, **79**, 95-105.
- Moraes, M., Carvalho, J.M.P., Silva, C.R., Cho, S., Sola, M.R. & Pinho, S.C. (2013). Liposomes encapsulating β -carotene produced by proliposomes method: characterization and shelf life of powders and phospholipid vesicles. *International Journal of Food Science and Technology*, **48**, 274-282.
- Nakamura, O. & Okonogi, S. (2015). Comparison and combination effects on antioxidant power of curcumin with gallic acid, ascorbic acid, and xanthone. *Drug Discoveries & Therapeutics*, **9**, 136-141.
- Parada, J. & Aguilera, J.M. (2007). Microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, **72**, 21-32.
- Popova, A.V. & Hincha, D.K. (2003). Intermolecular interactions in dry and rehydrated pure and mixed bilayers of phosphatidylcholine and digalactosyldiacylglycerol: a Fourier Transform infrared spectroscopy study. *Biophysical Journal*, **85**, 1682-1690.
- Portier, C.J.H., Trevaskis, N.L. & Charman, W.N. (2007). Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, **6**, 231-248.
- Taylor, T.M., Davidson, P.M., Bruce, B.D. & Weiss, J. (2005). Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**, 587-605.
- Tilkekar, R., Pan, Y. & Nitin, N. (2013). Fate of curcumin encapsulated in silica nano-particle stabilized pickering emulsion during storage and simulated digestion. *Food Research International*, **51**, 370-377.
- Toniuzzo, T., Berbel, I.F., Cho, S., Fávoro-Trindade, C.S., Moraes, I.C.F. & Pinho, S.C. (2014). β -carotene-loaded liposome dispersions stabilized with xanthan and guar gums: physicochemical stability and feasibility of application in yogurt. *LWT - Food Science and Technology*, **59**, 1265-1273.
- Xia, F., Jin, H., Zhao, Y. & Guo, X. (2011). Supercritical antisolvent-based technology for preparation of vitamin D3 proliposome and its characteristics. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **19**, 1039-1046.
- Xia, F., Hu, D., Jin, H., Zhao, Y. & Liang, J. (2012). Preparation of lutein proliposomes by supercritical anti-solvent technique. *Food Hydrocolloids*, **26**, 456-463.
- Yoshida, P.A., Yokota, D., Foglio, M.A., Rodrigues, R.A.F. & Pinho, S.C. (2010). Liposomes incorporating essential oil of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): characterization of aqueous dispersions and lyophilized formulations. *Journal of Microencapsulation*, **27**, 416-425.
- Zömper, R.H., Lopez-Rubio, A., Pinho, S.C., Langaron, J.M. & de la Torre, L.G. (2015). Hybrid encapsulation structures based on β -carotene-loaded nanoliposomes within electrospun fibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **134**, 475-482.

23/05/2018

RightsLink Printable License

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Ma

This Agreement between Samantha Pinho ("You") and John Wiley and Sons ("John and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4355010964528
License date	May 23, 2018
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	International Journal of Food Science & Technology
Licensed Content Title	Characterisation of curcumin-loaded proliposomes produced by coating of micronised sucrose and hydration of phospholipid powders to obtain multilamellar liposomes
Licensed Content Date	Dec 29, 2016
Licensed Content Pages	9
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Obtenção de prolipossomas por recobrimento de sacarose micronizada, produção de lipossomas multilamelares encapsulando curcumina e incorporação das vesículas em inerte