UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MATHEUS ANDRADE CHAVES

**Coencapsulação de curcumina e vitamina D₃ em lipossomas
multilamelares**

Pirassununga

2017

MATHEUS ANDRADE CHAVES

**Coencapsulação de curcumina e vitamina D₃ em lipossomas
multilamelares**

Versão corrigida

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

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

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

Pirassununga

2017

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

C512c Chaves, Matheus Andrade
Coencapsulação de curcumina e vitamina D3 em
lipossomas multilamelares / Matheus Andrade Chaves
; orientadora Samantha Cristina de Pinho. --
Pirassununga, 2017.
112 f.

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

1. Microencapsulação. 2. Curcuminóide. 3.
Colecalciferol. 4. Prolipossomas. 5. Vesículas
Fosfolipídicas. I. de Pinho, Samantha Cristina ,
orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marilene e Luiz Fernando, por todo esforço, apoio e sacrifícios feitos para que eu tivesse a oportunidade do estudo. Não tenho palavras para descrever o quão grato sou a vocês. Muito obrigado.

À minha irmã Mariana, pela amizade e compreensão que sempre me motivaram a pensar no melhor e seguir adiante.

À minha avó Deize, pela ajuda e suporte oferecidos durante esses dois anos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Samantha Cristina de Pinho, não apenas pela paciência, dedicação e confiança concedidas a mim, mas também por ter sido mais do que minha professora durante todo esse tempo, uma verdadeira amiga. Se tenho a certeza do que quero para meu futuro, essa certeza foi a senhora quem me deu. Muito obrigado!

Ao Diego Augusto Durante, pelo carinho, pelas palavras de apoio e pela força imprescindível durante os últimos meses.

À Prof^a Izabel Cristina Freitas Moraes, pela disposição em ajudar, pela paciência e pelos ensinamentos na parte de reologia e Fenômenos de Transporte.

Ao Prof. Cristiano Luis Pinto de Oliveira e ao MsC. Pedro Leônidas Oseliero Filho (Grupo de Fluidos Complexos, Instituto de Física - USP) pela boa vontade e disposição em colaborar com as análises de Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS).

Ao Especialista de Laboratório Marcelo Thomazini, pela ajuda com as análises de quantificação de vitamina D.

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

À Prof^a Rita Sinigaglia-Coimbra e ao André Aguilera (UNIFESP) pelas microscopias eletrônicas de transmissão.

À Carla Giovana Luciano pela ajuda nas análises de reologia.

À Juliana Silveira de Souza Rocha, a Camila Garcia Jange e ao Guilherme de Sousa Silva pela ajuda durante as análises experimentais.

A todos do Laboratório de Coloides e Funcionalidade de Macromoléculas, especialmente para Thais Carvalho Brito Oliveira e Camila Pinheiro Silva Cazado pelas conversas e risadas.

Aos meus amigos Isabella, Thiago, Amanda, Caio, Bianca, Fernanda, Natália e Guilherme pelo apoio e pelos momentos de descontração. A vida não seria a mesma sem vocês!

Aos alunos da XIV turma de Engenharia de Alimentos da FZEA/USP por darem à minha vida mais um propósito.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de Mestrado concedida (Processo 2015/03362-6).

RESUMO

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

Atualmente, a demanda por alimentos com apelo funcional tem se tornado cada vez mais recorrente dentre os consumidores devido a uma crescente busca por hábitos de vida mais saudáveis. Sendo assim, o desenvolvimento de técnicas que possibilitem uma adição mais efetiva de ingredientes funcionais em matrizes alimentícias se torna uma necessidade. Essas técnicas devem possibilitar principalmente (i) a incorporação de mecanismos de liberação sustentada na formulação; (ii) o aumento da bioacessibilidade e biodisponibilidade aos ingredientes, a partir do controle da microestrutura do alimento. Esse projeto visa contemplar essas duas premissas, ao propor a encapsulação de dois bioativos hidrofóbicos, a curcumina e a vitamina D₃, conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes e nutracêuticas, em carreadores de origem lipídica, os lipossomas, estabilizando-os com diferentes hidrocoloides - goma xantana, goma guar e inulina. Os lipossomas foram produzidos por hidratação de prolipossomas e suas propriedades físico-químicas foram caracterizadas ao longo de 42 dias de armazenagem, a partir de análises de diâmetro médio hidrodinâmico, potencial zeta, colorimetria instrumental e quantificação de bioativos encapsulados. Análises que permitiram a caracterização da microestrutura das dispersões produzidas também foram realizadas, sendo elas: calorimetria diferencial de varredura (DSC), espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) e ensaios reológicos. As análises de SAXS mostraram que lipossomas produzidos na presença de curcumina são mais estáveis que àqueles produzidos na ausência da mesma e que não houve mudança na estrutura da bicamada lipídica das vesículas após a adição de vitamina D₃, mesmo quando uma alta concentração foi incorporada ao sistema (80.000 UI). Por fim, verificou-se que a coencapsulação foi possível em lipossomas multilamelares estabilizados apenas com gomas guar e xantana, resultado que pode ser comprovado pelo alto teor de retenção dos bioativos ao longo do tempo de armazenagem.

Palavras-chave: curcuminoide, colecalciferol, prolipossomas, vesículas fosfolipídicas, microencapsulação

ABSTRACT

CHAVES, M. A. **Co-encapsulation of curcumin and vitamin D₃ in multilamellar liposomes.** 2017. 112p. Dissertation (Master). Faculty of Animal Science and Food Engineering - University of São Paulo, Pirassununga, 2017.

Currently, the demand for food with functional appeal has become increasingly recurrent among the consumers due to a growing search for healthier living habits. Therefore, the development of techniques that allow a more effective addition of functional ingredients in food matrices becomes a necessity. These techniques should mainly enable to (i) incorporate a sustained release mechanisms into the formulation; (ii) increase the bioaccessibility and bioavailability to these ingredients, from the control of the food microstructure. This project aims to contemplate these two premises by proposing the encapsulation of two hydrophobic bioactives, curcumin and vitamin D₃, known for their antioxidant and nutraceutical properties, in liposomes – lipid carriers - stabilizing them with different hydrocolloids - xanthan gum, guar gum and inulin. Liposomes were produced by proliposomes hydration and their physicochemical properties were characterized during 42 days of storage, including analyzes of hydrodynamic average diameter, zeta potential, instrumental colorimetry and quantification of encapsulated bioactives. Analyzes that allowed the microstructure characterization of the produced dispersions were also performed, including: differential scanning calorimetry (DSC), small-angle X-ray scattering and rheological tests. The SAXS analysis showed that liposomes produced in the presence of curcumin were more stable when compared to the empty ones and that there was no change in the lipid bilayer of the vesicles after the addition of vitamin D₃, even when a high concentration was incorporated into the system (80,000 IU). Finally, it was concluded that the coencapsulation was possible in multilamellar liposomes stabilized with guar and xanthan gums, a result that can be evidenced by the high content of bioactives retained throughout the storage time.

Keywords: cholecalciferol, proliposomes, microencapsulation, phospholipid vesicles, curcuminoid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado da formação de um lipossoma	3
Figura 2. Estrutura química da fosfatidilcolina	4
Figura 3. Diferenças estruturais entre alguns dos tipos de lipossomas encontrados na literatura	5
Figura 4. Esquema de produção de lipossomas por hidratação do filme lipídico seco	10
Figura 5. Esquema de um homogeneizador de alta pressão	11
Figura 6. Esquema de um microfluidizador	12
Figura 7. Esquema de produção laboratorial de lipossomas por injeção de etanol	13
Figura 8. Esquema de produção industrial de lipossomas por injeção de etanol	13
Figura 9. Esquema de produção de lipossomas por evaporação em fase reversa	14
Figura 10. Esquema de produção de lipossomas por remoção de detergente	15
Figura 11. Esquema de produção de lipossomas por hidratação de prolipossomas	17
Figura 12. Distribuição mundial (em porcentagem) do uso de corantes pela indústria alimentícia	18
Figura 13. Estrutura química do corante amarelo tartrazina	19
Figura 14. Rizoma de <i>Curcuma longa</i> L. e curcumina desidratada	20
Figura 15. Estrutura e concentração dos curcuminoides encontrados na raiz de <i>Curcuma longa</i>	22
Figura 16. Estruturas moleculares das vitaminas D ₂ e D ₃	23
Figura 17. Produção de vitamina D ₃ a partir do seu precursor (ergosterol)	24
Figura 18. Concentração de vitamina D após exposição à iluminação solar	25
Figura 19. Estrutura química da goma guar	27
Figura 20. Estrutura química da goma xantana	28
Figura 21. Estrutura molecular da inulina	29
Figura 22. Sistema de rotaevaporação utilizado para a produção de prolipossomas pelo método do recobrimento de sacarose micronizada	35
Figura 23. A esfera CIELAB	39
Figura 24. Ilustração de duas bicamadas vizinhas	41
Figura 25. Lipossomas encapsulando curcumina produzidos com 2 g de prolipossomas, no dia zero, estabilizadas com diferentes proporções de hidrocoloides	46
Figura 26. Aspecto visual das dispersões de lipossomas encapsulando curcumina produzidos com 2 g de prolipossomas, desestabilizados (dia 14)	46
Figura 27. Aspecto visual das dispersões de lipossomas encapsulando curcumina produzidos com 1 g de prolipossomas, no dia zero, estabilizadas com diferentes proporções de hidrocoloides	46
Figura 28. Aspecto visual das dispersões de lipossomas encapsulando curcumina produzidos com 1 g de prolipossomas, desestabilizados (dia 14)	46

Figura 29. Aspecto visual dos lipossomas (instáveis), evidenciando a separação das fases aquosa e oleosa	47
Figura 30. Curvas de distribuição de tamanho hidrodinâmico obtidas nos dias zero e 14 para as formulações produzidas com 2 g de prolipossomas	50
Figura 31. Curvas de distribuições de tamanho hidrodinâmico obtidas nos dias zero e 14 para as formulações produzidas com 1 g de prolipossomas	51
Figura 32. Perfis temporais de concentração de curcumina ao longo do tempo de estocagem para formulações produzidas com (a) 2 g de prolipossomas e (b) 1 g de prolipossoma	52
Figura 33. Curvas de distribuições de tamanho hidrodinâmico obtidas nos dias zero (----) e 42 (- -) para as formulações: A) 50.000 UI VD ₃ ; B) 80.000 UI VD ₃ ; C) 50.000 UI VD ₃ + curcumina; D) 80.000 UI VD ₃ + curcumina.	57
Figura 34. Valores de potencial zeta obtidos para os lipossomas encapsulando vitamina D ₃ e coencapsulando curcumina e vitamina D ₃	59
Figura 35. Perfil temporal da concentração de curcumina ao longo do tempo de armazenagem nos lipossomas coencapsulando curcumina e vitamina D ₃	60
Figura 36. Perfil temporal da concentração de vitamina D ₃ ao longo do tempo de armazenagem nos lipossomas coencapsulando curcumina e vitamina D ₃	60
Figura 37. Representação da localização da curcumina e da vitamina D ₃ na bicamada lipídica dos lipossomas	62
Figura 38. Parâmetros colorimétricos obtidos para os lipossomas encapsulando curcumina e coencapsulando curcumina e vitamina D ₃	64
Figura 39. Parâmetros colorimétricos obtidos para os lipossomas encapsulando curcumina e coencapsulando curcumina e vitamina D ₃ : A) Croma (C* _{ab}) e B) Ângulo de Hue (h* _{ab})	65
Figura 40. Diferença Total de Cor (TCD) obtida para os lipossomas encapsulando curcumina e coencapsulando curcumina e vitamina D ₃	66
Figura 41. Termogramas obtidos para as dispersões de lipossomas encapsulando curcumina, 50.000 UI de VD ₃ , 80.000 UI de VD ₃ e coencapsulando curcumina e 50.000 UI de VD ₃ ou curcumina e 80.000 UI de VD ₃ .	68
Figura 42. Termogramas obtidos para as dispersões de lipossomas estabilizadas com misturas de gomas guar e xantana	70
Figura 43. Possíveis conformações dos fosfolipídios constituintes dos lipossomas dependendo da temperatura de transição (T _m)	71
Figura 44. Tipos de ligações químicas encontradas nas moléculas de fosfatidilcolina: (a) assimétrica; (b) conformação <i>trans</i> e (c) conformação <i>cis</i>	71
Figura 45. Curvas de escoamento obtidas os lipossomas	74
Figura 46. Perfil temporal da viscosidade aparente (μ _s) das dispersões	75
Figura 47. Perfil temporal do índice de comportamento (n)	77

Figura 48. Perfil temporal do índice de consistência (K)	77
Figura 49. Curvas de intensidade $[I(q)]$ obtidas por SAXS para os padrões de espalhamento de raios-X das dispersões	79
Figura 50. Curvas de densidade eletrônica obtidas por SAXS para as dispersões	80
Figura 51. Representação esquemática da evolução dos parâmetros obtidos pelas análises de SAXS após modelagem por deconvolução gaussiana	82
Figura 52. Curvas de intensidade $[I(q)]$ obtidas para as dispersões contendo apenas vitamina D ₃ ou coencapsulando curcumina e vitamina D ₃	83
Figura 53. Curvas de intensidade $[I(q)]$ obtidas para as dispersões contendo 50.000 UI ou 80.000 UI de vitamina D ₃ , encapsulado na ausência e na presença de curcumina	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos lipossomas baseada em parâmetros estruturais (diâmetro médio e lamelaridade).....	5
Tabela 2. Exemplos de estudos encontrados na literatura empregando lipossomas para encapsulação de bioativos alimentícios.....	8
Tabela 3. Formulações empregadas durante a produção dos prolipossomas	34
Tabela 4. Proporções empregadas na produção dos lipossomas multilamelares encapsulando curcumina	36
Tabela 5. Tabela resumo dos parâmetros obtidos para as dispersões produzidas com 2 g de prolipossomas em sua composição, no começo e no final da vida de prateleira.....	54
Tabela 6. Tabela resumo dos valores obtidos para as dispersões produzidas com 1 g de prolipossoma em sua composição, no começo e no final da vida de prateleira.....	55
Tabela 7. Tabela resumo dos parâmetros obtidos para os lipossomas produzidos encapsulando curcumina ou vitamina D ₃ e coencapsulando curcumina e vitamina D ₃	67
Tabela 8. Parâmetros calorimétricos obtidos para as dispersões de lipossomas estabilizados com 0,10% gomas totais (m/v) sendo 10% GX (m/v) e 90% GG (m/v).....	69
Tabela 9. Resumo dos parâmetros obtidos após modelagem dos dados de SAXS pelo modelo da deconvolução gaussiana	81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CIE - *Commission Internationale de l'Eclairage*

DSC - calorimetria diferencial de varredura (*differential scanning calorimetry*)

FDA - *Food and Drug Administration*

GG – goma guar

GX – goma xantana

GT – gomas totais

LBDD - *Lipid-Based Drug Delivery*

LUV - vesículas unilamelares grandes (*large unilamellar vesicles*)

MLV - vesículas multilamelares (*multilamellar vesicles*)

MVV - vesículas multivesiculares (*multivesicular vesicles*)

PCS - espectroscopia de correlação de fótons (*photon correlation spectroscopy*)

SAXS - espalhamento de raios-X a baixos ângulos

SUV - vesículas unilamelares pequenas (*small unilamellar vesicles*)

TCD - diferença total de cor (*total color difference*)

T_m - temperatura de transição gel-líquido cristalino

T_{onset} - temperatura *onset*

LISTA DE SÍMBOLOS

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

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

C^*_{ab} - croma

h_{ab} - ângulo de Hue (graus)

L^* - luminosidade

n = índice de comportamento de escoamento (adimensional)

τ = tensão de cisalhamento (Pa)

τ_0 = tensão de cisalhamento inicial (Pa)

γ = taxa de deformação (s^{-1})

SUMÁRIO

1	<u>INTRODUÇÃO</u>	1
2	<u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1	LIPOSSOMAS: ESTRUTURA, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	3
2.1.1	ESTRUTURA E PROPRIEDADES	3
2.1.2	APLICAÇÃO DOS LIPOSSOMAS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	6
2.2	MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE LIPOSSOMAS	9
2.2.1	MÉTODO DA HIDRATAÇÃO DO FILME LIPÍDICO SECO	9
2.2.2	MÉTODO DE HOMOGENEIZAÇÃO A ALTA PRESSÃO	10
2.2.3	MICROFLUIDIZAÇÃO	11
2.2.4	MÉTODO DA INJEÇÃO DE ETANOL	12
2.2.5	MÉTODO DA EVAPORAÇÃO EM FASE REVERSA	13
2.2.6	MÉTODO DE REMOÇÃO DE DETERGENTE	14
2.2.7	MÉTODO DA HIDRATAÇÃO DE PROLIPOSSOMAS	15
2.3	A TÉCNICA DA COENCAPSULAÇÃO	17
2.4	BIOATIVOS HIDROFÓBICOS UTILIZADOS: CURCUMINA E VITAMINA D₃	18
2.4.1	CURCUMINA: DEFINIÇÕES E DISCUSSÃO SOBRE SUA POSSIBILIDADE NA SUBSTITUIÇÃO DE CORANTES AMARELOS ARTIFICIAIS	18
2.4.2	A VITAMINA D: PROPRIEDADES E UM PANORAMA DE SUA IMPORTÂNCIA NOS DIAS ATUAIS	23
2.5	OS POLISSACARÍDEOS E SUA FUNÇÃO ESTABILIZANTE	26
2.5.1	GOMAS GUAR E XANTANA: PROPRIEDADES	27
2.5.2	INULINA: PROPRIEDADES E APLICABILIDADE EM ALIMENTOS	28
3	<u>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</u>	31
4	<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	33
4.1	MATERIAL	33
4.2	MÉTODOS	33
4.2.1	PRODUÇÃO DE SACAROSE MICRONIZADA	33
4.2.2	PRODUÇÃO DOS PROLIPOSSOMAS PELO MÉTODO DO RECOBRIMENTO DE SACAROSE MICRONIZADA	33
4.2.3	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS DISPERSÕES DE LIPOSSOMAS ENCAPSULANDO CURCUMINA E VITAMINA D ₃	35

4.2.3.1	<i>Produção dos lipossomas por hidratação dos prolipossomas</i>	35
4.2.3.2	<i>Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de vesícula</i>	36
4.2.3.3	<i>Determinação do potencial zeta</i>	37
4.2.3.4	<i>Quantificação de curcumina</i>	37
4.2.3.5	<i>Quantificação de vitamina D₃</i>	37
4.2.3.6	<i>Determinação de parâmetros colorimétricos</i>	38
4.2.3.7	<i>Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS)</i>	40
4.2.3.8	<i>Análises térmicas por calorimetria diferencial de varredura (DSC)</i>	41
4.2.3.9	<i>Análises reológicas</i>	41
4.2.3.10	<i>Análise estatística dos dados</i>	42

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO **43**

5.1	PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS MULTILAMELARES	43
5.1.1	TESTES PRELIMINARES UTILIZANDO-SE INULINA COMO ESPESSANTE	43
5.1.2	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICOQUÍMICA DOS LIPOSSOMAS ENCAPSULANDO SOMENTE CURCUMINA E ESTABILIZADOS COM GOMA XANTANA, GOMA GUAR E INULINA	44
5.1.3	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DOS LIPOSSOMAS ENCAPSULANDO SOMENTE VITAMINA D ₃ E COENCAPSULANDO CURCUMINA E VITAMINA D ₃	56
5.1.3.1	<i>Diâmetro médio, distribuição do tamanho de vesícula e potencial zeta</i>	56
5.1.3.2	<i>Estabilidade da curcumina e da vitamina D₃ encapsuladas</i>	59
5.1.3.3	<i>Análises de colorimetria instrumental</i>	62
5.2	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS LIPOSSOMAS	68
5.2.1	ANÁLISES TÉRMICAS UTILIZANDO CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	68
5.2.2	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS REOLÓGICOS	72
5.2.3	ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXOS ÂNGULOS (SAXS)	78
5.2.3.1	<i>Influência da temperatura na estrutura da bicamada lipídica dos lipossomas</i>	78
5.2.3.2	<i>Influência da curcumina no sistema contendo vitamina D₃</i>	82
5.2.3.3	<i>Influência da quantidade de vitamina D₃ adicionada ao sistema</i>	84

6 CONCLUSÕES **86**

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS **87**

8 REFERÊNCIAS **88**

1 INTRODUÇÃO

A coencapsulação é uma técnica relativamente nova na literatura, encontrada com maior recorrência em estudos nas áreas farmacêutica e médica, e cujo principal objetivo é aumentar o potencial bioativo de dois ou mais compostos em medicamentos. Na área de alimentos, poucos trabalhos sobre o assunto são encontrados. O desenvolvimento e a caracterização de estruturas que possam levar a mecanismos de liberação sustentada capazes de aumentar a bioacessibilidade e a biodisponibilidade de ingredientes naturais a partir do controle da microestrutura do alimento pode ser considerado, então, uma inovação tecnológica na área alimentícia.

A hidrofobicidade de substâncias como determinados pigmentos naturais e vitaminas dificulta a adição de forma direta desses compostos em matrizes alimentícias, visto que a maioria delas possui base aquosa. Sendo assim, a incorporação dessas substâncias em matrizes lipídicas como lipossomas surge como uma alternativa. Essas estruturas são compatíveis com a maioria dos bioativos de natureza hidrofóbica e, devido a sua composição lipídica, podem auxiliar na absorção desses compostos pelo trato intestinal e conferir um alto valor nutricional.

Dentre os métodos de produção de lipossomas, poucos podem ser considerados escalonáveis, o que dificulta sua utilização especialmente pela indústria alimentícia. A técnica de hidratação de prolipossomas se apresenta como um método simples, facilmente escalonável, que não faz uso de equipamentos caros, possível de ser aplicado nas indústrias de alimentos. Na literatura, pouco se encontra sobre a produção de prolipossomas com o objetivo de se produzir lipossomas encapsulando um bioativo, mas poucos estudos contemplam a coencapsulação de mais de um bioativo na mesma estrutura.

Devido à conhecida instabilidade das dispersões de lipossomas multilamelares, pode-se tornar imprescindível o uso de estabilizantes nas formulações a fim de impedir o fenômeno de separação de fases. Diversos hidrocoloides são utilizados pela indústria de alimentos com o propósito de estabilizar emulsões alimentícias, sendo as gomas guar e xantana dois dos mais encontrados. As vantagens de se utilizar polissacarídeos como estabilizantes em alimentos incluem sua origem natural e ausência de valor calórico.

O objetivo da presente Dissertação de Mestrado foi produzir lipossomas multilamelares estáveis coencapsulando curcumina e vitamina D₃ pelo método de

hidratação de prolipossomas, utilizando-se misturas de goma xantana, goma guar e inulina como estabilizantes. As dispersões lipossomais foram caracterizadas quanto ao seu diâmetro médio, potencial zeta, colorimetria instrumental e quantificação de bioativos encapsulados, ao longo da armazenagem sob refrigeração. A microestrutura das vesículas também foi analisada utilizando-se calorimetria diferencial de varredura (DSC), espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS), bem como análises reológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipossomas: estrutura, propriedades e aplicações na indústria de alimentos

2.1.1 Estrutura e propriedades

Lipossomas, também chamados de vesículas lipídicas, são dispersões coloidais compostas majoritariamente por fosfolipídios que, em meio aquoso, se agrupam formando bicamadas lipídicas (conforme mostrado na Figura 1). Essas bicamadas, por sua vez, tendem a se agregar entre si formando vesículas, incorporando parte do meio no qual estão inseridas (LASIC, 1993; TAYLOR et al., 2005). De acordo com Muthu e Singh (2009), diversas aplicações são atribuídas aos lipossomas devido às suas propriedades estruturais, como o tamanho submicrométrico ou nanométrico, a alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, certa permeabilidade da membrana para diferentes solutos e compatibilidade com compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, esta última graças à característica anfifílica dos fosfolipídios (LASIC, 1993).

Figura 1. Esquema simplificado da formação de um lipossoma

Fonte: Adaptado de: <<http://www.healthproductsdistributors.com/wp/wp-content/uploads/2015/12/1-liposome-diagram.jpg>>

O fosfolipídio mais utilizado atualmente na produção de lipossomas é também o mais abundante na natureza, a fosfatidilcolina (também chamada de lecitina), composta por duas cadeias de hidrocarbonetos, constituindo sua parte apolar hidrofóbica, e uma cabeça polar hidrofílica composta por um grupo fosfocolina (Figura 2) (KOYNOVA et al., 1998). A fosfatidilcolina comercial é geralmente um produto derivado da gema de ovo, de grãos de soja e, raramente, do coração e medula espinhal de bovinos, sendo composta por ácidos graxos com diferentes graus de insaturação. Outras vantagens do

uso da fosfatidilcolina incluem seu baixo custo e a ausência de reatividade química e de grupamentos eletricamente carregados.

Os fosfolipídios são moléculas anfifílicas capazes de incorporar substâncias lipofílicas/hidrofóbicas como vitaminas, corantes e nutrientes, às bicamadas dos lipossomas. Para tal, é necessário realizar a inserção desses compostos em misturas lipídicas, submetendo-as a subsequente processamento para formação de vesículas (MOZAFARI et al., 2008).

Figura 2. Estrutura química da fosfatidilcolina

Fonte: Adaptado de: <<http://drogaspsicoactivas.com/wp-content/uploads/2015/02/fosfatidilcolina.jpg>>

O tamanho médio dos lipossomas pode variar entre 0,05 e 1 μm dependendo do método pelo qual são produzidos (BARENHOLZ et al., 1996; KAMATH et al., 2000; MOZAFARI et al., 2002). A classificação dos lipossomas pode ser feita a partir do seu tamanho e da sua estrutura; lipossomas unilamelares possuem apenas uma bicamada lipídica em sua composição, diferindo apenas no diâmetro (*small unilamellar vesicles* - SUV / *large unilamellar vesicles* - LUV), enquanto lipossomas multilamelares possuem maior tamanho e são constituídos por mais de uma bicamada lipídica (*multilamellar vesicles* - MLV / *multivesicular vesicles* - MVV), diferindo na disposição das mesmas (Tabela 1). Os MVV são estruturas constituídas por uma vesícula de tamanho micrométrico, cujo interior é composto por número randômico de vesículas de menor

tamanho; os MLV, por outro lado, consistem em estruturas onde as bicamadas lipídicas estão dispostas de forma concêntrica (NEW, 1990). A Figura 3 mostra os tipos de lipossomas encontrados na literatura.

Tabela 1. Classificação dos lipossomas baseada em parâmetros estruturais (diâmetro médio e lamelaridade)

Fonte: Adaptado de Barenholz et al. (1996)

Tipo de lipossoma	Diâmetro médio	Abreviatura
Vesículas unilamelares pequenas	20 – 100 nm	SUV
Vesículas unilamelares grandes	Maior que 100 nm	LUV
Vesículas multilamelares	Maior que 0,5 μm	MLV
Vesículas multivesiculares	Maior que 1,0 μm	MVV

Figura 3. Diferenças estruturais entre alguns dos tipos de lipossomas encontrados na literatura

Fonte: Adaptado de Taylor et al. (2005)

Os lipossomas multilamelares (MLV) apresentam algumas vantagens em relação aos demais tipos de vesículas existentes, principalmente no que refere à sua produção; a maioria dos métodos para produção de MLV não faz uso de reagentes de alto custo e, além do mais, consistem em processos escalonáveis. Uma característica funcional importante atribuída aos lipossomas do tipo MLV é sua capacidade de encapsular uma maior quantidade de bioativos, especialmente hidrofóbicos, quando comparados aos lipossomas SUV/LUV (SHARMA, 1997, LASCH et al., 2003; TAYLOR et al., 2007; JI et al., 2011).

As propriedades e estabilidade dos lipossomas podem ser influenciadas por fatores intrínsecos (concentração de fosfolipídios, composição, natureza do bioativo encapsulado) e extrínsecos (pH, força iônica, temperatura). Segundo Taylor et al. (2005), a instabilidade química dos lipossomas pode estar relacionada à oxidação e à

hidrólise da parte polar dos fosfolipídios constituintes; essa instabilidade pode ser apresentada na forma de separação entre as fases lipídica e aquosa ou no aumento do tamanho característico da vesícula, devido às agregações das bicamadas lipídicas, resultando na perda do bioativo encapsulado. Dessa forma, faz-se necessária uma maior atenção à escolha do binômio fosfolipídio/bioativo a ser utilizado, de forma que a estabilidade da dispersão, sob condições específicas de trabalho, seja otimizada.

É importante ressaltar que uma das vantagens do emprego de lipossomas para microencapsulação de bioativos altamente hidrofóbicos está relacionada à sua composição lipídica. Tal tipo de matriz pode ser capaz de aumentar a biodisponibilidade de bioativos lipofílicos incorporados nos alimentos (PARADA et al., 2007; PORTER et al., 2007; AHMED et al., 2012). A utilização de sistemas lipídicos visando o aumento da bioacessibilidade de certos bioativos no organismo já é uma realidade na indústria farmacêutica, sendo essa técnica chamada de *Lipid-Based Drug Delivery* (LBDD) e consiste em empregar diferentes sistemas constituídos por matrizes lipídicas como carreadores. Emulsões, nanoemulsões, partículas lipídicas sólidas e lipossomas podem ser citados como alguns desses mecanismos (IMMORDINO; DOSIO, CATTEL, 2006; GHOSH; MURTHY, 2006; KHAN et al., 2006; SAMAD; SULTANA; AQIL, 2007; MCCLEMENTS, 2011; EKAMBARAM; SATHALI; PRIYANKA, 2012). Nesse contexto, os lipossomas vêm sendo estudados visando o tratamento de doenças como o câncer de pulmão, o diabetes do tipo 2, dentre outras (SAFARI; ZARNEGAR, 2013; DERGUNOV et al., 2015; LEE et al., 2015). A eficiente aplicabilidade provém da boa capacidade das vesículas em aprisionar os bioativos de interesse em seu interior, permitindo também a liberação destes em regiões específicas do corpo humano (TAYLOR et al., 2005). Uma vantagem dos sistemas lipossomais em comparação com outras estratégias de encapsulação é que tais estruturas são compostas por matérias primas biocompatíveis e biodegradáveis (TAYLOR et al., 2005; THOMPSON et al., 2006).

2.1.2 Aplicação dos lipossomas na indústria de alimentos

Diversos estudos encontrados na literatura mostram o interesse a respeito da encapsulação de bioativos naturais em lipossomas, a maioria deles hidrofóbicos, como vitaminas, corantes, óleos essenciais, fitosteróis, peptídeos, flavonoides e carotenoides, visando posterior aplicações em alimentos (Tabela 2). Os lipossomas surgem como

alternativa para a incorporação desses compostos em produtos alimentícios, uma vez sua matriz lipídica podem aumentar o valor nutricional do produto no qual serão aplicados, além do fato de que grande parte das formulações existentes é constituída por um meio majoritariamente aquoso, contornado o problema da hidrofobicidade. Por esse motivo, alimentos como leite, iogurtes, queijos e sucos são utilizados como matrizes de incorporação (PICON et al., 1993; PICON et al., 1995; XIA e XU, 2005; RODRIGUEZ-NOGALES e DELGADILLO-LÓPEZ, 2006; TONIAZZO et al., 2014; MARSANASCO et al., 2015).

Sabe-se que essas estruturas podem também contribuir na modificação do *flavor* de alguns alimentos a partir da liberação de ingredientes de forma sustentada (CHAUDHRY et al., 2008). Outros estudos envolvendo lipossomas na área de alimentos incluem a produção de novos materiais de embalagem com propriedades de barreira antimicrobianas e o desenvolvimento de nanossensores capazes de detectar o grau de conservação dos alimentos durante o transporte e armazenamento (TAYLOR et al., 2005; LA TORRE e PINHO, 2015).

Alguns dos principais problemas encontrados para a efetiva aplicação dos lipossomas em matrizes alimentícias envolvem a dificuldade de realizar o escalonamento do processo, bem como a falta de estudos e pesquisas sobre o uso das vesículas nesse ramo da Indústria. Outra limitação existente é o custo do processo, uma vez que se utilizam equipamentos específicos para a produção de lipossomas com diâmetro reduzido como, por exemplo, homogeneizadores de alta pressão e microfluidizadores, ambos com custo elevado (CARVALHO et al., 2015; TONIAZZO et al., 2014).

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

Bioativo encapsulado	Tipo de lipossoma	Referência
Nisina	MLV	(Were et al., 2004)
β -galactosidase	LUV	(Rodriguez-Nogales e Delgadillo, 2005)
Sulfato ferroso	SUV	(Kosaraju et al., 2006)
β -galactosidase	MLV, SUV	(Rodriguez-Nogales et al., 2006)
Nisina	SUV	(Taylor et al., 2007)
Óleo essencial de <i>Eugenia uniflora</i> L.	MLV	(Yoshida et al., 2010)
Extrato de ukon (<i>Curcuma longa</i> L.)	SUV, MLV	(Takahashi et al., 2008)
Extrato de enzima comercial (Debitrase DBP20)	SUV	(Nongonierma et al., 2009)
Nisina	MLV	(Malheiros et al., 2010)
Polifenóis de chá verde	SUV	(Lu et al., 2011)
Vitamina C e vitamina E	MLV	(Marsanasco et al., 2011)
Glicinato ferroso	Nanovesículas	(Ding et al., 2011)
Luteína	MLV	(Xia et al., 2012)
Ácido ascórbico	LUV	(Wechtersbach et al., 2012)
L-carnosina	MLV, LUV	(Maherani et al., 2012)
Hidrolisado protéico de caseína	MLV	(Yokota et al., 2012)
Ácido ascórbico	SUV	(Farhang et al., 2012)
β -caroteno	Nanosuspensão	(De Paz et al., 2012)
β -caroteno	MLV	(Moraes et al., 2013)
β -caroteno	MLV	(Toniazzo et al., 2014)
Quercetina + Óleo de Peixe	MLV	(Frenzel et al., 2015)
Óleo essencial de cravo da Índia	SUV	(Sebaaly et al., 2015)
Catequina (polifenol presente no chá verde)	SUV	(Rashidinejad et al., 2015)
Fitosteróis	SUV	(Zhao et al., 2015)
Óleo de peixe	SUV	(Amnuait, 2015)
Curcumina	LUV	(Jin et al., 2016)
Vitamina C	MLV	(Liu et al., 2016)
Vitamina B ₁₂	SUV	(Bochicchio et al., 2016)
Ergocalciferol	SUV	(Bochicchio et al., 2016)
Eugenol	MLV	(Sebaaly et al., 2016)
Extrato de semente de uva	MLV	(Gibis et al., 2016)
Óleo de peixe	MLV	(Ghorbanzade et al., 2017)
Ácido docosahexaenóico e Ácido eicosapentaenoico	MLV	(Sahari et al., 2017)
Curcumina	MLV	(Silva et al., 2017)

2.2 Métodos de produção de lipossomas

Atualmente, diversos métodos de produção de lipossomas vêm sendo estudados. Algumas técnicas escalonáveis para produção são citadas por Laouini et al. (2012) e incluem: liofilização, método de aquecimento, evaporação de fase reversa com fluido supercrítico, injeção de etanol, hidratação de filme lipídico seco e hidratação de prolipossomas. Alguns processos mecânicos de produção também são encontrados na literatura, como a homogeneização a alta pressão e a microfluidização, já citados anteriormente. Patil e Jadhav (2014) discutiram a necessidade do desenvolvimento de métodos de produção de lipossomas que não fazem uso de solventes orgânicos ou detergentes, uma vez que ambos podem ser tóxicos ao organismo caso sejam ingeridos.

2.2.1 Método da hidratação do filme lipídico seco

O método consiste basicamente na hidratação de um filme lipídico produzido a partir da evaporação do solvente empregado na dissolução dos fosfolipídios, geralmente clorofórmio ou uma mistura clorofórmio/metanol (MEURE, FOSTER e DEHGhani, 2008). Para a hidratação do filme lipídico seco geralmente se utilizam soluções salinas, soluções tampão ou água destilada (DUA; RANA; BHANDARI, 2012). A temperatura utilizada durante o processo de hidratação depende da natureza e da temperatura de transição gel-líquido cristalino (T_m) do fosfolipídio, visto que, em temperaturas maiores que a T_m , as cadeias de hidrocarbonetos do lipídio estão em estado menos ordenado permitindo a hidratação dos radicais hidrofílicos (BATISTA *et al.*, 2007). A temperatura do rotaevaporador, equipamento geralmente utilizado para realizar a evaporação do solvente, deve ser controlada e condizente com a matéria prima lipídica utilizada, a fim de evitar reações de hidrólise (DUA; RANA; BHANDARI, 2012). Geralmente são produzidas, a partir desta técnica, dispersões bastante heterogêneas e com baixo potencial de encapsulação. Em contrapartida, trata-se de um método rápido, simples e que não requer uma grande quantidade de energia a ser adicionada ao sistema (BARENHOLZ et al., 1977; LASCH et al., 2003; TAYLOR et al., 2007). A Figura 4 mostra um esquema de produção de lipossomas pelo método aqui descrito, onde (1) adição da fase aquosa a um filme lipídico seco (obtido por evaporação de solvente orgânico); (2) agitação e desprendimento do filme da parede do balão; (3) suspensão de MLV.

Figura 4. Esquema de produção de lipossomas por hidratação do filme lipídico seco (Fonte: PRÓPRIA, 2015)

2.2.2 Método de homogeneização a alta pressão

Os homogeneizadores a alta pressão, juntamente com os homogeneizadores ultrassônicos, são os principais equipamentos utilizados pela indústria para produção de lipossomas e nanoemulsões (ANTON, BENOIT, SAULNIER, 2008). Os métodos que os empregam são denominados “de alta energia” e têm como vantagem a ausência do uso de solventes orgânicos durante as etapas de processamento, o que os torna atrativos para a indústria de alimentos (SOUTO; MÜLLER, 2006). Não se recomenda o emprego desse método ao se trabalhar com misturas lipídicas, visto que o mesmo não garante uniformidade na composição dos lipossomas produzidos.

A homogeneização a alta pressão utiliza pressões que variam entre 50 e 100 MPa e ocorre em três etapas, sendo elas: (1) aquecimento das fases aquosa e oleosa, separadamente; (2) mistura das fases para formação de lipossomas multilamelares (MLV); (3) diminuição do tamanho médio da vesícula a partir de homogeneização (ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008; DE ASSIS et al., 2012). Fernandez et al. (2004) atribuem a formação de nanoestruturas à geração de energia mecânica a partir da alta tensão de cisalhamento, uma vez que ocorre a ruptura das gotículas micrométricas.

A Figura 5 esquematiza a diminuição do tamanho de lipossomas através da presença de uma válvula existente no homogeneizador à alta pressão. Esse dispositivo é encontrado em diversas geometrias e consiste em duas partes, sendo uma delas móvel e a outra fixa. Primeiramente, produz-se a dispersão de lipossomas em tanques agitados. A dispersão é então bombeada para dentro do equipamento, a alta pressão, colide com o anel de impacto existente nos arredores da válvula, levando a uma quebra na estrutura dos lipossomas, que se subdividem em estruturas menores devido à queda brusca de

pressão e ao impacto sofrido (BARNADAS-RODRÍGUEZ; SABÉS, 2001; TAYLOR et al., 2005).

Figura 5. Esquema de um homogeneizador de alta pressão (Fonte: PRÓPRIA, 2015)

2.2.3 Microfluidização

O processo de microfluidização se assemelha à homogeneização a alta pressão, sendo extensivamente empregado na indústria alimentícia para preparo de nanodispersões (JAFARI et al., 2006). A técnica consiste primeiramente na produção de dispersão de lipossomas MLV em tanques agitados. A corrente de entrada, contendo a dispersão de lipossomas, é então dividida em duas correntes distintas, direcionadas para a cavidade interna de uma câmara existente no equipamento, a partir de canais com orifícios de diâmetro reduzido, e fazendo com que ambas colidam entre si. O choque e a interação entre as vesículas acarretam na diminuição do tamanho dos lipossomas resultantes. A microfluidização utiliza pressões que chegam a 10 MPa (BARNADAS-RODRÍGUEZ; SABÉS, 2001; MOZAFARI et al., 2008). O esquema de funcionamento de um microfluidizador é mostrado na Figura 6. Algumas desvantagens desse método incluem a dificuldade em se trabalhar com misturas lipídicas, visto que não há uniformidade na composição dos lipossomas produzidos, o alto custo do equipamento e a necessidade de instalação de um evaporador que opere em grande escala. Não se aconselha, então, a utilização de microfluidização na produção de lipossomas encapsulando bioativos termolábeis (MAA; HSU, 1999; ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008).

Figura 6. Esquema de um microfluidizador (Fonte: PRÓPRIA, 2015)

2.2.4 Método da injeção de etanol

Esse método consiste na injeção rápida de uma corrente etanólica contendo a dispersão de fosfolipídios em uma solução aquosa. Do ponto de vista tecnológico, essa técnica é relativamente rápida e simples, além de ser facilmente escalonável (MEURE; FOSTER; DEGHANI, 2008) e possibilitar uma diminuição no índice de degradação do bioativo ao final do processo (JUSTO e MORAES, 2011). Esse procedimento resulta em vesículas unilamelares pequenas (SUV), altamente estáveis (JUSTO e MORAES, 2005). Para isso, um rigoroso controle dos diferentes parâmetros do processo é necessário principalmente em relação aos seguintes parâmetros: composição e concentração lipídica, a taxa e pressão de injeção de etanol aplicadas, temperatura e intensidade de agitação (MAITANI et al., 2001; JUSTO e MORAES, 2011).

Pode-se citar como desvantagens desse processo a heterogeneidade no tamanho das vesículas formadas (entre 30 e 110 nm), a dificuldade em se retirar todo o etanol presente devido à formação de azeótropos, o que contribui na degradação de certos bioativos, e a diluição não controlada da dispersão (DUA; RANA; BHANDARI, 2012). Esquemas de produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol, em escalas laboratorial e industrial, são mostrados nas Figuras 7 e 8.

Figura 7. Esquema de produção laboratorial de lipossomas por injeção de etanol (Fonte: PRÓPRIA, 2015)

Figura 8. Esquema de produção industrial de lipossomas por injeção de etanol

Fonte: Adaptado de JUSTO E MORAES (2010)

2.2.5 Método da evaporação em fase reversa

Esse método consiste em produzir, através de sonicação, uma emulsão contendo fosfolípidios, algum solvente orgânico (sendo os mais comumente utilizados, o éter isopropílico, o éter dietílico e misturas de clorofórmio com éter isopropílico) e uma solução tampão contendo o bioativo a ser encapsulado. O solvente orgânico é removido do sistema a partir da redução da pressão formando um gel viscoso. Os lipossomas são formados quando o solvente remanescente é retirado por rotaevaporação a baixa pressão (DUA; RANA; BHANDARI, 2012). Esse método é bastante utilizado na encapsulação de proteínas e ácidos nucleicos, porém apresenta algumas desvantagens como, por

exemplo, a exposição dos bioativos ao solvente orgânico, a necessidade de sonicação, que pode contribuir com a degradação do material a ser encapsulado e a heterogeneidade dos lipossomas formados (SZOKA; PAPAHAADJOPOULOS, 1978; NEW, 1990; TAYLOR et al., 2007). As vesículas produzidas a partir desse método apresentam caráter multimodal e são frequentemente submetidas a um segundo processo de extrusão com o propósito de se obter dispersões de menor tamanho e mais homogêneas (NEW, 1990a).

A Figura 9 mostra um esquema de produção de lipossomas a partir deste método. Em (A) tem-se a adição dos fosfolipídios em solvente orgânico; em (B) ocorre a adição da solução tampão contendo o bioativo; forma-se, em (C), a emulsão água em óleo (O/W) através de um processo de sonificação; o solvente orgânico é então evaporado em (D); obtém-se em (E) uma estrutura semelhante a um gel; por fim, em (F), a dispersão de lipossomas é formada através do colapso do gel sob agitação em vórtex.

Figura 9. Esquema de produção de lipossomas por evaporação em fase reversa

Fonte: Adaptado de SZOKA JUNIOR; PAPAHAADJOPOULOS (1978)

2.2.6 Método de remoção de detergente

Algumas das grandes vantagens desse método incluem a amenidade das condições de processamento utilizadas, resultando em uma maior padronização do tamanho dos lipossomas obtidos (do tipo LUV) e sua excelente reprodutibilidade. Consiste na solubilização de uma mistura fosfolipídica em dispersão de moléculas de detergente, formando compostos intermediários (micelas mistas) de detergente/lipídio. Os lipossomas são formados quando se remove o detergente a partir de técnicas

específicas, como a diálise (LASIC, 1993), cromatografia de permeação em gel com coluna ou por adsorção (DUA; RANA; BHANDARI, 2012).

O processo de produção de lipossomas através da remoção de detergente é lento, quando comparado aos demais, e limita-se à necessidade de se utilizar uma quantidade reduzida de fosfolípido (MAHERANI et al., 2011). A Figura 10 mostra o esquema de formação dos lipossomas por esse método.

Figura 10. Esquema de produção de lipossomas por remoção de detergente (Fonte: PRÓPRIA, 2015)

2.2.7 Método da hidratação de prolipossomas

Relatados pela primeira vez por Payne et al. (1986), os prolipossomas são pós de fosfolípidios que surgiram como uma alternativa para a demanda de sistemas carreadores contendo bioativos, uma vez que, por não estarem dispersos em meio aquoso, evitam problemas de instabilidade como agregação e fusão das vesículas. Além do mais, por se apresentarem na forma sólida, a distribuição, transporte, pesagem (SHAJI; BHATIA, 2013), dosagem (NEKKANTI et al., 2014) e até mesmo a comercialização (PAYNE et al., 1986) desses sistemas podem ser facilitadas.

Os prolipossomas podem ser produzidos a partir de diferentes técnicas, dentre elas, liofilização (FEI et al., 2009; GUAN et al., 2012), sublimação (ZHANG; ZHU, 1999), por fluidos supercríticos (XIA et al., 2012; LIU et al., 2014) e spray drying (KIKUCHI; YAMAUCHI; HIROTA, 1991; ALVES; SANTANA, 2004; TONIAZZO et al., 2014; ZHENG et al., 2015; HAO et al., 2016). O método de hidratação de prolipossomas é uma boa opção principalmente quando se objetiva o escalonamento do processo (PAYNE et al., 1986).

A produção de prolipossomas por spray drying é interessante, visto que neste caso se faz uso de um equipamento amplamente encontrado na indústria de alimentos.

Sabe-se, porém, que o rendimento resultante desse processo é baixo, além de utilizar temperaturas elevadas, o que limita as opções de bioativos a serem encapsulados, visto que vários deles são termossensíveis (TONIAZZO, 2013).

Os prolipossomas diferem-se dos filmes lipídicos secos uma vez que a solução contendo o bioativo é seca sobre sistemas particulados como sorbitol, cloreto de sódio, lactose ou polissacarídeos. Quando hidratadas, essas estruturas produzem lipossomas do tipo multilamelar (MLV), ao contrário daqueles produzidos por hidratação de filme lipídico seco que, por sua vez, produzem lipossomas heterogêneos dos tipos unilamelar e multilamelar (SUV/MLV). O equipamento de rotaevaporação utilizado para produção de prolipossomas deve garantir que a solução fosfolipídica seja aspergida/gotejada sobre o carreador particulado introduzido no balão volumétrico acoplado na extremidade do rotaevaporador. Parâmetros como temperatura e vazão de bombeamento devem ser controlados com o propósito de garantir a dispersão homogênea dos bioativos sobre os carreadores. Devido à grande área superficial garantida por esse método, a produção de prolipossomas apresenta vantagens sobre a produção de filme lipídico seco como, por exemplo, uma maior rapidez na formação dos lipossomas, visto que é possível realizar a hidratação dos prolipossomas logo após sua produção, além de garantir homogeneidade no tamanho médio das vesículas formadas e possibilitar o armazenamento por um longo período de tempo (RANADE; CANNON, 2011).

Uma modificação do método de produção de prolipossomas foi sugerido e testado por Elhissi et al. (2006) e consiste em realizar o gotejamento de solução etanólica contendo fosfolipídios e o bioativo a ser encapsulado, sob evaporação rotativa a vácuo, sobre carreador micronizado (no caso, sacarose micronizada). Os lipossomas são formados a partir da hidratação do pó resultante (Figura 11), sob condições controladas de agitação e temperatura (XIA et al., 2005; TONIAZZO et al., 2014). A hidratação dos prolipossomas em meios aquosos (contendo ou não sais) permite que os fosfolipídios constituintes rapidamente se dispersem no meio, possibilitando a formação da suspensão lipossomal contendo o bioativo de interesse em seu interior (PAYNE et al., 1986).

Elhissi et al. (2006) também verificaram que a utilização de sacarose como carreador micronizado durante a produção de prolipossomas possibilitou a formação de lipossomas mais estáveis, sem separação de fases ou perda de bioativo, quando comparados a lipossomas gerados pelo método de hidratação do filme lipídico seco.

Figura 11. Esquema de produção de lipossomas por hidratação de prolipossomas (Fonte: PRÓPRIA, 2015)

2.3 A Técnica da Coencapsulação

A coencapsulação é uma prática frequentemente utilizada nas indústrias farmacêuticas e tem por objetivo encapsular, em um mesmo carreador, dois ou mais bioativos de interesse. Lipossomas já vêm sendo utilizados com esse propósito, conforme alguns estudos encontrados na literatura farmacêutica/médica (TARDI et al., 2007; HALWANI et al., 2008), porém, nota-se que a técnica é pouco abordada na área de alimentos. O principal objetivo ao se coencapsular mais de um bioativo no mesmo carreador é promover o aumento da bioatividade seja de um, seja de mais compostos presentes, acarretando no aumento da funcionalidade total da estrutura (HALWANI et al., 2008).

Chen et al. (2012) justificaram a coencapsulação de fitosteróis e óleo de peixe em lipossomas após verificarem que estudos anteriores comprovavam o efeito sinérgico dos componentes no combate a doenças cardiovasculares, uma vez que ambos são capazes de reduzir a taxa de colesterol sérico no organismo (KHANDELWAL et al., 2009; MICALLEF; GARG, 2009). Halwani et al. (2008), por sua vez, realizaram a coencapsulação de gálio e gentamicina em lipossomas para o combate da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, causadora de fibrose cística, e verificaram um aumento no poder antibiótico da gentamicina quando combinada ao metal. Na área de alimentos, Tavano et al. (2014) coencapsularam diferentes antioxidantes, sendo um lipofílico e outro hidrofílico, em niossomas com o propósito de fortificar alimentos lácteos que

auxiliem na prevenção de doenças causadas pelo stress oxidativo, e verificaram que houve um aumento da função antioxidante da estrutura contendo dois bioativos quando comparada à estrutura contendo apenas um deles.

2.4 Bioativos hidrofóbicos empregados: curcumina e vitamina D₃

Poucos estudos são encontrados na literatura a respeito da encapsulação de curcumina em lipossomas produzidos por hidratação de prolipossomas, sendo que os existentes não fazem uso do método de recobrimento de sacarose (JIA et al., 2016). O mesmo pode ser dito a respeito de trabalhos envolvendo a encapsulação de vitamina D₃, que utilizam, em sua maioria, prolipossomas obtidos comercialmente (BANVILLE; VUILLEMARD; LACROIX, 2000). Nos tópicos subsequentes serão abordadas as principais características estruturais e funcionais desses dois bioativos.

2.4.1 Curcumina: definições e discussão sobre sua possibilidade na substituição de corantes amarelos artificiais

A principal função da utilização de corantes pela indústria alimentícia é tornar os alimentos mais atrativos à percepção do consumidor. Os corantes artificiais são atualmente os mais utilizados para tal propósito (Figura 12) e fornecem uma ampla variedade de cores podendo então dispor, ao fabricante de alimentos, uma gama infinita de tons. A maioria dos corantes artificiais apresenta alta estabilidade a fatores extrínsecos e intrínsecos, como luz, oxigênio, calor e pH, além de conferir uniformidade na cor, isenção de contaminação microbiológica e custo de produção relativamente baixo. Apesar dessas vantagens, a substituição por corantes naturais tem sido gradativa (PRADO; GODOY, 2003).

Figura 12. Distribuição mundial (em porcentagem) do uso de corantes pela indústria alimentícia

Fonte: DOWNHAM; COLLINS (2000)

A tonalidade atribuída aos corantes artificiais está relacionada à distribuição eletrônica das ligações carbono-nitrogênio e carbono-enxofre presentes em suas moléculas, diferentemente da coloração fornecida pelas ligações duplas conjugadas dos corantes naturais. Essa diferença também explica o porquê do potencial carcinogênico dos corantes artificiais (LAURO; FRANCIS, 2000).

Pela legislação brasileira, através das Resoluções nº 382 a 388, de 9 de agosto de 1999, da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), são autorizados os seguintes grupos de corantes artificiais: azo (amaranto, azorrubina, tartrazina, amarelo crepúsculo, ponceau 4R e vermelho 40), trifenilmetanos (azul patente V, verde rápido e azul brilhante), indigóides (indigotina) e xantenos (eritrosina). Dentre os corantes do tipo azo, a tartrazina, cuja fórmula química é apresentada na Figura 13, tem despertado uma maior atenção de toxicologistas e alergistas, sendo apontado como o responsável por várias reações adversas, causando desde asma até urticária (KUREK; GRUBSKA-SUCHANUK, 2001; AL-DEGS, 2009; KASHANIAN e ZEIDALI, 2011; SHAWISH et al., 2013). Alguns estudos relacionam esse corante a outros problemas como hiperatividade, ansiedade e câncer (SARAHEY, FARMANY e MORTAZAVI, 2013). Estima-se que uma em cada 10 mil pessoas apresente reações a esse corante (HANNESSEY, 2012), sendo este permitido em muitos países, como Canadá, Estados Unidos e União Europeia, sendo um dos corantes mais utilizados pela indústria de alimentos, nas áreas de panificação, laticínios, doces e bebidas (NETTO, 2009).

Figura 13. Estrutura química do corante amarelo tartrazina

Fonte: Adaptado de REVISTA INSUMOS (2015)

Desde 1981, o FDA exige que o corante tartrazina seja listado no rótulo de todos os produtos que o contenham, de modo que os consumidores sensíveis possam evitá-lo. Segundo a Resolução RDC nº. 340 da ANVISA (BRASIL, 2002), “as empresas fabricantes de alimentos que contenham em sua composição o corante tartrazina (INS

102) devem obrigatoriamente declarar na rotulagem, na lista de ingredientes, o nome do corante tartrazina por extenso”.

Uma alternativa para o uso dos corantes artificiais em produtos alimentícios, com o propósito de diminuição dos malefícios por eles causados, é sua substituição pelos corantes ditos naturais. Os pigmentos naturais são aqueles extraídos diretamente de substâncias de origem animal ou vegetal (SELVAN et al., 2015). No que se refere à tartrazina, tem-se a curcumina como uma substituinte em potencial.

A curcumina, nome dado ao principal corante presente no rizoma da espécie *Curcuma longa* L. (Figura 14), é atualmente utilizada como corante e condimento, sendo potencialmente comercializada também em países Índia, China, Paquistão, Peru, Chile, dentre outros, como conservante de alimentos (ARRUE et al., 2015; KUMAR et al., 2016; LI et al., 2016). Contém substâncias antioxidantes e antimicrobianas que lhe conferem a possibilidade de emprego nas áreas de cosméticos, têxtil, medicinal e de alimentos (KHALIL e ALI, 2011; BORRA et al., 2013; NAKSURIYA e OKONOGHI, 2015).

Figura 14. Rizoma de *Curcuma longa* L. e curcumina desidratada

Fonte: <http://imgsapp.revistaencontro.com.br/app/noticia_133890394703/2015/01/21/152000/20150121165003827559o.jpg>

Os antioxidantes são moléculas capazes de neutralizar a ação dos radicais livres antes que os mesmos atuem na oxidação lipídica e proteica das paredes celulares, além de evitar possíveis mecanismos de mutação. Na indústria de alimentos, diversos antioxidantes sintéticos vêm sendo empregados, dentre eles, o 2,3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA), o hidroxitolueno butilado (BHT) e o terc-butil-hidroquinona (TBHQ), porém vê-se uma necessidade em substituí-los visto que são tóxicos ao fígado a longo prazo, além de serem potencialmente carcinogênicos (GRICE, 1986; WICHI, 1988; BORRA et al., 2013).

Sendo assim, o desenvolvimento de técnicas para a utilização de antioxidantes de origem natural é cada vez mais requerido pela indústria. Os compostos fenólicos vêm sendo abundantemente estudados uma vez que previnem a ação dos radicais livres além de serem biodegradáveis e não-tóxicos (LIM et al., 2002; LUO et al., 2002).

A cúrcuma contém quatro pigmentos amarelos distintos (Figura 15) – curcumina, demetoxicurcumina, bis-demetoxicurcumina e ciclocurcumina – estando todos associados a diferentes propriedades nutraceuticas, atuando principalmente como antioxidantes, anti-inflamatórios e imunomoduladores (JAYAPRAKASHA; RAO; SAKARIAH, 2006; RAHMAN; ANGAWI; KADI, 2015). As estruturas desses compostos são mostradas na Figura 15. Diversos estudos avaliam os atributos benéficos atribuídos à curcumina, no tratamento de doenças como, por exemplo, o mal de Alzheimer, esclerose múltipla, alergias, artrite, psoríase, diabetes tipo II e doenças inflamatórias cardiovasculares e intestinais (YEH et al., 2005; KIM et al., 2007; MOON et al., 2008; WEISBERG et al., 2008; LAI et al., 2009; XIE et al., 2009; EPSTEIN et al., 2010; GIRI et al., 2013).

Figura 15. Estrutura e concentração dos curcuminoides encontrados na raiz de *Curcuma longa*

Fonte: Adaptado de SRIVASTAVA et al. (2011)

A maioria das doenças previamente citadas está intimamente relacionada com a formação de radicais livres, moléculas produzidas a partir do consumo de oxigênio pelas células. Tais radicais incluem os ânions superóxidos (O_2^-) e as hidroxilas (OH^-), compostos importantes nas reações de produção de energia e na regulação do crescimento das células, mas que são potencialmente perigosos uma vez que atacam a estrutura do DNA e as estruturas lipídicas presentes nas paredes celulares (BORRA et al., 2013).

A curcumina apresenta aspecto cristalino, sendo solúvel em etanol e pouco solúvel em água, portanto, não sendo possível sua aplicação direta em alimentos; sendo assim, é comum misturar a curcumina com solventes e emulsificantes de grau alimentício. Apresenta alta sensibilidade à luz, fator que usualmente limita o seu emprego em alimentos, uma vez que reações de oxidação são desencadeadas. A curcumina é usada também em combinação com outros corantes, como o urucum, em condimentos, sobremesas, sorvetes, iogurtes e óleos (FRANCIS, 1996).

O uso de lipossomas pode ser útil para o aumento da estabilidade da curcumina em meios aquosos, assim como para possibilitar sua dispersão em meios aquosos devido à sua matriz lipídica, visto que se trata de um composto altamente hidrofóbico (CHEN et al., 2012; EZHILARASI et al., 2013; GHALANDARLAKI et al., 2014; SARI et al., 2015).

2.4.2 A vitamina D: propriedades e um panorama de sua importância nos dias atuais

A vitamina D é encontrada na natureza sob duas formas: vitamina D₂ (ergocalciferol) e vitamina D₃ (colicalciferol) (Figura 16). A primeira, encontrada em plantas, é produto da irradiação de luz ultravioleta em moléculas de ergosterol, podendo ser consumida na forma de suplemento ou após ingestão de alimentos fortificados. A segunda, por sua vez, é produto da irradiação de luz ultravioleta em moléculas de 7-deidrocolesterol, podendo sendo sintetizada pela epiderme humana ou consumida na forma de suplementos ou alimentos fortificados (HOLICK, 2007; LEE et al., 2008).

Figura 16. Estruturas moleculares das vitaminas D₂ e D₃

Fonte: <<http://www.robortofrancodoamaral.com.br/blog/wp-content/uploads/2014/01/vitaminas-d2-d3.png>>

Atualmente não se encontra no mercado brasileiro uma ampla variedade de alimentos fortificados com vitamina D, sendo esse um dos principais motivos da ocorrência de problemas relacionados à deficiência desta em regiões como Estados Unidos e Europa. Diferentemente do que se pensava, a carência de vitamina D não é responsável apenas por doenças ósseas em crianças, mas também por diversas doenças crônicas como câncer, asma, artrite, hipertensão, osteoporose e problemas cardiovasculares (SAITO et al., 2008; FEMKE et al. 2010; SUZANNE et al., 2010).

Alguns benefícios conferidos à ingestão de vitamina D₃ incluem a melhoria da absorção de cálcio pelo intestino e a homeostase do mesmo mineral na corrente sanguínea (KULIE et al., 2009).

A molécula precursora da vitamina D é o ergosterol (ou 7-deidrocolesterol), estrutura relativamente rígida que é incorporada pelo organismo ao ser absorvida pela camada lipídica da membrana plasmática. A produção de pró-vitamina D ocorre após incidência solar no anel aromático da molécula de ergosterol (Figura 17). A estrutura torna-se então menos rígida, promovendo um aumento da sua permeabilidade e permitindo, portanto, a incorporação de inúmeros íons em seu interior, incluindo o cálcio (HOLICK, 2007).

Figura 17. Produção de vitamina D₃ a partir do seu precursor (ergosterol)

Fonte: Adaptado de HOLICK (2007)

A produção cutânea de vitamina D₃ é constante durante a maior parte da vida, uma vez que as reservas de 7-hidrocolesterol permanecem inalteradas ao longo dos anos. O declínio começa a ser observado na velhice onde, de acordo com estudos realizados por MacLaughlin e Holick (1985), apenas 25% da quantidade de vitamina D continuam a ser sintetizados, comparando-se ao produzido por uma pessoa mais jovem, considerando-se um mesmo período de exposição solar (Figura 18).

Figura 18. Concentração de vitamina D (em nmol/L) na epiderme humana após exposição à iluminação solar

Fonte: Adaptado de Holick (2007)

Outros fatores que influenciam, além da idade, na absorção de vitamina D pelo organismo são principalmente ambientais e incluem: latitude, estação do ano e período do dia. Isso acontece devido a mudança na quantidade incidida de raios ultravioleta no planeta, que atingem a superfície em um ângulo mais oblíquo, sendo absorvidos em maior quantidade pela camada de ozônio, diminuindo sua disponibilidade (HOLICK, 1994; HOLICK, 2003).

Poucos alimentos contêm naturalmente vitamina D em sua composição, sendo alguns peixes, como o salmão, o carapau e a sardinha, suas principais fontes. Por muitos anos, a principal forma de ingestão desta vitamina foi o consumo de óleo de fígado de bacalhau. Recentemente, foi iniciada a prática de fortificação de alimentos, com o propósito de fornecer certos minerais ao organismo; sucos, alguns pães e cereais, além de leite e seus derivados, são alguns dos alimentos que vêm sendo fortificados com essa vitamina (HOLICK, 2004; TANGPRICHA et al., 2003). Com o propósito de não acarretar o fenômeno denominado hipervitaminose (ingestão acima de 150 ng/mL), deve-se atentar a população ao consumo consciente e satisfatório de vitamina D.

Cerca de 90% da quantidade diariamente requerida de vitamina D pode ser obtida com exposição à luz solar, uma vez que a pele tem uma grande capacidade de produzi-la (HOLICK, 1994; HOLICK, 2003). Porém, por volta de 80% da população, vivendo em ambiente urbano, são carentes dessa vitamina devido à permanência por longos períodos de tempo em lugares fechados, não expostos ao sol (STUPIELLO,

2014). Outras causas da deficiência de vitamina D incluem a ingestão de anticonvulsivos ou de medicamentos que diminuem a absorção de colesterol, além de doenças como síndrome de Chron, hipertireoidismo, hiperparatireoidismo, tuberculose, sarcoidose, doença celíaca e obesidade (KULIE et al., 2009).

Como qualquer componente lipofílico, ao ser digerida no trato gastrointestinal (mais especificamente no duodeno), a vitamina D é primeiramente incorporada a micelas mistas que entram nos enterócitos a partir de difusão passiva. Em seguida, as mesmas são compreendidas por quilomícrons que, por sua vez, serão ativados no fígado (PONCHON et al., 1969). Em humanos, a vitamina D₃ é três vezes melhor absorvida e mais potente que a vitamina D₂ (ARMAS et al., 2004). A ingestão diária recomendada de vitamina D, considerando um consumo adequado de cálcio/fósforo e exposição suficiente a luz solar, é de 5 µg/dia (GONNET et al., 2010).

Como se trata de um composto altamente lipofílico, a ingestão de vitamina D₃ acompanhada de lipídios, ou em uma matriz lipídica de encapsulação, por exemplo, pode ajudar no aumento de sua bioacessibilidade (PORTER et al., 2007; PARADA et al., 2007). Diversos mecanismos de entrega vêm sendo estudados com o propósito de encapsular vitaminas lipossolúveis como as vitaminas A, D e K incluindo nanoemulsões (CHEN; WAGNER, 2004; SHUKAT; RELKIN, 2011), emulsões (SANCHEZ-PAZ et al., 2008), partículas lipídicas sólidas (DINGLER et al., 1999; MA et al., 2007), microemulsões (CHIU; YANG, 1992) e partículas preenchidas com hidrogel (DE BRITTO et al., 2012).

2.5 Os polissacarídeos e sua função estabilizante

Os estabilizantes consistem em macromoléculas empregadas na produção de dispersões coloidais termodinamicamente estáveis. Um estabilizante age formando uma rede polimérica no meio disperso, instalando-se na interface óleo/água, impedindo a coalescência ou quebra das vesículas e garantindo a homogeneidade do sistema (MORAES et al., 2013; TONIAZZO et al., 2014; CARVALHO et al., 2015).

Os polissacarídeos são carboidratos de cadeia longa, insolúveis em água, que podem ser empregados como estabilizantes com o propósito de impedir a separação de fases durante a produção e armazenamento de alimentos. Na indústria, são comumente encontrados os alginatos, fosfatos dissódico ou de potássio, fumarato de estearila e sódio, glutaconato de cálcio e gomas, dentre elas, arábica, caraia, jataí, adragante, guar e

xantana. As duas últimas, por sua vez, já vêm sendo empregadas na estabilização de lipossomas, na área farmacêutica (MANCA et al., 2012; KAMINSKI et al., 2016) e na área de alimentos (CANSELL; MOUSSAOUI; LEFRANÇOIS, 2001; MORAES et al., 2013; TONIAZZO et al., 2014). Além das gomas guar e xantana, esse trabalho buscou estudar a ação estabilizante da inulina, um polissacarídeo prebiótico com capacidade espessante e gelificante (GONZALEZ-TOMÁS et al., 2008; MEYER et al., 2011).

2.5.1 Gomas guar e xantana: propriedades

A goma guar é uma galactomanana, um tipo de polissacarídeo pertencente à classe das fibras solúveis, extraída da semente da planta *Cyamopsis tetragonolobus*. Sua alta massa molecular, por volta de 100 – 2.800 kDa, é responsável por sua alta viscosidade. Consiste em uma cadeia linear de manose (β -1,4) com resíduos de galactose como cadeias laterais, na proporção de uma unidade de galactose para duas de manose (Figura 19) (MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2014). Atualmente, a goma guar é utilizada como estabilizante e espessante em diversos produtos como molhos, sopas, produtos lácteos e biscoitos. Não forma gel sozinha, porém forma dispersões altamente viscosas quando hidratadas em água fria. Pode atuar sinergicamente com outros hidrocolóides seja para enriquecer a sensação tátil bucal como para evitar cristalização em alimentos que passam por sucessivos ciclos de congelamento/descongelamento (MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2011).

Figura 19. Estrutura química da goma guar

Fonte: <<http://gomaguar.com.br/img/formula.png>>

A goma xantana é um polissacarídeo produzido a partir da fermentação de *Xanthomonas campestris*, e possui massa molecular de 200.000 Da. A estrutura química da goma xantana consta de uma espinha dorsal celulósica (ligação β -1,4)

substituída em resíduos de glucose, alternados por cadeia lateral de trissacarídeos (Figura 20). A goma xantana possui um custo baixo em comparação às demais gomas, sendo amplamente utilizada pela indústria em molhos para salada, geleias, produtos cárneos, enlatados, confeitos e sopas (KATZBAUER, 1997). Sua habilidade espessante está relacionada basicamente com sua capacidade de modificar propriedades reológicas do meio. Diferentemente de outras gomas, a goma xantana é estável em uma longa faixa de temperaturas e pH (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). É graças a essa alta estabilidade em diferentes pH que é possível o uso da goma xantana em dispersões estabilizadas por proteínas, uma vez que a mesma contribui na compensação da alta dependência da proteína pelo pH do meio, fator intimamente ligado à estabilidade das vesículas (FELIX; ROMERO; GRANERO, 2017).

Figura 20. Estrutura química da goma xantana

Fonte: <<http://0.tqn.com/d/chemistry/1/S/c/O/1/Xanthan.jpg>>

2.5.2 Inulina: propriedades e aplicabilidade em alimentos

A inulina é um oligossacarídeo composto por unidades básicas de frutose unidas entre si por ligações do tipo β (2 $\rightarrow$ 1); uma molécula de glicose pode ser adicionada ao final da cadeia a partir de uma ligação α (1 $\rightarrow$ 2) (ZULETA et al., 2001). Na natureza, a inulina pode ser encontrada em mais de 30.000 espécies vegetais, dentre as quais as raízes de chicória se destacam por apresentarem uma boa produtividade, mesmo em condições de clima moderado. Sua estrutura é mostrada na Figura 21, onde $n = 35$. Devido à presença dessas ligações glicosídicas (β), a inulina não é hidrolisada pelas

enzimas digestivas presentes no intestino delgado, sendo absorvida apenas no cólon, lhe sendo atribuída então a definição de fibra alimentar solúvel (CLEMENS, 2001).

Figura 21. Estrutura molecular da inulina

Fonte: <http://patentimages.storage.googleapis.com/WO2013037739A1/imgf000005_0001.png>

A inulina apresenta valor calórico reduzido (1,5 kcal/g) em comparação a outros carboidratos (4 kcal/g). Após ser fermentada pela microflora do cólon, a inulina é transformada em gases (10%), ácidos graxos voláteis (50%) ou encontram-se na biomassa bacteriana excretada (40%). Sendo assim, ela não aumenta nem a glicemia nem a taxa de insulina no sangue, podendo ser consumida por diabéticos (MOSCATTO et al., 2004). Alguns outros efeitos benéficos são atribuídos à inulina incluindo: efeitos competitivos com microrganismos patogênicos, imunoestimulação e imunomodulação, atividades anticarcinogênicas e antimutagênicas, diminuição dos sintomas relativos à intolerância a lactose, redução do colesterol sérico e redução da pressão arterial. Esse probiótico também estimula a síntese de vitaminas, a produção de enzimas, a estabilização da microflora e a redução do câncer de cólon (BERROCAL et al., 2002; BARRANTE et al., 2004).

A inulina é um ingrediente altamente utilizado na indústria alimentícia em países da Europa, nos EUA e no Canadá, tendo sua principal aplicação relacionada com a sua capacidade de substituir o açúcar e a gordura sem fornecer grande quantidade de calorias, sendo, portanto, muito utilizado como ingrediente em produtos light, diet ou low fat (LEITE et al., 2004). Quando presente em formulações aquosas, a inulina apresenta textura semelhante à da gordura, podendo atuar como sua substituta em produtos lácteos, massas assadas, recheios, sobremesas congeladas e molhos (NINESS, 1999; SCHALLER-POVOLNY; SMITH, 1999).

Diversos estudos na literatura investigaram a influência da inulina na textura de produtos líquidos, semissólidos e sólidos, especialmente em produtos lácteos (MEYER et al., 2011). De forma geral, em baixas quantidades a inulina não afeta as propriedades reológicas nem a qualidade sensorial do produto (uma vez que possui um sabor neutro ou muito ligeiramente doce). Conforme se aumenta sua quantidade, entretanto, seu efeito na estrutura e na textura do produto pode se tornar relevante, sendo que suas propriedades físico-químicas estão relacionadas com seu grau de polimerização (FRANCK, 2002; TUNGLAND et al., 2002; MEYER et al., 2011). A inulina possui a capacidade de interagir com outros componentes dos alimentos, como o amido e hidrocoloides (GIANNOULI et al., 2004).

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Atualmente, é uma tendência na área de alimentos a substituição de ingredientes artificiais por naturais, bem como o desenvolvimento de produtos funcionais. A problemática dos corantes artificiais amarelos, com grande potencial alergênico, é amplamente conhecida, bem como a problemática relacionada com a ingestão insuficiente de vitamina D₃. Em relação aos corantes amarelos, a curcumina surge como uma alternativa de corante natural a ser empregado; entretanto, seu caráter altamente hidrofóbico e seu sabor picante característico podem ser grandes obstáculos tecnológicos a serem superados para adição em produtos lácteos. A vitamina D₃, por sua vez, possui também a desvantagem de ser um bioativo altamente lipofílico, acarretando em uma dificuldade tecnológica de incorporação em alimentos de base aquosa.

Os lipossomas multilamelares possuem, comprovadamente, uma grande capacidade de incorporação de ativos hidrofóbicos em sua bicamada, mas possuem a desvantagem de serem dispersões altamente instáveis. Tal instabilidade pode ser, conforme comprovado pela literatura em trabalhos anteriores do grupo (MORAES *et al.*, 2013; TONIAZZO *et al.*, 2014), minimizada pela adição de agentes espessantes polissacarídicos.

Dentro deste contexto, o objetivo principal desse trabalho é viabilizar a produção de lipossomas para a coencapsulação de curcumina e vitamina D₃ pelo método da hidratação de prolipossomas. Para que fosse possível atingir este objetivo principal, os seguintes tópicos foram estabelecidos:

- a) Determinação dos parâmetros de produção dos lipossomas multilamelares coencapsulando curcumina e vitamina D₃ pelo método da hidratação de prolipossomas (concentração de prolipossomas na dispersão);
- b) Determinação da combinação e da concentração adequada de espessantes (polissacarídeos – gomas guar e xantana, inulina) para estabilização da dispersão de lipossomas multilamelares e caracterização reológica dos sistemas;
- c) Verificar a ação espessante da inulina no sistema lipossomal encapsulando curcumina e vitamina D₃;
- d) Caracterização físico-química dos lipossomas estabilizados por diferentes polissacarídeos (morfologia, comportamento térmico);

- e) Estudo da estabilidade físico-química dos lipossomas produzidos (a partir da análise de diâmetro médio hidrodinâmico e distribuição de tamanho, potencial zeta, quantificação de curcumina e vitamina D₃ encapsuladas, ao longo do tempo, colorimetria instrumental);
- f) Estudo da estrutura lipossomal por espalhamento de luz a baixos ângulos (SAXS) para avaliar efeitos da coencapsulação de curcumina e vitamina D₃.

As inovações do presente projeto seriam três: (i) a utilização de um novo método de produção de prolipossomas por recobrimento de sacarose micronizada; (ii) a coencapsulação de dois ativos hidrofóbicos nos lipossomas multilamelares; (iii) a utilização de inulina como espessante das dispersões. A utilização da inulina surgiu como opção pelo fato de ser um polissacarídeo com propriedades funcionais, o que poderia agregar ainda mais valor ao insumo produzido.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Para a etapa de produção dos prolipossomas foram utilizados: curcumina na sua forma purificada e cristalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), vitamina D₃ (colicalciferol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), lecitina de soja purificada e hidrogenada (Phospholipon® 90H, Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemanha), sacarose (Synth, Diadema, SP, Brasil) e álcool etílico anidro (Synth, Diadema, SP, Brasil). O fosfolipídio utilizado possui 90% de fosfatidilcolina hidrogenada, sendo 98% das cadeias alifáticas compostas por ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0). Além disso, utilizou-se: goma xantana (Grindsted® Xanthan 80, doada pela Danisco, Cotia, SP, Brasil), goma guar (Êxodo Científica, Hortolândia, SP, Brasil), inulina (Frutafit, IQ, Sensus, Roosendaal, Holanda) 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).

4.2 Métodos

4.2.1 Produção de sacarose micronizada

Foram adicionados 20 g de sacarose (Synth, Diadema, SP, Brasil) em frascos com tampa contendo 40 g de bolas de zircônio. Este sistema foi levado a um moinho de bolas (CE500, CIENLAB, Campinas, SP, Brasil) e, após 10 h de constante agitação a 100 rpm e temperatura ambiente, obteve-se a sacarose micronizada (SILVA et al., 2017).

4.2.2 Produção dos prolipossomas pelo método do recobrimento de sacarose micronizada

Para a produção de prolipossomas, cinco formulações foram testadas, conforme pode ser visto na Tabela 3. A solução-mãe de vitamina D₃ foi feita a partir da dissolução de 0,01 g de colecalciferol em 100 mL de etanol, resultando em uma solução contendo aproximadamente 400.000 UI de vitamina. Os volumes de solução-mãe de vitamina D₃ mostrados na Tabela 3 - 12,5 mL e 20 mL - correspondem a uma adição em

concentração de 50.000 UI e 80.000 UI, respectivamente. Um volume total de 100 mL da solução etanólica, contendo o fosfolipídio e os bioativos, foi injetado, com o auxílio de bomba peristáltica (Masterflex 7528-30, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA), sobre 2 g de sacarose previamente micronizada. O processo foi realizado continuamente utilizando-se um rotaevaporador (Marconi MA120, Piracicaba, SP, Brasil), a uma vazão de 4 mL/min. O balão rotativo foi mantido a $45 \pm 2^\circ \text{C}$ para evaporação do etanol.

Tabela 3. Formulações empregadas durante a produção dos prolipossomas

Formulação	Fosfolipídio (g)	Curcumina (mg)	Vitamina D ₃ (mL de solução-mãe)	Etanol (mL)
A	3,2	25	-	100
B	3,2	-	12,5	100
C	3,2	-	20	100
D	3,2	25	12,5	100
E	3,2	25	20	100

A Figura 22 mostra o esquema experimental montado para a produção dos prolipossomas. A injeção da solução etanólica ocorreu de forma contínua, por meio de uma bomba de deslocamento positivo (a), acoplada ao sistema de rotaevaporação, cuja vazão determinada foi de 4 mL/min. O etanol foi removido por evaporação, sendo o sistema operado a vácuo, condição esta promovida pelo auxílio de uma bomba tipo trompa d'água (b). Por meio do controle das temperaturas de aquecimento do banho termostático (f) acoplado ao rotaevaporador (45°C) e do banho de gelo (g) (10°C), respectivamente, responsáveis pela evaporação do etanol e sua posterior condensação (c), obteve-se, o condensado, coletado no balão (d). Lembrando que o vácuo foi necessário para maximizar a eficácia de extração de álcool etílico. Devido a sua afinidade molecular com a curcumina, um pequeno percentual de bioativo foi carregado conjuntamente com o etanol evaporado. O produto resultante coletado no balão (e) foi composta por micropartículas de sacarose recobertas por fosfolipídio e curcumina. Os prolipossomas produzidos foram armazenados em dessecador a vácuo e mantidos à temperatura ambiente. Este método de produção de prolipossomas foi descrito por Silva et al. (2016) e baseado na descrição metodológica feita em Elhissi et al. (2006) e Elhissi et al. (2012).

Figura 22. Sistema de rotaevaporação utilizado para a produção de prolipossomas pelo método do recobrimento de sacarose micronizada

4.2.3 Produção e caracterização das dispersões de lipossomas encapsulando curcumina e vitamina D3

4.2.3.1 Produção dos lipossomas por hidratação dos prolipossomas

Para a produção das dispersões de lipossomas, os prolipossomas foram hidratados em 100 mL de água deionizada, através de ultra-agitação mecânica (IKA T25, IKA, Staufen, Alemanha) a 13.000 rpm a 65° C por cinco minutos (MORAES et al., 2013; TONIAZZO et al., 2014). Na sequência, o sistema foi resfriado até 25° C para a adição de benzoato de sódio (0,02%) e dos espessantes a serem estudados.

a) Lipossomas encapsulando apenas curcumina

Para verificar a ação espessante da inulina, foram testadas diferentes proporções do polissacarídeo em lipossomas contendo apenas curcumina. As formulações empregadas estão relacionadas na Tabela 4 – as formulações de 1 a 3 foram produzidas a fim de verificar a ação espessante da inulina na ausência de qualquer outro polissacarídeo, já as formulações 4 a 11 foram produzidas com o propósito de verificar uma ação estabilizante sinérgica da inulina com outros polissacarídeos (goma guar e goma xantana). As quantidades de gomas xantana e guar adicionadas aos sistemas foram baseadas nas formulações estudadas por Toniazzo et al. (2014), que encapsularam beta-caroteno em lipossomas multilamelares.

Tabela 4. Proporções empregadas na produção dos lipossomas multilamelares encapsulando curcumina

Formulação	Prolipossoma (g)	Goma xantana (% mássica)	Goma guar (% mássica)	Inulina (% mássica)
1	2	-	-	2
2	2	-	-	5
3	2	-	-	10
4	2	0,015	0,135	0,25
5	2	0,030	0,120	0,25
6	2	0,01	0,09	0,25
7	2	0,02	0,08	0,25
8	1	0,015	0,135	0,25
9	1	0,030	0,120	0,25
10	1	0,01	0,09	0,25
11	1	0,02	0,02	0,25

b) Lipossomas encapsulando curcumina e vitamina D₃

Os lipossomas coencapsulando curcumina e vitamina D₃ foram produzidos a partir da hidratação de 2 g de prolipossomas e na ausência de inulina, visto que o polissacarídeo não contribuiu positivamente no tempo de vida útil das dispersões. A mistura de polissacarídeos utilizada foi a melhor definida por Toniazzi et al. (2014) – 0,10% (m/v) de gomas totais (GT), sendo 10% (m/v) de goma xantana (GX) e 90% (m/v) de goma guar (GG).

4.2.3.2 Determinação do diâmetro médio e distribuição do tamanho de vesícula

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

4.2.3.3 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado por medidas de mobilidade eletroforética, utilizando-se o equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, Holtsville, NY, EUA), diluindo-se uma gota da dispersão em solução de cloreto de potássio 1 mM. A condutividade do equipamento foi então de 50 mS/cm e a respectiva mobilidade foi calculada utilizando-se a equação de Helmholtz-Smoluchowski. As análises dos dados foram realizadas pelo software incluído no sistema (ZetaPlus).

4.2.3.4 Quantificação de curcumina

Para a determinação da curcumina encapsulada nos lipossomas, obteve-se primeiramente uma curva padrão para quantificação de curcumina em etanol anidro absoluto. As amostras de lipossomas foram diluídas em etanol na proporção 1:20 (v/v) e a leitura de suas absorbâncias realizada por espectrofotometria (Libra S22, Biochrom, Cambridge, Reino Unido), utilizando-se etanol como branco e comprimento de onda de 425 nm. A curva utilizada para tal, com $R^2 = 0,9984$, é mostrada no Apêndice A.

4.2.3.5 Quantificação de vitamina D₃

i) Obtenção do extrato metanólico

Uma massa de 2,0 g da dispersão de lipossomas foi colocada em um tubo de centrífuga de 15 mL. Após a adição de 5 mL de metanol, o tubo foi agitado em vórtex (IKA, Staufen, Alemanha) por 10 segundos e, em seguida, mantido em banho ultrassônico (Modelo 410US, Marte, São Paulo, SP, Brasil) a 30 °C por 5 minutos. Em seguida, o tubo foi centrifugado (5430R, Eppendorf, Berzdorf, Alemanha) por 5 minutos a 6.890 x g (a 4 °C). O extrato metanólico foi então transferido para um balão volumétrico de 10 mL. A extração com metanol foi repetida até a centrifugação, transferindo-se a nova alíquota de extrato para o mesmo balão volumétrico e, completando-o, por fim, com metanol até o volume de 10 mL. O extrato metanólico foi então filtrado através de membrana de nylon de 0,45 µm com 13 mm de diâmetro interno, sendo recolhido no interior de vials de 2 mL com tampa e septo, e posteriormente analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

ii) *Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

A vitamina D₃ foi determinada em condições analíticas modificadas a partir da metodologia descrita por Staffas e Nyman (2003). Utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Prominence Modular HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japão) controlado por software LC Solution (Versão 1.25) e equipado com bomba de fase móvel quaternária, degaseificador online, injetor automático, compartimento de coluna termostaticado e detector por arranjo de diodos. A coluna analítica com fase estacionária de octadecilsilano (250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno e 4,6 µm de diâmetro de partícula – Shim-Pack VP-ODS, Shimadzu, Kyoto, Japão) foi mantida a 35 °C. Metanol e acetonitrila foram usados como fase móvel na proporção respectiva de 90:10 (v/v) com fluxo constante de 1,60 mL/min. Injetaram-se 10 µL das amostras com detecção espectrofotométrica em 265 nm e tempo total de corrida igual a 10 minutos. A identificação foi realizada por comparação com o tempo de retenção (7,30 min.) da substância padrão de vitamina D₃. A quantificação foi realizada por padronização externa a partir das áreas obtidas de análises em triplicata de 7 níveis de concentrações da vitamina D₃ preparadas entre 0,5 e 15,0 µg/mL.

4.2.3.6 Determinação de parâmetros colorimétricos

As análises de cor instrumental das dispersões de lipossomas foram realizadas em um colorímetro (Miniscan XE PLUS, Hunterlab, Virginia, EUA). O sistema de leitura utilizado foi o CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*), com iluminante D65 e ângulo de visão com abertura de 10°. Foram determinados os parâmetros colorimétricos (L*, a*, b*) e calculados os valores de croma (C*_{ab}), ângulo de Hue (h_{ab}) e diferença total de cor (TCD, *total color difference*).

A esfera CIELAB representando todos os parâmetros colorimétricos é mostrada na Figura 23.

Figura 23. A esfera CIELAB

Fonte: SANT'ANA et al. (2013)

A saturação do sistema, determinada através do parâmetro C^*_{ab} (croma), foi determinada pela Equação 1:

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

onde:

C^*_{ab} : croma (saturação da cor)

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

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

A tonalidade do sistema, determinada através do ângulo de Hue, foi determinada pela Equação 2:

$$h_{ab} = \left(\left(\tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \right) * (-1) \right) + 90 \quad (2)$$

onde:

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

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

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

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

$$TCD = \sqrt{(L^* - L^*_0)^2 + (a^* - a^*_0)^2 + (b^* - b^*_0)^2} \quad (3)$$

onde:

L^* : luminosidade

a^* : cromaticidade variando do vermelho/verde

b^* : cromaticidade variando do amarelo/azul

L_0^* : luminosidade (primeiro dia de estocagem)

a_0^* : cromaticidade variando do vermelho/verde (primeiro dia de estocagem)

b_0^* : cromaticidade variando do amarelo/azul (primeiro dia de estocagem)

4.2.3.7 Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS)

As medidas de SAXS foram feitas usando um equipamento Xeuss (Xenocs, Sassenage, França). As amostras foram mantidas em um capilar de quartzo de diâmetro médio 1,5 mm. O intervalo efetivo do módulo do vetor momento de transferência, $q = 4\pi \sin\theta / \lambda$ (onde θ é metade do ângulo de espalhamento e λ o comprimento de onda dos raios X), acessível experimentalmente, foi de 0,018 – 0,40 Å⁻¹. As medidas foram feitas com variação da temperatura, iniciando-as em 25° C e terminando-as em 60 °C. As intensidades coletadas foram corrigidas usando o espalhamento de *background*, capilar vazio e transmissão da amostra, passando pela posterior normalização para escala absoluta usando como padrão a água. Para o tratamento dos dados utilizou-se o pacote SUPERSAXS (OLIVEIRA et al., 2009). Tais experimentos foram realizados no Laboratório de Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos, no Departamento de Física Experimental do Instituto de Física da USP, sob responsabilidade do prof. Cristiano L. P. Oliveira.

A bicamada lipídica foi descrita a partir do modelo de deconvolução gaussiana, uma vez que este possibilita uma descrição mais detalhada da modulação da densidade eletrônica a partir de variações mais suaves do perfil eletrônico. Os parâmetros de interesse para esse modelo são: periodicidade lamelar D (distância entre bicamadas vizinhas), espessura da bicamada δ_m e o parâmetro de Caillé η (diretamente proporcional à flexibilidade das bicamadas). A Figura 24 mostra um esquema da disposição dos parâmetros D e δ_m na estrutura do lipossoma.

Figura 24. Ilustração de duas bicamadas vizinhas, onde δ_m corresponde à espessura da bicamada e D é a periodicidade lamelar.

Fonte: Adaptado de GERBELLI (2012)

4.2.3.8 Análises térmicas por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises de calorimetria diferencial de varredura foram realizadas através do equipamento DSC-TA2010 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA). Uma alíquota de 10 mg de dispersão de lipossoma foi colocada em uma cápsula de alumínio, sendo então hermeticamente fechada. As amostras foram aquecidas de 10° a 100° C utilizando-se uma rampa de aquecimento de 10° C/min. As entalpias de transição de fases e as temperaturas de transição de fases foram calculadas utilizando o software do equipamento, Universal Analyses V.7 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA).

4.2.3.9 Análises reológicas

As análises reológicas foram realizadas utilizando-se um reômetro rotacional de tensão controlada (AR 2000 Rheometer, TA Instruments, New Castle, DE, EUA), com geometria do tipo cilíndricos 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 4:

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \gamma^n \quad (4)$$

onde:

τ = tensão de cisalhamento (Pa)

τ_0 = tensão de cisalhamento inicial (Pa)

K = índice de consistência (Pa.Sⁿ)

γ = taxa de deformação (s⁻¹)

n = índice de comportamento (adimensional)

4.2.3.10 *Análise estatística dos dados*

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e estão apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão. Às médias dos resultados obtidos foi aplicado o teste de Tukey, com nível de significância de 5%, utilizando-se o software Assistat versão 7.7 (beta).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção e avaliação da estabilidade dos lipossomas multilamelares

Após verificar que os lipossomas produzidos encapsulando apenas curcumina (na ausência de qualquer polissacarídeo – formulação 1) desestabilizaram logo no primeiro dia de estocagem, mesmo sob temperatura de refrigeração, comprovou-se a necessidade da adição de espessantes. Essa necessidade também é observada em outros trabalhos do presente grupo de pesquisa (TONIAZZO et al., 2014; CARVALHO et al., 2015).

5.1.1 Testes preliminares utilizando-se inulina como espessante

Os primeiros testes para verificação da capacidade espessante da inulina foram realizados adicionando-a as dispersões nas formulações 1, 2 e 3 da Tabela 4. Esses valores foram escolhidos a partir dos dados apresentados por Franck (2002), que verificou que adições de 2 a 10% (m/v) de inulina permitiram a estabilização de sistemas emulsionados em matrizes alimentícias.

Os lipossomas, porém, permaneceram estáveis por apenas três dias até a separação completa de fases. Essa instabilidade se deu provavelmente pelo fato da inulina, um polissacarídeo altamente higroscópico, ter sequestrado parte da água livre presente no sistema promovendo a formação de agregados do polissacarídeo, o que contribuiu com o aumento do tamanho médio do lipossoma e sua consequente coalescência. Esse fenômeno ocorre uma vez que a inulina possui uma baixa energia de interação com a superfície lipídica do lipossoma, impedindo sua adsorção (TADROS et al., 2004a). Uma forma de contornar esse problema proposta pelos autores foi substituir certos grupamentos da molécula de inulina por grupamentos alquila, que são geralmente hidrofóbicos, o que garantiu um aumento da sua adsorção na superfície lipídica, melhorando seu potencial tensoativo. Tadros et al. (2004b) verificaram a necessidade de se adicionar um cotensoativo lipossolúvel a emulsões estabilizadas com inulina, uma vez que o mesmo promove uma diminuição da tensão superficial na interface óleo/água e uma consequente redução do tamanho médio da partícula, quando comparados a emulsões estabilizadas apenas por inulina. Isso se deve ao fato de que o diâmetro médio de uma emulsão, quando preparada utilizando-se um método de alta energia, é

diretamente proporcional à sua tensão interfacial (WALSTRA, 1983; MCCLEMENTS; RAO, 2011). Carvalho (2003), por sua vez, ao tentar produzir microcápsulas de inulina, observou um aumento no tamanho de partícula após alguns dias de armazenagem e concluiu que a rápida instabilidade da microcápsula resultava da ação da umidade sobre o processamento, levando à aglomeração das partículas de inulina.

Uma vez que a mistura dos outros polissacarídeos (gomas xantana e guar) foi adicionada em razões totais de 0,10% (m/v) ou 0,15% (m/v), optou-se por escolher novas proporções de polissacarídeos, diminuindo-se a concentração de inulina a ser adicionada às dispersões, mantendo-a na mesma ordem de grandeza dos outros estabilizantes, sendo 0,25% (m/v) o valor escolhido (formulações 4 a 7 da Tabela 4).

5.1.2 Avaliação da estabilidade físicoquímica dos lipossomas encapsulando somente curcumina e estabilizados com goma xantana, goma guar e inulina

A Figura 25 apresenta o aspecto visual dos lipossomas no dia de produção (dia zero) estabilizados com percentuais totais de gomas de 0,10% (m/v) e 0,15% (m/v), sendo 10% (m/v) de goma xantana e 90% (m/v) de goma guar, ou 20% (m/v) de goma xantana e 80% (m/v) de guar, dependendo da formulação. Foram adicionados também 0,25% (m/v) de inulina em todas as amostras. A Figura 26, por sua vez, mostra o aspecto visual dos mesmos lipossomas no 14º dia de armazenagem, sendo possível notar clara separação de fases. A Figura 29 evidencia a instabilidade ocorrida na amostra produzida com 2 g de prolipossomas estabilizada com 0,10 % (m/v) de gomas totais (sendo 10 % GX (m/v) e 90 % GG (m/v)).

Com o propósito, então, de verificar se a inulina era a única responsável pela instabilidade dos lipossomas, optou-se por trabalhar com menores quantidades de prolipossomas na etapa de hidratação. Os lipossomas, mostrados na Figura 27, foram então produzidos utilizando-se 1 g de prolipossoma (formulações 8 a 11 da Tabela 4). Os resultados foram semelhantes aos obtidos com os lipossomas produzidos a partir de 2 g de prolipossomas, podendo-se observar separação de fases no 14º dia de armazenagem (Figura 28). A instabilidade observada nas amostras (c) e (d) da Figura 28 foi semelhante à mostrada na Figura 29.

Foi possível verificar que diferentes fenômenos levaram os sistemas estabilizados com misturas de gomas guar, goma xantana e inulina à instabilidade. Pelas Figuras 26 (b) e 28 (a), observa-se que a desestabilização dos sistemas ocasionou a

formação de fase creme, enquanto que nas Figuras 26 (c), 26 (d) e 28 (b), ocorreu o processo de sedimentação. A cremação ocorre quando a densidade da fase oleosa é menor que a densidade da fase contínua na qual ela está dispersa; enquanto que a sedimentação ocorre quando a densidade da fase oleosa é maior que a da fase contínua. A explicação para que os dois fenômenos tenham ocorrido nas dispersões estabilizadas na presença de inulina pode estar relacionada com as ações das forças gravitacionais e do movimento browniano durante o aumento do tamanho do diâmetro médio das vesículas. Para que ocorra migração da fase oleosa para a superfície da dispersão (cremação), a quantidade de vesículas de maior tamanho formadas por forças gravitacionais deve ser maior que a quantidade de vesículas cujo tamanho aumenta por ação do movimento browniano. O movimento da fase oleosa é então dominado pela ação de forças gravitacionais em vesículas de maior tamanho, enquanto que o movimento browniano rege o comportamento de vesículas de menor diâmetro (MCCLEMENTS; RAO, 2011). Portanto, conclui-se que houve a prevalência de agregação de vesículas de menor tamanho a partir de movimento browniano nas formulações onde foi possível notar a presença de sedimentação.

Figura 25. Lipossomas encapsulando curcumina produzidos com 2 g de prolipossomas, no dia zero, estabilizadas com diferentes proporções de hidrocoloides em que: (A) 0,10% gomas totais (10% GX + 90% GG); (B) 0,15% gomas totais (10% GX + 90% GG); (C) 0,15% gomas totais (10% GX + 90% GG); (D) 0,15% gomas totais (20% GX + 80% GG). Todas as dispersões foram mantidas a 10 °C e contêm, além das gomas, 0,25% de inulina.

Figura 26. Aspecto visual das dispersões de lipossomas encapsulando curcumina produzidos com 2 g de prolipossomas, desestabilizados (dia 14), em que: (A) 0,10% gomas totais (10% GX + 90% GG); (B) 0,15% gomas totais (10% GX + 90% GG); (C) 0,15% gomas totais (10% GX + 90% GG); (D) 0,15% gomas totais (20% GX + 80% GG). Todas as dispersões foram mantidas a 10 °C e contêm, além das gomas, 0,25% de inulina.

Figura 27. Aspecto visual das dispersões de lipossomas encapsulando curcumina produzidos com 1 g de prolipossomas, no dia zero, estabilizadas com diferentes proporções de hidrocoloides em que: (A) 0,10% gomas totais (10% GX + 90% GG); (B) 0,15% gomas totais (10% GX + 90% GG); (C) 0,15% gomas totais (10% GX + 90% GG); (D) 0,15% gomas totais (20% GX + 80% GG). Todas as dispersões foram mantidas a 10 °C e contêm, além das gomas, 0,25% de inulina.

Figura 28. Aspecto visual das dispersões de lipossomas encapsulando curcumina produzidos com 1 g de prolipossomas, desestabilizados (dia 14), em que: (A) 0,10% gomas totais (10% GX + 90% GG); (B) 0,15% gomas totais (10% GX + 90% GG); (C) 0,15% gomas totais (10% GX + 90% GG); (D) 0,15% gomas totais (20% GX + 80% GG). Todas as dispersões foram mantidas a 10 °C e contêm, além das gomas, 0,25% de inulina.

Figura 29. Aspecto visual dos lipossomas (instáveis), evidenciando a separação das fases aquosa e oleosa

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que a estabilidade do sistema não foi influenciada pela quantidade de prolipossomas adicionada. A instabilidade provém, provavelmente, da presença de inulina no meio. Tadros et al. (2004b) mostraram em seu trabalho que quantidades adicionadas de inulina menores que 1% (m/v), em relação a fase oleosa, promovem um aumento no tamanho médio da partícula e o aparecimento de coalescência, porém em emulsões estocadas a uma temperatura de 50° C, caso que não ocorre nesse trabalho, uma vez que as dispersões são estocadas a temperaturas refrigeradas de 10 °C. Essa diferença pode ser explicada a partir de mudanças empregadas na formulação utilizada pelos autores, que atribuíram seus melhores resultados de estabilidade graças à adição de um cosurfactante na dispersão, o Span 20. Todavia, deve-se se atentar ao fato de que os autores utilizaram uma massa mínima de inulina da ordem de 0,5% (m/v) para obter seus resultados, enquanto esse trabalho conseguiu produzir lipossomas estáveis por 14 dias na presença de quantidades ainda menores de inulina (0,25% (m/v)).

Em relação à distribuição do tamanho de vesícula médio dos lipossomas, verificou-se que todos eles, independentemente da massa de prolipossomas utilizada, apresentaram distribuição de diâmetro com caráter multimodal, característica de lipossomas multilamelares (CARVALHO et al., 2015). O diâmetro hidrodinâmico médio das amostras contendo 2 g de prolipossomas variou de 800 a 3000 nm, enquanto que o das amostras contendo 1 g permaneceu na faixa de 700 a 2000 nm. Esses valores condizem com Lasic (1988), que verificou que lipossomas do tipo MLV produzidos a partir de hidratação de prolipossomas têm geralmente diâmetro médio de 1 a 4 µm.

Resultados semelhantes foram encontrados por Toniazzi et al. (2014), que obtiveram diâmetros entre 2000 e 3000 nm para lipossomas encapsulando beta-caroteno produzidos também a partir de hidratação de prolipossomas.

As distribuições de tamanho podem ser vistas nas Figuras 30 e 31. A partir da análise das curvas, pode-se observar que, para todas as formulações estudadas, houve um aumento gradual do tamanho dos lipossomas com o passar do tempo. Esse resultado era esperado uma vez que esse aumento está diretamente relacionado à estabilidade de sistemas coloidais. Infere-se a partir de tal resultado que a inulina, mesmo adicionada em uma baixa proporção, provocou a desestabilização dos sistemas, atrapalhando na estabilidade da rede polimérica formada pelas gomas guar e xantana. Esse fenômeno ocorre uma vez que a rede não consegue estabilizar os lipossomas e os agregados de inulina que são formados no meio.

Morris (2006) relata que uma substituição parcial de goma xantana por goma guar em matrizes alimentícias leva a um enfraquecimento do gel formado pela rede polimérica. Sendo assim, era esperado que as amostras contendo 0,15% de gomas totais apresentassem diâmetros médios superiores com o passar do tempo. Tal comportamento pode ser visto nas Figuras 30 (c) e (d) e 31 (c) e (d), porém não se pode atribuir a instabilidade dos sistemas somente a esse enfraquecimento, deve-se levar em conta a presença da inulina, que também atuou de forma desfavorável na rede polimérica.

Em relação à quantidade de curcumina retida os lipossomas verificou-se, como se era esperado, que as amostras contendo maior quantidade de prolipossoma (2 g) apresentaram valores superiores de concentração de curcumina encapsulada durante o período de armazenagem, em relação àquelas produzidas com menor quantidade de prolipossoma (1 g) (Figura 32). No período de armazenagem estudado, verificou-se que para os lipossomas produzidos com 2 g de prolipossomas, a formulação contendo 0,10 % (m/v) de gomas totais (sendo 10 % (m/v) GX + 90 % (m/v) GG) + 0,25 % (m/v) de inulina foi a que promoveu a maior retenção de curcumina na dispersão enquanto que, para os lipossomas produzidos com 1 g, o valor máximo da retenção de curcumina ocorreu nas formulações estabilizadas com 0,10 % (m/v) de gomas totais (sendo 20 % (m/v) GX + 80 % (m/v) GG) + 0,25 % (m/v) de inulina. Para o primeiro caso, 84 % do bioativo se mantiveram encapsulados ao longo dos 14 dias de armazenagem refrigerada, enquanto que, para o segundo caso, a retenção foi de 62 %, sendo que foi necessária uma maior quantidade de goma xantana para obter tal resultado.

Sabe-se que um aumento na quantidade de curcumina adicionada à dispersão leva a uma maior condensação da bicamada lipídica, visto que uma maior quantidade de bioativo estará ligada na região hidrofóbica da molécula de fosfolipídio (mais precisamente nos grupamentos acila, próximos às moléculas de glicerol), ocasionando em uma redução no diâmetro médio hidrodinâmico (KAREWICZ et al., 2011).

A curcumina é um composto com baixa resistência à oxidação, sendo facilmente degradada por agentes como a luz e a temperatura. Tais agentes foram evitados uma vez que as dispersões foram acondicionadas em ambiente refrigerado (aproximadamente 10 °C). Pensando a respeito do fosfolipídio utilizado, sabe-se que o Phospholipon 90H consiste em uma matéria prima com 98 % (m/m) de seus fosfolipídios na forma hidrogenada, o que impede sua degradação por peroxidação. Uma quantidade de 2 % (m/m) de fosfolipídios insaturados contribui muito pouco para a taxa de peroxidação do composto como um todo, não podendo ser citado como responsável pelo decaimento da quantidade de curcumina com o tempo.

Sendo assim, o único fator que pode ter desencadeado o processo de oxidação da curcumina nos lipossomas foi a etapa de ultragitação mecânica para a hidratação dos prolipossomas. Nesta etapa, é utilizada uma temperatura de 60 °C, temperatura superior a temperatura da transição gel-líquido cristalino (T_m) dos fosfolipídios constituintes da matéria prima utilizada (aproximadamente 53 °C), o que pode alterar a natureza do filme interfacial dos lipossomas, aumentando a rigidez da bicamada lipídica e levando a uma consequente liberação dos bioativos no meio em que estão dispersos (CHRAI; MURARI; AHMAD, 2002). A formação de agentes prooxidantes produzidos devido à agitação também pode ter contribuído para a diminuição da quantidade de curcumina encapsulada, visto que a ultragitação ocorreu em condições de contato com o ar atmosférico. Além disso, uma das propriedades atribuídas a gomas como a xantana inclui sua capacidade de quelar metais, o que pode ter contribuído na proteção dos lipídios presentes nos lipossomas contra a oxidação ocasionada por impurezas advindas das matérias primas e equipamentos utilizados durante o processamento (SHIMADA et al., 1992; MCCLEMENTS; DECKER, 2000).

Figura 30. Curvas de distribuição de tamanho hidrodinâmico obtidas nos dias zero e 14 para as formulações produzidas com 2 g de prolipossomas em que (A) 0,10% gomas totais (10% GX + 90% GG); (B) 0,10% gomas totais (20% GX + 80% GG); (C) 0,15% gomas totais (10% GX + 90% GG); (D) 0,15% gomas totais (20% GX + 80% GG). Todas as dispersões contêm, além das gomas, 0,25% de inulina.

Figura 31. Curvas de distribuições de tamanho hidrodinâmico obtidas nos dias zero e 14 para as formulações produzidas com 1 g de prolipossomas, em que (A) 0,10% gomas totais (10% GX + 90% GG); (B) 0,10% gomas totais (20% GX + 80% GG); (C) 0,15% gomas totais (10% GX + 90% GG); (D) 0,15% gomas totais (20% GX + 80% GG). Todas as dispersões contêm, além das gomas, 0,25% de inulina.

Figura 32. Perfis temporais de concentração de curcumina ao longo do tempo de estocagem (10 °C, na ausência de luz) para formulações produzidas com (a) 2 g de prolipossomas e (b) 1 g de prolipossoma, onde (●) 0,10% GT (10% GX + 90% GG) + 0,25% I, (■) 0,15% GT (10% GX + 90% GG) + 0,25% I, (▲) 0,10% GT (20% GX + 80% GG) + 0,25% I, (◆) 0,15% GT (20% GX + 80% GG) + 0,25% I.

As Tabelas 5 e 6 resumem todos os dados obtidos para as amostras contendo 2 e 1 g de prolipossomas, estabilizados com as diferentes proporções de gomas xantana, guar e inulina nos dias zero e quatorze.

Por não ter contribuído com nenhum benefício para o sistema, não ter funcionado como estabilizante (pelo contrário, a capacidade de formação de agregados foi deletéria para a estabilidade coloidal), optou-se por excluir a inulina das etapas posteriores desse trabalho, empregando somente goma xantana e goma guar durante a estabilização de lipossomas contendo curcumina e vitamina D₃.

Tabela 5. Tabela resumo dos parâmetros obtidos para as dispersões produzidas com 2 g de prolipossomas em sua composição, no começo e no final da vida de prateleira (sob refrigeração). Todas as dispersões contêm, além das gomas, 0,25% de inulina.

Formulação / Tempo								
	0,10% gomas totais (10% GX + 90% GG)		0,10% gomas totais (20% GX + 80% GG)		0,15% gomas totais (10% GX + 90% GG)		0,15% gomas totais (20% GX + 80% GG)	
	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	1188 ^A ± 44	1378 ^A ± 163	1125 ^A ± 116	1350 ^A ± 104	1197 ^A ± 42	1292 ^A ± 62	1221 ^A ± 130	1558 ^A ± 66
Polidispersidade	0,234 ^A ± 0,032	0,252 ^A ± 0,111	0,301 ^A ± 0,006	0,260 ^A ± 0,062	0,228 ^A ± 0,077	0,163 ^A ± 0,077	0,296 ^A ± 0,049	0,236 ^A ± 0,051
Concentração de curcumina (mg/L)	55,4 ^A ± 8,04	46,3 ^A ± 5,27	45,8 ^A ± 6,35	33,2 ^A ± 4,13	50,3 ^A ± 4,47	35,6 ^A ± 10,20	48,7 ^A ± 2,16	36,8 ^A ± 4,06
% curcumina preservada	-	83,6	-	72,4	-	70,8	-	75,6
a*	-0,26 ^A ± 0,23	-0,18 ^A ± 0,07	-0,82 ^A ± 0,11	-0,70 ^A ± 0,23	-0,82 ^A ± 0,06	-0,75 ^A ± 0,12	-0,88 ^B ± 0,30	-0,82 ^B ± 0,23
b*	27,8 ^A ± 0,06	27,5 ^A ± 0,41	28,2 ^A ± 0,61	28,2 ^A ± 0,27	27,5 ^B ± 0,34	26,9 ^B ± 0,25	28,0 ^C ± 0,13	27,8 ^C ± 0,29
L*	18,5 ^A ± 0,05	18,4 ^A ± 0,08	20,5 ^A ± 0,11	20,4 ^A ± 0,03	18,9 ^B ± 0,11	19,2 ^B ± 0,04	18,9 ^C ± 0,05	19,0 ^C ± 0,10
C* _{ab}	27,8 ^A ± 0,05	27,5 ^A ± 0,95	28,2 ^A ± 0,58	28,3 ^A ± 0,05	27,5 ^A ± 0,06	26,9 ^A ± 0,36	28,0 ^A ± 0,69	27,8 ^A ± 0,58
h _{ab}	96,7 ^A ± 0,07	89,6 ^A ± 0,02	85,4 ^A ± 0,03	88,0 ^A ± 0,04	89,4 ^A ± 0,05	90,3 ^A ± 0,06	92,6 ^A ± 0,04	88,8 ^A ± 0,04
TCD	-	0,34 ^A ± 0,03	-	0,15 ^B ± 0,08	-	0,66 ^C ± 0,08	-	0,23 ^B ± 0,02

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

Tabela 6. Tabela resumo dos valores obtidos para as dispersões produzidas com 1 g de prolipossoma em sua composição, no começo e no final da vida de prateleira (sob refrigeração). Todas as dispersões contêm, além das gomas, 0,25% de inulina.

Formulação / Tempo								
	0,10% gomas totais (10% GX + 90% GG)		0,10% gomas totais (20% GX + 80% GG)		0,15% gomas totais (10% GX + 90% GG)		0,15% gomas totais (20% GX + 80% GG)	
	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14	Dia 0	Dia 14
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	1032 ^A ± 33	1228 ^A ± 167	1109 ^A ± 75	1182 ^A ± 35	995 ^A ± 109	1101 ^A ± 19	824 ^A ± 18	1124 ^A ± 42
Polidispersidade	0,349 ^A ± 0,003	0,195 ^B ± 0,169	0,325 ^A ± 0,011	0,314 ^A ± 0,027	0,349 ^A ± 0,018	0,334 ^A ± 0,048	0,314 ^A ± 0,064	0,285 ^A ± 0,019
Concentração de curcumina (mg/L)	29,7 ^A ± 5,54	15,7 ^B ± 3,74	22,8 ^C ± 9,50	14,2 ^D ± 3,08	23,5 ^E ± 6,69	14,5 ^F ± 2,73	23,62 ^G ± 4,79	8,64 ^H ± 1,99
% curcumina preservada	-	53,8	-	62,2	-	61,6	-	36,6
a*	-1,28 ^A ± 0,04	-1,24 ^A ± 0,13	-2,98 ^A ± 0,42	-3,14 ^A ± 0,49	-1,28 ^B ± 0,52	-1,24 ^B ± 0,35	-2,57 ^C ± 0,21	-2,60 ^C ± 0,26
b*	22,6 ^A ± 0,52	22,6 ^A ± 11,5	23,0 ^A ± 0,23	22,5 ^A ± 0,38	22,6 ^A ± 0,04	22,6 ^A ± 0,02	16,0 ^B ± 0,09	16,4 ^B ± 0,77
L*	15,0 ^A ± 0,17	15,1 ^A ± 7,59	15,7 ^B ± 0,85	15,7 ^B ± 0,87	15,0 ^C ± 0,41	15,1 ^C ± 0,43	10,3 ^D ± 0,60	10,5 ^D ± 0,49
C* _{ab}	22,6 ^A ± 0,12	22,6 ^A ± 11,5	23,2 ^B ± 0,24	22,7 ^B ± 0,27	22,6 ^B ± 0,01	22,6 ^B ± 0,02	16,2 ^C ± 0,04	16,6 ^C ± 0,68
h _{ab}	89,6 ± 0,06	88,5 ^A ± 0,07	90,1 ^B ± 0,06	90,8 ^B ± 0,06	89,6 ^C ± 0,03	88,6 ^C ± 0,01	72,6 ^B ± 0,06	167 ^B ± 0,06
TCD	-	0,20 ^A ± 0,02	-	0,55 ^B ± 0,18	-	0,09 ^C ± 0,03	-	0,44 ^{A,B} ± 0,14

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

5.1.3 Avaliação da estabilidade físico-química dos lipossomas encapsulando somente vitamina D₃ e coencapsulando curcumina e vitamina D₃

As amostras coencapsulando os dois bioativos (curcumina e vitamina D₃) e encapsulando apenas vitamina D₃ foram produzidas de acordo com as formulações B a E da Tabela 3. Para tal, todos os sistemas foram estabilizados utilizando-se a melhor proporção de hidrocoloides obtida por Toniazzi et al. (2014) - 0,10 % gomas totais (m/v) sendo 10 % GX (m/v) e 90 % GG (m/v).

5.1.3.1 Diâmetro médio, distribuição do tamanho de vesícula e potencial zeta

As curvas de distribuição obtidas para as dispersões são mostradas na Figura 33. Pode-se verificar um aumento no tamanho do diâmetro hidrodinâmico médio em todas as amostras ao longo do tempo de armazenagem; tal resultado era esperado uma vez que uma das causas para a instabilidade de sistemas coloidais se refere à perda do potencial estabilizante da rede biopolimérica formada pelas gomas, com consequente aumento das forças atrativas entre as moléculas constituintes dos lipossomas, levando à formação de estruturas de maior tamanho. Os agregados formados, constituídos principalmente pela fase lipídica, possuem densidade menor que a densidade da fase aquosa, sendo assim, eles migram para a superfície da dispersão, podendo ser visível uma separação de fases.

Figura 33. Curvas de distribuições de tamanho hidrodinâmico obtidas nos dias zero (----) e 42 (- - -) para as formulações: **A)** 50.000 UI VD₃; **B)** 80.000 UI VD₃; **C)** 50.000 UI VD₃ + curcumina; **D)** 80.000 UI VD₃ + curcumina.

A Figura 34, por sua vez, apresenta os valores de potencial zeta obtidos para as dispersões encapsulando vitamina D₃ e coencapsulando curcumina e vitamina D₃, estabilizadas com gomas guar e xantana, ao longo do tempo de armazenagem. Os valores obtidos variaram entre -10,39 e -55,83 mV. Sabe-se que a carga total do lipossoma depende intimamente da composição do fosfolipídio constituinte e do meio no qual o mesmo está disperso (MAHERANI et al., 2011), sendo assim, pode-se afirmar que o resultado negativo obtido para as dispersões são resultantes dos grupos hidroxila (OH⁻) provenientes da água, que interagem com grupamentos da própria fosfatidilcolina, considerada uma molécula neutra por possuir cargas positivas e negativas em quantidades semelhantes; como resultado, há a formação de cargas majoritariamente negativas na superfície dos lipossomas (HSU; NACU, 2003).

Pode-se observar que, após o 14º dia, houve um aumento nos valores do potencial zeta para as formulações coencapsulando os dois bioativos, enquanto que para as dispersões encapsulando apenas vitamina D₃, tal aumento ocorreu após o 7º dia de armazenagem. Segundo Greenwood e Kendall (1999), uma “ótima estabilidade” é conferida a dispersões com valores de potencial zeta menores que -30 mV e maiores que 30 mV. Pode-se concluir então que, após o 14º dia de estocagem das dispersões coencapsulando ambos os bioativos e após o 7º dia para os lipossomas contendo apenas vitamina D₃, as forças atrativas se tornaram mais significantes que as repulsivas, dando início ao processo de agregação das vesículas que resultou em separação de fases total no 42º dia de armazenagem.

Tseng et al. (2007) verificaram que a repulsão eletrostática e potencial zeta de vesículas produzidas a partir de fosfatidilcolina tenderam a aumentar quando colesterol foi adicionado à dispersão de lipossomas; sabendo-se que a vitamina D₃ é uma molécula derivada do colesterol, pode-se dizer que ambas propiciam efeito semelhante quando adicionadas a dispersões produzidas com a mesma matéria-prima. Mohammadi, Ghanbarzadeh e Hamishehkar (2014) verificaram mudanças pouco significativas em valores de potencial zeta obtidos a partir de análise de lipossomas encapsulando vitamina D₃ quando comparados às vesículas vazias. Os autores atribuíram tal resultado a baixa quantidade de vitamina D₃ adicionada à dispersão (5.000 UI). Os resultados obtidos por esse trabalho, por sua vez, mostraram que lipossomas encapsulando maiores quantidades de vitamina D₃ também são capazes de permanecer estáveis por um longo período de tempo (42 dias). Comparando-se as formulações entre si, percebe-se que as dispersões contendo 80.000 UI apresentaram maiores valores positivos e negativos de

potencial zeta, indo contra o que foi apresentado por Fatouros e Antimisiaris (2002), de que compostos hidrofóbicos, quando adicionados em maior quantidade, poderiam acarretar em uma mudança na conformação espacial da fosfatidilcolina, devido a uma mudança de direção das cabeças polares para regiões externas ao lipossoma, o que acarretaria em uma instabilidade precoce do sistema.

Figura 34. Valores de potencial zeta obtidos para os lipossomas encapsulando vitamina D₃ e coencapsulando curcumina e vitamina D₃, onde (▲) 50.000 UI VD₃, (◆) 80.000 UI VD₃, (●) 50.000 UI VD₃ + curcumina e (■) 80.000 UI VD₃ + curcumina

5.1.3.2 Estabilidade da curcumina e da vitamina D₃ encapsuladas

Em relação à capacidade de proteção da curcumina encapsulada nos lipossomas, ao longo dos 42 dias de armazenagem sob refrigeração, pode-se verificar, observando-se a Figura 35, que as perdas de bioativo foram relativamente baixas, sendo 11,3 % (m/v) para a formulação contendo 50.000 UI de vitamina D₃ e 6,7 % (m/v) para a formulação contendo 80.000 UI. A concentração de vitamina D₃, por sua vez, apresentou um decaimento de 11,6 % (m/v) nos lipossomas coencapsulando curcumina e 50.000 UI e 8,8 % (m/v) nos lipossomas coencapsulando curcumina e 80.000 UI (Figura 36), valores também considerados baixos. As diferenças entre as quantidades de vitamina iniciais (dia zero) obtidas para as amostras contendo a mesma concentração do bioativo (50.000 UI e 80.000 UI), coencapsulado ou não com curcumina, se devem à heterogeneidade dos prolipossomas produzidos.

Figura 35. Perfil temporal da concentração de curcumina ao longo do tempo de armazenagem nos lipossomas coencapsulando curcumina e vitamina D₃, onde (●) 50.000 UI VD₃ + curcumina e (■) 80.000 UI VD₃ + curcumina.

Figura 36. Perfil temporal da concentração de vitamina D₃ ao longo do tempo de armazenagem nos lipossomas coencapsulando curcumina e vitamina D₃, onde (▲) 50.000 UI VD₃, (◆) 80.000 UI VD₃, (●) 50.000 UI VD₃ + curcumina e (■) 80.000 UI VD₃ + curcumina.

A produção de dispersões coloidais contendo bioativos hidrofóbicos e vitaminas com propriedades antioxidantes é uma prática decorrente na literatura (HENTSCHEL et al., 2008; GOMES et al., 2013; GOMES et al., 2017). Para os lipossomas produzidos

neste trabalho, pode-se dizer que a presença da vitamina D₃ exerceu um papel protetor sobre a curcumina, aparentemente protegendo-a da oxidação ao longo da armazenagem.

A vitamina D não apresenta grande potencial antioxidante quando comparada às vitaminas A, E e C (CATANIA; BARROS; FERREIRA, 2009), sendo assim, uma outra explicação foi necessária para explicar essa “proteção” oferecida à curcumina; para tal, utilizou-se como base a localização da molécula de vitamina D₃ na bicamada lipídica dos lipossomas.

Sabe-se que a matéria-prima empregada, o Phospholipon 90H, possui 98% de fosfatidilcolina hidrogenada, contendo majoritariamente ácido palmítico (C16:O) e ácido esteárico (C18:O); logo, se trata de uma matéria prima estruturalmente heterogênea que possui cadeias de hidrocarbonetos mistas. A partir dessa informação, é possível considerar que a vitamina D₃, quando adicionada a uma dispersão lipossomal, tende a se localizar, em menor proporção, nos espaços livres que são formados ao final das cadeias de hidrocarbonetos dos ácidos constituintes de menor tamanho; no caso desse trabalho, nos espaços deixados pelas moléculas de ácido palmítico (mostrado na Figura 37B como (I)).

Uma segunda hipótese pode ser inferida a partir da estrutura molecular da vitamina D₃, partindo-se do fato de que a mesma possui um radical hidroxila (OH) em sua extremidade, conforme observado na Figura 16. Moléculas com hidroxilas expostas, por sua vez, são utilizadas como crioprotetores durante a produção de lipossomas liofilizados, uma vez que se unem ao grupamento polar dos fosfolipídios constituintes, provocando um aumento da rigidez da bicamada lipídica, acarretado pela diminuição do espaçamento entre os fosfolipídios, o que impede a expulsão dos bioativos encapsulados do interior da estrutura da vesícula. Sendo assim, pode-se propor que a vitamina D₃ contribuiu na mudança da localização da curcumina na membrana fosfolipídica, devido a consequente condensação das moléculas de fosfatidilcolina, fazendo com que o curcuminóide se encontre em regiões mais profundas da estrutura e, portanto, esteja mais protegido da oxidação (mostrado Figura 37B como (II)). No caso deste trabalho, uma maior quantidade de vitamina D₃ presente na estrutura do lipossoma, no caso 80.000 UI, proporcionou uma maior proteção para a curcumina também presente no sistema.

Figura 37. Representação da provável localização da curcumina e da vitamina D₃ na bicamada lipídica dos lipossomas, onde (A) dispersão encapsulando apenas curcumina e (B) dispersão coencapsulando curcumina e vitamina D₃, em que (I) vitamina se localiza nos “buracos” deixados pelo ácido palmítico na molécula de fosfatidilcolina e (II) vitamina se localiza ligada à cabeça polar da fosfatidilcolina.

5.1.3.3 Análises de colorimetria instrumental

Os parâmetros colorimétricos, obtidos ao longo dos 42 dias de armazenagem, para os lipossomas coencapsulando curcumina e vitamina D₃ e estabilizados com gomas xantana e guar são mostrados na Figura 38. Em relação às coordenadas a^* e b^* (Figura 38A), pode-se verificar que o parâmetro a^* seguiu com valor constante até o final da vida de prateleira das dispersões enquanto o valor de b^* decaiu com o passar do tempo. Os valores obtidos de a^* indicaram que a curcumina sofreu pouca oxidação em todas as formulações, visto que seus valores permaneceram negativos, próximos a zero, na região do amarelo. Caso houvesse oxidação, os valores passariam para a região da cor verde, já que a curcumina oxidada apresenta essa coloração. O decaimento do valor de b^* foi mais presente na formulação contendo 80.000 UI de vitamina, tal fato pode ser explicado pelo fato da dispersão apresentar maiores quantidades de vitamina D₃, que apresenta caráter branco quando pura, porém acinzentada quando degradada. Logo, um aumento na opacidade causada pela oxidação da vitamina D₃ levaria a uma diminuição tanto do parâmetro b^* , que migraria para a região do azul, quanto da luminosidade (L^*), o que de fato ocorreu, de acordo com a Figura 38B.

O croma (C^*_{ab}), mostrado na Figura 39A, também sofreu decaimento acentuado na formulação contendo 80.000 UI de vitamina D₃. Isso ocorre uma vez que, de acordo

com a Equação 1, o valor de C^*_{ab} depende diretamente do valor do quadrado de b^* , portanto, quanto maior a diferença nos valores de b^* , maior a diferença os valores de C^*_{ab} . Em relação ao ângulo de Hue (Figura 39B), pode-se notar que os valores estão todos próximos a 90° , valor correspondente ao amarelo na escala CIELAB (Figura 23), valor condizente com a tonalidade fornecida pela curcumina às dispersões.

Em relação a diferença total de cor (TCD), cujos valores estão apresentados na Figura 40, é possível observar que, no dia final da vida de prateleira das dispersões, a formulação contendo 80.000 UI de vitamina D_3 apresentou uma diferença total de cor de aproximadamente 23,8, enquanto que a formulação contendo 50.000 UI apresentou uma diferença de 4,74. O alto valor obtido para a amostra contendo maior quantidade de vitamina D_3 , como no caso do croma, é devido aos valores de b^* determinados ao longo do tempo, já que esse parâmetro é calculado utilizando os valores de b^* (Equação 3). Portanto, do ponto de vista instrumental, houve perda da coloração das dispersões contendo 80.000 UI. Porém pela Figura 36, pode-se verificar que essa perda não corresponde a uma perda na eficiência de encapsulação dos lipossomas multilamelares.

Figura 38. Parâmetros colorimétricos obtidos para os lipossomas encapsulando curcumina¹ e coencapsulando curcumina e vitamina D₃: **A)** a* e b* e **B)** Luminosidade (L*), onde (▲) curcumina, (●) 50.000 UI VD₃ + curcumina e (■) 80.000 UI VD₃ + curcumina.

¹ Valores determinados pela aluna de iniciação científica Camila Garcia Jange durante execução do Projeto FAPESP 2014/23376-9, que monitorou lipossomas encapsulando curcumina durante 35 dias de armazenagem.

Figura 39. Parâmetros colorimétricos obtidos para os lipossomas encapsulando curcumina¹ e coencapsulando curcumina e vitamina D₃: **A)** Croma (C^*_{ab}) e **B)** Ângulo de Hue (h^*_{ab}) onde (▲) curcumina, (●) 50.000 UI VD₃ + curcumina e (■) 80.000 UI VD₃ + curcumina.

¹ Valores determinados pela aluna de iniciação científica Camila Garcia Jange durante execução do Projeto FAPESP 2014/23376-9, que monitorou lipossomas encapsulando curcumina durante 35 dias de armazenagem

Figura 40. Diferença Total de Cor (TCD) obtida para os lipossomas encapsulando curcumina¹ e coencapsulando curcumina e vitamina D₃, onde (▲) curcumina, (●) 50.000 UI VD₃ + curcumina e (■) 80.000 UI VD₃ + curcumina.

A Tabela 7 dispõe os valores obtidos para os parâmetros físico-químicos obtidos para as dispersões coencapsulando os dois bioativos de interesse e para as dispersões encapsulando apenas vitamina D₃.

¹ Valores determinados pela aluna de iniciação científica Camila Garcia Jange durante execução do Projeto FAPESP 2014/23376-9, que monitorou lipossomas encapsulando curcumina durante 35 dias de armazenagem

Tabela 7. Tabela resumo dos parâmetros obtidos para os lipossomas produzidos encapsulando curcumina¹ ou vitamina D₃ e coencapsulando curcumina e vitamina D₃ armazenados a 10 °C na ausência de luz

Formulação/ Tempo										
	Lipossoma Curcumina		Lipossoma 50.000 UI		Lipossoma 80.000 UI		Lipossoma 50.000 UI VD ₃ + Curcumina		Lipossoma 80.000 UI VD ₃ + Curcumina	
	Dia 0	Dia 30	Dia 0	Dia 42	Dia 0	Dia 42	Dia 0	Dia 42	Dia 0	Dia 42
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	686 ^A ± 22	804 ^B ± 21	1131 ^C ± 82,4	1367 ^{C,D} ± 100	1213 ^C ± 54,3	1583 ^D ± 106	1312 ^C ± 72,2	1527 ^D ± 64,0	813 ^B ± 41,8	1103 ^C ± 29,7
Polidispersidade	-	-	0,100 ^A ± 0,032	0,094 ^A ± 0,038	0,293 ^B ± 0,019	0,141 ^A ± 0,045	0,254 ^B ± 0,020	0,121 ^A ± 0,024	0,154 ^A ± 0,026	0,169 ^A ± 0,043
Concentração de curcumina (µg/mL)	20,2 ^A ± 2,73	15,4 ^B ± 1,58	-	-	-	-	43,4 ^C ± 3,45	38,9 ^C ± 3,48	54,1 ^D ± 5,08	50,5 ^{C,D} ± 4,14
% curcumina preservada	-	76,2	-	-	-	-	-	89,6	-	93,3
Concentração de VD ₃ (µg/mL)	-	-	3,71 ^A ± 0,13	3,36 ^B ± 0,07	4,80 ^C ± 0,24	3,96 ^D ± 0,11	5,21 ^E ± 0,16	4,60 ^C ± 0,19	8,14 ^F ± 0,43	7,43 ^F ± 0,56
% VD ₃ preservada	-	-	-	90,6	-	82,5	-	88,3	-	91,3
Potencial Zeta (mV)	-42,7 ^A ± 2,38	-21,5 ^B ± 5,92	-36,0 ^C ± 3,11	-12,5 ^D ± 2,46	-49,4 ^A ± 9,76	-14,4 ^D ± 6,24	-29,5 ^B ± 2,92	-18,3 ^{B,D} ± 2,44	-42,9 ^A ± 3,51	-13,2 ^D ± 1,56
Parâmetro Colorimétrico	a*	-8,28 ^A ± 0,31	-7,15 ^B ± 0,02	-	-	-	-9,69 ^C ± 0,32	-8,23 ^A ± 0,49	-8,27 ^A ± 0,41	-7,97 ^A ± 0,26
	b*	38,2 ^A ± 0,20	32,7 ^B ± 0,61	-	-	-	43,1 ^C ± 0,70	38,8 ^D ± 1,38	58,1 ^E ± 1,08	39,4 ^D ± 0,52
	L*	42,4 ^A ± 0,41	39,3 ^B ± 0,19	-	-	-	38,3 ^C ± 0,29	39,9 ^{B,C} ± 1,02	56,9 ^D ± 0,14	42,2 ^{A,B} ± 1,58
	C* _{ab}	38,4 ^A ± 0,15	34,0 ^B ± 0,36	-	-	-	44,1 ^C ± 0,35	39,7 ^D ± 0,47	58,7 ^E ± 0,26	40,2 ^D ± 0,44
	h* _{ab}	88,7 ^A ± 0,01	88,7 ^A ± 0,01	-	-	-	90,3 ^B ± 0,26	90,0 ^B ± 0,14	91,1 ^B ± 0,22	89,8 ^B ± 0,14
	TCD	-	0,85 ^A ± 0,50	-	-	-	-	4,74 ^B ± 0,17	-	23,8 ^C ± 4,21

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

¹ Valores determinados pela aluna de iniciação científica Camila Garcia Jange durante execução do Projeto FAPESP 2014/23376-9, que monitorou lipossomas encapsulando curcumina durante 35 dias de armazenagem.

5.2 Caracterização estrutural dos lipossomas

Os lipossomas coencapsulando curcumina e vitamina D₃, com 50.000 UI e 80.000 UI, encapsulando apenas vitamina D₃ (em ambas as proporções) e encapsulando apenas curcumina, todos estabilizados com 0,10% gomas totais (m/v), sendo 10 % GX (m/v) e 90 % GG (m/v), foram submetidos às seguintes análises: calorimetria diferencial de varredura, análises de espalhamento de raios-X a baixos ângulos e análises reológicas.

5.2.1 Análises térmicas utilizando calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A Figura 41 apresenta os termogramas obtidos para os lipossomas encapsulando curcumina, encapsulando diferentes concentrações de vitamina D₃ e coencapsulando ambos os bioativos, sendo todas as dispersões estabilizadas com mistura de gomas xantana e guar a 0,10% gomas totais (m/v) sendo 10% GX (m/v) e 90% GG (m/v). A Tabela 8, por sua vez, apresenta os parâmetros calorimétricos obtidos durante as análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC), incluindo a temperatura onset (T_{onset}), a temperatura de transição de fase (T_m), a altura do pico endotérmico e a entalpia de transição (ΔH_m).

Figura 41. Termogramas obtidos para as dispersões de lipossomas encapsulando curcumina, 50.000 UI de VD₃, 80.000 UI de VD₃ e coencapsulando curcumina e 50.000 UI de VD₃ ou curcumina e 80.000 UI de VD₃.

Tabela 8. Parâmetros calorimétricos obtidos (em triplicata) para as dispersões de lipossomas estabilizados com 0,10% gomas totais (m/v) sendo 10% GX (m/v) e 90% GG (m/v).

Formulação	T_{onset} (°C)	T_m (°C)	Altura do Pico (W/g)	ΔH_m (J/g)
Curcumina	$50,4 \pm 0,30$	$52,6 \pm 0,28$	$-0,026 \pm 0,001$	$0,62 \pm 0,02$
50.000 UI VD ₃	$52,0 \pm 0,45$	$53,9 \pm 0,49$	$-0,024 \pm 0,003$	$0,57 \pm 0,05$
80.000 UI VD ₃	$51,8 \pm 0,17$	$53,7 \pm 0,06$	$-0,023 \pm 0,002$	$0,51 \pm 0,11$
Curcumina + 50.000 UI VD ₃	$51,2 \pm 0,17$	$53,1 \pm 0,04$	$-0,021 \pm 0,000$	$0,50 \pm 0,00$
Curcumina + 80.000 UI VD ₃	$50,9 \pm 0,15$	$53,1 \pm 0,01$	$-0,027 \pm 0,001$	$0,67 \pm 0,04$

Como é possível verificar, todos os termogramas apresentaram um pico de transição endotérmico, com T_m próximos a 53 °C. A presença deste único pico é um indicativo de certa homogeneidade estrutural dos lipossomas produzidos, indicando a não formação de subdomínios na bicamada lipídica, além de uma confirmação da premissa de que a rede polimérica formada pelas gomas guar e xantana foi realmente formada na fase contínua das dispersões, visto que a presença de mais picos nos termogramas poderia indicar a adsorção dos hidrocoloides na superfície das vesículas (TONIAZZO, 2013; TONIAZZO et al., 2014). Esse comportamento era esperado, uma vez que o fosfolipídio utilizado (Phospholipon 90H) é uma matéria prima altamente hidrogenada. No entanto, ao contrário de observado por TONIAZZO (2013) (Figura 42), os picos obtidos por esse trabalho não foram estreitos, ou seja, não apresentaram uma grande altura de pico, significando que o fenômeno de transição de fase não foi completamente cooperativo. Outra explicação para tal parte do princípio de que os diâmetros médios hidrodinâmicos obtidos para as amostras produzidas por Toniazzi et al. (2014) foram maiores do que os obtidos por este trabalho; Melchior e Stein (1976) mostraram que vesículas de menor tamanho tendem a possuir menores valores de entalpia de transição e entropia de transição.

Figura 42. Termogramas obtidos para as dispersões de lipossomas estabilizadas com misturas de gomas guar e xantana

Fonte: TONIAZZO (2013)

A temperatura de transição de fases indica a temperatura em que as ligações dos hidrocarbonetos que constituem os fosfolipídios passam de seu estado mais ordenado (gel) para um estado menos ordenado (líquido-cristalino) e é influenciada, dentre outros parâmetros, pelo tamanho da cadeia alifática e da cabeça polar dos fosfolipídios constituintes, além do grau de insaturação da cadeia (JAIN; WU, 1977; LASIC, 1993; TAYLOR; MORRIS, 1995; KOYNOVA; CAFFREY, 1998). Sabe-se que no estado gel as cadeias acil dos hidrocarbonetos apresentam menor mobilidade do que no estado líquido-cristalino, uma vez que a maioria das ligações apresenta conformação *trans*. No estado líquido-cristalino, a configuração *cis* dos fosfolipídios proporciona uma estrutura menos ordenada (mais fluida), mais dinâmica e mais permeável (JAKUBOWSKI, 2016). A Figura 43 mostra um esquema dos estados físicos gel e líquido cristalino, evidenciando a disposição dos fosfolipídios.

Figura 43. Possíveis estados físicos dos fosfolipídios constituintes dos lipossomas dependendo da temperatura de transição (T_m)

Fonte: Adaptado de Smith e Dea (2013)

Em relação à fase líquido-cristalino, sabe-se que a curcumina causa um estiramento das cadeias acil da fosfatidilcolina, agindo de forma similar ao colesterol, tornando a molécula termodinamicamente mais estável, o que leva a um aumento da rigidez da membrana e uma consequente perda de sua mobilidade e permeabilidade (LEE et al., 2005; HERNÁNDEZ; SCHOLZ, 2008; BRIUGLIA et al., 2015, JAKUBOWSKI, 2016). A Figura 44 mostra um esquema dos tipos possíveis de ligações encontrados nas moléculas de fosfatidilcolina após adição de curcumina na dispersão de lipossomas.

Figura 44. Tipos de ligações químicas encontradas nas moléculas de fosfatidilcolina: (a) assimétrica; (b) conformação *trans* e (c) conformação *cis*.

Fonte: Adaptado de KOYNOVA e CAFFREY (1998)

Uma vez que todas as dispersões apresentaram valores de T_m próximos a 53 °C pode-se afirmar que nem a curcumina e nem a vitamina D₃ alterou significativamente a fluidez da bicamada lipídica. A adição de vitamina D₃ não alterou as interações hidrofóbicas nos lipossomas contendo curcumina. Outra importante conclusão a ser tirada diz respeito ao fato de que a T_m para todas as dispersões é muito superior à temperatura em que os lipossomas permanecem quando estão armazenados (aproximadamente 10 °C), ou seja, não há a

possibilidade de transição de fases durante a refrigeração, o que contribui na estabilidade do sistema como um todo.

Gardikis et al. (2006) produziram dispersões com dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) e dimetoxicurcumina e verificaram que, a partir de certa quantidade de bioativo adicionada no sistema, o mesmo entra em colapso, sendo possível observar uma consequente queda nos valores obtidos para entalpia de transição (ΔH_m). Foi possível verificar tal diminuição nos valores de ΔH_m quando maiores quantidades de vitamina D₃ foram adicionadas sozinhas ao sistema; sabe-se que algumas moléculas podem causar uma desestabilização do mosaico lipídico do lipossoma, visto que atuam como espaçadores, levando a uma diminuição no valor da temperatura de transição gel-líquido-cristalino (SAIJA et al., 1995). O mesmo não pôde ser observado quando maiores quantidades de vitamina foram adicionadas conjuntamente com curcumina. Uma possibilidade a ser considerada seria aquela em que a presença de maiores quantidades de vitamina, atuando sinergicamente com a curcumina, contribui em uma maior rigidez da estrutura da bicamada lipídica, o que retardaria o processo de agregação. Jorgensen et al. (1991) mostraram que moléculas que se ligam às cadeias intermediárias do grupamento acila dos lipídios que constituem os lipossomas provocam variações na temperatura de transição gel-líquido-cristalino mas não provocam mudanças na entalpia necessária para que tal transição ocorra; esse efeito não foi visto nas dispersões encapsulando vitamina D₃, na presença ou não de curcumina, visto que não houveram mudanças significativas nos valores de ΔH_m com o aumento da concentração do bioativo, corroborando o que foi mostrado anteriormente. Ou seja, provavelmente a vitamina D₃ não se liga às cadeias intermediárias dos fosfolipídios e sim no carbono final da cadeia aumentando consequentemente a temperatura de transição (T_m) do lipossoma, o que pode ser visto a partir do aumento das temperaturas de transição das formulações contendo vitamina comparando-se com a temperatura da formulação contendo apenas curcumina.

5.2.2 Determinação de parâmetros reológicos

As curvas de escoamento mostradas na Figura 45 foram obtidas em duplicata, a fim de ampliar a caracterização dos sistemas lipídicos estudados. Além das curvas apresentando o comportamento das formulações coencapsulando curcumina e vitamina D₃ coencapsulados (Figuras 45E e 45F), são mostrados também as curvas obtidas para lipossomas encapsulando somente vitamina D₃ nas quantidades 50.000 UI (Figura 45C) e 80.000 UI (Figura 45D), lipossomas encapsulando apenas curcumina (Figura 45B) e lipossomas “vazios” (Figura

45A). A partir dos resultados obtidos, observa-se que os sistemas estudados apresentaram comportamento não-newtoniano do tipo pseudoplástico. É possível verificar também que taxas mais altas de deformação levaram a valores maiores de tensão de cisalhamento, comprovando que as moléculas constituintes dos lipossomas fluíram no sentido do escoamento, o que levou a uma diminuição da viscosidade do sistema. Verificou-se também que, no 42º dia de armazenagem, as amostras apresentaram valores inferiores de tensão de cisalhamento em comparação ao dia zero, evidenciando uma perda acentuada da viscosidade; tal fato pode ser explicado a partir da perda da capacidade de estabilização da rede polimérica composta pelas gomas guar e xantana, que vai enfraquecendo com o passar dos dias durante a armazenagem (TONIAZZO et al., 2014; CARVALHO et al., 2015).

Comparando-se os lipossomas com e sem bioativos é possível verificar um aumento na tensão de cisalhamento logo no dia zero de armazenagem. Levando em consideração os lipossomas encapsulando apenas curcumina, observa-se que as tensões necessárias no dia zero para cisalhar a amostra foram superiores a todas as tensões obtidas para as formulações contendo vitamina D₃. Sabe-se que um aumento no diâmetro médio da vesícula é decorrente da inserção de bioativos na membrana fosfolipídica. Muitos estudos na literatura correlacionam o aumento do diâmetro com mudanças nos parâmetros reológicos (MILLER, 1988; LÓPEZ-MONTILLA et al., 2002; BOUCHEMAL et al., 2004; SABERI; YANG; MCCLEMENTS, 2013).

Sabe-se que a viscosidade de misturas contendo gomas xantana e guar depende de uma série de parâmetros como concentração dos hidrocoloides, temperatura de dissolução e relação da proporção das gomas (CASAS et al., 2000). Na Figura 46 são apresentados os dados de viscosidade aparente (μ_s) ao longo dos 42 dias de armazenagem. É possível notar que a dispersão de lipossomas vazios apresentou menores valores de viscosidade ao longo dos 42 dias de armazenagem, logo nota-se que a presença de bioativos no lipossoma influenciam no valor da viscosidade do sistema, isso se deve provavelmente ao aumento do diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas constituintes, o que contribui no aumento da viscosidade e consequentemente no aumento da tensão de cisalhamento (LIN; PASCALL, 2014).

Figura 45. Curvas de escoamento obtidas para os lipossomas estabilizados com gomas guar e xantana, armazenados a 10 °C na ausência de luz, nas seguintes condições: vazios (**A**), encapsulando curcumina (**B**), 50.000 UI VD₃ (**C**), 80.000 UI VD₃ (**D**) ou coencapsulando 50.000 UI VD₃ e curcumina (**E**) e 80.000 UI VD₃ e curcumina (**F**), ao longo do tempo de armazenagem, onde (♦) Dia Zero, (■) 14° Dia, (▲) 30° Dia e (●) 42° Dia

Figura 46. Perfil temporal da viscosidade aparente (μ_a) dos lipossomas estabilizados com gomas guar e xantana, armazenados a 10 °C na ausência de luz, nas seguintes condições (●) lipossomas vazios, (■) encapsulando curcumina, (◆) 50.000 UI VD₃, (▲) 80.000 UI VD₃ ou (x) coencapsulando 50.000 UI VD₃ e curcumina e (*) 80.000 UI VD₃ e curcumina, ao longo do tempo de armazenagem. Taxa de deformação: 0,01 a 100 s⁻¹

Nas Figuras 47 e 48, a seguir, são mostrados os valores de “n” (índice de comportamento de escoamento) e “K” (índice de consistência) obtidos a partir de ajuste do modelo de Herschel-Bulkley, ao longo do período de 42 dias de armazenagem refrigerada. É possível notar que as amostras contendo curcumina em sua formulação apresentaram menores valores de “n” ao longo do tempo de armazenagem. O “n” representa o grau de pseudoplasticidade da amostra, sendo que, quanto maiores seus valores, menores o grau de pseudoplasticidade. Nota-se que as amostras com maior viscosidade aparente foram aquelas que apresentaram menores valores de “n”, conforme esperado. O parâmetro “K”, por sua vez, foi maior nas amostras com maiores valores de viscosidade aparente, no caso os lipossomas contendo apenas curcumina, o que também era esperado, sendo que quanto maior a aglomeração da rede polimérica, maior o valor de “K”. Em relação aos lipossomas contendo diferentes concentrações de vitamina D₃, é possível verificar que as amostras contendo 80.000 UI de VD₃, coencapsulando ou não curcumina, apresentaram maiores valores de “K” e menores valores de “n” quando comparadas as amostras contendo 50.000 UI de VD₃, mostrando que uma maior adição de vitamina leva a um aumento na viscosidade do sistema, não atuando de forma desfavorável na formação da rede polimérica formada pelas gomas guar e xantana. Assim como as dispersões contendo apenas curcumina, as dispersões contendo apenas vitamina D₃ apresentaram maiores valores de “K” e menores valores de “n” quando comparadas aos sistemas coencapsulando os dois bioativos, mostrando que a coencapsulação promove a formação de sistemas menos pseudoplásticos, porém não menos estáveis que as amostras contendo apenas um bioativo encapsulado, conforme visto nos resultados obtidos durante a etapa de verificação estabilidade dos lipossomas.

Figura 47. Perfil temporal do índice de comportamento (n) para lipossomas estabilizados com gomas guar e xantana, armazenados a 10 °C na ausência de luz: (●) lipossomas vazios, (■) encapsulando curcumina, (◆) 50.000 UI VD_3 , (▲) 80.000 UI VD_3 ou (x) coencapsulando 50.000 UI VD_3 e curcumina e (*) 80.000 UI VD_3 e curcumina, ao longo do tempo de armazenagem.

Figura 48. Perfil temporal do índice de consistência (K) para lipossomas estabilizados com gomas guar e xantana, armazenados a 10 °C na ausência de luz (●) lipossomas vazios, (■) encapsulando curcumina, (◆) 50.000 UI VD_3 , (▲) 80.000 UI VD_3 ou (x) coencapsulando 50.000 UI VD_3 e curcumina e (*) 80.000 UI VD_3 e curcumina, ao longo do tempo de armazenagem.

5.2.3 Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

As análises de espalhamento de raios-X a baixos ângulos tiveram como objetivo determinar a influência da presença da curcumina e vitamina D₃ na estrutura da membrana fosfolipídica dos lipossomas. Como o objetivo principal do projeto foi determinar a possibilidade de coencapsulação de curcumina e vitamina D₃ na mesma matriz lipossomal, foi crucial verificar se a presença de algum dos bioativos seria capaz de desestabilizar a membrana fosfolipídica dos lipossomas; caso tal fato ocorresse, a inserção de outro bioativo na bicamada poderia se tornar ainda mais problemática.

5.2.3.1 *Influência da temperatura na estrutura da bicamada lipídica dos lipossomas*

As curvas de intensidade de espalhamento de raios-X $[I(q)]$ para os lipossomas encapsulando curcumina, vitamina D₃ e coencapsulando os dois bioativos são mostradas na Figura 49. Comparando-se as curvas de intensidade para as amostras contendo apenas curcumina e apenas vitamina D₃ (A, B e D), independente da concentração adicionada (50.000 UI ou 80.000 UI), pode-se verificar que elas se assemelham entre si, evidenciando que, de forma isolada, os bioativos não interferem na estrutura da bicamada lipídica. Pode-se ver claramente o aumento da intensidade quando a temperatura se aproxima da temperatura de transição gel-líquido-cristalino (T_m), aproximadamente 53 °C, conforme observado nas análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC), onde as ligações dos hidrocarbonetos que constituem os fosfolipídios passam para seu estado menos ordenado. A análise de SAXS pode ser utilizada também para determinar fases líquido-cristalinas de uma dispersão, uma vez que os raios-X possuem comprimento de onda com tamanho equivalente aos espaçamentos encontrados entre os grupos formadores de cristais (ATKINS, 1998). A combinação dos bioativos, no entanto, cujas curvas são mostradas nas Figuras 46C e 46E, promove certa resistência à transição de fases, visto que não há um aumento na intensidade de raios-X quando se atinge a T_m , mostrando que a membrana se torna mais rígida na presença dos dois bioativos, fator que contribui na estabilidade dos bioativos no interior da estrutura lipossomal.

Figura 49. Curvas de intensidade $I(q)$ obtidas por SAXS para os padrões de espalhamento de raios-X das dispersões contendo: (A) curcumina, (B) 50.000 UI VD_3 , (C) 50.000 UI VD_3 + curcumina, (D) 80.000 UI VD_3 e (E) 80.000 UI VD_3 + curcumina.

Conclusões adicionais podem ser retiradas dos gráficos de distribuição eletrônica obtidos pelas análises se SAXS, aqui mostrados na Figura 50. É possível observar que, para todas as formulações estudadas, houve certo encurtamento no tamanho da lamela (r) quando a temperatura passou de 50 (curva rosa) – 23 $\text{\AA}$ para 60 °C (curva verde) – 20 $\text{\AA}$, esse resultado reflete a contração da bicamada lipídica, conforme visto anteriormente, devido a passagem pela temperatura de transição gel-líquido-cristalino (T_m) dos fosfolipídios que constituem os lipossomas, aproximadamente 53 °C.

Figura 50. Curvas de densidade eletrônica obtidas por SAXS para as dispersões contendo: (A) curcumina, (B) 50.000 UI VD₃, (C) 50.000 UI VD₃ + curcumina, (D) 80.000 UI VD₃ e (E) 80.000 UI VD₃ + curcumina.

A Tabela 9 apresenta um resumo de todos os parâmetros obtidos após ajuste dos dados obtidos por SAXS pelo modelo da deconvolução gaussiana, enquanto a Figura 48 apresenta um perfil esquemático mostrando a evolução dos parâmetros com o aumento da temperatura de análise.

A distância entre bicamadas lipídicas vizinhas (D) se mostrou crescente para todas as formulações até a temperatura de 50 °C, decaindo logo em seguida; esse comportamento reflete o encurtamento da estrutura, característica visível na fase líquido-cristalino (Figura 51A).

Em relação ao parâmetro δ_m (Figura 51B), pode-se observar que, para todas as amostras, a espessura da bicamada se manteve praticamente constante com o aumento da temperatura, mesmo naquelas coencapsulando os dois bioativos, com pequeno decréscimo nas amostras contendo vitamina D₃ quando a temperatura de transição de fase foi atingida, evidenciando que ambos se acomodaram na estrutura interna do lipossoma sem que ocorresse nenhuma perturbação no tamanho da bicamada.

O parâmetro N (Figura 51C), por sua vez, apresentou o mesmo comportamento que δ_m até a temperatura de 50 °C, ponto em que foi verificado um aumento considerável em seu valor, evidenciando-se a presença de um maior número de camadas correlacionadas.

O parâmetro de Caillé (η) (Figura 51D) apresentou certa tendência de crescimento quando há o aumento da temperatura, corroborando a premissa de que a membrana vai se tornando cada vez mais flexível com o aquecimento.

Tabela 9. Resumo dos parâmetros obtidos após modelagem dos dados de SAXS pelo modelo da deconvolução gaussiana

Formulação	T (°C)	Parâmetro			
		D	δ_m	N	η
Lipossoma + Curcumina	20	$70,9 \pm 0,18$	$56,8 \pm 4,50$	$2,78 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,00$
	30	$71,5 \pm 0,16$	$58,2 \pm 7,30$	$2,34 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,00$
	40	$73,2 \pm 0,16$	$54,6 \pm 7,80$	$2,52 \pm 0,04$	$0,06 \pm 0,00$
	50	$75,0 \pm 0,26$	$54,1 \pm 2,40$	$2,60 \pm 0,08$	$0,09 \pm 0,00$
	60	$68,3 \pm 0,19$	$56,5 \pm 5,30$	$7,63 \pm 0,04$	$0,07 \pm 0,00$
Lipossoma + 50.000 UI VD ₃	20	$68,9 \pm 0,26$	$52,7 \pm 1,88$	$2,51 \pm 0,06$	$0,03 \pm 0,00$
	30	$69,0 \pm 0,25$	$55,8 \pm 1,60$	$2,59 \pm 0,07$	$0,03 \pm 0,00$
	40	$68,8 \pm 0,29$	$55,4 \pm 2,82$	$2,85 \pm 0,10$	$0,07 \pm 0,03$
	50	$73,2 \pm 0,11$	$54,8 \pm 0,49$	$2,65 \pm 0,09$	$0,06 \pm 0,03$
	60	$67,6 \pm 0,06$	$51,3 \pm 0,17$	$7,82 \pm 0,13$	$0,09 \pm 0,01$
Lipossoma + 80.000 UI VD ₃	20	$70,2 \pm 0,28$	$55,6 \pm 1,34$	$3,00 \pm 0,13$	$0,01 \pm 0,00$
	30	$70,3 \pm 0,30$	$52,7 \pm 2,00$	$3,09 \pm 0,08$	$0,02 \pm 0,00$
	40	$71,5 \pm 0,19$	$51,1 \pm 1,50$	$2,53 \pm 0,06$	$0,06 \pm 0,00$
	50	$73,1 \pm 0,26$	$54,1 \pm 0,21$	$3,15 \pm 0,09$	$0,06 \pm 0,02$
	60	$67,9 \pm 0,08$	$50,4 \pm 0,21$	$6,94 \pm 0,14$	$0,05 \pm 0,01$
Lipossoma + Curcumina + 50.000 UI VD ₃	20	$70,7 \pm 0,46$	$55,4 \pm 1,25$	$2,26 \pm 0,06$	$0,01 \pm 0,00$
	30	$70,8 \pm 0,34$	$54,6 \pm 1,02$	$2,48 \pm 0,08$	$0,01 \pm 0,00$
	40	$71,7 \pm 0,31$	$56,4 \pm 0,39$	$2,73 \pm 0,13$	$0,02 \pm 0,00$
	50	$75,3 \pm 0,39$	$58,0 \pm 1,68$	$2,65 \pm 0,09$	$0,01 \pm 0,00$
	60	$68,2 \pm 0,09$	$52,3 \pm 0,22$	$6,88 \pm 0,13$	$0,06 \pm 0,00$
Lipossoma + Curcumina + 80.000 UI VD ₃	20	$69,0 \pm 0,16$	$52,8 \pm 0,31$	$2,45 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,00$
	30	$68,8 \pm 0,12$	$52,8 \pm 0,67$	$2,62 \pm 0,06$	$0,05 \pm 0,00$
	40	$68,7 \pm 0,16$	$52,7 \pm 1,61$	$2,71 \pm 0,07$	$0,03 \pm 0,00$
	50	$72,5 \pm 0,29$	$55,0 \pm 1,93$	$2,52 \pm 0,06$	$0,08 \pm 0,03$
	60	$67,9 \pm 0,09$	$50,5 \pm 0,21$	$7,50 \pm 0,19$	$0,09 \pm 0,01$

Figura 51. Representação esquemática da evolução dos parâmetros obtidos pelas análises de SAXS após modelagem por deconvolução gaussiana

5.2.3.2 Influência da curcumina no sistema contendo vitamina D₃

Pode-se observar que a intensidade do padrão de espalhamento de raios-X se altera significativamente quando os sistemas são submetidos a uma temperatura de 60 °C, conforme visto na Figura 52. É possível notar a formação de picos melhor estruturados, condizentes com a fase líquido-cristalino na qual os lipossomas estão após atingir a temperatura de transição de fases (53 °C), onde as cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolipídios estão menos ordenadas. A partir de tal resultado, pode-se concluir que a curcumina contribui na estabilidade térmica das vesículas, visto que as curvas de intensidade não se alteram até que se atinja a temperatura de transição de fases.

Figura 52. Curvas de intensidade $[I(q)]$ obtidas para as dispersões contendo apenas vitamina D₃ (em preto) ou coencapsulando curcumina e vitamina D₃ (em vermelho), sendo 50.000 UI (coluna à esquerda) e 80.000 UI (coluna à direita), em diferentes temperaturas de análise: (A) 40 °C, (B) 50 °C e (C) 60 °C.

5.2.3.3 Influência da quantidade de vitamina D₃ adicionada ao sistema

A Figura 53 mostra as intensidades dos padrões de espalhamento de raios-X das amostras contendo 50.000 UI e 80.000 UI de vitamina D₃, coencapsulando ou não curcumina, sob diferentes temperaturas de análise. Pode-se verificar que, independente da concentração adicionada, da temperatura empregada e da presença de curcumina, as curvas de intensidade se assemelham muito entre si; isso mostra que a vitamina D não exerce atividade estabilizante significativa no sistema lipossomal. Comparando-se os padrões das dispersões encapsulando apenas vitamina D₃ (coluna da esquerda) com aqueles relativos às dispersões coencapsulando vitamina D₃ e curcumina (coluna da direita), pode-se verificar que a presença de curcumina provoca um aumento na faixa de intensidade, tal como o aumento do ruído da leitura após um valor de “q” igual a 0,2 Å⁻¹.

Figura 53. Curvas de intensidade $I(q)$ obtidas para as dispersões contendo 50.000 UI (em preto) ou 80.000 UI (em vermelho) de vitamina D₃, encapsulado na ausência (coluna à esquerda) e na presença (coluna à direita) de curcumina, em diferentes temperaturas de análise: (A) 40 °C, (B) 50 °C e (C) 60 °C.

B **C**

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos ao decorrer deste trabalho de Mestrado, concluiu-se que:

- O método de produção de prolipossomas por recobrimento de sacarose micronizada se mostrou efetivo na produção de lipossomas multilamelares coencapsulando curcumina e vitamina D₃, sendo estes estáveis por 42 dias de armazenagem refrigerada;
- A inulina foi deletéria para a instabilidade precoce dos primeiros lipossomas produzidos, não atuando de forma sinérgica com os demais estabilizantes utilizados – goma guar e goma xantana.
- A proporção de gomas utilizada para estabilização dos lipossomas – 0,10% gomas totais (m/v) sendo 10% GX (m/v) e 90% GG (m/v) foi eficaz na estabilização dos lipossomas multilamelares.
- A coencapsulação dos dois bioativos foi possível, resultado que pode ser comprovado pelo alto teor de retenção de ambos os bioativos ao longo do tempo de armazenagem. As análises de SAXS mostraram que os lipossomas permanecem 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. Tal fato é muito importante ao se pensar em aplicações dos lipossomas produzidos, pois é possível coencapsular vitamina D₃ em concentrações compatíveis com sua utilização em doses recomendadas diárias, juntamente com a curcumina;
- A presença de dois bioativos não influenciou negativamente na formação da rede polimérica estabilizante composta pelas gomas guar e xantana, conforme observado nas análises reológicas realizadas.
- A presença de curcumina e vitamina D₃ não influencia negativamente a estrutura da bicamada lipídica do lipossoma, visto que não houve mudanças significativas na temperatura de transição de fases conforme resultados obtidos por DSC.
- Uma maior concentração de vitamina D₃ adicionada ao meio lipossomal permitiu uma retenção de uma maior quantidade de curcumina ao longo do tempo de armazenagem.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aplicar os lipossomas produzidos durante esse projeto de Mestrado em alguma matriz alimentícia de origem láctea (como sorvete ou iogurte, por exemplo);
- Realizar estudos de digestibilidade, bioacessibilidade e biodisponibilidade de curcumina e da vitamina D₃ coencapsulados nos lipossomas em ensaios *in vitro* e *in vivo*;
- Submeter as dispersões a diferentes condições de stress (pH, temperatura, presença de sal e açúcar, etc);

8 REFERÊNCIAS

AHMED, S. et al. Formation of Lipid Sheaths around Nanoparticle-Supported Lipid Bilayers. **Small Journal**, v. 8, n. 11, p. 1740-1751, 2012.

AL-DEGS, Y. S. Determination of three dyes in commercial soft drinks using HPLC/MS and liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 117, p. 485–490, 2009.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, E. F.; KOESTER, L. S. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na Atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p.780-788, 2008.

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

AMNUAIKIT, T. Formulation development and preparation of fish oil liposome by using high pressure homogenizer for food supplement product. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2015.

ANTON, N.; BENOIT, J.P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185–199, 2008.

ARMAS, L. A. G., HOLLIS, B. W., HEANEY, R. P. Vitamin D₂ is much less effective than vitamin D₃ in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 11, p. 5387–5391, 2004.

ARRUE, L. et al. Substituted phenylhydrazono derivatives of curcumin as new ligands, a theoretical study. **Chemical Physics Letters**, v. 623, p. 42-45, 2015.

ATKINS, P. W. Diffractions techniques. In: Atkins P. W. **Physical Chemistry**, Oxford University Press, p. 619-646, 1998.

BANVILLE, C.; VUILLEMARD, J. C.; LACROIX, C. Comparison of different methods for fortifying Cheddar cheese with vitamin D. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 5-6, p. 375-382, 2000.

BARENHOLZ, Y. et al. A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. **Biochemistry**, v. 16, p. 2806–2810, 1977.

BARENHOLZ, Y.; LASIC, D. D. **Handbook of nonmedical applications of liposomes**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 291-301, 1996.

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

BARRANTE, X. et al. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 54, p. 293-297, 2004.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BERROCAL, D. et al. Evaluación de la actividad de cultivos probióticos sobre *Listeria monocytogenes* durante la producción y almacenamiento de yogurt. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 52, p. 375-380, 2002.

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

BORRA, S. K. et al. Antioxidant and free radical scavenging activity of curcumin determined by using different in vitro and ex vivo models. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 36, p. 2680-2690, 2013.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1-2, p. 241-251, 2004.

BRASIL. Resolução RDC nº 340, de 13 de dezembro de 2002. As empresas fabricantes de alimentos que contenham na sua composição o corante tartrazina (INS 102) devem obrigatoriamente declarar na rotulagem, na lista de ingredientes, o nome do corante tartrazina por extenso. **Diário Oficial de União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 dez. 2002.

BRIUGLIA, M. L. et al. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. **Drug Delivery and Translational Research**. v. 5, n. 3, p. 231-242, 2015.

CANSELL, M.; MOUSSAOUI, N.; LEFRANÇOIS, C. Stability of maride lipid based-liposomes under acird conditions. Influence of xanthan gum. **Journal of Liposome Research**, v. 11, n. 2-3, p. 229-242, 2001.

CARVALHO, A. I. M. Caracterização morfológica das microcápsulas de inulina em iferentes graus de polimerização médio produzidas por spray drying. **Dissertação de Mestrado – Instituto Superior de Agronomia**. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2013.

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

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

CATANIA, A. S.; BARROS, C. R. FERREIRA, S. R. G. Vitaminas e minerais com potencial antioxidante e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 550-559, 2009

CHANAMAI; R.; MCCLEMENTS, D. J. Comparison of gum arabic, modified starch, and whey protein isolate as emulsifiers: Influence of pH, CaCl₂ and temperature. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 120-125, 2002.

CHAUDHRY, Q. et al. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 25, n. 3, p. 241-258, 2008.

CHEN, C. C.; WAGNER, G. Vitamin E nanoparticle for beverage applications. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 82, n. A11, p. 1432–1437, 2004.

CHEN, Y. et al. Preparation of Curcumin-Loaded Liposomes and Evaluation of Their Skin Permeation and Pharmacodynamics. **Molecules**, v. 17, p. 5972-5987, 2012.

CHIU, Y. C.; YANG, W. L. Preparation of vitamin-E microemulsion possessing high-resistance to oxidation in air. **Colloids and Surfaces**, v. 63, n. 3–4, p. 311–322, 1992.

CHRAI, S. S.; MURARI, R.; AHMAD, I. Liposomes: A review. Part I: Manufacturing Issues. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, n. 4, p. 28-34, 2002.

CLEMENS, R. Redefining fiber. **Food Technology**, v. 55, n. 2, p. 100, 2001.

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

DE BRITTO, D. et al. N-trimethyl chitosan nanoparticles as a vitamin carrier system. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 487–493, 2012.

DE PAZ, E.; MARTIN, A.; COLERO, M. J. Formulation of beta-carotene with soybean lecithin by PGSS (particles from gas saturated solutions)-drying. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 72, p. 125-133, 2012.

DERGUNOV, S. A. et al. Liposomal delivery of a phosphodiesterase 3 inhibitor rescues low oxygen-induced ATP release from erythrocytes of humans with type 2 diabetes. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 2, p. 137-142, 2015.

DING, B. et al. Preparation, characterization and the stability of ferrous glycinate nanoliposomes. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 202-208, 2011.

DINGLER, A. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN (TM)/Lipopearls (TM)) - a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, n. 6, p. 751–767, 1999.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our food in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 5-22, 2000.

DUA, J. S.; RANA, A. C.; BHANDARI, A. K. Liposome: methods of preparation and applications. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, v. 3, n. 2, p. 14-20, 2012.

EKAMBARAM, P.; SATHALI, A. A. H.; PRIYANKA, K. Solid lipid nanoparticles: a review. **Scientific Reviews & Chemical Communications**, v. 2, n. 1, p. 80-102, 2012.

ELHISSI, A. M. A.; MCCARTHY, D.; TAYLOR, K. M. G. A study of size, microscopic morphology, and dispersion mechanism of structures generated on hydration of proliposomes, **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 33, p. 1121, 2012.

ELHISSI, A. M. 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**, v. 320, n. 1, p. 124-130, 2006.

EPSTEIN, J. et al. Curcumin suppresss p38 mitogen-activated protein kinase activation, reduces IL-1beta and matrix metalloproteinase-3 and enhances IL-10 in the mucosa of children and adults with inflammatory bowel disease. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 6, p. 824–832, 2010.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 628-647, 2013.

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

FATOUROS, D. G.; ANTIMISIARIS, S.G. Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: a study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 251, n. 2, p. 271-277, 2002.

FEI, X. et al. Preparation, characterization, and dstribution of breviscapine proliposomes in heart. **Journal of Drug Targeting**, v. 17, p. 408-414, 2009.

FELIX, M.; ROMERO, A.; GUERRERO, A. Viscoelastic properties, microstructure and stability of high-oleic O/W emulsions stabilised by crayfish protein concentrate and xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 9-17, 2017.

FEMKE, B. et al. Vitamin D: Modulator of the immune system. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 482–496, 2010.

FERNANDEZ, P. et al. Nanoemulsions formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53-58, 2004.

FRANCIS, F. J. Less common natural colorants. In: HENDRY, G. A. F; HOUGHTON, J. D. **Natural food colorants**. 2nd ed. Glasgow: Blackie Academic and Professional, p. 310-335, 1996.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition** v. 87, n. 2, p. 287-291, 2002.

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

GARCÍA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549-579, 2000.

GARDIKIS, K. et al. Effect of a bioactive curcumin derivative on DPPC membrane: A DSC and Raman spectroscopy study. **Thermochimica Acta**, v. 447, p. 1-4, 2006.

GERBELLI, B. B. Propriedades estruturais e elásticas de fases lamelares: O efeito da composição da membrana. **Dissertação (Mestrado)**. Instituto de Física, Universidade de São Paulo, 2012.

GHALANDARLAKI, N.; ALIZADEH, A. M.; ASHKANI-ESFAHANI, S. Nanotechnology-Applied Curcumin for Different Diseases Therapy. **BioMed Research International**, 2014.

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

GHOSH, P. K.; MURTHY, R. S. R. Microemulsions: A Potential Drug Delivery System. **Current Drug Delivery**, v. 3, n. 2, p. 167-180, 2006.

GIANNOULI, P.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, E. R., Effect of polymeric cosolutes on calcium pectinate gelation. Part 2. Dextrans and inulin. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n.4, p. 357–365, 2004.

GIBIS, M.; RUEDT, C.; WEISS, J. In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. **Food Research International**, v. 88, Part A, p. 105-113, 2016.

GIRI, R. K.; SELVARAJ, S. K.; KALRA, V. K. Amyloid peptide-induced cytokine and chemokine expression in THP-1 monocytes is blocked by small inhibitory RNA duplexes for early growth response-1 messenger RNA. **The Journal of Immunology**, v. 170, n.10, p. 5281–94, 2003.

GOMES, G. V. L. et al. Physico-chemical stability and in vitro digestibility of beta-carotene-loaded lipid nanoparticles of cupuacu butter (*Theobroma grandiflorum*) produced by the phase inversion temperature (PIT) method. **Journal of Food Engineering**, v. 192, p. 93-102, 2017.

GOMES, G. V. L. et al. Characterization and shelf life of beta-carotene loaded solid lipid microparticles produced with stearic acid and sunflower oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, V. 56, n. 4, p. 663-671, 2013.

GONNET, M.; LETHAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, v. 146, p. 276–290, 2010.

GONZALEZ-TOMÁS, L.; COLL-MARQUÉS, J.; COSTELL, E. Viscoelasticity of inulin-starch-based dairy systems. Influence of inulin average chain length. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n.7, p. 1372-1380, 2008.

GREENWOOD, R; KENDALL, K. Electroacoustic studies of moderately concentrated colloidal suspensions. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 19, n. 4, p. 479–488, 1999.

GRICE, H. C.; Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. **Food and Chemical Toxicology**. v. 24, p. 1127-1130, 1986

GUAN, T. et al. Injectable nimodipine-loaded nanoliposomes: preparation, lyophilization and characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 410, p. 180-187, 2011.

HALWANI, M. et al. Co-encapsulation of gallium with gentamicin in liposomes enhances antimicrobial activity of gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 1291-1297, 2008.

HANNESSEY, R. Living in Color: The Potential Dangers of Artificial Dyes. Forbes. 2015. Disponível em: <<http://www.forbes.com/sites/rachelhennessey/2012/08/27/living-in-color-the-potential-dangers-of-artificial-dyes/>>. Acesso em 08/12/2015.

HAO, F. et al. Improvement of oral availability of ginseng fruit saponins by a proliposome delivery system containing sodium deoxycholate. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, S113-S125, 2016.

HENTSCHEL, A. et al. Beta-Carotene-Loaded Nanostructured Lipid Carriers. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, p. 1-6, 2008.

HERNÁNDEZ, V. A.; SCHOLZ, F. The lipid composition determines the kinetics of adhesion and spreading of liposomes on mercury electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 74, n. 1, p. 149-156, 2008.

HOLICK, M. F. McCollum Award Lecture: vitamin D: new horizons for the 21st century. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, p. 619 –630, 1994.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 266–281, 2007.

HOLICK, M. F. Vitamin D: a millennium perspective. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, p. 296 –307, 2003.

HOLICK, M. F. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 362–371, 2004.

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

IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic Science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 297-315, 2006.

INSUMOS. Aditivos alimentares. **Os corantes alimentícios**. n. 118, p. 28-39, 2015.

JAFARI, S. M.; HE, Y.; BHANDARI, B. Nano-emulsion production by sonication and microfluidization – a comparison. **International Journal of Food Properties**, v. 9, n. 3, p. 475-485, 2006.

JAIN, M. K.; WU, N. M. Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III. Phase transition in lipid bilayer. **The Journal of Membrane Biology**, v. 34, n. 1, p. 157-201, 1977.

JAYAPRAKASHA, G.K.; JAGANMOHAN-RAO, L.; SAKARIAH, K.K. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. **Food Chemistry**, v. 98, p. 720-724, 2006.

Jl, J. et al. Preparation, characterization and in vitro release of chitosan nanoparticles loaded with gentamicin and salicylic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 803-808, 2011.

JIA, J. et al. Release-controlled curcumin proliposome produced by ultrasound-assisted supercritical antisolvent method. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 113, p. 150-157, 2016.

JIN, H. H.; LU, Q.; JIANG, J. G. Curcumin liposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids and soybean lecithin. **Journal of Dairy Science (In Press)**, 2016.

JORGENSEN, K. et al. A general model for the interaction of foreign molecules with lipid membranes: drugs and anesthetics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1062, p. 227-238, 1991.

JUSTO, O. R., MORAES, A. M. Kanamycin incorporation in lipid vesicles prepared by ethanol injection designed for tuberculosis treatment. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 57, p. 23–30, 2005.

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

JUSTO, O. R.; MORAES, A. M. Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: Effect of

temperature and batch volume. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 785–792, 2011.

KAMATH, M. P. et al. Prolonged release biodegradable vesicular carriers for rifampicin formulation and kinetics of release. **Indian Journal of Experimental Biology**., vol 38, p. 113–118, 2000.

KAMINSKI, G. A. T. et al. Layer-by-layer polysaccharide-coated liposomes for sustained delivery of epidermal growth factor. **Carbohydrate Polymers**, v. 140, p. 129-135, 2016.

KAREWICZ, A. et al. Interaction of curcumin with lipid monolayers and liposomal bilayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, p. 231-239, 2011.

KASHANIAN, S.; ZEIDALI, S. H. DNA binding studies of tartrazine food additive. **DNA and Cell Biology**, v. 30, p. 499–505, 2011.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer degradation and stability**, v. 59, p. 81-84, 1998.

KHALIL, F. A.; ALI, N. H. Protective Effect of Dietary Antioxidants Curcumin, Vitamin C and Ginko Biloba on Oxidative Stress in Colonic Rats Induced by Butylated Hydroxyanisol. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 10, p. 1489-1495, 2011.

KHAN, Y. A. et al. Multiple emulsions: an overview. **Current Drug Delivery**, v. 3, n. 4, p. 429, 2006.

KHANDELWAL, S. et al. Independent and interactive effects of plant sterols and fishoil n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the plasma lipid profile of mildly hyperlipidaemic indian adults. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 722–732, 2009.

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

KIM, Y. S. et al. Curcumin attenuates inflammatory responses of TNF-alpha-stimulated human endothelial cells. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 41–49, 2007

KOSAJARU, S. L.; TRAN, C.; LAWRENCE, A. Liposomal delivery systems for encapsulation of ferrous sulfate: preparation and characterization. **Journal of Liposome Research**, v. 16, p. 347-35, 2006.

KOYNOVA, R. Liquid crystalline phase metastability of phosphatidylglycerols. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 89, p. 67-73, 1997.

KOYNOVA, R.; CAFFREY, M. Phase and phase transitions of the phosphatidylcholines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1376, p. 91-145, 1998.

KULIE, T. et al. Vitamin D: an evidence-based review. **Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 22, n. 6, p. 698-706, 2009.

KUMAR, D. D. et al. Formulation and characterization of nanoencapsulated curcumin using sodium caseinate and its incorporation in ice cream. **Food & Function**, v. 7, p. 417-424, 2016.

KUREK, M.; GRUBSKA-SUCHANEK, E. Challenge tests with food additives and aspirin in the diagnosis of chronic urticarial. **Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique**, v. 41, n. 5, p. 463-469, 2001.

LA TORRE, L. G.; DE PINHO, S. C. Lipid matrices for nanoencapsulation in food: liposomes and lipid nanoparticles. In: HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G.F. (Ed.). **Food Nanoscience and Nanotechnology**. Springer International Publishing, cap. 7, p. 99-143, 2015.

LAI, J. J. et al. Monocyte/macrophage androgen receptor suppresses cutaneous wound healing in mice by enhancing local TNF- α expression. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 12, 3739-3751, 2009.

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

LASCH, J.; WEISSIG, V.; BRANDL, M. Preparation of liposomes. In: TORCHILIN, V. P.; WEISSIG, V. (Ed.). **Liposomes: a Practical Approach**, New York: Oxford University Press, v. 2, p. 24-25, 2003.

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

LAURO, G.J.; FRANCIS, J. **Natural Food Colorants: Science and Technology**. Editora CRC Press, p. 141, 2000.

LEE, J. H. et al. Vitamin D deficiency: an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 24, 1949–1956, 2008.

LEE, S. C. et al. The effect of cholesterol in the liposome bilayer on the stabilization of incorporated retinol. **Journal of Liposome Research**. v. 15, n. 3-4, 2005.

LEE, W. H. et al. Inhalation of nanoparticle-based drug for lung cancer treatment: Advantages and challenges. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 6, p. 481-489, 2015.

LEITE, J. T. C. et al. Caracterização reológica das diferentes fases de extrato de inulina de raízes de chicória, obtidas por abaixamento de temperatura. **Revista Engenharia Agrícola**., v. 24, n. 1, p. 202-210, 2004.

LI, X. et al. Preparation and in-vitro/in-vivo evaluation of curcumin nanosuspension with solubility enhancement. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 8, p. 980-988, 2016.

LIM, S. N. et al. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3862-3866, 2002.

LIN, S.; PASCALL, M. A. Incorporation of vitamin E into chitosan films and its effect on the material properties (viscosity, dry rate) and the solubility and thermal properties of the dried film. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 78-84, 2014.

LIU, G. et al. Preparation of 10-hydroxycamptothecin proliposomes by the supercritical CO₂ anti-solvent process. **Chemical Engineering Journal**, v. 243, p. 289-296, 2014.

LIU, W. et al. Environmental stress stability of microencapsules based on liposomes decorated with chitosan and sodium alginate. **Food Chemistry**, v. 196, p. 396-404, 2016.

LOPEZ-MONTILLA, J. C. et al. Spontaneous emulsification: mechanisms, physicochemical aspects, modeling and applications. **Journal of Dispersion Science & Technology**, v. 23, p. 269-277, 2002.

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**, v. 59, p. 13004-13011, 2011.

LUO, X. D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Polyphenolic antioxidants from the fruit of *Chrysophyllum cainito* L. (Star Apple). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 1379–1382, 2002.

MA, Q. H. et al. Preparation, characterization and photoprotection of tocopherol loaded nanostructured lipid carriers. **IEEE/ICME International Conference on Complex Medical Engineering**, p. 203-208, 2007.

MAA, Y. F., HSU, C. C. Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 4, p. 233–240, 1999.

MACLAUGHLIN, J.; HOLICK, M. F. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 76, p. 1536-1538, 1985.

MAHERANI, B. et al. Liposomes: A review of manufacturing techniques and targeting strategies. **Current Nanoscience**, v. 7, p. 436-452, 2011.

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

MAITANI, Y. et al. Modified ethanol injection method for liposomes containing β -sitosterol and β -d-glucoside. **Journal of Liposome Research**, v. 11, p. 115–125, 2001.

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

MANCA, M. L. et al. Liposomes coated with chitosan-xanthan gum (chitosomes) as potential carriers for pulmonary delivery of rifampicin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 2; p. 566-575, 2012.

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

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

MASTROGIACOMO, D. et al. Lipid/detergent mixed micelles as a tool for transferring antioxidant power from hydrophobic natural extracts into bio-deliverable liposome carriers: the case of lycopene rich oleoresins. **RSC Advances**, v. 4, 2015.

MCCLEMENTS, D. J. Colloidal basis of emulsions color. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, n. 5-6, p. 451-455, 2002.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **The Royal Society of Chemistry**, v. 7, p. 2297-2316, 2011.

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

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 285-330, 2011.

MELCHIOR, D. L.; STEIM, J. M. Thermotropic transitions in biomembranes. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 5, p. 205-238, 1976.

MEURE, L. A., FOSTER, N. R., DEGHANI, F. Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review. **AAPS PharmSciTech**. v. 9, p. 798–809, 2008.

MEYER, D. et al. Inulin as texture modifier in dairy applications. **Food Hydrocolloids**, p. 1881-1890, 2011.

MICALLEF, M. A.; GARG, M. L. Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals. **Atherosclerosis**, v. 204, n. 2, p. 476-482, 2009.

MILLER, C. A. Spontaneous emulsification produced by diffusion: A review. **Colloids and Surfaces**, v. 29, n. 1, p. 89-102, 1988.

MOHAMMADI, M.; GHANBARZADEH, B.; HAMISHEHKAR, H. Formulation of nanoliposomal vitamin D₃ for potential application in beverage fortification. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, s. 2, p. 569-575, 2014.

MOON, D. O. et al. Curcumin attenuates ovalbumin-induced airway inflammation by regulating nitric oxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 375, n. 2, p. 275–279, 2008.

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**, v. 48, n. 2, p. 274-282, 2013.

MORRIS, J. V. Bacterial polysaccharides. In STEPHEN, M. A.; PHILIPS, O. G. & WILLIAMS, A. P. Eds.), **Food polysaccharides and their applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006.

MOSCATTO, J. A., PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H.; HAULY, C. O. M. Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 634–640, 2004.

MOZAFARI, M. R. et al. Construction of stable anionic liposome-plasmid particles using the heating method: A preliminary investigation. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 7, n. 3, p. 923–927, 2002.

MOZAFARI, M. R. et al. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology, **International Journal of Food Processing**, v. 11, p. 833-844, 2008.

MUDGIL, D.; BARAK, S.; KHATKAR, B. S. Effect of hydrocolloids on the quality characteristics of tomato ketchup. **Carpathian Journal of Food Science and Techonology**, v. 3, p. 39-43, 2011.

MUDGIL, D.; BARAK, S.; KHATKAR, B. S. Guar gum: processing, properties and food applications - a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 409-418, 2014.

MUTHU, M. S.; SINGH, S. Targeted nanomedicines: Effective treatment and brain disorders. **Nanomedicine** v. 4, p. 105–118, 2009.

NAKSURIYA, O.; OKONOGI, S. Comparison and combination effects on antioxidant power of curcumin with gallic acid, ascorbic acid, and xanthone. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 9, n. 2, p. 136-141, 2015.

NEKKANTI, V.; VENKATESAN, N.; BETAGERI, G. V. Proliposomes for oral delivery: progress and challenges. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, p. 303-312, 2015.

NETTO, R. C. M. **Dossiê Corantes**. Food Ingredients Brasil, n. 9, 2009.

NEW, R. R. C. Introduction. In **Liposomes: A Practical Approach**. New, Oxford University Press, New York, NY, p. 1– 32, 1990.

NEW, R. R. C. Preparation of Liposomes. In **Liposomes: A Practical Approach**. New, Oxford University Press, New York, NY, p. 33–104, 1990a.

NINESS, K. R. Inulin and oligofructose: What are they? **Journal of Nutrition**. v. 129, n. 7, p. 1682-1687, 1999.

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**, v. 57, n. 8, p. 3291-3297, 2009.

OLIVEIRA, C. L. P. et al. Gaussian deconvolution: a useful method for a form-free modeling of scattering data from mono- and multilayered planar systems. **Journal of Applied Crystallography**, v. 45, n. 6, p. 1278-1286, 2012.

PARADA, J., AGUILERA, J. M. Microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 21-32, 2007.

PATIL, Y. P.; JADHAV, S. Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 177, p. 8–18, 2014.

PAYNE, N. I. et al. Proliposomes: A novel solution to an old problem. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 4, p. 325-329, 1986.

PICON, A. et al. The effect of liposome encapsulation of chymosine derived by fermentation on Manchego cheese ripening, **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 16-23, 1993.

PICON, A. et al. The effect of liposome-encapsulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening, **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1238-1247, 1995.

PONCHON, G.; DELUCA, H. F. The role of the liver in the metabolism of vitamin D. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 7, p. 1273-1279, 1969.

PORTER, C. J. H., TREVASKIS, N. L., CHARMAN, W. N. Lipids and lipid-based formulations: Optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. **Nature Reviews**. 2007.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 237-250, 2003.

RAHMAN, A. F.; ANGAWI, R. F.; KADI, A. A. Spatial localization of curcumin and rapid screening of the chemical compositions of turmeric rhizomes (*Curcuma longa* Linn.) using Direct Analysis in Real Time-Mass Spectrometry (DART-MS). **Food Chemistry**, v. 173, p. 489-494, 2015.

RANADE, V. V.; CANNON, J. B. **Drug Delivery Systems**. 3ed. Editora CRC Press, p. 8-10, 2011.

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

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

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**, v. 16, n. 4, p. 354-360, 2006.

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

SABERI, A. H.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 391, p. 95-102, 2013.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85-99, 2014.

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

SAIJA, A. et al. Flavonoid-biomembrane interactions: A calorimetric study on dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 124, p. 1-8, 1995.

SAITO, T. et al. Novel gemini vitamin D (3) analogs have potent antitumor activity. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 112, p. 151–156. 2008.

SAMAD, A.; SULTANA, Y.; AQIL, M. Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review. **Current Drug Delivery**, v. 4, n. 4, p. 297-305, 2007.

SANT'ANA, V. et al. Tracking bioactives compounds with color changes in foods. **Dyes and pigments**, v. 98, n. 3, p. 601-608, 2013.

SANCHEZ-PAZ, V. et al. Quantitative determination of alphotocopherol distribution in a tributyrin/Brij 30/water model food emulsion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 320, n. 1, p. 1–8, 2008.

SARAHEY, R.; FARMANY, A.; MORTAZAVI, S. S. A nanosilver-based spectrophotometry method for sensitive determination of tartrazine in food samples. **Food Chemistry** v. 138, p. 1239–1242, 2013.

SARI, T. P. et al. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 540-546, 2015.

SCHALLER-POVOLNY, L. A.; SMITH, D. E. Sensory attributes and storage life of reduced fat ice cream as related to inulin content. **Journal of Food Science**. v. 64, n. 3, p. 555-559. 1999.

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

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

SELVAM, R. M. et al. Extraction of natural dyes from *Curcuma longa*, *Trigonella foenum graecum* and *Nerium oleander*, plants and their application in antimicrobial fabric. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 84-90, 2015.

SHAJI, J.; BHATIA, V. Proliposomes: a brief overview of novel delivery system. **International Journal of Pharma and Biosciences**. v. 4, n. 1, p. 150-160, 2013.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, p. 123–140, 1997.

SHAWISH, H. M. A. et al. Development of novel potentiometric sensors for determinations of tartrazine dye concentration in foodstuff products. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 126-132, 2013.

SHIMADA, K. et al. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 6, p. 945-948, 1992.

SHUKAT, R.; RELKIN, P. Lipid nanoparticles as vitamin matrix carriers in liquid food systems: on the role of high-pressure homogenisation, droplet size and adsorbed materials. **Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 119–124, 2011.

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**, 2016. (aceito para publicação – DOI: 10.1111/ijfs.13334)

SMITH, E. A.; DEA, P. K. **Differential Scanning Calorimetry Studies of Phospholipid Membranes: The Interdigitated Gel Phase**, In: Applications of Calorimetry in a Wide Context- Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry, ed. INTECH Open Access Publisher, p. 407-444, 2013.

SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. The use of SLN nad NLC as tropical particulate carriers for imidazole antifungal agents. **Pharmazie**, v. 61, n. 5, p. 431-437, 2006.

SRIVASTAVA, R. M. et al. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 331-341, 2011.

STAFFAS, A.; NYMAN, A. Determination of cholecalciferol (vitamin D₃ in selected foods by liquid chromatography: NMKL Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 400-406, 2003.

STUPIELLO, B. Vitamina D: conheça os benefícios e como obter essa substância. Portal Minha Vida. Disponível em: <<http://www.minhavidade.com.br/alimentacao/tudo-sobre/17540-vitamina-d-conheca-os-beneficios-e-como-obter-essa-substancia>>. Acesso em 09/12/2015.

SUZANNE, E. J. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reduces systolic blood pressure in hypertensive adults: A pilot feasibility study. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, p. 445–447, 2010.

SZOKA, F. C.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reversephase evaporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences-USA**, v. 75, p. 4194–4198, 1978.

TADROS, T. F. et al. Stabilization of emulsions using hydrophobically modified inulin (polyfructose). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 250, p. 133-140, 2004.

TADROS, T. F. et al. Stabilization of emulsions using polymeric surfactants based on inulin. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 207-226, 2004.

TAKAHASHI, M. et al. Characterization and bioavailability of liposomes containing a ukon extract. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 72, p. 1199-1205, 2008.

TANGPRICHA, V. et al. Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach to enhance vitamin D nutritional health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 1478–1483, 2003.

TARDI, P. G. et al. Coencapsulation of irinotecan and floxuridine into low cholesterol-containing liposomes that coordinate drug release in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 678-687, 2007.

TAVANO, L. et al. Co-encapsulation of antioxidants into niosomal carriers: gastrointestinal release studies for nutraceutical applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 82-88, 2014.

TAYLOR, K. M. G.; MORRIS, R. M. Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes. **Thermochimica Acta**, v. 248, p. 289-301, 1995.

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

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

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

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

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

TUNGLAND, B. C.; MEYER, D.; **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, p. 90–109, 2002.

TSENG, L. P. et al. Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. **Journal of Medical and Biological Engineering**, v. 27, n. 1, p. 29-34, 2007.

WALSTRA, P. Principles of emulsion formation. **Chemical Engineering Science**, v. 48, n. 2, p. 333-349, 1993.

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

WEISBERG, S. P.; LEIBEL, R.; TORTORIELLO, D. V. Dietary curcumin significantly improves obesity-associated inflammation and diabetes in mouse models of diabetes. **Endocrinology**, v. 149, n. 7, p. 3549–3558, 2008.

WERE, L. M. Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipid nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 8073-8079, 2003.

WICHI, H. P. Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. **Food and Chemical Toxicology**, v. 26, p. 717-723, 1988.

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

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

XIE, L. et al. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by curcumin treatment through inhibition of IL-17 production. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 575–581, 2009.

YEH, C. H. et al. Inhibition of NFkappaB activation with curcumin attenuates plasma inflammatory cytokines surge and cardiomyocytic apoptosis following cardiac ischemia/reperfusion. **Journal of Surgical Research**, v. 125, n. 1, p. 109–116, 2005.

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

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

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

ZHAO, L. et al. Preparation of liposomes using supercritical carbon dioxide technology: Effects of phospholipids and sterols. **Food Research International**, v. 77, part 1, p. 63-72, 2015.

ZHENG, B. et al. Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 254-264, 2015.

ZULETA, A.; SAMBUCETTI, M. E. Inulin determination for food labeling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4570- 4572, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Curva analítica utilizada para determinação da total encapsulado de curcumina nos lipossomas multilamelares

APÊNDICE B: Curva analítica utilizada para determinação da quantidade encapsulada de vitamina D₃ nos lipossomas multilamelares