



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ROGÉRIO MIGDON VIEIRA DA SILVA

Desenvolvimento de nanolipossomas estáveis e seu uso
na encapsulação de compostos fenólicos puros e
provenientes de extrato de *Euterpe oleracea*

BELÉM – PARÁ

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ROGÉRIO MIGDON VIEIRA DA SILVA

**Desenvolvimento de nanolipossomas estáveis e seu uso
na encapsulação de compostos fenólicos puros e
provenientes de extrato de *Euterpe oleracea***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito final à obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Yvan Larondelle

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez

BELÉM – PARÁ

2011

ROGÉRIO MIGDON VIEIRA DA SILVA

Desenvolvimento de nanolipossomas estáveis e seu uso na encapsulação de compostos fenólicos puros e provenientes de extrato de *Euterpe oleracea*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito final à obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciência e tecnologia de matérias-primas alimentícias da Amazônia e de resíduos agroindustriais.

DATA DE AVALIAÇÃO: 22/07/2011.

CONCEITO: APROVADO.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Yvan Larondelle
(PPGCTA/UFPA – Orientador)

Prof. Dr. Hervé Rogez
(FEA/ITEC/UFPA – Co-orientador)

Prof. Dr. Pietro Ciancaglini
(FCFLRP/USP– Membro)

Prof. Dr. Evaldo Martins da Silva
(IECOS/UFPA – Membro)

Prof. Dr. Rosinelson da Silva Pena
(FEA/ITEC/UFPA – Suplente)

*À minha mãe, Rosa Maria Vieira da
Silva, por está sempre ao meu lado em
todos os momentos em minha vida.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ser a lâmpada para os meus pés nesta longa jornada.

Ao meu orientador Yvan Larondelle e co-orientador Hervé Rogez pelos conhecimentos transmitidos durante o mestrado.

A FAPESPA que tornaram possível a execução dessa dissertação.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio incondicional.

A minha namorada Jaqueline Moraes pelo companheirismo e compreensão.

Um agradecimento especial ao Prof^o Pietro Ciancaglini e aos membros do seu laboratório, pela disponibilização para execução da parte experimental e pelos preciosos conhecimentos passados.

A Prof^a Maria José Vieira Fonseca e aos técnicos José Roberto Jabor e José Orestes pelo auxílio laboratorial

Aos amigos que tornaram possível deste trabalho, em especial, à Priscila Alamar, Elem Caramês, Rafael Holanda, Aureliano Meireles, Marco Velloso, Rebeca Oliveira, Vanessa Fortes, Ana Sper e Simone Barbosa.

Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar, para atravessar o
rio da vida - ninguém, exceto tu, só tu.

(Nietzsche)

RESUMO

Os nanolipossomas são vesículas lipídicas constituídas de fosfolipídios e esteróis e apresentam grande potencialidade na encapsulação de compostos bioativos para evitar degradações e aumentar a sua biodisponibilidade. Este trabalho objetivou otimizar a composição lipídica através das características físicas dos lipossomas para a encapsulação de compostos fenólicos sintéticos puros e provenientes de extrato purificado de *Euterpe oleracea*. Dezoito composições lipídicas obtidas através de um delineamento experimental de misturas restringidas de três componentes: fosfolipídio de soja (64,5 a 80%), colesterol/ β -sitosterol (19,5 a 35%) e Tween 80 (0 a 0,5%); as quais tiveram a estabilidade física avaliada em função do espalhamento dinâmico da luz (diâmetro médio e índice de polidispersão), em distintas temperaturas (10 e 25°C) por 30 dias. No desenvolvimento e purificação dos lipossomas utilizou-se a extrusão em membranas de policarbonato (200 nm) e a cromatografia em gel Sephadex G-25, respectivamente. Para a composição lipídica mais estável foi realizada a encapsulação de 0,1% (p/v) de ácidos fenólicos e flavonoides (sintéticos) e de extrato purificado de *Euterpe oleracea* e sua posterior caracterização física (diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta). O delineamento experimental ajustou-se a um modelo linear para os dois esteróis ($R^2 > 0,700$). Os nanolipossomas apresentaram na faixa de 150 a 200 nm de diâmetro médio e índice de polidispersão entre 0,2 a 0,4. Os fosfolipídios e os esteróis influenciaram na estruturação das vesículas e o Tween 80 promoveu estabilidade física. A composição lipídica mais estável apresentou 72,38% de fosfatilcolina de soja, 27,38% de esterol e 0,25% de Tween 80, com diâmetros médios de $189,2 \pm 4,2$ nm (colesterol) e $153,2 \pm 4,6$ nm (β -sitosterol) e índices de polidispersão de $0,223 \pm 0,022$ (colesterol) e $0,257 \pm 0,060$ (β -sitosterol). Os nanolipossomas instáveis apresentaram comportamento de natureza sigmoidal com tempo de estabilidade até o 7º dia. Na encapsulação dos compostos fenólicos, o diâmetro médio e o potencial zeta não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$); contudo o índice de polidispersão apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para os compostos fenólicos, esteróis e interação.

ABSTRACT

Nanoliposomes are lipid vesicles constituted by phospholipids and sterols and present great potentiality on the encapsulation of bioactive compounds to avoid losses and to increase their bioavailability. This work at optimizing the lipid composition by physical characteristics liposomas to encapsulate phenolic compounds and extract purified of *Euterpe oleracea*. Eighteen lipid compositions obtained by a constrained mixtures design of three components: soy phospholipid (64.5 – 80%), cholesterol/ β -sitosterol (19 – 35%) and Tween 80 (0 – 0.5%), were evaluated by physical stability evaluated in function dynamic light scattering (average size and polydispersity index), in distinct temperatures (10 and 25°C) for 30 days. Extrusion through polycarbonate membrane (200 nm) and size exclusion chromatography were used in development and purification, respectively. At most stable lipid composition was carried out encapsulation of phenolic acids, flavonoids and extract purified of *Euterpe oleracea* (0.1%, w/v) and their physical characterization (average size, polydispersity and zeta potential). Constrained mixture design was adjusted to the linear model to both sterols ($R^2 > 0.700$). Nanoliposomes presented average size at range of 150 – 200 nm and polydispersity indexes at range of 0.2 – 0.4. Phospholipid and sterols influenced the vesicle structuration and Tween 80 promoted physical stability. The most stable lipid composition had 72.38% of soy phospholipid, 27.38% of sterol and 0.25% of Tween 80, with average sizes 189.2 ± 4.2 nm (cholesterol) and 153.2 ± 4.6 nm (β -sitosterol) and polydispersity indexes of 0.223 ± 0.022 (cholesterol) e 0.257 ± 0.060 (β -sitosterol). Instable nanoliposomes presented sigmoidal behavior with stability time until 7th day. In phenolic compounds encapsulation, average size and zeta potential showed no significant difference ($p < 0.05$), however, polydispersity index showed significant difference ($p < 0.05$) to phenolic compounds, sterols and interaction.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. OS PRINCIPAIS ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS.....	9
FIGURA 2. ESTRUTURA DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS.....	10
FIGURA 3. ESTRUTURA DE BASE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	11
FIGURA 4. ESTRUTURA DAS PRINCIPAIS AGLICONAS.....	13
FIGURA 5. ESTRUTURA DAS ANTOCIANIDINAS MAIS COMUNS.....	14
FIGURA 6. AS ESTRUTURAS DOS FLAVAN-3-ÓIS MAIS COMUNS.....	16
FIGURA 7. ESTRUTURAS DA APIGENINA E LUTEOLINA.....	17
FIGURA 8. AS PRINCIPAIS ISOFLAVONAS E A ESTRUTURA DO ESTRADIOL.....	18
FIGURA 9. ESTRUTURAS DAS PRINCIPAIS FLAVANONAS.....	19
FIGURA 10. ROTA DA FORMAÇÃO DOS METABÓLITOS E CONJUGADOS DE FLAVONÓIDES.....	21
FIGURA 11. FRUTOS DE <i>EUTERPE OLERACEA</i>	22
FIGURA 12. MOLÉCULAS ANFIPÁTICAS EM SOLUÇÃO AQUOSA.....	25
FIGURA 13. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS LIPOSSOMAS.....	27
FIGURA 14. ESTRUTURA BÁSICA DOS FOSFOLIPÍDIOS.....	29
FIGURA 15. ESTRUTURA QUÍMICA DO COLESTEROL.....	31
FIGURA 16. INTERAÇÃO ENTRE BICAMADA LIPÍDICA E COLESTEROL.....	32
FIGURA 17. ESTRUTURA DOS PRINCIPAIS FITOSTERÓIS.....	33
FIGURA 18. ESTRUTURA BASE DOS SURFACTANTES DA SÉRIE TWEEN®.....	35
FIGURA 19. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS VESÍCULAS.....	36
FIGURA 20. MICROSCOPIA CRIOLETRÔNICA DAS VESÍCULAS EXTRUSADAS DE FOSFATIDILCOLINA-COLESTEROL (55:45 RAZÃO MOLAR) FEITAS EM (A) 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4 OU (B) ÁGUA DESTILADA. BARRA DE ESCALA: 200 NM.....	39
FIGURA 21. ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS FLAVONÓIS ESTUDADOS.....	44
FIGURA 22. QUARTO ANEL AROMÁTICO DE SEIS MEMBROS.....	44
FIGURA 23. ELUIÇÃO EM COLUNA SEPHADEX G-25 EM SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO 75 mM pH 6,0 DE CORANTES BLUE DEXTRAN E AZUL DE METILENO A 1 MG/ML.....	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE FOSFATIDILCOLINA DE GEMA DE OVO E SOJA	30
TABELA 2. DOMÍNIOS EXPERIMENTAIS PARA O PLANEJAMENTO DE MISTURAS RESTRINGIDAS	46
TABELA 3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE MISTURAS RESTRINGIDAS COM VARIÁVEIS CODIFICADAS	46
TABELA 4. VALORES DO DIÂMETRO MÉDIO E DO ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DE MISTURAS PARA AS DIFERENTES MISTURAS DE FOSFATIDILCOLINA, TWEEN 80 E COLESTEROL (1 A 9) OU B-SITOSTEROL (A A I).....	53
TABELA 5. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO MODELO LINEAR DOS VALORES DE DIÂMETRO MÉDIO E DE ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO PARA AS MISTURAS CONTENDO COLESTEROL.....	54
TABELA 6. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO MODELO LINEAR DOS VALORES DE DIÂMETRO MÉDIO E DE ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO PARA AS MISTURAS CONTENDO B-SITOSTEROL.	55
TABELA 7. VALORES DOS COEFICIENTES DO MODELO LINEAR PARA O DIÂMETRO MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO PARA OS LIPOSSOMAS CONTENDO COLESTEROL.....	55
TABELA 8. VALORES DOS COEFICIENTES DO MODELO LINEAR PARA O DIÂMETRO MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO PARA OS LIPOSSOMAS CONTENDO B-SITOSTEROL.....	55
TABELA 9. PARÂMETROS OBTIDOS PELA MODELAGEM MATEMÁTICA DOS LIPOSSOMAS INSTÁVEIS.....	58
TABELA 10. VALORES DO DIÂMETRO MÉDIO E DO ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DAS MISTURAS QUE CONTINHAM 72,38% DE FOSFATILCOLINA, 27,38% DE ESTEROL E 0,25% DE TWEEN 80.....	61
TABELA 11. RESULTADO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE DOIS FATORES ENTRE O TIPO DE COMPOSTO FENÓLICO E O TIPO DE ESTEROL E INTERAÇÃO PARA OS DIÂMETROS MÉDIOS DOS LIPOSSOMAS.	61
TABELA 12. RESULTADO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE DOIS FATORES ENTRE O TIPO DE COMPOSTO FENÓLICO E O TIPO DE ESTEROL E INTERAÇÃO PARA OS ÍNDICES DE POLIDISPERSÃO DOS LIPOSSOMAS.	62
TABELA 13. VALORES DO POTENCIAL ZETA DAS SOLUÇÕES DE COMPOSTOS FENÓLICOS E DAS MISTURAS QUE CONTINHAM 72,38% DE FOSFATILCOLINA, 27,38% DE ESTEROL E 0,25% DE TWEEN 80.	63
TABELA 14. RESULTADO DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE DOIS FATORES ENTRE O TIPO DE COMPOSTO FENÓLICO E O TIPO DE ESTEROL E INTERAÇÃO PARA OS POTENCIAIS ZETA DOS LIPOSSOMAS.....	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1	COMPOSTOS FENÓLICOS	8
2.1.1	Ácidos fenólicos.....	8
2.1.2	Flavonóides	11
2.1.3	Biodisponibilidade de compostos fenólicos.....	19
2.1.4	Euterpe oleracea	22
2.2	INTERAÇÕES NÃO-COVALENTES	23
2.2.1	Interações iônicas	23
2.2.2	Pontes de hidrogênio.....	23
2.2.3	Interações de van der Waals	24
2.2.4	Interações hidrofóbicas.....	25
2.3	ENCAPSULAÇÃO	26
2.3.1	Lipossomas	27
2.3.2	Composição dos lipossomas.....	29
2.3.3	Classificação dos lipossomas	36
2.3.4	Tipos de encapsulação	37
2.3.5	Métodos de produção	37
2.3.6	Métodos de purificação.....	40
2.3.7	Métodos de caracterização	41
2.3.8	Interações dos lipossomas.....	43
3	MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1	PRODUÇÃO DE NANOLIPOSSOMAS	45
3.1.1	Planejamento experimental de misturas restringidas	45
3.1.2	Método de produção.....	47
3.1.3	Caracterização física dos lipossomas	47
3.2	AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE FÍSICA	49
3.3	ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	49
3.4	PURIFICAÇÃO DOS NANOLIPOSSOMAS	49
3.5	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA	50
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
4.1	AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE FÍSICA.....	52
4.1.1	Tamanho médio e índice de polidispersão	52
4.1.2	Modelagem matemática da cinética de estabilidade física	58
4.1.3	Temperatura de estocagem	59

4.2	PURIFICAÇÃO DOS NANOLIPOSSOMAS	59
4.3	ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	60
4.3.1	<i>Efeito sobre o diâmetro médio e o índice de polidispersão dos lipossomas</i>	<i>60</i>
4.3.2	<i>Efeito sobre o potencial zeta dos lipossomas</i>	<i>63</i>
5	CONCLUSÃO.....	65
6	ANEXOS	66
	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são uma classe de metabólitos secundários que possuem inúmeras funções fisiológicas nos vegetais e apresentam-se com diferentes perfis entre espécies e variedades da mesma espécie. Classificam-se quimicamente em diferentes grupos devido ao número de anéis fenólicos e seus grupos funcionais elementares ligados a outros anéis (MANACH et al., 2004; KOH e MITCHELL, 2006). São amplamente encontrados na dieta e promovem inúmeros efeitos biológicos, tais como a captura de espécies reativas de oxigênio, modulação da atividade de algumas enzimas específicas, inibição da proliferação celular, bem como ação antimicrobiana, antialérgica e anti-inflamatória (MANACH et al., 2004).

A espécie vegetal *Euterpe oleracea* é amplamente encontrada na região e está intimamente ligada aos hábitos sócio-econômico e cultural da população. É utilizada na alimentação utilizando-se os frutos e apresentam efeitos benéficos associados ao elevado conteúdo de compostos fenólicos (ROGEZ, 2000 e PACHECO-PALENCIA et al., 2009)

Há uma tendência mundial que aponta para a necessidade de que os alimentos não sejam mais vistos apenas como fonte de nutrientes com apelo sensorial, mas como fonte de bem-estar e saúde dos consumidores. Torna-se, assim, cada vez mais relevante integrar essa mudança de paradigma no desenvolvimento de novos produtos e a necessidade do controle da bioacessibilidade de determinados componentes a fim de se alegar algum efeito funcional. As técnicas de encapsulação apresentam-se como um meio de aumentar a bioacessibilidade (FAVARO-TRINDADE, PINHO e ROCHA, 2008). As técnicas de encapsulação utilizadas na indústria de alimentos estão baseadas em matrizes poliméricas compostas de açúcares, amidos, gomas, proteínas, dextrinas e alginatos. Entre elas, a produção de lipossomas tem ganhado importância recentemente (TAYLOR et al., 2005).

Os lipossomas são utilizados como excelentes modelos de membrana celular, como carreadores para várias substâncias bioativas (drogas, nucleotídeos, vacinas, enzimas, cosméticos e nutracêuticos), na redução da toxicidade sistêmica, e na prevenção da degradação precoce de drogas encapsuladas após introdução no corpo (COSTA, 2000). São considerados como um sistema de liberação superior e aceitável por ser biocompatível, biodegradável e atóxico (SUNTRES e OMRI, 2006; HASIRCI, 2007), sendo constituídos de

fosfolipídios naturais ou sintéticos, esteróis e estabilizantes (VEMURI e RHODES, 1995).

Na área de alimentos, os lipossomas são utilizados para encapsular aromas, mascarar sabores e proteger nutrientes contra degradações no trato gastro-intestinal (KELLER, 2001; TAYLOR et al., 2005). Vários estudos recentes apontam o potencial dos lipossomas para auxiliar na proteção da bioatividade de nutrientes contra a degradação nos alimentos, bem como o potencial para a fortificação de alimentos com vitaminas encapsuladas em lipossomas para aumentar o benefício nutracêutico do produto (TAYLOR et al., 2005).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo geral de desenvolver nanolipossomas contendo compostos fenólicos puros e provenientes dos frutos de *E. oleracea* para potencializar a bioacessibilidade no organismo humano.

Os objetivos específicos do estudo englobam:

- Otimizar a produção de nanolipossomas vazios em função de suas composições (fosfolipídio, surfactante não-iônico, colesterol/ β -sitosterol) em condições operacionais padronizadas.
- Avaliar a estabilidade física dos nanolipossomas a partir de suas características físicas;
- Encapsular compostos fenólicos puros ou de frutos de *E. oleracea*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos representam uma classe de metabólitos secundários que apresentam funções críticas na fisiologia das plantas que incluem a pigmentação, a resistência ao stress patógeno e herbívoro, e a proteção contra radiação ultravioleta. Os perfis dos compostos fenólicos das plantas são geralmente sintetizados em resposta as condições ambientais, além disso, diferem entre espécies e variedades da mesma espécie. Estes compostos podem ser classificados em diferentes grupos como uma função do número dos anéis fenólicos que contêm e das estruturas elementares que ligam estes anéis a outros e destas distinções são classificados em: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanas (MANACH et al., 2004; KOH e MITCHELL, 2006).

2.1.1 Ácidos fenólicos

Esses são amplamente representados nas plantas, no entanto sua distribuição pode fortemente variar com as espécies, as variedades e o estágio fisiológico. Apresentam um papel tanto nas interações entre a planta e o seu ambiente biótico e abiótico, bem como na qualidade sensorial e nutricional das frutas, hortaliças e produtos derivados. Suas propriedades antioxidantes são essenciais na estabilidade dos alimentos e nos mecanismos de defesa antioxidante dos sistemas biológicos (FLEURIET e MACHEIX, 2003).

Duas classes de ácidos fenólicos podem ser distinguidas, dependendo de sua estrutura química: os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos (LAFAY e GILIZQUIERDO, 2008). São encontrados na forma conjugada podendo ser solúveis e acumulados nos vacúolos das células vegetais, ou insolúveis e associados aos componentes da parede celular. No entanto, algumas situações excepcionais podem promover o acúmulo na forma livre, tais como: condições extremas de extração, perturbações fisiológicas, contaminações microbianas, anaerobiose, processamento de sucos de fruta e produção de vinho; também são encontrados em extratos vegetais previamente submetidos à hidrólise química (FLEURIET e MACHEIX, 2003).

De uma forma geral, os ácidos fenólicos são considerados ácidos fracos e sofrem

ionização em função da variação do pH do meio, podendo apresentar uma ou mais constantes de ionização (pK_a) (VERMERRIS e NICHOLSON, 2006).

2.1.1.1 Ácidos hidroxibenzoicos

Os ácidos hidroxibenzoicos têm uma estrutura geral do tipo C_6-C_1 derivada diretamente do ácido benzoico, e as variações na estrutura estão nas hidroxilações e metoxilações do anel aromático. Eles estão principalmente presentes nas frutas e hortaliças nas formas *O*-glicosídeos, no entanto encontram-se também nas formas esterificadas (FLEURIET e MACHEIX, 2003).

Os principais ácidos hidroxibenzoicos são os ácidos gálico, protocatecúico, e *p*-hidroxibenzoico (Figura 1) (LAFAY e GIL-IZQUIERDO, 2008). Além disso, os ácidos hidroxibenzoicos são componentes de estruturas complexas conhecidas por taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) (MANACH et al., 2004). A presença dos ácidos hidroxibenzoicos existe provavelmente como produtos de degradação das formas conjugadas, durante a extração ou hidrólise subsequente (FLEURIET e MACHEIX, 2003).

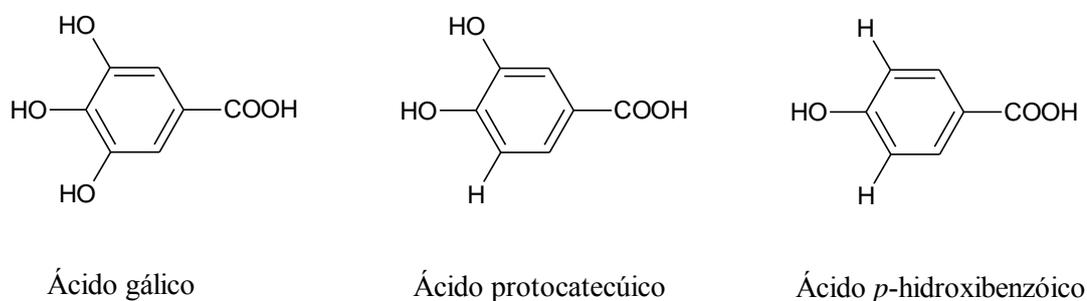


Figura 1. Os principais ácidos hidroxibenzoicos

O conteúdo de ácido hidroxibenzoico em vegetais comestíveis é geralmente muito baixo, com exceção das frutas vermelhas, rabanetes e cebolas. O chá verde também é considerado uma importante fonte de ácido gálico (MANACH et al., 2004).

2.1.1.2 Ácidos hidroxicinâmicos

Os ácidos hidroxicinâmicos são mais comuns do que os ácidos hidroxibenzóicos e consistem principalmente de quatro moléculas básicas: os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferrúlico e sinápico (Figura 2) (ROBARDS, 1999; FLEURIET e MACHEIX, 2003; MANACH et al., 2004; LAFAY e GIL-IZQUIERDO, 2008).

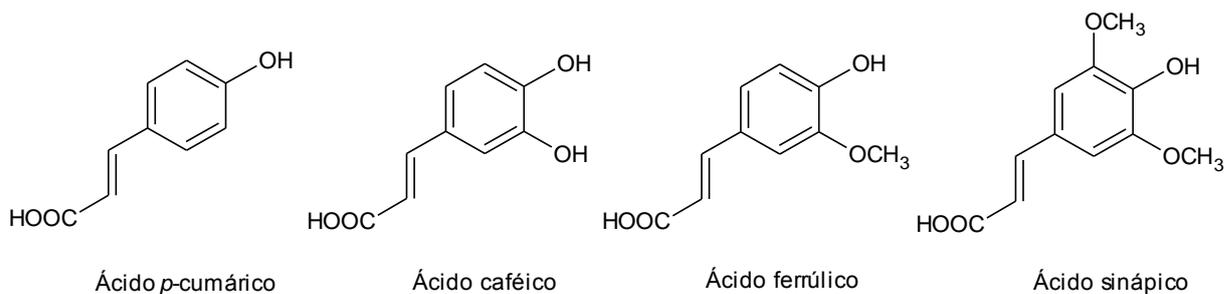


Figura 2. Estrutura dos principais ácidos hidroxicinâmicos

Os conjugados de ácidos hidroxicinâmicos resultam da diversidade do tipo das ligações e das moléculas envolvidas. Para estes compostos, a presença de uma dupla ligação na cadeia lateral promove a existência das formas isoméricas *cis* (Z) e *trans* (E). Os compostos predominantes na natureza estão principalmente na forma *trans*, porém a isomerização pode ocorrer durante a extração e purificação, bem como pela ação da luz ou de outros fatores químicos e físicos (ROBARDS, 1999; FLEURIET e MACHEIX, 2003).

Estes ácidos são raramente encontrados na forma livre, exceto no processamento de alimentos que se submetam ao congelamento, esterilização ou fermentação (MANACH et al., 2004). Nas frutas, ocorrem na forma esterificada com glicose, ácido quínico, ácido chiquímico e ácido tartárico (ROBARDS, 1999; MANACH et al., 2004, LAFAY e GIL-IZQUIERDO, 2008).

Os ácidos hidroxicinâmicos são encontrados em todas as partes dos frutos, mas as maiores concentrações estão nas partes externas da fruta madura. As concentrações geralmente diminuem no decorrer do amadurecimento, porém, as quantidades totais aumentam quando o fruto aumenta em tamanho (MANACH et al., 2004).

O ácido caféico é o ácido fenólico mais abundante e representa de 75% a 100% do conteúdo total de ácidos hidroxicinâmicos nas frutas. O ácido ferrúlico é o principal ácido fenólico encontrado nos cereais, sobretudo nas partes mais externas, representando acima de

90% dos compostos fenólicos totais, sendo sua principal fonte na dieta (MANACH et al., 2004; LAFAY e GIL-IZQUIERDO, 2007).

Devido a sua presença em muitas frutas e hortaliças, os ácidos hidroxicinâmicos realizam contribuições muito mais significativas ao total de compostos fenólicos ingeridos do que os ácidos hidroxibenzóicos e os flavonóides (flavan-3-óis ou flavonas) (LAFAY e GIL-IZQUIERDO, 2008).

2.1.2 Flavonóides

São amplamente distribuídos nos vegetais, onde estão presentes no interior das células ou nas superfícies dos diferentes órgãos vegetais (folhas, sementes, flores, cascas, raízes) (MANACH et al., 2004). Representam os compostos fenólicos mais amplamente distribuídos na dieta ocidental (KOH e MITCHELL, 2006).

Os flavonóides apresentam uma estrutura química baseada no difenilpropano (C₆-C₃-C₆) (Figura 3) e diferem na saturação do anel heteroatômico C, na localização do segundo anel aromático nas posições C-2 ou C-3 do anel C, e em todos os padrões de hidroxilação. Podem também ser modificados pela metoxilação, ou pela *O*-glicosilação dos grupos hidroxilas, bem como pela glicosilação direta ao átomo de carbono da estrutura flavonóide (STOBIECKI e KACHLICKI, 2006). Essas modificações possibilitam a classificação em seis principais subclasses: flavonóis, antocianidinas, flavan-3-óis, flavonas, isoflavonas e flavanonas (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000; MANACH et al., 2004; KOH e MITCHELL, 2006); porém, comparativamente e com menor frequência na dieta, estão os dihidroflavonóis, os flavan-3,4-dióis, as cumarinas, as calconas, as dihidrocalconas e as auronas (CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

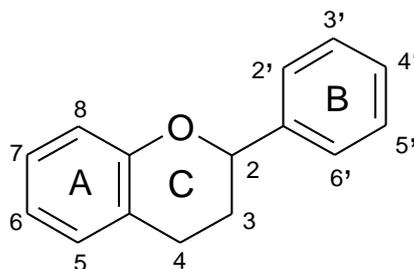


Figura 3. Estrutura de base dos compostos fenólicos

2.1.2.1 Flavonóis

Flavonóis são os mais difundidos entre os flavonóides, sendo encontrados no reino vegetal, com exceção das algas (CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009). Acumulam-se nos tecidos externos e aéreos (cascas e folhas) devido a sua biossíntese ser estimulada pela luz (MANACH et al., 2004).

São comumente encontrados como *C*-glicosídeos e *O*-glicosídeos. Os primeiros são caracterizados pela ligação carbono-carbono entre o carbono anomérico da molécula de açúcar e o carbono C-6 ou C-8 no núcleo flavan; os *O*-glicosídeos ocorrem via uma ligação β -glicosídica nas posições 5, 7, 3', 4' e 5', embora a ligação na posição C-3 predomine (KOH e MITCHEL, 2006; CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009). Vários açúcares, incluindo monossacarídeos (exemplo: quercetina-3-glicosídeo) e dissacarídeos (exemplo: quercetina-3-ramnosídeo, também conhecida como rutina) são comuns; contudo, os trissacarídeos e tetrassacarídeos também são encontrados (KOH e MITCHEL, 2006). As frutas contêm frequentemente de 5 a 10 flavonóides glicosilados diferentes (MANACH et al., 2004).

Encontram-se amplamente distribuídos na dieta ocidental e incluem a quercetina, o caempferol, a miricetina, a morina, a isoharmnetina e suas formas glicosiladas (Figura 4) (MANACH et al., 2004; KOH e MITCHEL, 2006; CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009). São descritos aproximadamente 380 flavonóis glicosilados, porém a maioria são derivados de quercetina ou caempferol (KOH e MITCHEL, 2006).

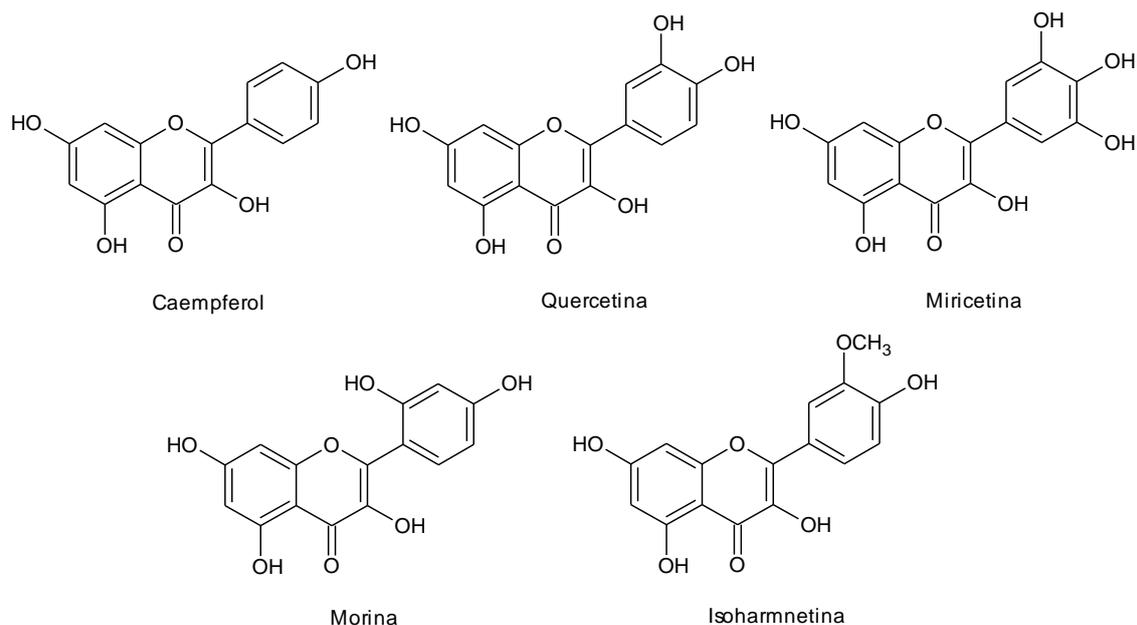


Figura 4. Estrutura das principais agliconas

As fontes alimentares comuns de quercetina e caempferol incluem cebolas, couve, maçãs, alho-poró, brócolis, mirtilos, vinho tinto e chá verde (AZUMA et al., 2002; MANACH et al., 2004; KOH e MITCHEL, 2006).

2.1.2.2 Antocianidinas

As antocianidinas são responsáveis pelas colorações vermelha, azul e violeta, particularmente evidentes nos tecidos das frutas e das flores, entretanto são encontradas nas folhas, caules, sementes e raízes (CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009). Suas funções são atrair os polinizadores e dispersores de sementes, a fotoproteção, por absorver a luz azul-verde e a captura de radicais livres gerados durante a fotossíntese (KOH e MITCHELL, 2006).

Nos tecidos vegetais, estes compostos são hidrossolúveis, e encontram-se invariavelmente como conjugados de açúcares (glicose, ramnose, galactose e arabinose) que passam a ser denominadas como antocianinas. As antocianidinas podem também ser aciladas com ácidos fenólicos (ácidos cumárico, caféico, ferrúlico, *p*-hidroxibenzóico, sinápico e malônico) e com ácidos carboxílicos (ácido acético) (KOH e MITCHELL, 2006; CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009; MATEUS e DE FREITAS, 2009).

As antocianidinas mais comuns são: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina (Figura 5). Elas têm em comum um hidroxilação do cátion *flavilium* nas posições C-3, C-5 e C-7, enquanto se diferem no padrão de substituição dos grupos hidroxila e/ou metoxila no anel B (MAZZA, 2007; KOH e MITCHELL, 2006).

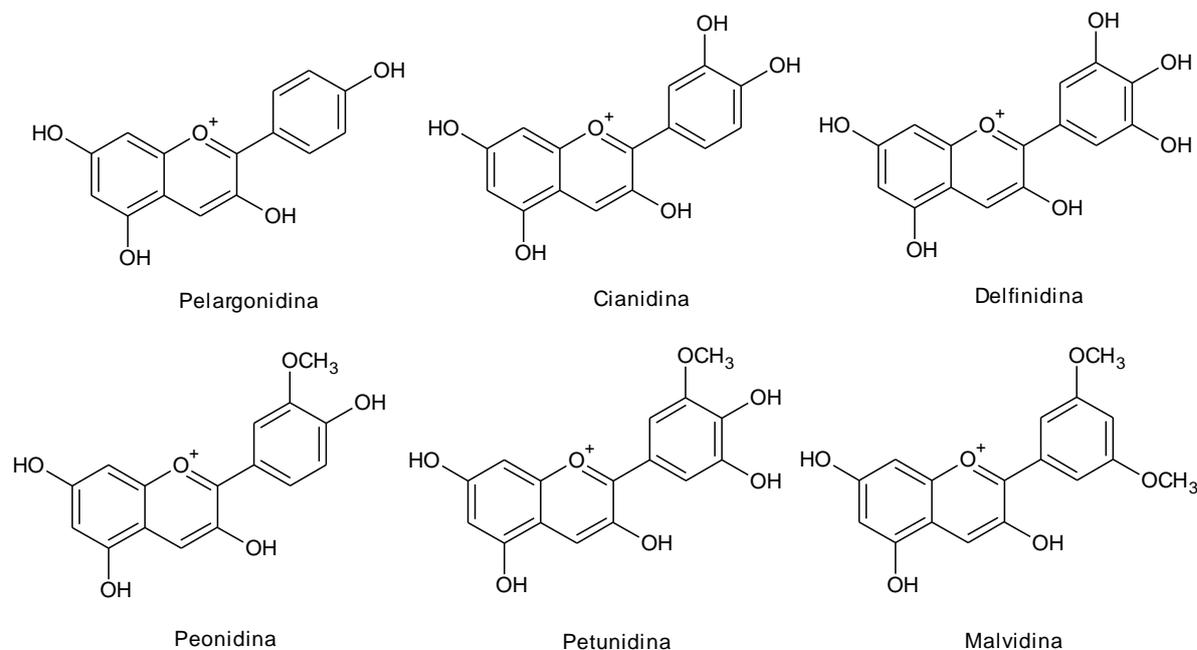


Figura 5. Estrutura das antocianidinas mais comuns

As diferenças de coloração entre as antocianinas são amplamente determinadas pelas seguintes condições: padrão de substituição do anel B da aglicona, padrão de glicosilação, grau e natureza da esterificação dos açúcares, pH, temperatura, tipo de solvente e a presença de co-pigmentos (MAZZA, 2007).

A estabilidade da antocianidina aumenta com o número dos grupos metoxila no anel B e diminui como o aumento do número de hidroxilas no anel B. Nesse contexto, a antocianidina mais estável é a malvidina, seguida pela peonidina, pelargonidina, petunidina, cianidina e delphinidina. Como a glicosilação e a acilação dos açúcares aumenta a estabilidade das antocianidinas, os dissacarídeos são mais estáveis do que suas contrapartes monossacarídeos (KOH e MITCHEL, 2006).

A antocianidina mais comum na natureza é a cianidina, e as maiores fontes do composto são: mirtilos, cerejas, framboesas, morangos, groselhas pretas, uvas roxas e vinho

tinto (MAZZA, 2007).

Numerosos estudos têm demonstrado que as antocianinas apresentam uma ampla faixa de atividades biológicas, incluindo: antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticarcinogênica, aumento da visão, indução da apoptose e efeitos neuroprotetores. Além disso, elas apresentam uma variedade de efeitos sobre os vasos sanguíneos e plaquetas, que reduzem o risco de doenças coronarianas (MAZZA, 2007).

2.1.2.3 Flavan-3-óis

Os flavan-3-óis constituem a subclasse mais complexa estruturalmente dos flavonóides. Estes são compostos não-planares e apresentam dois centros quirais no C-2 e C-3, que produzem quatro isômeros para nível de hidroxilação do anel B, por exemplo: (+)-catequina e (-)-epicatequina, estes amplamente encontrados na natureza; contudo, (-)-catequina e (+)-epicatequina são comparativamente raros (CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

Podem variar de simples monômeros, os quais podem sofrer hidroxilação para formar as galocatequinas. Também são esterificados com unidades de ácido gálico para formar estruturas mais complexas, chamadas de proantocianidinas oligoméricas e poliméricas (taninos condensados). Estas estruturas apresentam um centro quiral adicional no C-4 para cada unidade adicional de flavan-3-ol, podendo ocorrer acima de 50 unidades (KOH e MITCHELL, 2006; CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009). Os oligômeros são primariamente ligados nas posições C4-C8 ou, menos comum, na posição C4-C6 (ligação interflavan tipo B). Como exemplo, as procianidinas tipo A têm uma segunda ligação éter entre um grupo hidroxila do anel A e a posição C-2 do anel C (KOH e MITCHELL, 2006).

A quiralidade presente, apresenta um efeito significativo na estrutura tridimensional das moléculas tanto na captura de radicais livres como no efeito pronunciado nas propriedades de interação com outras moléculas, onde o conceito “chave-fechadura” é fundamental (CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

Como visualizado na Figura 6, os principais flavan-3-óis são: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina (GC), (-)-epigalocatequina (EGC), (-)-epicatequina-3-galato

(ECG) e (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG) (ARON e KENNEDY, 2008; KOH e MITCHELL, 2006).

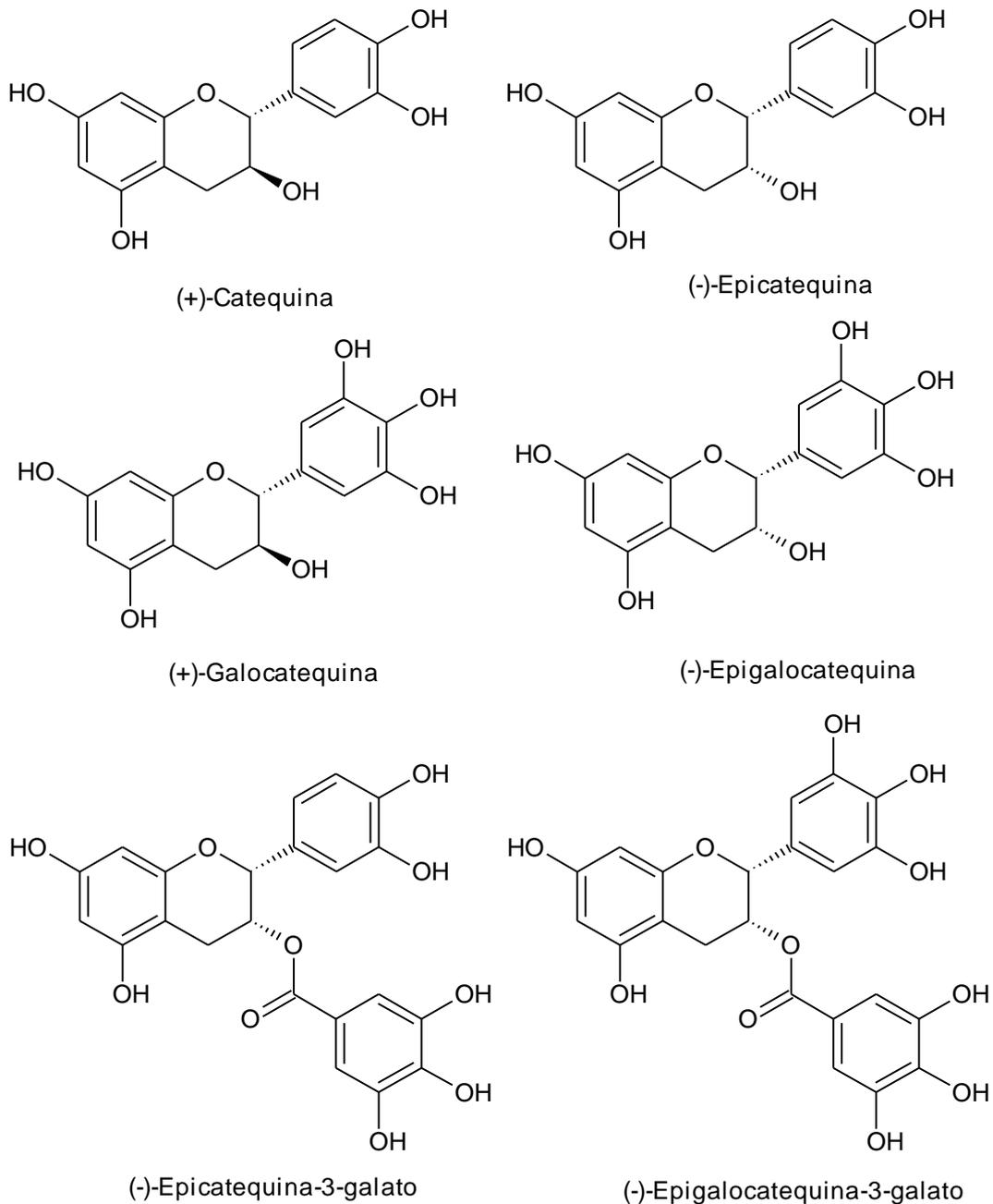


Figura 6. As estruturas dos flavan-3-óis mais comuns

A qualidade dos alimentos é afetada grandemente pelos flavan-3-óis, por promoverem a adstringência na boca, a qual é resultante da interação dos taninos com as proteínas salivares ricas em prolina, interferindo nas características sensoriais (sabor e aroma). Os flavan-3-óis apresentam habilidade de formar espuma, estabilidade microbiana, oxidativa e térmica

(ARON e KENNEDY, 2008). São encontrados no chá, vinho tinto, maçã e cacau (MANACH et al., 2004; KOH e MITCHELL, 2006).

Os flavan-3-óis podem interferir na patogênese de doenças cardiovasculares, via muitos mecanismos: antioxidante (captura de radicais livres, quelação de metais de transição, mediação/inibição enzimática), anti-trombogênico e anti-inflamatório. Em particular, as proantocianidinas e os monômeros de flavan-3-óis ajudam a diminuição do nível de colesterol no plasma, inibem a oxidação das LDL's, e ativam a produção de iNOS endotelial para prevenir a formação das placas de ateroma. Eles podem também influenciar o estresse oxidativo via modificação enzimática, e na modulação das vias de sinalização celular (ARON e KENNEDY, 2008).

2.1.2.4 Flavonas

As flavonas não apresentam um grupo oxo no C-3, mas por outro lado podem ter uma ampla gama de substituição, incluindo hidroxilação, metoxilação, *O*- e *C*-acilação e glicosilação; muitas flavonas ocorrem como 7-*O*-glicosídeos (CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009). São, sobretudo, glicosídeos de apigenina e luteolina (Figura 7), sendo as fontes mais importantes: o aipo e a salsa (MANACH et al., 2004). As flavonas metoxiladas, tais como tangeretina e nobiletina, são encontradas no gênero *Citrus*. Estas flavonas polimetoxiladas são os flavonóides mais hidrofóbicos (MANACH et al., 2004; CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

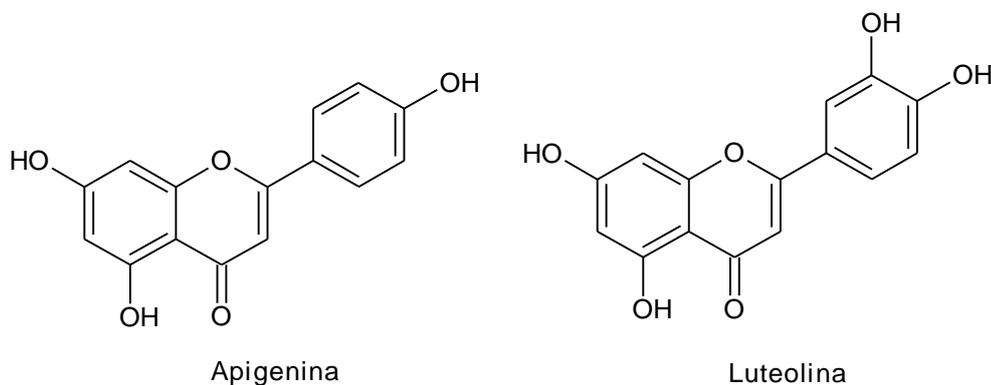


Figura 7. Estruturas da apigenina e luteolina

2.1.2.5 Isoflavonas

Ao contrário dos outros flavonóides, as isoflavonas são flavonóides com o anel B ligado a posição 3 do anel C (KOH e MITCHELL, 2006), como pode ser visualizado na Figura 8. São encontradas quase que exclusivamente nas leguminosas, com elevadas concentrações nos grãos de soja, considerada como a principal fonte de isoflavonas da dieta (MANACH et al., 2004; CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

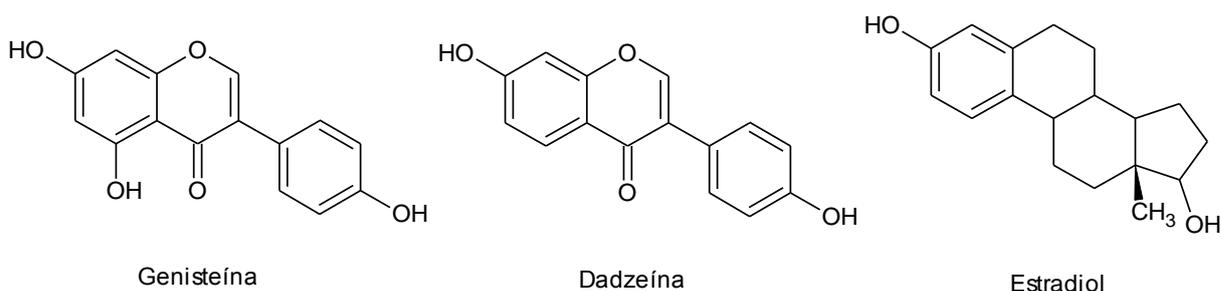


Figura 8. As principais isoflavonas e a estrutura do estradiol

As moléculas principais são a genisteína e a daidzeína (Figura 8) (MANACH et al., 2004). As isoflavonas apresentam similaridades estruturais com estrógenos, apresentando uma configuração das hidroxilas análoga ao estradiol (esterol) (Figura 8). Isto lhe confere propriedades pseudohormonais, por se ligar aos receptores de estrógenos, sendo conseqüentemente denominadas de fitoestrogénos (MANACH et al., 2004). O consumo da genisteína e da daidzeína na dieta diminui a incidência dos cânceres de próstata e de mama (CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

As isoflavonas encontradas nos alimentos a base de soja são *O*-glicosados e *O*-glicosados acetilados e malonilados. A glicosilação ocorre principalmente na posição C-7, com exceção da puerarina (8-*C*-glicosildaidzeína) encontrada em *kudzu*. Porém, as formas malonil são predominantes em sojas cruas (KOH e MITCHELL, 2006). Os *O*-glicosilados são sensíveis ao calor e frequentemente hidrolisados no decorrer do processamento industrial, como na produção do leite de soja, de *miso* e *tempeh*, enquanto as respectivas agliconas são muito resistentes ao calor (MANACH et al., 2004). As agliconas têm solubilidade limitada, tanto na água quanto em solventes orgânicos, ao contrário, os *O*-glicosilados são altamente hidrossolúveis (KOH e MITCHELL, 2006).

2.1.2.6 Flavanonas

As flavanonas são não-planares e apresentam um centro quiral no C-2. Na maioria das flavanonas naturais, o anel C é ligado ao anel B no C-2, na configuração α (CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

As flavanonas são encontradas em tomates e certas plantas aromáticas (menta). Elas estão presentes em altas concentrações nas frutas cítricas, como laranjas, toranjas e limões (MANACH et al., 2004, KOH e MITCHELL, 2006; CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009). As principais agliconas são naringenina, hesperidina, e eriodictiol (Figura 9). Neohesperidina e naringina são flavanonas glicosiladas no C-7, responsáveis pelo sabor amargo em laranjas e toranjas, respectivamente. Enquanto a hesperidina e a narirutina são flavanonas rutinosídeos e são insípidas (MANACH et al., 2004, KOH e MITCHELL, 2006; CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

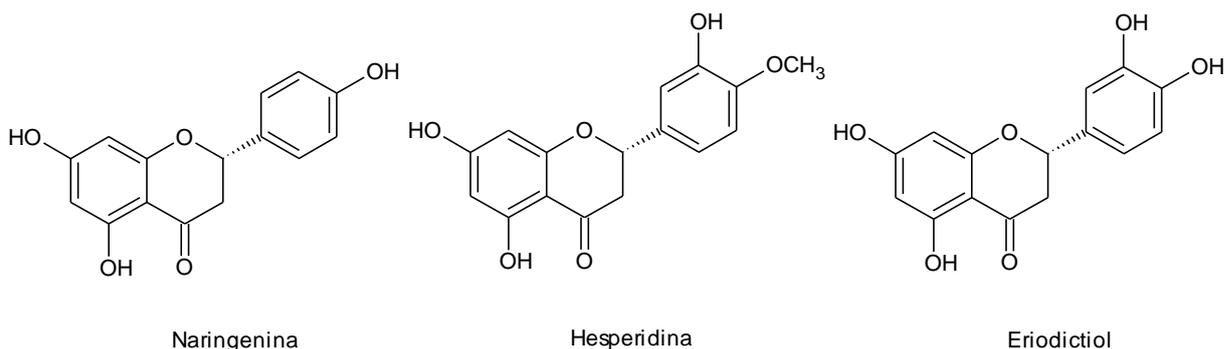


Figura 9. Estruturas das principais flavanonas

2.1.3 Biodisponibilidade de compostos fenólicos

Sobre o consumo oral, a captação de micronutrientes e fitoquímicos no corpo não é completa; apenas certa percentagem é absorvida. A biodisponibilidade é utilizada para quantificar a quantidade que é absorvida, distribuída no tecido, metabolizada e eventualmente excretada. A biodisponibilidade descreve a concentração de um composto ou seu metabólito no órgão alvo; contudo, não há definição que englobe precisamente a natureza multifatorial do termo. A bioacessibilidade no trato intestinal, que se trata de um pré-requisito para a biodisponibilidade, é definida como a quantidade que é potencialmente absorvível no lúmen.

Ela depende da matriz alimentar (por exemplo; da localização na planta, do processamento sofrido, da digestão gástrica e luminal), bem como da estrutura química e das propriedades dos nutrientes e dos fitoquímicos. Uma baixa bioacessibilidade pode limitar a biodisponibilidade significativamente (HOLST e WILLIAMSON, 2008).

2.1.3.1 Biodisponibilidade dos ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são biodisponíveis quando estão na forma aglicona e são geralmente absorvidos na parte superior do trato gastrointestinal. Recentemente, mostrou-se que o estômago constitui uma região de absorção ativa, este fato explica a rápida absorção deles entre 1 a 2h após a ingestão alimentar. O intestino delgado constitui outra região de absorção. Quando os ácidos fenólicos estão esterificados, a biodisponibilidade diminui alcançando somente 0,3-0,4% da ingestão, pois nesta forma necessitam ser hidrolisados nos enterócitos, antes de alcançarem a corrente sanguínea, devido à blindagem enzimática das células intestinais não são suficientes para hidrolisar as ligações ésteres. No entanto, grande parte alcança o cólon para ser metabolizada pela microflora e, por isso, há uma detecção dos metabólitos microbianos no plasma entre 7 e 8 h após a ingestão (LAFAY e GIL-IZQUIERDO, 2008).

2.1.3.2 Biodisponibilidade dos flavonóides

Seguindo a ingestão dos flavonóides (agliconas e glicosilados), a absorção de alguns para o sistema circulatório ocorre no intestino delgado. Tipicamente, isso está associado à hidrólise realizada pela lactase-floridizina hidrolase (LPH), na borda das escovas das células epiteliais do intestino delgado, liberando as agliconas. Esta enzima apresenta ampla especificidade para flavonóides *O*- β -D-glicosídeos. As agliconas liberadas podem passar entre as células epiteliais por difusão passiva, devido à lipofilicidade aumentada e a proximidade com a membrana celular. Antes da passagem da corrente sanguínea, as agliconas são metabolizadas pela ação das sulfotransferases (SULT), das UDP-glucuronil-transferases (UGTs) e/ou das catecol-*O*-metiltransferases (COMT), produzindo, respectivamente, metabólitos sulfatados, glucuronidados e metilados. Uma vez na corrente sanguínea, os metabólitos são submetidos ao metabolismo da fase II, com mais conversões no fígado, onde

o transporte entero-hepático na bile pode resultar em alguma reciclagem no intestino delgado (CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009) (Figura 10).

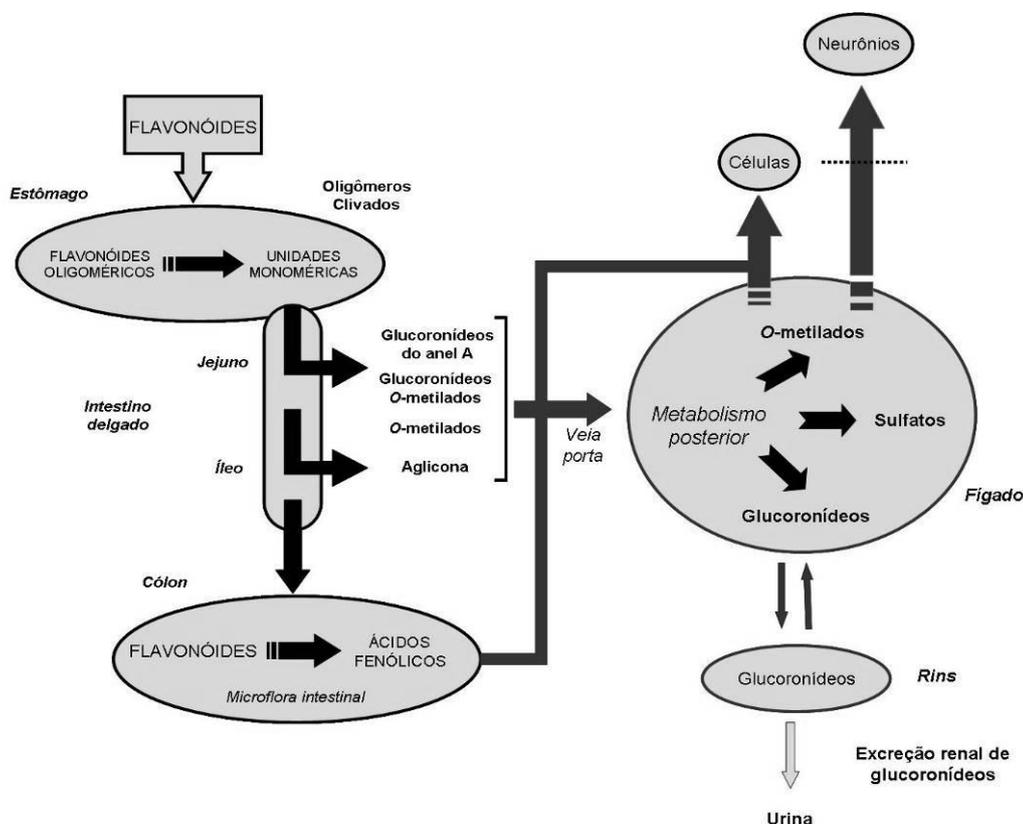


Figura 10. Rota da formação dos metabólitos e conjugados de flavonóides (SPENCER, 2003)

Os flavonóides e seus metabólitos não são absorvidos no intestino delgado, porém podem ser absorvidos no intestino grosso, mas também serão submetidos à ação da microflora do cólon (CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009). Os metabólitos produzidos são compostos fenólicos simples derivados dos anéis A e B, após o anel C ser quebrado. A presença substancial de compostos fenólicos não absorvidos e seus respectivos metabólitos, além de seu efeito benéfico direto sobre os tecidos humanos, exercem efeitos significantes no ambiente intestinal, pela modulação da microbiota (SELMA, ESPÍN e TOMÁS-BARBERÁN, 2009). Também os flavonóides podem ser absorvidos e excretados na urina em quantidades substanciais. Na maioria dos casos estão bem superiores aos metabólitos que entraram no sistema circulatório, através do intestino delgado (CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

2.1.4 *Euterpe oleracea*

Euterpe oleracea Mart. (Figura 11) é uma palmeira amplamente distribuída no estuário amazônico e apresenta grande importância socioeconômica no estado do Pará. Também é encontrada na Colômbia e no Suriname, tanto na alimentação como na medicina popular (efeito anti-diarréico) (ROGEZ, 2000; SCHAUSS et al., 2006). Atualmente, os produtos de açaí estão sendo exportados para os mercados europeu, asiático e norte-americano (CHIN et al., 2008). A polpa dos frutos apresenta uma grande quantidade de compostos fenólicos, principalmente de antocianinas (cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo), contudo apresenta outros compostos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e flavan-3-óis) (ROGEZ, 2000; PACHECO-PALENCIA et al., 2008; MERTEN-TALCOTT et al., 2008).

O açaí apresenta muitos efeitos benéficos à saúde, além de sua capacidade de capturar radicais livres. Os extratos de açaí apresentam efeitos benéficos sobre a antiproliferação e indução da apoptose em células humanas de leucemia HL-60 e em células cancerígenas de cólon HT-29. (TALCOTT, DEL POZO-INSFRAN e PERCIVAL, 2006; PACHECO-PALENCIA et al., 2008). Em ratos, os extratos de sementes e cascas de açaí apresentaram efeito vasodilatador (MENTES-TALCOTT, 2008; CHIN et al., 2008). A capacidade antioxidante do açaí foi demonstrada utilizando diferentes ensaios antioxidantes: ORAC_{FL}, NORAC e HORAC; também foi demonstrado inibir a geração de espécies reativas de oxigênio e as atividades das COX-1 e -2 (SCHAUSS et al., 2006; MENTES-TALCOTT et al., 2008). Os extratos de açaí apresentam influência na produção de NO, na expressão iNOS endotelial e da testoterona 5 α -redutase (CHIN et al., 2008).



Figura 11. Frutos de *Euterpe oleracea*

2.2 INTERAÇÕES NÃO-COVALENTES

Segundo Nelson e Cox (2002) há quatro tipos de interações não-covalentes que atuam entre biomoléculas dissolvidas em água: interações iônicas, pontes de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas.

2.2.1 Interações iônicas

As interações iônicas ocorrem quando dois grupos de cargas opostas se aproximam e são atraídos mutuamente através de uma força atrativa coulômbica (F), que é descrita pela Equação 1:

$$F = \frac{1}{D} \frac{q_1 q_2}{r^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde a força (F) das interações iônicas em solução depende da magnitude das cargas q_1 e q_2 ; r é a distância entre elas e D é a constante dielétrica do meio em que os átomos se aproximam (COPELAND, 2000; NELSON e COX, 2002). Uma vez que D aparece no denominador, a força das interações (F) torna-se muito elevada em solvente de baixa constante dielétrica, por isso as forças eletrostáticas são mais fortes no interior hidrofóbico das proteínas, do que na superfície exposta para o solvente (COPELAND, 2000).

A água é especialmente eficaz na seleção das interações eletrostáticas entre os íons dissolvidos, devido a sua elevada constante dielétrica (NELSON e COX, 2002). São as interações não-covalentes mais fortes e podem atuar por grandes distâncias ao contrário das demais interações não-covalentes. Conseqüentemente, a estabilidade dos polímeros biológicos em ambiente aquoso não é fortemente dependente deste tipo de interação, mas realizam um papel no reconhecimento de uma molécula por outra (HORTON et al., 2006).

2.2.2 Pontes de hidrogênio

As pontes de hidrogênio se formam facilmente entre um átomo eletronegativo (F, O,

N) e um átomo de hidrogênio ligado covalentemente a outro átomo eletronegativo, na mesma ou em outra molécula. Estas interações não são restritas à água. O átomo o qual o hidrogênio é covalentemente ligado é a ponte de hidrogênio doadora, e o outro átomo é a ponte de hidrogênio receptora: $N^{\delta-}-H^{\delta+}\cdots O^{\delta-}$ (COPELAND, 2000; NELSON e COX, 2002).

Os receptores nas pontes de hidrogênio são quase exclusivamente heteroátomos eletronegativos; geralmente são átomos de oxigênio e de nitrogênio, ou algumas vezes, átomos de enxofre. As pontes de hidrogênio são mais fracas que as ligações covalentes, variando a energia de ligação entre 2,5 e 8,0 kcal/mol. A força de uma ponte de hidrogênio é dependente de muitos fatores, mas principalmente do comprimento da ligação entre o hidrogênio e o heteroátomo receptor (COPELAND, 2000; NELSON e COX, 2002).

Segundo Jeffret e Saenger (1991) a fragilidade individual de uma ponte de hidrogênio é tal que, frequentemente ela não é suficiente para promover a forma e a especificidade necessárias para os processos biológicos, mas caso as pontes de hidrogênio doadoras e receptoras sejam arranjadas em geometrias particulares, elas tornar-se-ão mais específicas, com forças adicionais e frequentemente cooperativas. A formação destas redes de pontes de hidrogênio ocorre em proteínas, contudo, coletivamente favorecendo grande estabilidade para certas estruturas (COPELAND, 2000).

2.2.3 Interações de van der Waals

As interações de van der Waals ocorrem devido à distribuição de elétrons em torno de um átomo variar em função do tempo. Através destas variações, uma assimetria transiente da distribuição eletrônica pode ser estabelecida em um átomo, o qual cria um dipolo elétrico transiente, induzindo um dipolo elétrico transiente de carga oposta, ou seja, promovendo uma redistribuição similar da densidade eletrônica nos átomos das vizinhanças (COPELAND, 2000; NELSON e COX, 2002). Os dois núcleos aproximam-se e suas nuvens eletrônicas começam a se repelir, a ponto das interações de van der Waals equilibrarem esta força repulsiva (NELSON e COX, 2002).

A interação de van der Waals é muito mais fraca do que as interações iônicas e as pontes de hidrogênio. Tipicamente a energia de uma ligação de van der Waals é apenas cerca

de 1,0 kcal/mol. Quando as condições do meio permitem um grande número de interações de van der Waals, de forma simultânea, proporcionam uma energia estabilizante significativa para as interações entre as macromoléculas (COPELAND, 2000).

2.2.4 Interações hidrofóbicas

As interações hidrofóbicas são forças que mantêm juntas as regiões apolares das moléculas anfipáticas. Em contato com a água, as regiões polares destas moléculas interagem favoravelmente com o solvente e tendem a se dissolver; entretanto, as regiões apolares tendem a evitar o contato com a água, agregando-se às regiões apolares de outras moléculas; apresentando assim menor área hidrofóbica, como observado na Figura 12 (NELSON e COX, 2002).

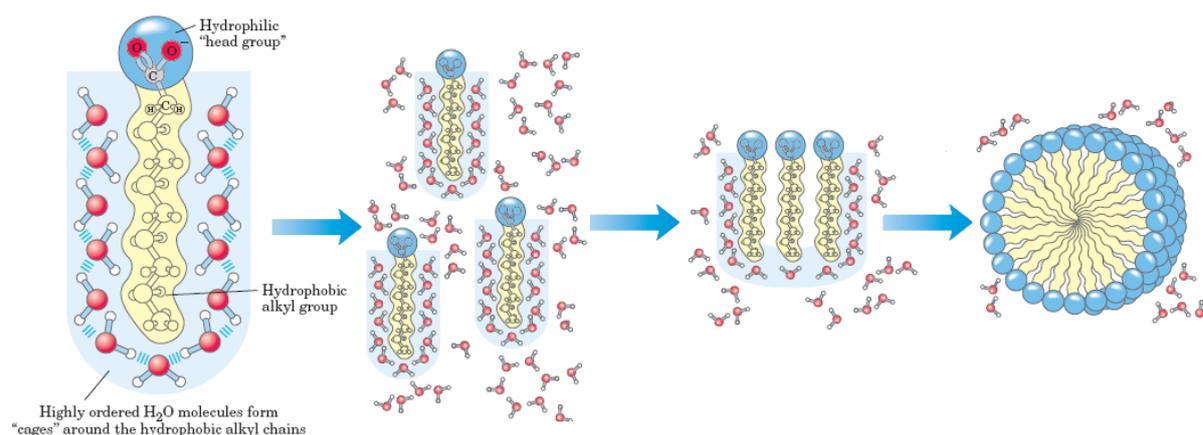


Figura 12. Moléculas anfipáticas em solução aquosa (NELSON e COX, 2002).

Estas interações não ocorrem por nenhuma atração intrínseca entre as moléculas anfipáticas, mas devido ao fato de obter maior estabilidade termodinâmica, que minimizam o número de moléculas de água requeridas para envolver as regiões apolares das moléculas anfipáticas (NELSON e COX, 2002).

Assim como as outras interações não-covalentes, as interações hidrofóbicas são consideradas muito mais fracas que as ligações covalentes; apresentam forças de ligação variáveis, as quais dependem da polaridade do solvente. Embora sejam individualmente fracas, suas influências tornam-se muito significativas coletivamente como nas estruturas tridimensionais de proteínas, de ácidos nucleicos, de polissacarídeos e de lipídios de

membranas (NELSON e COX, 2002).

O efeito cumulativo de muitas interações hidrofóbicas pode ter um efeito significativo na estabilidade de uma macromolécula. A estrutura tridimensional de muitas proteínas, por exemplo, é largamente determinada pelas interações hidrofóbicas formadas durante a dobradura espontânea da cadeia polipeptídica. As moléculas de água são ligadas na superfície externa da proteína, mas não pode penetrar no interior, onde muitos grupos apolares estão localizados (HORTON et al., 2006).

2.3 ENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é definida como uma tecnologia de acondicionamento de sólidos, líquidos e gases em miniatura; cápsulas seladas que podem liberar seus conteúdos a taxas de controle, sob condições específicas (FAVARO-TRINDADE, PINHO e ROCHA, 2008; MOZAFARI et al., 2008a). O material revestido é conhecido como material interno, ativos, recheio, fase interna ou *payload*; enquanto, o material de revestimento pode ser chamado de cápsula, material de parede, membrana, carreador ou concha. As microcápsulas são vesículas pequenas que podem variar de tamanho de nanômetros até micrômetros. São idealmente esféricas, contudo, sua forma é fortemente influenciada pela estrutura original do material encapsulado e dos ingredientes das cápsulas. Podem ser feitas de açúcares, gomas, proteínas, polissacarídeos naturais ou modificados, lipídios, fosfolipídios e polímeros sintéticos (MOZAFARI et al., 2008a).

Na indústria de alimentos, a microencapsulação é utilizada para estabilizar e controlar a liberação do material interno (tanto o início quanto a taxa de liberação) e para separar os componentes reativos ou incompatíveis da formulação. As microcápsulas oferecem muitas vantagens, tais como: a proteção de componentes sensíveis, a prevenção das perdas nutricionais, o mascaramento de sabores, etc (MOZAFARI et al., 2008a).

Numerosas técnicas de encapsulação foram desenvolvidas em escalas micro e nano. Em geral, três etapas estão envolvidas na encapsulação de compostos bioativos: (a) formar a parede em torno do material a ser encapsulado, (b) assegurar que não haja vazamento indesejável e (c) assegurar que o material indesejável não entre (MOZAFARI et al., 2008a).

As técnicas de encapsulação incluem *spray-drying*, *spray-chilling* ou *spray-cooling*, revestimento por extrusão, revestimento em leito fluidizado, captura em lipossoma, coarcevação, inclusão por complexação, extrusão centrífuga, deposição eletrostática, etc. (MOZAFARI et al., 2008a).

Há uma tendência mundial que aponta para a necessidade de que os alimentos não sejam mais somente vistos como uma fonte de nutrientes com apelo sensorial, mas também como fonte de bem-estar e de saúde para os indivíduos. Esta mudança de perspectiva requer mudanças de paradigma no desenvolvimento de novos produtos, aplicando-se os métodos tradicionais, mas também observando a necessidade do controle da bioacessibilidade de determinados componentes dos alimentos. Conforme se estabelece as relações entre a genética, a alimentação e a saúde, a microencapsulação é um meio efetivo de se alcançar tais objetivos (FAVARO-TRINDADE, PINHO e ROCHA, 2008).

2.3.1 Lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas pequenas, nos quais, um ou mais compartimentos estão completamente fechados por moléculas que têm funcionalidade anfipática, tais como os fosfolipídios e o colesterol (HASIRCI, 2007). Moléculas hidrofílicas podem ser encapsuladas nos compartimentos aquosos e as moléculas lipofílicas nas bicamadas lipídicas, como pode ser observado na Figura 13 (SUNTRES e OMRI, 2006).

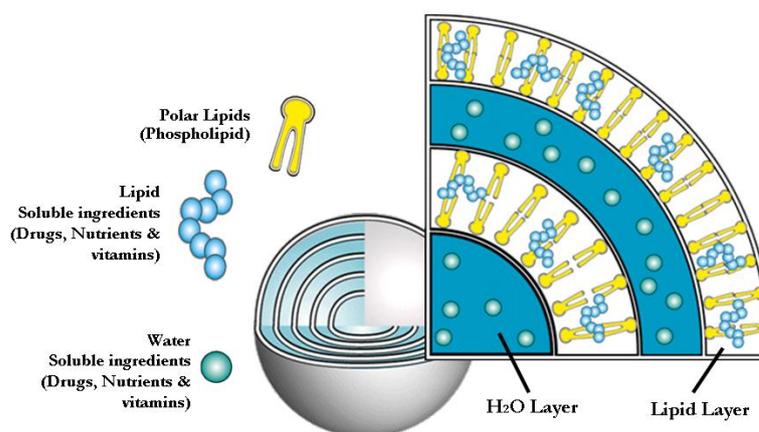


Figura 13. Características estruturais dos lipossomas (KELLER, 2001).

Suas propriedades variam substancialmente em função da composição, tamanho, carga

superficial e o método de preparação (HASIRCI, 2007).

Os lipossomas são utilizados como excelentes modelos de membrana celular, como carreadores para várias substâncias bioativas (drogas, nucleotídeos, vacinas, enzimas, cosméticos e nutracêuticos), na redução da toxicidade sistêmica, e evitam a degradação precoce de drogas encapsuladas após introdução no corpo. São considerados como um sistema de liberação superior e aceitável por ser biocompatível, biodegradável e atóxico (SUNTRES e OMRI, 2006; HASIRCI, 2007). Podem ser produzidos por ingredientes seguros obtidos de fontes naturais, tais como ovo, soja ou leite (MOZAFARI et al., 2008b).

Os lipossomas podem ser incorporados tanto em formulações relativamente simples, como em preparações mais complexas, tais como géis, cremes, pastas, suspensões, dispersões coloidais e dentre outros, o que flexibiliza sua utilização. Quando direcionados à liberação de compostos terapêuticos dependem de suas características físicas e químicas, por exemplo, composição, tamanho, eficiência de encapsulação e estabilidade (JUSTO, 2003).

Os lipossomas têm um grande potencial não somente nos campos avançados da medicina ou da farmácia, mas também em outros campos, tais como a indústria de alimentos. Recentemente, muitos alimentos funcionais foram introduzidos no mercado, contudo, alguns dos seus componentes ativos são decompostos no estômago e não absorvidos eficientemente no intestino. Para melhorar a absorção de tais materiais ativos dentro do corpo é essencial prevenir a decomposição/degradação e aumentar a absorção intestinal (MOZAFARI et al., 2008a).

Uma aplicação típica de nanolipossoma na área de alimentos é a encapsulação de antioxidantes, pois estes apresentam uma capacidade muito limitada em atravessar membranas celulares e são rapidamente retirados das células (MOZAFARI et al., 2008a).

Segundo Stone e Smith (2004) o termo *lipossomas antioxidantes* é utilizado para referenciar lipossomas que contêm antioxidantes lipossolúveis ou hidrossolúveis, antioxidantes enzimáticos ou combinação destes antioxidantes.

2.3.2 Composição dos lipossomas

2.3.2.1 Fosfolipídios

Segundo Nelson e Cox (2002) os fosfolipídios são lipídios em que dois ácidos estão unidos através de ligação éster ao primeiro e ao segundo carbono de uma molécula de glicerol, e um grupo altamente polar ou carregado está ligado, por meio de uma ligação fosfodiéster, ao terceiro carbono.

De um modo geral, os fosfolipídios contêm um ácido graxo saturado C_{16} ou C_{18} em C-1 e um ácido graxo insaturado C_{18} a C_{20} em C-2 (NELSON e COX, 2002), como visto na Figura 14.

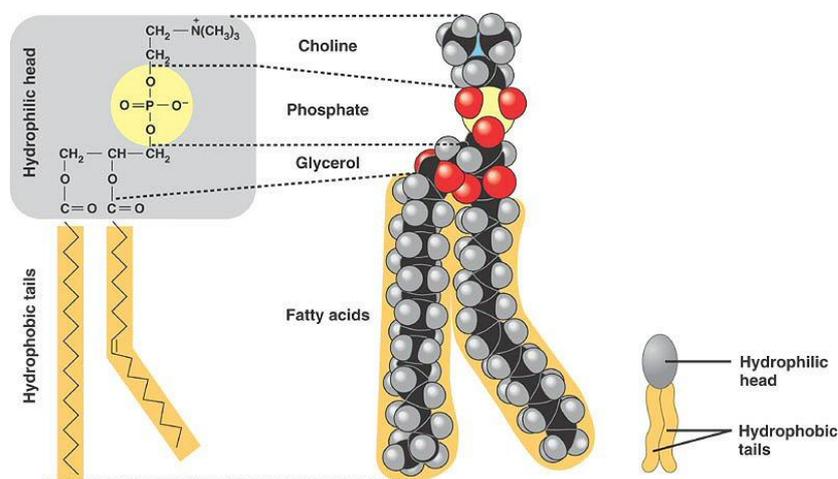


Figura 14. Estrutura básica dos fosfolipídios (Fonte: <http://kvhs.nbed.nb.ca>)

Os fosfolipídios constituem a maior parte estrutural de muitas membranas biológicas e lipossomas. Devido ao seu caráter anfipático, eles promovem interações hidrofóbicas entre si e interações hidrofílicas com a água que direcionam sua organização como bicamadas ou como lipossomas (VEMURI e RHODES, 1995; NELSON e COX, 2002). São caracterizados por uma temperatura de transição de fase (T_t), na qual a bicamada passa de uma fase mais ordenada (gel) para uma menos ordenada (cristal-líquido). O comprimento e a saturação dos ácidos graxos influenciam a T_t , ou seja, diferentes lipossomas, formados por distintos lipídios, podem apresentar diferentes níveis de fluidez na mesma temperatura. A permeabilidade dos lipossomas é relativamente baixa quando a temperatura está abaixo da T_t dos mesmos, sendo a T_t medida pelo fluxo ou pela taxa em que o soluto sai do compartimento aquoso, através da bicamada (BATISTA, CARVALHO e MAGALHÃES, 2007).

O tipo e a posição dos ácidos graxos são importantes para as características dos fosfolipídios (VEMURI e RHODES, 1995). Um exemplo disso são os ácidos graxos presentes nas fosfatidilcolinas de origem animal e vegetal que podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição de ácidos graxos de fosfatidilcolina de gema de ovo e soja

Composição de ácidos graxos (%)		Fosfatidilcolina	
		Ovo	Soja
16:0	Palmítico	32	12
16:1	Palmitoléico	1,5	< 0,2
18:0	Estearico	16	2,3
18:1	Oléico	26	10
18:2	Linoléico	13	68
18:3	Linolênico	< 0,3	5
20:4	Araquidônico	4,8	< 0,1
22:5	Docosapentaenóico	4,0	< 0,1

Fonte: Vemuri e Rhodes (1995).

Os fosfolipídios mais frequentes em plantas e animais são: a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina. Há um número considerável de fosfolipídios sintéticos disponíveis e utilizados na preparação de lipossomas (VEMURI e RHODES, 1995).

Nos lipossomas, os fosfolipídios mais utilizados são os que apresentam uma forma cilíndrica como as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiélna, que tendem a formar uma bicamada mais estável em solução aquosa. As fosfatidilcolinas são as mais empregadas por apresentarem grande estabilidade frente a variação de pH ou da concentração de soluto no meio (BATISTA, CARVALHO e MAGALHÃES, 2007).

Muitos concentrados de fosfolipídios ou lecitinas são obtidos durante a degomagem de óleos comestíveis e não são adequadas para o consumo humano. Somente a lecitina de soja (50-70% de fosfolipídios) é adequada para uso humano e industrial. A fração de fosfolipídio de lecitina de soja contém cerca de 30 a 32% de fosfatidilcolina, 22 a 28% de fosfatidiletanolamina, 18 a 20% de fosfatidilinositol, 3 a 4% de fosfatidilserina e 20 a 29% de outras substâncias (POKORNÝ, 2003).

2.3.2.2 Esteróides

Os esteróis são os menores constituintes presentes nos lipídios da dieta humana, porém são amplamente distribuídos e de extrema importância nas membranas celulares

(WAŚOWICZ, 2003; O'KEFFE, 2008). Eles compõem a maior porção da fração insaponificável de muitos óleos e gorduras. Podem ser classificados de acordo com a sua origem como esteróis animais ou esteróis vegetais; estes são subdivididos em fitosteróis e micosteróis (WAŚOWICZ, 2003).

a) *Colesterol*

Segundo Nelson e Cox (2002) o colesterol é considerado o mais importante esterol dos tecidos animais. É anfipático, com um grupo-cabeça polar (o grupo hidroxila em C-3) e um corpo hidrocarbônico não-polar (o núcleo esteróide e uma cadeia lateral hidrocarbonada em C-17) (Figura 15), de comprimento igual a um ácido graxo de 16 carbonos na sua forma estendida.

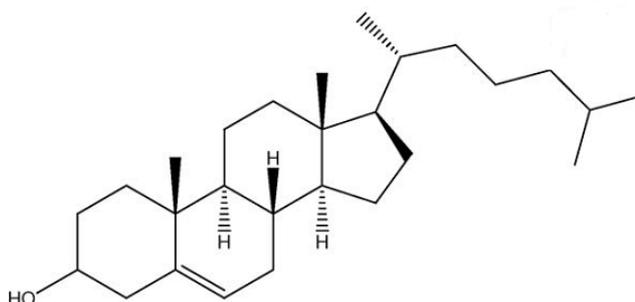


Figura 15. Estrutura química do colesterol

Além de ser precursor de vários produtos com atividades biológicas específicas (ácidos biliares, pró-vitamina B e D₃ e hormônios esteróides), apresenta caráter anfifílico que permite penetrar na membrana com a mesma orientação das moléculas de fosfolipídios, interagindo com os fosfolipídios através de pontes de hidrogênio (entre o grupo hidroxila do colesterol e a cabeça polar dos fosfolipídios) e através de interações hidrofóbicas e de van der Waals (entre o anel esteróide hidrofóbico e os grupos acila dos fosfolipídios). O colesterol modula a fluidez da membrana celular via sua inserção dentro de pequenos espaços entre os fosfolipídios, desse modo, restringindo seu movimento (Figura 16) (NELSON e COX, 2002; WAŚOWICZ, 2003; ROZNER e GARTI, 2005). Estes mesmos efeitos são reproduzidos nos lipossomas, sendo: fluidez da bicamada lipídica, redução da permeabilidade de compostos hidrossolúveis através da bicamada e estabilidade na presença de fluidos biológicos

(VEMURI e RHODES, 1995).

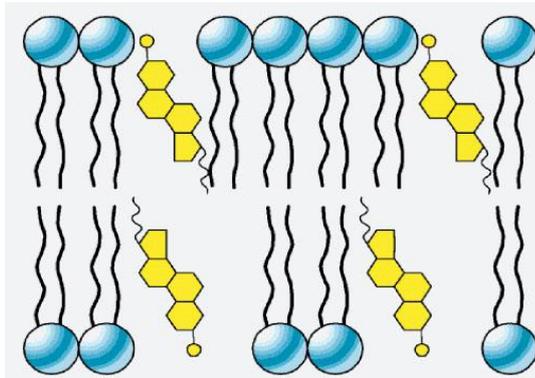


Figura 16. Interação entre bicamada lipídica e colesterol

b) Fitosteróis

Os esteróis das plantas estão presentes em pequenas quantidades em óleos vegetais, castanhas, sementes, cereais e feijões ($\approx 1\%$). São classificados em três grupos: 4-desmetilesteróis, 4-monometilesteróis, 4,4'-dimetilesteróis (WAŚOWICZ, 2003).

Os fitosteróis mais abundantes são: β -sistosterol, estigmasterol e campesterol (Figura 17). Estes fitosteróis e o colesterol são todos 4-desmetilesteróis que compartilham das estruturas idênticas dos anéis e diferem somente em suas cadeias laterais. Estes compostos contêm 28 e 29 átomos de carbono, comparados com os 27 átomos de carbono encontrados no colesterol e tendem a ser compostos mais hidrofóbicos do que o colesterol. Eles ocorrem na forma livre, mas também esterificados a ácidos graxos, a açúcares ou a ácidos fenólicos. Estas pequenas diferenças resultam em maiores mudanças nas suas funções biológicas (WAŚOWICZ, 2003).

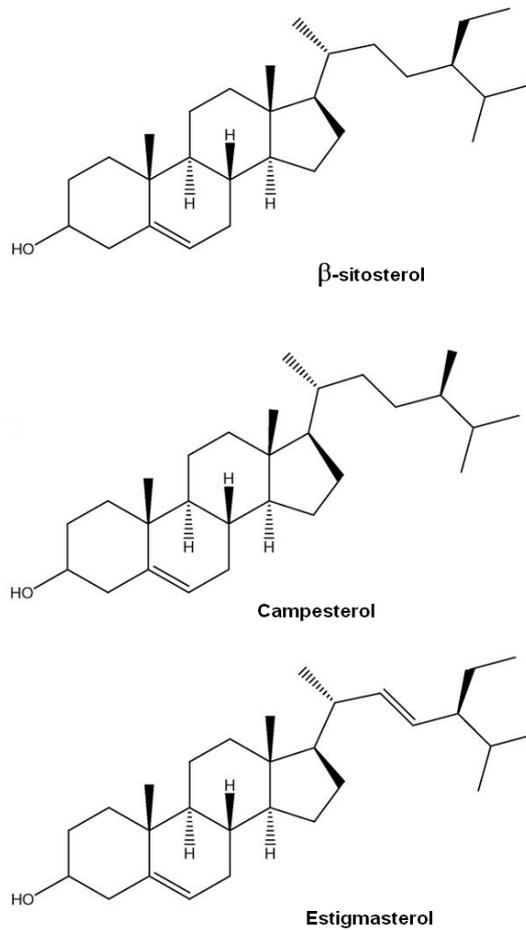


Figura 17. Estrutura dos principais fitosteróis (LAGARDA et al., 2006)

c) Colesterol vs. fitosteróis

A hipercolesterolemia é um dos maiores fatores de risco da aterogênese e promove uma série de doenças cardiovasculares. Um método preventivo é a redução da ingestão de alimentos ricos em colesterol, porém um método mais promissor atualmente é a ingestão dos fitosteróis. Os fitosteróis não são sintetizados pelo corpo humano, são mal absorvidos e efetivamente excretados pelo fígado, mostrando níveis muito baixos, normalmente abaixo de 1,0 mg/dL, e não apresentam efeitos colaterais (WAŚOWICZ, 2003; CHAN et al., 2004).

Os conteúdos de colesterol em lipossomas são baixos, e de fato, podem ser desprezíveis, quando comparados com os níveis alimentares, em indivíduos saudáveis. Porém aqueles com hipercolesterolemia são totalmente restringidos de ingerir colesterol, mesmo em concentrações baixas (CHAN et al., 2004). O objetivo do estudo de Chan et al. (2004) foi

investigar a eficiência da encapsulação e a estabilidade de lipossomas, quando o colesterol é substituído pelos fitosteróis (β -sitosterol e estigmasterol).

Além do efeito de redução do colesterol, os fitosteróis apresentam as seguintes atividades em animais: propriedades anti-câncer (com um efeito benéfico sobre a inibição do desenvolvimento do câncer de cólon), efeitos anti-inflamatório e antioxidante (LAGARDA et al., 2006).

2.3.2.3 Surfactantes

a) Generalidades

Surfactantes são compostos de baixo a moderado peso molecular e possuem natureza anfifílica. São classificados de acordo com suas cabeças polares (MALMSTEN, 2002):

- Aniônicos: apresentam grupos sulfatos e fosfatos, apresentam como propriedades características a atividade superficial e a auto-estruturação; e são muito sensíveis particularmente a cátions bivalentes ou polivalentes;
- Catiônicos: apresentam grupos cabeça-polares contendo amina. Devido a isso, as propriedades dos surfactantes catiônicos (a atividade superficial ou a formação estrutural) são fortemente dependentes da concentração de sais e da valência dos ânions presentes. São utilizados como agentes antibacterianos, porém são irritantes ou até mesmo tóxicos, e têm seu uso limitado com relação aos outros tipos de surfactantes;
- Zwitteriônicos: apresentam o grupo cabeça iônico contendo uma amina quarternária e um grupo sulfônico ou carboxílico. Devido a sua natureza zwitteriônica, a carga do surfactante muda com o pH – catiônico em pH baixo, nula em pH intermediário e aniônico em pH alto. São menos irritantes e comumente utilizadas em produtos de higiene pessoal;
- Não-iônicos: são muito utilizados na liberação de fármacos. Particularmente, apresentam grupo cabeça polar contendo oligo-oxietileno e não apresentam carga elétrica, os quais se mostram pouco sensíveis aos sais, porém muito sensíveis a

temperatura; tais características utilizadas como um parâmetro de liberação de princípios ativos. São menos irritantes do que os surfactantes aniônicos e catiônicos.

b) *Série Tween*[®]

Tween[®] é o nome comercial dado aos surfactantes não-iônicos derivados do polioxietileno sorbitol, onde o número de grupos polioxietileno é constante (20), variando a composição da cadeia de hidrocarbonetos (R) (Figura 18). Há vários derivados como, por exemplo: Tween 20, derivado do ácido láurico (C_{12:0}); Tween 40, derivado do ácido palmítico (C_{16:0}); Tween 60, derivado do ácido esteárico (C_{18:0}); Tween 80, derivado do ácido oléico (C_{18:1}) (PRETÉ, 2000).

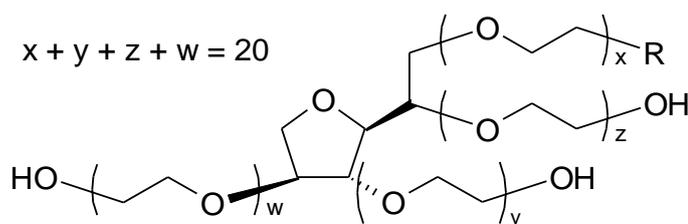


Figura 18. Estrutura base dos surfactantes da série Tween[®]

Tween 80 ou polisorbato 80 é um surfactante não-iônico polimérico, muito utilizado nas indústrias química, cosmética, ambiental, farmacêutica e de alimentos (PETER WUELFING et al., 2006). Produz emulsões de textura fina, boa estabilidade e é resistente a mudanças de pH e a concentrações consideráveis de eletrólito forte. Desse modo também funciona como um emulsificante ideal em estudos de absorção intestinal (DAHER, BAROODY e HOWLAND, 2003).

Daher, Baroody e Howland (2003) observaram que após a incorporação de Tween 80 na dieta de ratos, com doses de 1 ou 10% (m/m), aumentou a eficiência do sistema digestivo na absorção de lipídios, mas em concentrações altas (10 %, m/m) apresentou um efeito irritante ou tóxico no trato gastrointestinal.

Em lipossomas, sua utilização se deve a estabilidade física e química durante a produção e estocagem (XIA et al., 2007). Também permite avaliar as interações hidrofóbicas entre seus monômeros ou agregados e membranas, pois não estabelece ligações eletrostáticas

com os componentes dos lipossomas (PRETÉ, 2000).

2.3.3 Classificação dos lipossomas

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o seu tamanho e o número de bicamadas lipídicas que apresentam em sua constituição. Dois tipos de lipossomas são habitualmente os mais usados: as vesículas multilamelares (VML) ($> 0,5 \mu\text{m}$), e as vesículas unilamelares (VUL) pequenas (20-100 nm) ou grandes ($>100 \text{ nm}$) (JUSTO 2003; KHOSRAVI-DARANI et al., 2007). Porém, há outras estruturas menos usuais: vesícula de bicamada dupla (VDB) ($>100 \text{ nm}$), vesículas oligolamelares (VOL) (0,1-1,0 μm), vesículas multivesiculares (VMV) ($>1,0 \mu\text{m}$) e vesículas unilamelares gigantes (VUG) (MOZAFARI et al., 2008a), como podem ser visualizadas na Figura 19.

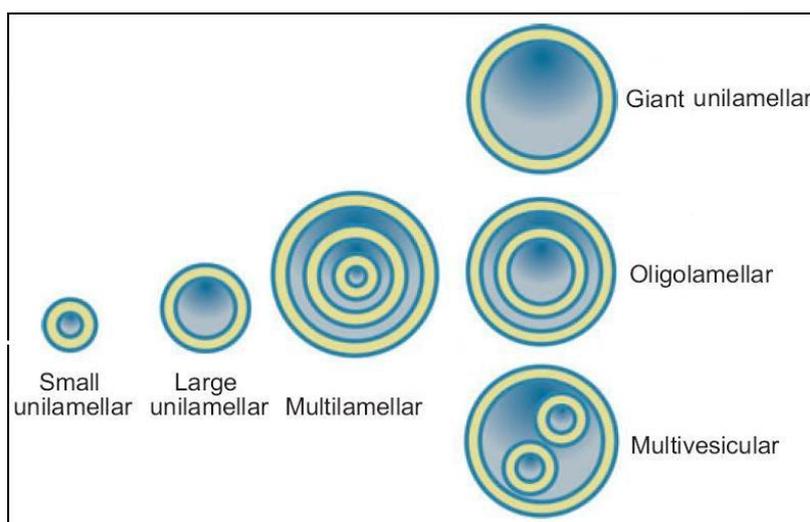


Figura 19. Representação esquemática das vesículas (JESORKA e OWAR et al., 2008).

As VML são formadas por camadas concêntricas de fosfolipídios e apresentam o compartimento aquoso reduzido, por isso são mais úteis para encapsular compostos lipofílicos. Quando estes lipossomas são submetidos à sonicação ou extrusão através de filtros ou membranas, formam-se as VUL. Em geral as VUL são mais adequadas para encapsular e transportar compostos hidrofílicos (JUSTO, 2003).

Foi reportado que VUL com tamanho de partícula médio de $\leq 1 \mu\text{m}$ são apropriados para uma eficiente absorção intestinal (MOZAFARI et al., 2008a).

2.3.4 Tipos de encapsulação

2.3.4.1 Encapsulação ativa

O composto a ser encapsulado é misturado aos lipossomas previamente preparados por encapsulação a um pH baixo e cujo meio externo tenha sido substituído por uma solução a pH mais elevado, estabelecendo um gradiente de prótons entre as fases aquosas (interna e externa) dos lipossomas. Neste tipo de encapsulação apenas compostos neutros podem atravessar a bicamada lipídica, enquanto compostos ionizados não têm esta capacidade. Havendo um excesso de prótons na fase aquosa interna, o composto encapsulado sofre ionização e não tem mais a capacidade de atravessar a bicamada lipídica, permanecendo no núcleo dos lipossomas (COSTA, 2000).

2.3.4.2 Encapsulação passiva

Esse tipo de encapsulação ocorre durante a formação dos lipossomas. Para compostos hidrofílicos, é realizado mediante a hidratação dos componentes lipídicos em uma solução aquosa do composto em estudo. A eficiência de encapsulação é determinada pela fração do composto incorporado e depende do volume aquoso retido no núcleo do lipossoma, que por sua vez depende do tamanho e do número de bicamadas. Para compostos lipofílicos, a encapsulação é feita dissolvendo o composto em estudo juntamente com os componentes lipídicos ao solvente orgânico desejado. A quantidade incorporada não deve afetar as interações hidrofóbicas das bicamadas lipídicas, as quais estão relacionadas à estabilidade do lipossoma (COSTA, 2000).

2.3.5 Métodos de produção

A produção dos lipossomas necessita do emprego de energia para a dispersão das moléculas de fosfolipídios no meio aquoso, porém o mecanismo para a formação dos lipossomas são basicamente interações hidrofílicas e hidrofóbicas entre os fosfolipídios e a água (KHOSRAVI-DARANI et al., 2007). Contudo, há muitas estratégias diferentes para preparação de nanolipossomas e um número de livros e *reviews* que relatam os detalhes dos métodos de produção estão disponíveis. A escolha correta do método de produção depende

dos seguintes parâmetros: das características físico-químicas do material a ser encapsulado e dos ingredientes lipossomais; da natureza do meio, no qual as vesículas lipídicas são dispersas; da concentração efetiva da substância encapsulada e da sua toxicidade potencial; os processos envolvidos durante a aplicação/liberação das vesículas; do tamanho ótimo, a polidispersividade, e da vida-de-prateleira das vesículas para aplicação pretendida; da reprodutibilidade por batelada, da possibilidade de produção segura em larga escala e da obtenção de produtos lipossomais eficientes (MOZAFARI et al., 2008b).

2.3.5.1 Extrusão em membranas de policarbonato

O conceito de extrusão foi inicialmente introduzido por Olson et al. (1979), que descreveram a passagem sequencial de uma suspensão diluída de lipossomas através de membranas de policarbonato de tamanho decrescente, utilizando uma seringa de mão e um suporte de filtro, a fim de produzir uma distribuição homogênea de tamanho. O processo foi desenvolvido posteriormente e realizado com melhor prática por Hope et al. (1985) pela construção de um extrusor robusto de metal que emprega pressões médias (5,52 MPa). Este processo representou um avanço na preparação rotineira de vesículas unilamelares (MUI, CHOW e HOPE, 2003).

Vesículas multilamelares formam-se espontaneamente quando as misturas de lipídios são hidratadas em excesso de água, as quais apresentam grandes diâmetros (0,5 a 10 μm), tamanho heterogêneo, múltiplos compartimentos internos, baixos volumes de encapsulação e má reprodutibilidade na produção que restringem sua aplicação prática (MUI, CHOU e HOPE, 2003).

Durante o processo de extrusão, as lamelas concêntricas das vesículas multilamelares comprimem-se dentro do poro da membrana, que sob pressão promovem a ruptura membranar e re-selagem subsequente, formando vesículas unilamelares. A consequência prática disto é que qualquer soluto encapsulado dentro do lipossoma irá vazar durante o ciclo de extrusão. Portanto, quando os solutos específicos estão para serem encapsulados, a extrusão é quase sempre realizada na presença do meio contendo a concentração final desejada de um soluto e o soluto externo (não encapsulado) é removido ao final do processo. No final da extrusão apresentam-se vesículas ovais ou oblongas devido à força osmótica que

as impedem de ser esféricas, ou seja, a um estado termodinamicamente mais baixo de energia. Portanto, na presença de soluto impermeáveis e semipermeáveis produzem vesículas deformadas, enquanto que as vesículas formadas com água pura são esféricas (MUI, CHOW e HOPE, 2003; VALENZUELA, 2007), como pode ser visualizado na Figura 20.

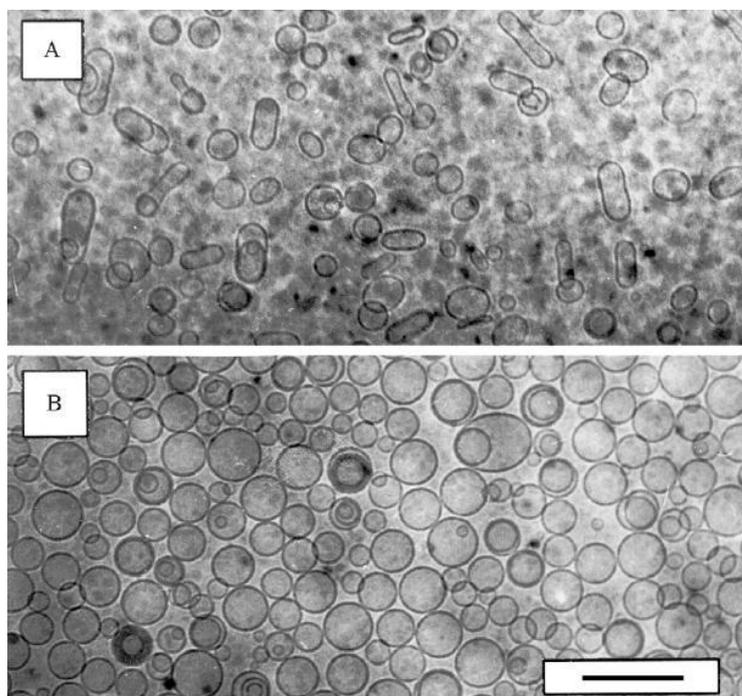


Figura 20. Microscopia crioeletrônica das vesículas extrusadas de fosfatidilcolina-colesterol (55:45 razão molar) feitas em (A) 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4 ou (B) água destilada. Barra de escala: 200 nm. (Fonte: MUI, CHOW e HOPE, 2003).

A conveniência e velocidade da extrusão tornaram-se as maiores vantagens sobre outras técnicas. A extrusão pode ser aplicada a uma ampla variedade de tipos de lipídios e misturas, sem a necessidade de redução sequencial de VML para VUL, não apresentando solventes orgânicos ou detergentes residuais nas preparações finais. O tempo de processo é da ordem de minutos e apresentam elevadas eficiências de encapsulação (> 30%), apenas limita-se pela concentração lipídica comparada com outros métodos (MUI, CHOW e HOPE, 2003; VALENZUELA, 2007).

Os lipossomas preparados pela extrusão oferecem certas propriedades desejáveis, tais como estabilidade a longo prazo e resposta controlada ao meio. Os lipossomas tendem a possuir uma forma mais elíptica alongada do que esférica, um ponto importante a ser considerado especialmente para o trabalho experimental onde a quantificação é necessária (VALENZUELA, 2007).

Os equipamentos disponíveis para extrusão de bancada (0,1 a 10 mL), pré-clínico (10 mL a 1 L) e clínico (> 1 L) são de baixo custo, especialmente a nível de pesquisa e pré-clínica (MUI, CHOW e HOPE, 2003).

2.3.6 Métodos de purificação

Segundo Lasch, Weissing e Brandl (2003), a purificação dos lipossomas tem dois objetivos a serem alcançados:

- Remover o material de baixo peso molecular que não está encapsulado dentro do compartimento aquoso (compostos hidrofílicos) ou que escaparam da incorporação dentro da bicamada lipídica (compostos hidrofóbicos) dos lipossomas;
- Remover as micelas ou vesículas mistas de detergentes que impedem a formação dos lipossomas. Neste último caso, somente os monômeros são removidos.

Similarmente aos métodos de produção de lipossomas, os métodos de purificação são diversos e podem ser aplicados dependendo da viabilidade e do uso dos lipossomas, os quais podem ser purificados por coluna de filtração ou por centrifugação.

A coluna de filtração é, em essência, uma diafiltração sob a força da gravidade ou da diferença hidrostática entre o reservatório de solvente e o orifício de saída. Colunas Sephadex G-50 ou G-100 são normalmente utilizadas, mas Sepharose 2B-6B ou Sephacryl S2000-S1000 podem ser empregadas. Os lipossomas não penetram os espaços entre partículas. Em taxas de fluxo baixas e volumes de amostras apropriados, a separação dos lipossomas de substâncias de baixo peso molecular, incluindo monômeros de detergentes, é excelente. Os lipossomas eluem no volume morto. O pré-tratamento é necessário se utilizar colunas empacotadas com mais ou menos partículas inchadas de polissacarídeo reticulado no tampão apropriado na primeira vez. Quando a pré-saturação da coluna pelos lipídios é realizada com dispersões de lipossomas vazios, a coluna de filtração pode ser utilizada para separar os lipossomas dos compostos de baixo peso molecular ou proteolipossomas de resíduos de proteína livres ou detergente monomolecular de micelas mistas (LASCH, WEISSING e BRANDL, 2003).

2.3.7 Métodos de caracterização

As características químicas e físicas dos lipossomas determinam o seu comportamento *in vitro* e *in vivo*. Assim, a disponibilidade de métodos analíticos para estabelecer essas características é essencial e mesmo com um extenso trabalho nos últimos 30 anos sobre a caracterização dos lipossomas não há orientações formais quanto a isso. O controle de qualidade das dispersões lipossomais é complicado pela natureza supermolecular dos sistemas a serem analisados. Os vários componentes são mantidos associados pelas interações relativamente fracas para a sua formação de tamanho e lamelaridade desejados. Além disso, todas as análises químicas requerem a dissolução, a solubilização ou a extração dos componentes dos lipossomas, as quais podem ser completos, não seletivos, e permitem a análise e quantificação de cada componente. No Quadro 1 estão listadas várias características de controle de qualidade que podem ser avaliadas durante as diferentes fases do desenvolvimento do produto, até o produto final (ZUIDAM, VAN WINDEN e CROMMELIM, 2003).

Quadro 1. Ensaio de controle de qualidade das formulações lipossomais

Ensaio de caracterização básica	Metodologia
pH	pHmêtro
Osmolaridade	Osmomêtro
Volume encapsulado	Medida da fase aquosa intralipossomal
Concentração de fosfolipídio	Conteúdo de fósforo em lipídio (método modificado de Bartlett), CLAE, método enzimático
Perfil de fosfolipídio	CCD (combinada com o método modificado de Bartlett), CLAE
Perfil das cadeias de ácidos graxos	CG
Concentração de colesterol	Método enzimático, CLAE
Concentração de composto ativo	Variável em função do ativo
Solventes orgânicos e metais pesados residuais	RMN, CG, protocolos de farmacopéia
Razão composto ativo/fosfolipídio	Determinação das concentrações de composto ativo e fosfolipídio
[H] ⁺ ou gradiente de íon antes e depois do carregamento remoto	Indicadores fluorescentes, indicadores ESR, [³¹ P] RMN, [¹⁹ F] RMN, concentração de íon intralipossomal
Estabilidade química	
Hidrólise de fosfolipídios	CCDAE, CLAE
Concentração de ácido graxo não-esterificado	CLAE ou método enzimático
Autoxidação das cadeias de ácidos graxos	Dienos conjugados, peróxidos lipídicos, espécies reativas de TBA, composição de ácidos graxos por CG
Autoxidação do colesterol	CCD, CLAE
Degradação de antioxidante	CCD, CLAE
Degradação do composto ativo	Variável em função do ativo
Caracterização física	
Aparência	Protocolos da farmacopéia (inspeção visual)
Distribuição do tamanho das vesículas	Espalhamento da luz dinâmico, espalhamento da luz estático, microscopia, cromatografia por exclusão em gel, turbidimetria
<i>Faixa Submicrônica</i>	
<i>Faixa Micrônica</i>	Contador de Coulter, microscopia óptica, difração a laser, espalhamento da luz estático, obscuração da luz
Potencial da superfície elétrica e superfície de pH	Uso de sondas de campo elétrico ligada a membranas e sondas sensíveis ao pH
Potencial zeta	Mobilidade eletroforética
Comportamento termotrópico, fase de transição e fase de separação	Varredura diferencial de calorimetria, RMN, métodos fluorescentes, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, espectroscopia Raman, Espectroscopia de spin eletrônico, turbidez específica.
Percentual de substância livre	Cromatografia por exclusão em gel, cromatografia por troca iônica, precipitação por polieletrólito, (ultra)centrifugação
Ensaio microbiológicos	
Esterilidade	Protocolos da farmacopéia
Nível de endotoxina	Protocolos da farmacopéia

Fonte: Zuidam, van Winden e Crommelin (2003).

2.3.8 Interações dos lipossomas

2.3.8.1 Interações com surfactantes

Sistemas mistos de compostos anfifílicos de única (surfactantes) ou dupla cadeia (fosfolipídios) são muito conhecidos por sofrerem uma transformação de vesículas para micelas. Quando a fração molar do surfactante é aumentada gradualmente, há a coexistência de vesículas e micelas (FADDA et al., 1998). Estas interações podem resultar na fusão membranar e nas conversões mútuas de vesícula-micela (FADDA et al., 1998).

A interação de um surfactante com lipossomas ocorre em três etapas principais, em função do aumento da concentração de surfactante (FADDA et al., 1998; CHERN, CHIU e YANG, 2006): (a) a incorporação dos monômeros dos surfactantes nas bicamadas lipídicas; (b) a coexistência de lipossomas e micelas mistas, em virtude da solubilização de algumas bicamadas lipídicas; (c) a solubilização completa apresentando somente micelas mistas.

2.3.8.2 Interações com compostos fenólicos

Segundo Nakayama et al. (1998) os ésteres de ácido caféico (fenetil-, etil-, e metiléster) e os ésteres de ácido gálico (lauril-, propil-, e metiléster) apresentam afinidade a bicamada lipídica dos lipossomas, enquanto os seus respectivos ácidos fenólicos não são incorporados nas bicamadas lipídicas.

Os flavonóides interagem com as membranas de acordo com a sua estrutura química; e dentre as suas subclasses as flavonas e flavanonas são mais hidrofóbicas do que os flavanóis e flavonóis, entretanto no mesmo grau de hidroxilação as flavonas são mais hidrofóbicas do que as flavanonas (OTEIZA et al., 2000). Surpreendentemente a glicosilação da naringenina e do eriodictiol aumentaram sua afinidade pelas bicamadas lipídicas dos lipossomas (BHENDRICH, 2006).

Kajiya et al. (2001) compararam as afinidades pelas bicamadas lipídicas, entre quatro flavonóis que se diferenciam pelo grau de hidroxilação no anel B: galangina, campferol, quercetina e miricetina (Figura 21). Seus resultados demonstraram que o número de hidroxilas no anel B apresentou uma correlação com a hidrofilicidade dos flavonóis: galangina < campferol < quercetina < miricetina.

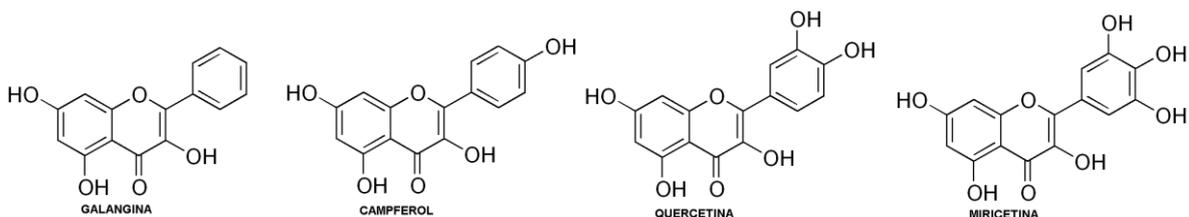


Figura 21. Estruturas químicas dos flavonóis estudados por Kajjya et al. (2001)

Kato et al. (2003) ao estudar as interações entre as isoflavonas e as bicamadas lipídicas, postularam que o grupo hidroxila na posição C-5 do anel A apresenta um papel “reforçador” na hidrofobicidade, pois este grupo hidroxila forma um quarto anel aromático de seis membros na estrutura das isoflavonas, podendo ser transferido para a estrutura dos flavonóis (Figura 22).

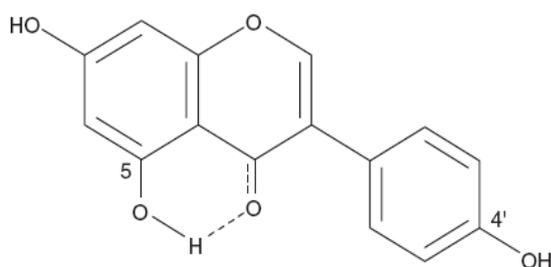


Figura 22. Genisteína e o quarto anel aromático de seis membros (NAKAYAMA et al., 2006).

Nakayama et al. (2006) compararam as afinidades dos flavanóis do tipo *cis* (epicatequinas) e *trans* (catequinas) em bicamadas lipídicas, e seus resultados demonstraram que os flavanóis do tipo *cis* apresentaram maior afinidade com relação aos seus correspondentes *trans*. Distintamente de outros compostos fenólicos, os flavanóis não apresentaram comportamento linear, mas comportamento convexo. Seus resultados indicaram que a epicatequina galato tem maior afinidade do que a epigalocatequina galato e a epicatequina tem maior afinidade do que a epigalocatequina; demonstrando que os três grupos hidroxilas presentes na epigalocatequina galato e epigalocatequina diminuem sua hidrofobicidade e conseqüentemente sua afinidade a bicamada lipídica em comparação as outras moléculas, que possuem apenas dois grupos hidroxilas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PRODUÇÃO DE NANOLIPOSSOMAS

Nesta primeira etapa, a produção de nanolipossomas vazios tornou-se a alternativa mais viável, devido os compostos fenólicos hidrofílicos não interagirem com as bicamadas dos lipossomas, estando apenas encapsulados no compartimento aquoso.

3.1.1 Planejamento experimental de misturas restringidas

A escolha dos lipídios foi baseada nas propriedades bioquímicas e biofísicas na literatura. Utilizou-se um delineamento experimental de misturas restringidas para avaliar a influência da variação da fração mássica dos componentes dos lipossomas a uma ampla faixa, uma vez que há muitos fosfolipídios (sintético ou natural), esteróis (origem animal ou vegetal) e agentes estabilizantes (surfactante não-iônico, etc.). Os componentes escolhidos foram fosfatidilcolina de soja 95% Phospholipon[®] 85G (Natterman Phospholipid), Tween 80 (Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate) (Mapric, São Paulo, Brasil); e o tipo de esterol: colesterol (Isifar, São Paulo, Brasil) e β -sitosterol (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, CA).

Nas Tabelas 2 e 3 são apresentados, respectivamente, os domínios experimentais utilizados e o planejamento experimental de misturas restringidas, gerado através do programa STATISTICA 7.0, onde a somatória dos três componentes corresponde a 1, com uma concentração final de 10 mg/mL baseado em Olson et al (1979).

Tabela 2. Domínios experimentais para o planejamento de misturas restringidas

Componentes	Valor mínimo	Valor máximo
Fostatidilcolina de soja (x_1)	0,645	0,800
Esterol (x_2)	0,195	0,350
Tween 80 (x_3)	0,000	0,005

Tabela 3. Planejamento experimental de misturas restringidas com variáveis codificadas

Componentes			Tipo de Esterol	
x_1	x_2	$x_3^{\text{®}}$	Colesterol	β-sitosterol
0,8000	0,2000	-	1	A
0,7250	0,2750	-	2	B
0,6500	0,3500	-	3	C
0,8000	0,1950	0,0050	4	D
0,7225	0,2725	0,0050	5	E
0,6450	0,3500	0,0050	6	F
0,8000	0,1975	0,0025	7	G
0,7238	0,2738	0,0025	8	H
0,6475	0,3500	0,0025	9	I

Na representação do ajuste dos valores de respostas, que são o diâmetro médio e índice de polidispersão dos lipossomas, utilizou-se as equações linear (Equação 2) e quadrática (Equação 3) em termos dos componentes. A significância estatística das equações foi feita através da análise de variância, a nível de 5% de significância.

$$\hat{y} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\hat{y} = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_1b_2x_1x_2 + b_1b_3x_1x_3 + b_2b_3x_2x_3 \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde:

\hat{y} : Estimativa da resposta de diâmetro médio e índice de polidispersão

b : Coeficientes da equação

x : Proporção dos componentes

3.1.2 Método de produção

De acordo com o planejamento apresentado na Tabela 3, foi realizada a pesagem dos lipídios (fosfatidilcolina e estero) em tubos de ensaio. Em seguida os lipídios foram solubilizados em 1 mL de clorofórmio, contendo porcentagens diferentes de Tween 80 (0, 0,25 e 0,5%). Após esta etapa, o solvente foi evaporado em fluxo de nitrogênio e obteve-se um filme lipídico que permaneceu no dessecador durante 24 h para a evaporação completa do solvente.

Os filmes lipídicos foram hidratados com 1 mL de solução tampão fosfato pH 6,0 (75 mM), e em seguida foram mantidos sob aquecimento acima da temperatura de transição de fases do lipídio em maior porcentagem (60°C) durante 1 h, com agitação mecânica por 10 s em intervalos de 10 min. Na sequência, os lipossomas multilamelares formados foram submetidos a banho ultra-som Fisher Scientific FS20 (70 W, 42 KHz), por 1 min.

Os lipossomas multilamelares passaram pelo extrusor Liposofast Avestin (Ottawa, Canadá) em membranas de policarbonato de 200 nm, durante 21 passes, sob aquecimento contínuo. Após a extrusão, as amostras foram transferidas para tubos *ependorf* e nitrogenados para a posterior caracterização física.

3.1.3 Caracterização física dos lipossomas

A caracterização física dos lipossomas foi realizada no equipamento analisador de tamanho de partícula N5 Submicron (Miami, Estados Unidos) no qual se obteve a distribuição de tamanho dos lipossomas. O aparelho utiliza o espalhamento de luz dinâmico. Nestes experimentos, o diâmetro médio é determinado a partir do coeficiente de difusão (D) das vesículas, as quais se movem ao acaso, devido ao movimento Browniano. O coeficiente de difusão das vesículas é calculado a partir da flutuação da intensidade da luz espalhada, expressa através do decaimento da função de correlação:

$$g(\tau) = 1 + e^{(-2Dq^2\tau)} \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde:

$g(\tau)$ é função de auto-correlação temporal;

D é o coeficiente de difusão das partículas;

q é o modulo do vetor de espalhamento

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \text{sen} \frac{\theta}{2} \quad \text{Eq. (5)}$$

Onde:

λ é o comprimento de onda da radiação

θ é o ângulo da luz coletada em relação ao feixe incidente.

A intensidade de luz espalhada é modulada através do Browniano das vesículas que se difundem resultando na ampliação da largura da linha do laser (efeito Doppler). Pelo exame da amplitude espectral da luz espalhada, o tamanho da vesícula pode ser calculado.

O raio hidrodinâmico pode ser obtido pela equação de Stokes-Einstein (Equação 6):

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_h} \quad \text{Eq. (6)}$$

Onde:

K_B é a constante de Boltzmann

T é a temperatura em K

η é a viscosidade do solvente

R_h é o raio hidrodinâmico

Na leitura dos diâmetros médios dos lipossomas e dos índices de polidispersão da distribuição de tamanho, as amostras foram diluídas em água ultra-pura (18 mΩ) para evitar interações inter-particulares. As leituras foram feitas na faixa de 10 a 1000 nm, considerando

a viscosidade da água a 25°C e o ângulo de leitura do espalhamento a 90°. Todas as leituras foram realizadas em pentaplicata.

3.2 AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE FÍSICA

A avaliação de estabilidade física consistiu em acompanhar a evolução do diâmetro médio e do índice de polidispersão dos diferentes lipossomas em duas temperaturas (10°C e 25°C) durante 30 dias em atmosfera nitrogenada, utilizando as mesmas condições de leitura.

3.3 ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os lipossomas mais estáveis foram refeitos para uma concentração final de 0,1% (p/v) de três soluções: (a) solução de ácido vanílico com ácido ferrúlico (1:1); (b) solução de (+)-catequina com rutina (1:1); e (c) solução de extrato purificado de açaí (28,8 mg/g de antocianinas totais, 42,2 mgEqAG/g).

3.4 PURIFICAÇÃO DOS NANOLIPOSSOMAS

A construção da coluna foi realizada a partir da lavagem e hidratação da resina Sephadex G-25 em água ultra-pura durante 24 h. A etapa subsequente foi uma desaeração por sistema de vácuo durante 1h e o posterior empacotamento em coluna de vidro de 27,5 cm x 1,3 cm, deixando-a em repouso por 48h até o completo empacotamento. A coluna foi acondicionada a 4°C para evitar o crescimento microbiano.

Foi realizado um teste preliminar com duas soluções de corantes: Blue Dextran (Sigma-Aldrich®) e Azul de metileno, ambas a 1 mg/mL, que irão simular a eluição dos lipossomas e dos compostos fenólicos, respectivamente. Para o acondicionamento da coluna utilizou-se 20 mL de tampão fosfato 75 mM pH 6,0, no carregamento adicionou-se 1 mL de solução de Blue Dextran; e a eluição foi realizada com 19 mL da mesma solução tampão. Cada fração coletada correspondia a um volume de 1,5 mL em cada tubo de ensaio. Realizou-se a posterior leitura em espectrofotômetro a 663 nm para obtenção da curva normal de separação da coluna. Realizou-se uma eluição nas mesmas condições operacionais para a

solução de Azul de metileno. Ao final da purificação, a coluna foi acondicionada a 4°C.

3.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA

Quando um campo elétrico é aplicado através de um eletrólito, as partículas carregadas suspensas no eletrólito são atraídas para o eletrodo de carga oposta. As forças viscosas que atuam sobre as partículas tende a se contrapor a este movimento. Quando um equilíbrio é estabelecido entre estas duas forças opostas, as partículas movem-se com velocidade constante. Por sua vez, a velocidade da partícula é dependente da força do campo elétrico ou gradiente de voltagem, do potencial zeta, da constante dielétrica e da viscosidade do meio.

A mobilidade eletroforética é a velocidade de uma partícula em um campo elétrico, utilizando o laser Doppler. Com este conhecimento pode-se obter o potencial zeta da partícula aplicando-se a equação de Henry (Equação 7):

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(Ka)}{3\eta} \quad \text{Eq. (7)}$$

Onde:

z: Potencial zeta

U_E : Mobilidade eletroforética

ε : Constante dielétrica

η : Viscosidade

$f(Ka)$: Função de Henry

O potencial zeta foi medido com a mobilidade eletroforética com laser Doppler utilizando o Zetasizer 2000 (Malvern, Reino Unido), a 25 °C. Todas as leituras foram realizadas em duplicata. Este parâmetro foi utilizado na caracterização física dos lipossomas que apresentam estabilidade física, como mencionado no item anterior.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos a um teste de Tukey ($p < 0,05$) e à uma modelagem matemática das misturas, análise de variância e teste de Pareto referentes ao 1º dia.

Somente as amostras que apresentaram instabilidade no decorrer dos 30 dias foram submetidas à modelagem matemática de acordo com modelo logístico de quatro parâmetros visto na Equação 8.

$$D(nm) = \frac{D_{min} - D_{máx}}{1 + \left(\frac{t}{t_{estável}}\right)^{\frac{dD}{dt}}} + D_{máx} \quad \text{ou} \quad IP = \frac{IP_{min} - IP_{máx}}{1 + \left(\frac{t}{t_{estável}}\right)^{\frac{dIP}{dt}}} + IP_{máx} \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde:

D_{min} ou IP_{min} : Assíntota mínima

dD/dt ou dIP/dt : Hill slope relacionada a aglomeração das vesículas

$t_{estável}$: ponto de inflexão relacionada ao tempo de estabilidade física

$D_{máx}$ ou $IP_{máx}$: Assíntota máxima

Foi aplicada nos lipossomas estáveis, a análise de variância a dois fatores e teste de Tukey ($p < 0,05$) sobre a encapsulação com a finalidade de avaliar a influência da modificação da família de compostos fenólicos e do tipo de esterol sobre as características físicas (diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE FÍSICA

4.1.1 Tamanho médio e índice de polidispersão

Neste primeiro momento buscou-se avaliar estabilidade dos lipossomas sem a presença dos compostos fenólicos alterando-se apenas a composição lipídica por um planejamento de misturas restringidas, mantendo-se constantes alguns fatores sob controle como: fatores do processo de extrusão (temperatura, tipo de equipamento, tamanho do poro da membrana de policarbonato), o pH e a força iônica do meio de dispersão e as condições de armazenamento. Como relatado por Heurtault et al. (2003), a avaliação do tamanho foi utilizada como ferramenta de caracterização, pois uma série de fatores influenciaram o diâmetro dos lipossomas e sua distribuição de tamanho. Segundo Ding et al. (2009), a distribuição de tamanho é normalmente expressa como um índice de distribuição do tamanho da partícula, ou seja, quanto menor for o valor do índice, a distribuição será mais estreita, e assim, as vesículas apresentam maior uniformidade no diâmetro. O espalhamento dinâmico da luz ou a espectroscopia de correlação de fótons é a técnica mais apropriada por ser uma técnica não-destrutiva e caracterizar no ambiente utilizado, porém não indica sua morfologia.

Com a hidratação do filme lipídico houve a formação de lipossomas multilamelares. Ao submeter ao processo de extrusão promoveu-se a redução da lamelaridade e a uniformização do tamanho médio e da distribuição de tamanho, tal mudança estrutural promove mudanças quanto à encapsulação de compostos hidrofílicos e estabilidade física (MUI, CHOW e HOPE, 2003; JESORKA e OWAR, 2008).

A Tabela 4 apresenta os valores de diâmetro médio e de índice de polidispersão respectivos ao 1º dia da avaliação de estabilidade física de acordo com o delineamento experimental de misturas restringidas citado na Tabela 3 (p. 44).

As misturas na ausência de Tween 80 apresentaram valores de diâmetro médio próximos ao diâmetro do poro da membrana de policarbonato utilizada (200 nm); apresentaram valores índices de polidispersão abaixo de 0,2, ou seja, as populações de lipossomas provenientes destas misturas são monodispersas (distribuição de tamanho mais estreita). Não apresentaram diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre as respectivas misturas (colesterol/ β -sitosterol), como pode ser visualizada pelos

índices alfabéticos.

Tabela 4. Valores do diâmetro médio e do índice de polidispersão do delineamento experimental de misturas para as diferentes misturas de fosfatidilcolina, Tween 80 e colesterol ou β -sitosterol correspondentes ao 1º dia de estabilidade.

<i>Composição</i>			<i>Diâmetro médio (nm)</i>		<i>Índice de polidispersão</i>	
<i>x₁</i>	<i>x₂</i>	<i>x₃</i>	<i>Colesterol</i>	<i>β-sitosterol</i>	<i>Colesterol</i>	<i>β-sitosterol</i>
0,8000	0,2000	0	209,2 ^{ef} ± 2,5	207,2 ^{ef} ± 23,1	0,169 ^{abc} ± 0,026	0,193 ^{abcd} ± 0,023
0,7250	0,2750	0	206,8 ^{ef} ± 10,3	189,3 ^{cdef} ± 28,4	0,151 ^{ab} ± 0,018	0,155 ^{abc} ± 0,050
0,6500	0,3500	0	212,3 ^f ± 12,2	195,4 ^{def} ± 2,7	0,164 ^{abc} ± 0,030	0,128 ^a ± 0,023
0,8000	0,1950	0,0050	161,1 ^{bcd} ± 10,4	151,2 ^{ab} ± 4,2	0,270 ^{abcd} ± 0,063	0,431 ^{ef} ± 0,080
0,7225	0,2725	0,0050	141,1 ^{ab} ± 0,5	164,2 ^{bcd} ± 1,3	0,295 ^{bcd} ± 0,000	0,336 ^{def} ± 0,012
0,6450	0,3500	0,0050	155,2 ^{bc} ± 6,6	115,9 ^a ± 2,1	0,305 ^{cde} ± 0,035	0,484 ^f ± 0,048
0,8000	0,1975	0,0025	207,8 ^{ef} ± 12,9	151,7 ^{abc} ± 7,5	0,287 ^{bcd} ± 0,028	0,271 ^{abcd} ± 0,125
0,7238	0,2738	0,0025	189,2 ^{cdef} ± 4,2	153,2 ^{abc} ± 4,6	0,223 ^{abcd} ± 0,022	0,257 ^{abcd} ± 0,060
0,6475	0,3500	0,0025	171,8 ^{bcd} ± 25,6	150,6 ^{abc} ± 4,5	0,179 ^{abc} ± 0,023	0,207 ^{abcd} ± 0,035

x₁: Fosfatidilcolina de soja; *x₂*: Colesterol ou β -sitosterol; *x₃*: Tween 80.

Letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A presença de surfactantes não-iônicos em sua composição promove a repulsão estérica devido ao revestimento das cadeias de polioxietileno das superfícies interna e externa da bicamada da vesícula, entretanto houve um aumento gradativo do percentual de Tween 80 que influenciou significativamente sobre a diminuição do diâmetro médio e o aumento do índice de polidispersão.

A redução do diâmetro médio ocorreu devido ao aumento da curvatura da vesícula, pois na superfície externa há um maior número de cadeias de polioxietileno na superfície externa da bicamada, que permitem o aumento da curvatura da vesícula, em contrapartida, há um menor número de cadeias expostas na superfície interna promovendo efeito contrário, como mencionado por Xia e Xiu (2005), Fan et al., (2007), e Ding et al. (2009). Enquanto para o aumento da polidispersão pode está relacionado com pouca interação nestas composições entre as moléculas de fosfatidilcolina, β -sitosterol e Tween 80, por apresentarem ligações duplas em suas estruturas: fosfolípido rico em ácidos graxos insaturados ($C_{18:1}$, $C_{18:2}$, $C_{18:3}$) e surfactante não-iônico que contém cadeia acila similar ao ácido oléico ($C_{18:1}$) e a cadeia lateral do β -sitosterol; outra suposição seja pelo fato de que os esteróis tendam a aumentar a rigidez das membranas (VEMURI e RHODES, 1995), enquanto os surfactantes apresentam efeito antagônico, ou seja, aumentam a fluidez das membranas.

Os lipossomas contendo 0,5% de Tween 80 apresentaram valores de diâmetro médio

entre 115 a 165 nm, contudo são considerados polidispersos por terem apresentado valores de índice de polidispersão acima de 0,27. Não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os seus respectivos diâmetros médios e índices de polidispersão, com exceção das misturas contendo 64,5% de fosfatidilcolina de soja e 35% de esterol. Este percentual permitiu diminuir significativamente o diâmetro médio dos lipossomas em relação a sua ausência, porém não foi significativa para mistura contendo 72,25% de fosfatidilcolina, 27,25% de β -sitosterol e 0,5% de Tween 80 e para a mistura contendo 72,5% de fosfatidilcolina e 27,5% de β -sitosterol.

As misturas contendo 0,25% de Tween 80 apenas apresentaram faixa de valores de diâmetro médio e de índice de polidispersão intermediários, indicando que esta concentração é suficiente para redução de diâmetro, porém não significativa, enquanto que uma redução significativa é registrada nas misturas com colesterol quando o Tween 80 é adicionado na maior concentração (0,5%).

Aplicou-se a análise de variância para avaliar o ajuste a modelos linear ou quadrático para os valores de diâmetro médio e de índice de polidispersão para o colesterol e o β -sitosterol (Tabelas 5 e 6, respectivamente), referente ao 1º dia (Tabela 4). Pôde ser verificado que o ajuste com o modelo linear mostrou-se significativo ($p < 0,05$) e foi verificado que não houve falta de ajuste, no entanto, o modelo quadrático não se mostrou significativo.

Tabela 5. Análise de variância do modelo linear dos valores de diâmetro médio e de índice de polidispersão para as misturas contendo colesterol

	<i>Diâmetro médio (nm)</i>					<i>Índice de polidispersão</i>				
	S.Q^a	G.L^b	M.Q^c	F^d	p	S.Q^a	G.L^b	M.Q^c	F^d	p
Regressão	5127,5	2	563,7	4,22	0,000	0,026	2	0,013	5,08	0,002
Erro Total	846,9	8	105,9			0,007	8	0,001		
Falta de ajuste	814,5	6	35,8	8,37	0,111	0,006	6	0,001	1,95	0,377
Erro puro	32,5	2	16,2			0,001	2	0,000		
Total Ajustado	5974,5	10	597,4			0,033	10	0,003		

^asoma quadrática; ^bgraus de liberdade; ^cmédia quadrática; ^dteste de Fischer

Tabela 6. Análise de variância do Modelo linear dos valores de diâmetro médio e de índice de polidispersão para as misturas contendo β -sitosterol.

	<i>Diâmetro médio (nm)</i>					<i>Índice de polidispersão</i>				
	S.Q ^a	G.L ^b	M.Q ^c	F ^d	p	S.Q ^a	G.L ^b	M.Q ^c	F ^d	p
Regressão	4744,1	2	2372,0	10,24	0,006	0,101	2	0,050	13,61	0,003
Erro Total	1853,1	8	231,6			0,030	8	0,004		
Falta de ajuste	1811,4	6	301,9	14,51	0,066	0,019	6	0,003	0,636	0,718
Erro puro	41,6	2	20,8			0,010	2	0,005		
Total Ajustado	6597,1	10	659,7			0,130	10	0,013		

^asoma quadrática; ^bgraus de liberdade; ^cmédia quadrática; ^dteste de Fischer

Os valores dos coeficientes da regressão linear (Equação 2) para representação as respostas, assim como os seus erros padrão, nos lipossomas com distintos esteróis, estão nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Valores dos coeficientes do modelo linear para o diâmetro médio e índice de polidispersão para os lipossomas contendo colesterol

	<i>Diâmetro médio (nm)</i>			<i>Índice de polidispersão</i>		
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3
Coefficiente	220,07	206,44	-1610,94	0,175	0,148	4,272
Erro padrão	6,83	6,83	264,65	0,019	0,019	0,751

$R^2_{\text{diâmetro médio}} = 0,8582$; $R^2_{\text{índice de polidispersão}} = 0,7903$.

Tabela 8. Valores dos coeficientes do modelo linear para o diâmetro médio e índice de polidispersão para os lipossomas contendo β -sitosterol

	<i>Diâmetro médio (nm)</i>			<i>Índice de polidispersão</i>		
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3
Coefficiente	198,37	180,26	-1523,37	0,153	0,127	8,396
Erro padrão	10,11	10,11	391,47	0,040	0,040	1,565

$R^2_{\text{diâmetro médio}} = 0,7191$; $R^2_{\text{índice de polidispersão}} = 0,7729$.

Analisando os coeficientes da regressão linear das Tabelas 7 e 8, verificou-se que o diâmetro médio aumentou com a proporção de fosfatidilcolina (x_1) e que o Tween 80 (x_3) apresentou um efeito negativo, porém de pouco impacto, em virtude de os domínios experimentais utilizados (0 a 0,5%). Esses resultados mostram que a fosfatidilcolina é o componente que está diretamente relacionado à formação dos lipossomas. Ao se comparar a hierarquização dos componentes que influenciam as respostas a partir de um gráfico de Pareto (Anexo 1, p. 65), o fosfolípido apresenta o maior impacto, seguido pelos esteróis e por último, o surfactante não-iônico.

Ao analisar o índice de polidispersão verificou-se que a heterogeneidade das vesículas dos lipossomas sofre efeito positivo dos três componentes, ou seja, tende a tornar as

populações polidispersas. Ao se hierarquizar as variáveis pelo teste de Pareto (Anexo 1, p. 65), o Tween 80 (x_3) apresentou-se como mais influente mesmo em proporções relativamente baixas (máximo de 0,5%) em misturas com β -sitosterol seguido fosfolípido e esterol, entretanto, em misturas de colesterol mostrou-se o menos influente.

Seguindo com a avaliação da estabilidade dos lipossomas não foi realizado o tratamento estatístico aplicado no 1º dia, pois nenhum modelo (linear ou quadrático) se ajustou significativamente ($p < 0,05$) nos demais dias, aplicando-se apenas observações qualitativas para o 4º, 7º, 14º e 30º dia.

No 4º dia de avaliação não houve alterações significativas nos parâmetros estudados. Deve-se ressaltar que os lipossomas foram produzidos por extrusão em um sistema tamponado e como consequência possuíam formas oblongas devido à força osmótica que os impediam de serem totalmente esféricos, tal qual observado por Mui, Chow e Hope (2003) e Valenzuela (2007) e também os cálculos de diâmetro pelo software são efetuados considerando-se os lipossomas como partículas esféricas, como dito por Heurtault et al. (2003). Porém houve um ligeiro aumento nos valores de índice de polidispersão, para as misturas de β -sitosterol mostrando uma instabilidade incipiente.

No 7º dia, as misturas contendo colesterol mantiveram-se sem alteração física significativa. Entretanto, dentre as misturas de β -sitosterol, somente a mistura contendo 80% de fosfatidilcolina e 20% de esterol apresentou um aumento vertiginoso de suas características físicas: 601,1 nm e 0,85 de diâmetro e índice de polidispersão, respectivamente. Isto indica uma alta instabilidade do sistema, associada à aglomeração das vesículas e promovendo o alargamento da distribuição dos diâmetros das vesículas. Os lipossomas apresentavam um alto percentual de fosfatidilcolina e não continha surfactante não-iônico em sua composição, assim sendo, pode-se relacionar a uma informação recorrente nos artigos indica que tal fosfolípido apresenta carga elétrica nula que propicia uma alta instabilidade, caso fosse constituído exclusivamente de fosfolípido. Além disso, a fosfatidilcolina de soja utilizada apresenta 95% de pureza e os 5% restantes são lipídios (fosfatidiletalona, ácido fosfatídico e fosfatidilinositol) que apresentam carga negativa (HUANG et al., 2011). O percentual de β -sitosterol promoveu a repulsão eletrostática, porém não de forma eficiente a evitar as colisões promovidas pelo movimento Browniano e que ocasionou na aglomeração dos lipossomas. Com um elevado índice de polidispersão, o sistema é considerado altamente polidisperso.

A aglomeração ou floculação é considerada um processo reversível, originário das interações de van der Waals, com a finalidade de dissipar o excesso de energia que foi requerido para evitar o favorecimento termodinâmico do empacotamento dos lipossomas. Para reverter tal situação pode-se aplicar forças de cisalhamento brandas, pela mudança de temperatura, ou mesmo da quelação de íons metálicos que inicialmente induziram tal fenômeno (HEURTAULT et al., 2003).

No 14º dia, os lipossomas tornaram-se totalmente instáveis nas misturas com ausência de Tween 80 que continham β -sitosterol, apresentando os valores máximos de diâmetro médio (1000 nm) e de índice de polidispersão (1,0), enquanto os lipossomas de colesterol mantiveram-se estáveis, estando de acordo com Hąc-wydro et al. (2007), as misturas contendo fosfolipídio-colesterol apresentam interações fortes enquanto as misturas contendo fosfolipídio-fitosterol são consideradas fracas. Não se pôde ratificar que tais valores permaneceram constantes devido à limitação de leitura do equipamento (leitura máxima de 1000 nm), mas presume-se que as vesículas sofreram danos à estrutura em virtude da aglomeração vesicular e fusão das membranas.

De acordo com Heurtault et al. (2003), a fusão de membranas é considerado um processo irreversível porque a estrutura primordial do lipossoma foi perdida e houve a formação de nova organização dos lipídios em novas estruturas (micelas), as quais atingiram escala micrométrica ($>1 \mu\text{m}$) que pôde ser observada a olho nu a configuração característica. As demais misturas que continham Tween 80 em sua composição mantiveram-se estáveis, graças à repulsão promovida pelas cadeias de acila de surfactante não-iônico.

No 30º dia, as misturas mantiveram o mesmo comportamento do 14º dia, com exceção da única mistura de colesterol (80% de fosfatidilcolina e 20% de esterol) que apresentou instabilidade física atingindo os valores máximos dos parâmetros analisados (998,7 nm e 1,0).

Observando globalmente diante dos valores mínimos e máximos das misturas que apresentaram estabilidade, pôde-se perceber que geralmente os lipossomas que apresentaram menor diâmetro médio e o maior índice polidispersão eram provenientes das misturas que continham 0,5% de Tween 80 (Anexo 2 e 3, p. 66 e 67).

Diante da presente avaliação atentou-se para as misturas que continham 0,25% de Tween 80, as quais apresentaram estabilidade física com menor variação de diâmetro médio e

de índice de polidispersão.

4.1.2 Modelagem matemática da cinética de estabilidade física

O modelo sigmoidal proposto conseguiu descrever a estabilidade física e os fenômenos de aglomeração e fusão dos lipossomas para todas as misturas instáveis. Este modelo descreve as fases observadas do experimento: (a) estabilidade até o ponto de inflexão; (b) a aglomeração das vesículas e (c) fusão das membranas dos lipossomas.

Os coeficientes de correlação obtidos mostram que as equações apresentaram um bom ajuste, indicando que elas podem ser usadas para fins preditivos. Tais parâmetros obtidos podem ser visualizados na Tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros obtidos pela modelagem matemática dos lipossomas instáveis.

<i>Mistura</i>	<i>Diâmetro médio</i>					<i>Índice de polidispersão</i>				
	D_{\min} (nm)	dD/dt (nm/dia)	$t_{\text{estável}}$ (dia)	D_{\max} (nm)	r	IP_{\min}	dIP/dt (dia ⁻¹)	$t_{\text{estável}}$ (dia)	IP_{\max} (nm)	r
2	214,7	233,97	15,52	998,7	0,9998	0,152	28,84	15,75	1	0,9998
A	211,1	5,81	7,04	1007	0,9998	0,193	5,42	5,73	1	0,9999
B	165,1	33,56	7,63	1000	0,9996	0,163	17,81	8,51	1	0,9996
C	204,6	18,82	8,59	1000	0,9999	0,147	10,11	8,29	1	0,9998

O tempo de estabilidade ($t_{\text{estável}}$) dado pelo ponto de inflexão do modelo matemático mostrou que os diâmetros médios das misturas que continham β -sitosterol (A, B e C) alcançaram sua instabilidade entre o 7º e o 9º dia, enquanto a mistura de colesterol (mistura 2) alcançou a instabilidade entre o 15º e 16º dia.

Considerando o mesmo parâmetro para os índices de polidispersão, pode-se observar uma analogia com o tempo de estabilidade das misturas 2, B e C, contudo verificou-se que o ponto de inflexão encontrado para a mistura A era menor do que o encontrado para o respectivo diâmetro médio, ou seja, tal amostra começou a se desestabilizar próximo do 6º dia.

Então se pode inferir que na ausência de surfactante não-iônico, os lipossomas com colesterol apresentam maior tempo de estabilidade física do que os lipossomas com β -

sitosterol. Porém, não há dados na literatura que possam confirmar tal inferência.

Na Tabela 7, podemos observar os dD/dt e dIP/dt , estes parâmetros representam a taxa de aumento de diâmetro ou índice de polidispersão em função do tempo após o ponto de inflexão ($t_{estável}$).

Comparando entre as misturas pode-se organizar na seguinte ordem, tanto para diâmetro médio quanto para índice de polidispersão: $2 > B > C > A$. Com este comportamento, presume-se que a mistura 1 possa ter apresentado instabilidade em algum momento do intervalo entre o 14º e 30º dia, pois não foi possível a leitura no 21º dia por problemas técnicos no equipamento. Para a mistura B classificada com o segundo maior valor por apresentar o menor valor de diâmetro médio (165 nm) e mostrou-se instável a partir do 7º dia.

Pode-se inferir que as misturas que não apresentaram instabilidade ainda não tinham alcançado o seu ponto de inflexão durante os 30 dias de avaliação.

4.1.3 Temperatura de estocagem

Parte das amostras foi estocada a 10°C e mantiveram-se estáveis durante os 30 dias. Este fato pode está relacionado à temperatura de estocagem estava abaixo da temperatura de transição de fase da fosfatidilcolina ($\approx 20^\circ\text{C}$), que configura para as cadeias dos ácidos graxos um estado mais ordenado (fase gel), facilitando a interdigitação das moléculas de esterol e aumentando a rigidez da bicamada (BATISTA, CARVALHO e MAGALHÃES, 2007). De acordo com Zuidam, van Winden e Crommelin (2003), uma das formas de minimizar a hidrólise dos fosfolípidios seria estocar a baixas temperaturas (4°C) ou estocar na forma liofilizada adicionando crioprotetores durante a produção.

4.2 PURIFICAÇÃO DOS NANOLIPOSSOMAS

As curvas normais da eluição das soluções de Blue Dextran e Azul de metileno em coluna Sephadex G-25 podem ser visualizadas na Figura 23. A ordem da eluição foi devido à diferença de peso molecular entre as duas espécies, o Blue dextran tem um alto peso

molecular (2.000.000) enquanto o azul de metileno tem um baixo molecular (319 g/mol). Realizando uma analogia quanto à purificação dos lipossomas, o Blue Dextran se comporta como os lipossomas contendo os compostos fenólicos, e o Azul de metileno se comporta como os compostos fenólicos livres. O volume morto da coluna foi determinado pela eluição do Blue Dextran (9 - 12 mL) e a eluição do azul de metileno ocorreu a partir de 21 mL.

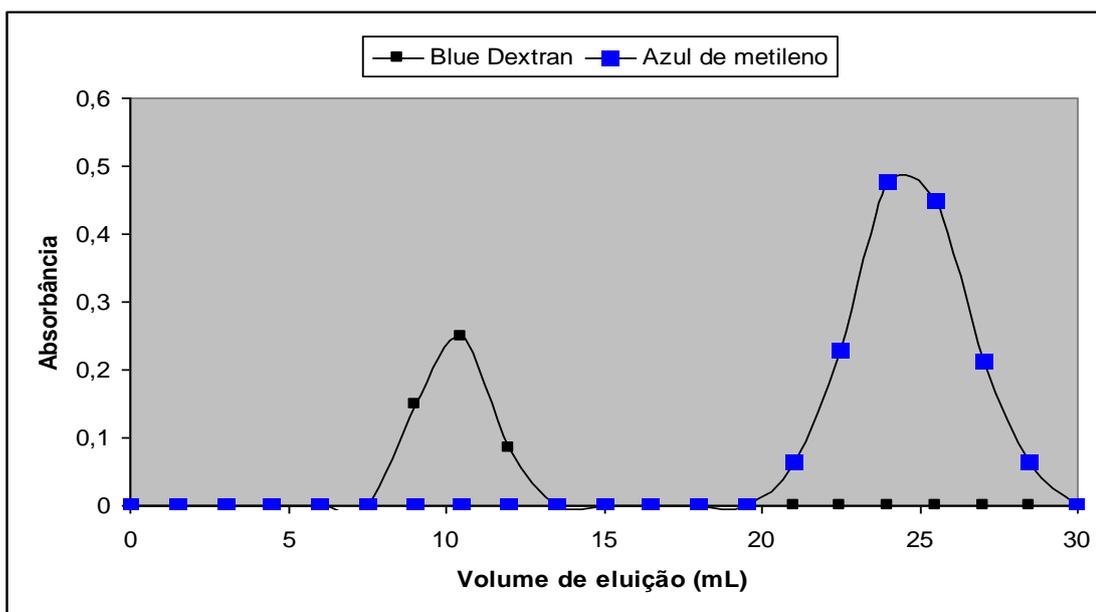


Figura 23. Eluição em coluna Sephadex G-25 em solução tampão fosfato 75 mM pH 6,0 de corantes Blue Dextran e azul de metileno a 1 mg/mL.

4.3 ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

4.3.1 Efeito sobre o diâmetro médio e o índice de polidispersão dos lipossomas

Na Tabela 10 estão dispostos os valores do diâmetro médio e do índice de polidispersão dos lipossomas mais estáveis durante a avaliação de estabilidade física por 30 dias a 10 e 25°C.

Tabela 10. Valores do diâmetro médio e do índice de polidispersão das misturas que continham 72,38% de fosfatilcolina, 27,38% de esterol e 0,25% de Tween 80.

<i>Fatores</i>		<i>Diâmetro médio (nm)</i>	<i>Índice de polidispersão</i>
Ácidos fenólicos	Colesterol	159,5 ± 4,7	0,302 ± 0,076
	β-sitosterol	154,5 ± 31,8	0,588 ± 0,077
Flavonóides	Colesterol	154,2 ± 4,2	0,227 ± 0,080
	β-sitosterol	117,0 ± 1,5	0,430 ± 0,123
<i>Euterpe oleracea</i>	Colesterol	145,4 ± 43,3	0,269 ± 0,059
	β-sitosterol	106,3 ± 5,2	0,463 ± 0,066
Controle*	Colesterol	161,6 ± 10,6	0,233 ± 0,058
	β-sitosterol	139,9 ± 3,3	0,229 ± 0,012

* Lipossomas vazios.

A análise de variância de dois fatores foi aplicada para verificar a existência de diferença significativa entre a variação do tipo de composto fenólico e a variação do tipo de esterol sobre o diâmetro médio (Tabela 11). Não há nenhum estudo na literatura que tenha relacionado tais fatores diante das características físicas estudadas.

Tabela 11. Resultado de análise de variância de dois fatores entre o tipo de composto fenólico e o tipo de esterol e interação para os diâmetros médios dos lipossomas.

<i>Fonte de variação</i>	S.Q^a	G.L^b	M.Q^c	F^d	p
Intercepto	486011,4	1	486011,4	1262,9	0,000
Composto fenólico	3614,6	3	1204,9	3,13	0,055
Esterol	3986,1	1	3986,1	10,36	0,005
Interação	1135,0	3	378,3	0,98	0,426
Erro	6157,5	16	384,8		

^asoma quadrática; ^bgraus de liberdade; ^cmédia quadrática; ^dteste de Fischer

Somente o tipo de esterol apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) sobre o diâmetro médio dos lipossomas. Pode-se inferir que as cadeias laterais dos esteróis e do surfactante e dos ácidos graxos constituintes, as quais apresentam ligações-dupla, sejam responsáveis por tal diferença. Também se pode relatar que a única diferença entre os esteróis seja suas cadeias laterais. Deve-se atentar que o tipo de composto fenólico apresentou um valor-p de 0,055, próximo de ser significativo para o diâmetro médio, mas significativo no índice de polidispersão.

Na Tabela 12 visualiza-se os resultados da análise de variância de dois fatores foi aplicada para verificar a existência de diferença significativa entre a variação do tipo de

composto fenólico e a variação do tipo de esterol sobre o índice de polidispersão.

Tabela 12. Resultado de análise de variância de dois fatores entre o tipo de composto fenólico e o tipo de esterol e interação para os índices de polidispersão dos lipossomas.

<i>Fonte de variação</i>	S.Q^a	G.L^b	M.Q^c	F^d	p
Intercepto	2,818	1	2,818	507,09	0,000
Composto fenólico	0,142	3	0,047	8,54	0,001
Esterol	0,172	1	0,172	31,02	0,000
Interação	0,068	3	0,023	4,06	0,025
Erro	0,089	16	0,006		

SQ: soma quadrática; GL: graus de liberdade; M.Q: média quadrática

Há diferença significativa ($p < 0,05$) para os efeitos do tipo de compostos fenólicos e para tipo de esterol. Como esta propriedade remete a distribuição de tamanho dos lipossomas. As fontes de variação irão repercutir significativamente, já que é sabido que o princípio da encapsulação dos compostos fenólicos é dependente da estrutura da molécula e as interações não-covalentes permitirão que os compostos fenólicos estejam solubilizados nos compartimentos aquosos, adsorvidos à superfície do lipossoma ou integrados à bicamada dos lipossomas.

Devemos ressaltar que os ácidos fenólicos utilizados foram uma mistura entre um ácido hidroxicinâmico (ácido ferrúlico) e um ácido hidroxibenzóico (ácido vanílico). Ambos apresentam um grupo metoxila ligado ao anel aromático, tal grupamento permite que possa interagir com bicamada lipídica. Dentre os flavonóides foram utilizados uma mistura entre um flavan-3-ol (catequina) e um flavonol glicosilado (rutina); pela sua estrutura tridimensional, (+)-catequina julga-se adsorver a bicamada lipídica relatado por Nakayama et al. (2006), enquanto a rutina possa ter interagido com a bicamada lipídica, efeito promovido pela glicosilação, já relatada por Rothwell, Day e Morgan (2005) e Bhendrich (2006). De acordo com Rogez (2000), os frutos de açaí são ricos em ácidos fenólicos e antocianinas; tal variedade e quantidade interagiram com as bicamadas promovendo um aumento expressivo no índice de polidispersão, observados na Tabela 10.

4.3.2 Efeito sobre o potencial zeta dos lipossomas

Na Tabela 13 estão dispostos os valores do potencial zeta das soluções de compostos fenólicos solubilizados em solução-tampão fosfato 75 mM pH 6,0 e dos lipossomas estáveis contendo as respectivas substâncias.

Tabela 13. Valores do potencial zeta das soluções de compostos fenólicos e das misturas que continham 72,38% de fosfatilcolina, 27,38% de esterol e 0,25% de Tween 80.

<i>Compostos fenólicos</i>	<i>Potencial zeta (mV)</i>	<i>Lipossomas</i>	<i>Potencial zeta (mV)</i>
Ácidos fenólicos	$-15,4 \pm 2,97$	Colesterol	$-3,08 \pm 0,49$
		β -sitosterol	$-2,43 \pm 0,02$
Flavonóides	$-13,1 \pm 0,07$	Colesterol	$-3,61 \pm 0,13$
		β -sitosterol	$-2,02 \pm 0,04$
<i>Euterpe oleracea</i>	$-11,1 \pm 0,99$	Colesterol	$-3,80 \pm 0,05$
		β -sitosterol	$-2,82 \pm 0,15$
Controle*	$-5,91 \pm 1,48$	Colesterol	$-3,67 \pm 0,66$
		β -sitosterol	$-2,22 \pm 0,46$

*O termo "controle" é o potencial zeta da solução tampão 75 mM a pH 6,0 e para os lipossomas são considerados vazios.

Não há nenhum estudo que tenha dados sobre o potencial zeta dos compostos fenólicos em solução. Observa-se que os ácidos fenólicos apresentam os menores valores de potencial zeta, que se postulamos estar envolvidos com a ionização dos grupos carboxila hidroxilas dos ácidos quando sujeitos a um campo elétrico. Seguiu-se com os flavonóides e com extrato de *E. oleracea*.

De uma forma geral, os maiores valores de potencial zeta são pertencentes ao controle, esta característica pode ser justificada por MOZURAITYTE, RUSTAD e STORRØ (2006) que pela adição de cátions monovalentes (no caso K^+) torna-se os valores menos negativos quando a força iônica aumenta.

Na Tabela 13, os valores de potencial zeta dos lipossomas contendo diferentes compostos fenólicos apresentaram-se dentro de uma faixa entre $|2|$ a $|4|$ mV. De acordo com HEURTAULT et al. (2003), tais valores estariam sujeito a uma faixa de floculação máxima ($|3|$ a $|5|$ mV), caso não houvesse surfactante não-iônico em sua composição. O surfactante não-iônico reduziu o potencial zeta, ou seja, a repulsão eletrostática, porém estabilizou os lipossomas a partir de repulsão estérica promovida pelas cadeias de polioxietileno, como mencionado por Heurtault et al. (2003), Tasi, Liu e Chen (2003) e Huang (2011).

Tabela 14. Resultado de análise de variância de dois fatores entre o tipo de composto fenólico e o tipo de esterol e interação para os potenciais zeta dos lipossomas.

<i>Fonte de variação</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Intercepto	209,48	1	209,48	1847,9	0,000
Composto fenólico	1,09	3	0,37	3,2	0,051
Esterol	8,20	1	8,20	72,3	0,000
Interação	0,85	3	0,28	2,5	0,098
Erro	1,81	16	0,11		

SQ: soma quadrática; GL: graus de liberdade; M.Q: média quadrática

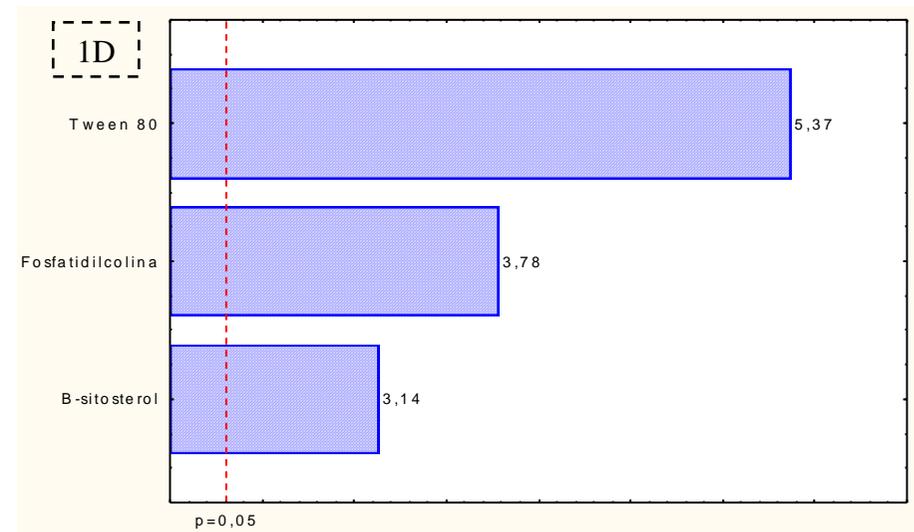
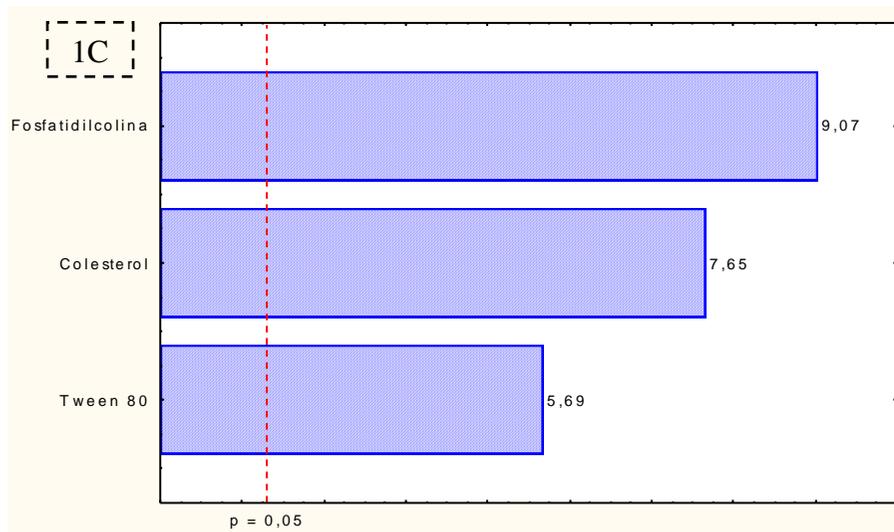
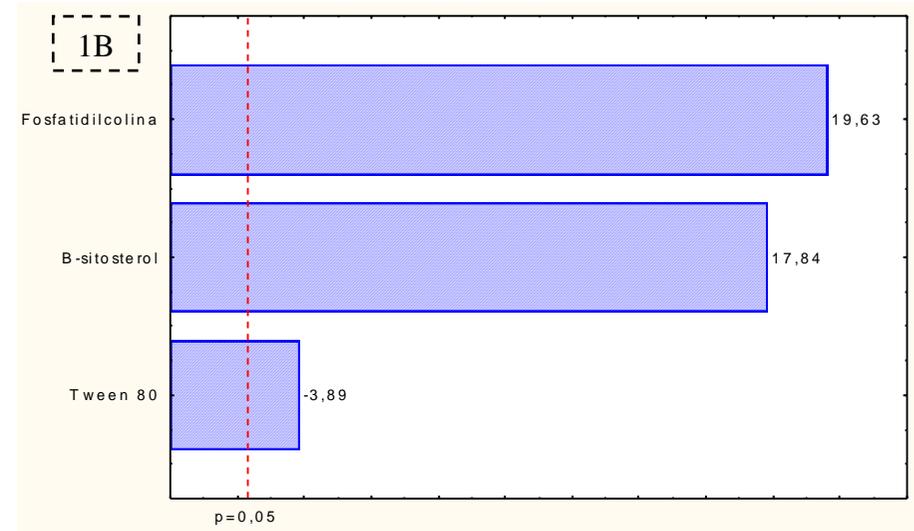
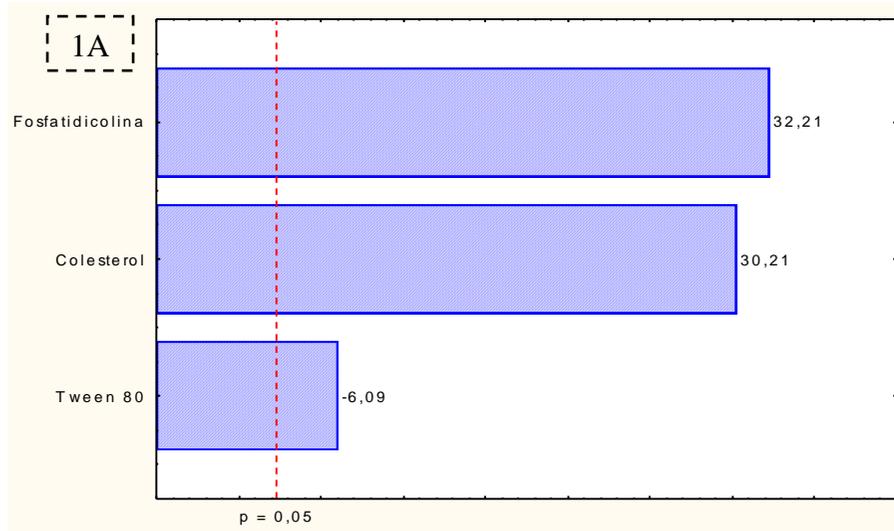
De acordo com os resultados da análise de variância de dois fatores aplicados sobre os potenciais zeta (Tabela 14), somente o tipo de esterol apresentou diferença significativa ($p < 0,05$). O potencial zeta compreende-se apenas como a repulsão eletrostática, mas não considera a repulsão estérica que é promovida pelo Tween 80, pois de acordo com Fan et al. (2007), neste caso, o potencial zeta não pode ser considerado o mais importante indicador de estabilidade dos lipossomas

5 CONCLUSÕES

- O método de extrusão em membranas de policarbonato mostrou-se eficaz no desenvolvimento de nanolipossomas;
- A variabilidade da composição lipídica do delineamento experimental de misturas restringidas influenciou no diâmetro médio e índice de polidispersão dos lipossomas, apresentando ajuste a um modelo de regressão linear com $R^2 > 0,7$;
- O Tween 80 promoveu a estabilidade física no decorrer do tempo, no entanto, diminuiu o diâmetro médio e aumentou o índice de polidispersão dos lipossomas;
- A temperatura de estocagem influenciou na estabilidade dos lipossomas estudados;
- Os lipossomas contendo Tween 80 em sua composição apresentaram estabilidade física, enquanto a instabilidade dos demais pôde ser modelada de forma sigmoideal;
- Os lipossomas contendo 72,38% de fosfatidilcolina de soja, 27,38% de esterol e 0,25% de Tween 80 mostraram maior estabilidade física.
- Na encapsulação de compostos fenólicos:
 - a. O tipo de esterol apresentou influência significativa sobre o diâmetro médio, o índice de polidispersão e o potencial zeta;
 - b. O tipo de composto fenólico apresentou influência significativa somente sobre o índice de polidispersão.

6 ANEXOS

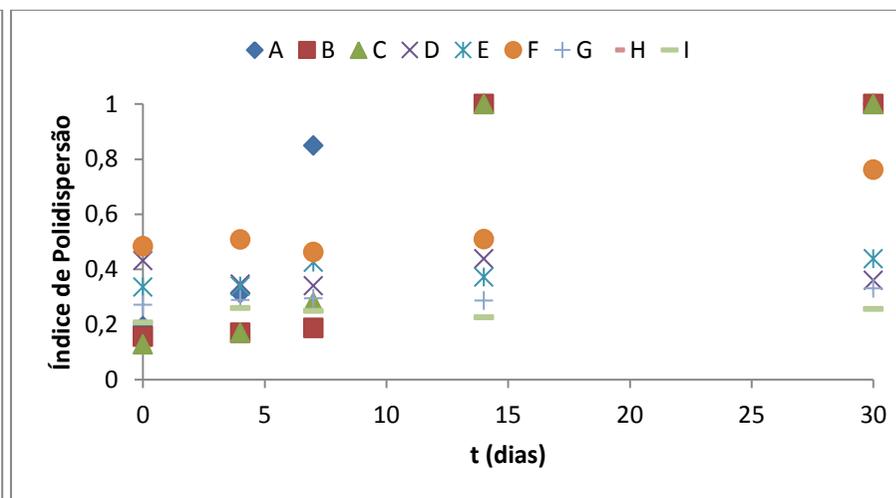
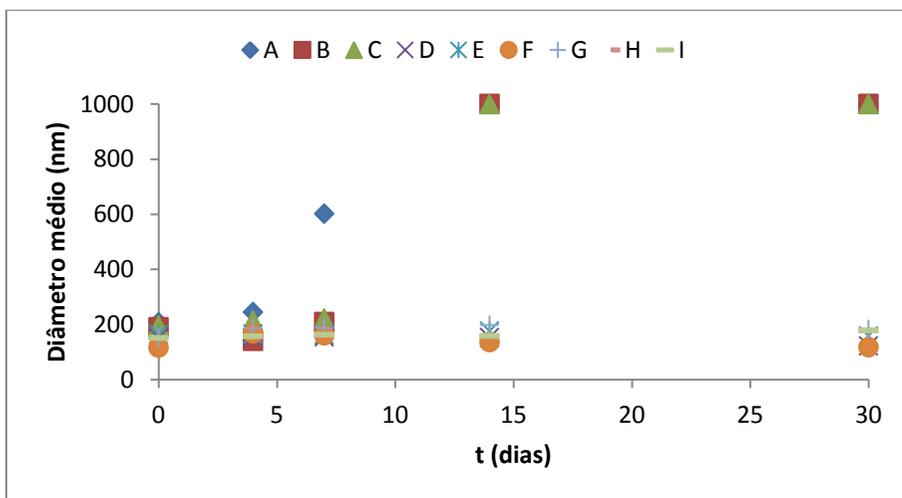
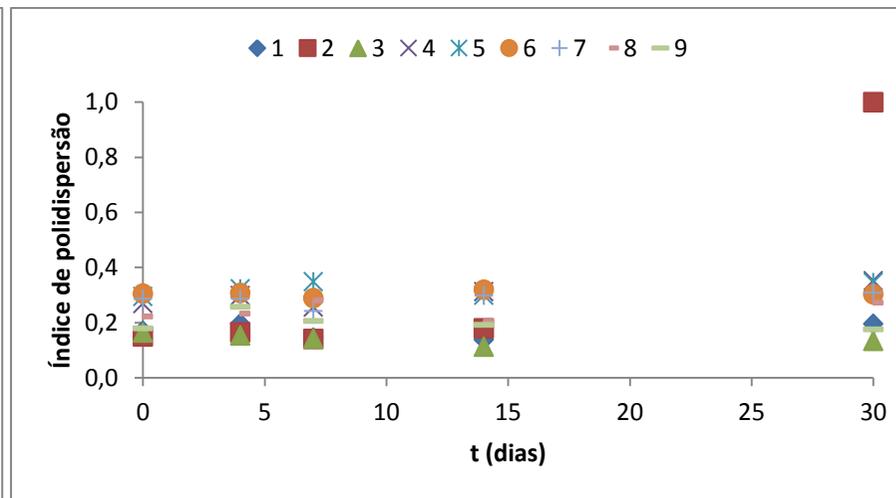
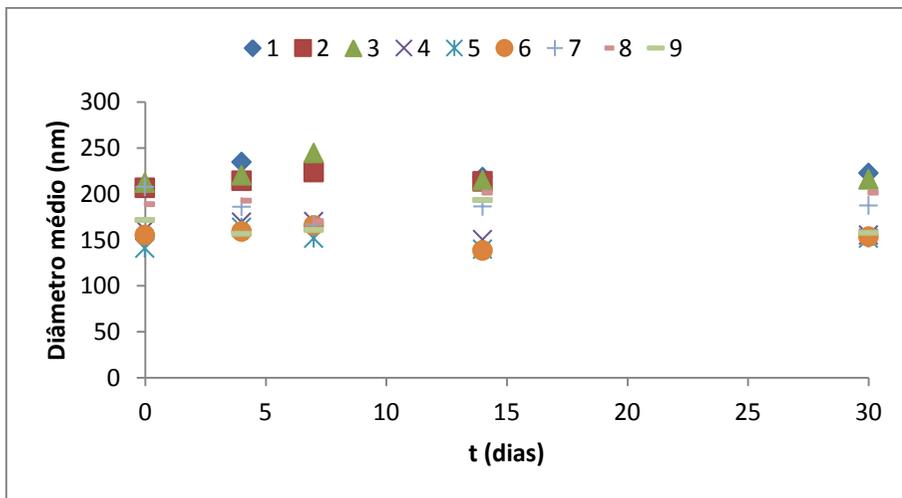
Anexo 1. Testes de Pareto do diâmetro médio (1A, 1B) e do índice de polidispersão (1C, 1D) para os lipossomas contendo colesterol e β -sitosterol respectivos ao plano de misturas restringidas.



Anexo 2. Valores máximos e mínimos de diâmetro médio e índice de polidispersão das misturas dos lipossomas durante os 30 dias a 25°C

t (dia)	Colesterol							
	Valores máximos				Valores mínimos			
	Mistura	D _{médio} (nm)	Mistura	IP	Mistura	D _{médio} (nm)	Mistura	IP
1°	3	212,3 ± 12,2	6	0,305 ± 0,035	5	141,1 ± 0,5	2	0,151 ± 0,018
4°	1	234,7 ± 24,7	5	0,322 ± 0,038	6	159,2 ± 5,7	3	0,154 ± 0,022
7°	3	244,6 ± 11,3	5	0,348 ± 0,026	5	151,6 ± 11,9	2	0,142 ± 0,007
14°	1	218,3 ± 5,2	6	0,320 ± 0,035	6	138,4 ± 13,6	3	0,112 ± 0,016
30°	2	998,7 ± 0,0	2	1 ± 0,0	5	151,7 ± 12,0	9	0,176 ± 0,054
t (dias)	β-sitosterol							
	Valores máximos				Valores mínimos			
	Mistura	D _{médio} (nm)	Mistura	IP	Mistura	D _{médio} (nm)	Mistura	IP
1°	A	207,2 ± 23,1	F	0,484 ± 0,048	F	115,9 ± 2,1	C	0,128 ± 0,023
4°	A	244,2 ± 14,7	F	0,508 ± 0,041	I	145,7 ± 19,3	B	0,170 ± 0,013
7°	A	601,1 ± 6,0	A	0,805 ± 0,084	D	154,1 ± 3,2	B	0,188 ± 0,023
14°	A, B, C	1000 ± 0,0	A, B, C	1 ± 0,0	H	154,1 ± 0,7	I	0,226 ± 0,029
30°	A, B, C	1000 ± 0,0	A, B, C	1 ± 0,0	F	136,2 ± 1,6	I	0,256 ± 0,017

Anexo 3. Avaliação da estabilidade física a partir da evolução do diâmetro médio e do índice de polidispersão por 30 dias a 25°C das distintas misturas.



Anexo 4. Ajuste de modelos matemáticos para características físicas das misturas de colesterol respectivo ao 4º e 7º dia de avaliação de estabilidade a 25°C.

<i>4º dia</i>										
<i>MODELO</i>	<i>Diâmetro médio (nm)</i>									
	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
Linear	5726	2	2863	1009	8	126	22,69	0,001	0,850	0,813
Quadrático	362	3	121	647	5	129	0,93	0,490	0,904	0,808
Total Ajustado	6735	10	674							
<i>MODELO</i>	<i>Índice de polidispersão</i>									
	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
Linear	0,029	2	0,015	0,003	8	0,000	35,48	0,000	0,899	0,873
Quadrático	0,002	3	0,001	0,002	5	0,000	1,43	0,339	0,945	0,891
Total Ajustado	0,032	10	0,003							
<i>7º dia</i>										
<i>MODELO</i>	<i>Diâmetro médio (nm)</i>									
	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
Linear	4331	2	2165	4708	8	586	3,68	0,074	0,479	0,349
Quadrático	2773	3	924	1935	5	387	2,39	0,185	0,786	0,572
Total Ajustado	9038	10	904							
<i>MODELO</i>	<i>Índice de polidispersão</i>									
	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
Linear	0,036	2	0,018	0,019	8	0,002	7,78	0,013	0,660	0,575
Quadrático	0,010	3	0,003	0,009	5	0,002	1,81	0,262	0,837	0,674
Total Ajustado	0,055	10	0,006							

Anexo 5. Ajuste de modelos matemáticos para características físicas das misturas de colesterol respectivo ao 14º e 30º dia de avaliação de estabilidade a 25°C.

<i>14º dia</i>										
<i>MODELO</i>	<i>Diâmetro médio (nm)</i>									
	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
Linear	7947	2	3974	1673	8	209	19,00	0,001	0,826	0,783
Quadrático	905	3	302	768	5	154	1,96	0,238	0,920	0,840
Total Ajustado	9621	10	962							
<i>Índice de polidispersão</i>										
<i>MODELO</i>	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
	Linear	0,045	2	0,022	0,010	8	0,001	17,30	0,001	0,812
Quadrático	0,001	3	0,000	0,010	5	0,002	0,12	0,945	0,825	0,649
Total Ajustado	0,055	10	0,006							
<i>30º dia</i>										
<i>MODELO</i>	<i>Diâmetro médio (nm)</i>									
	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
Linear	159297	2	79649	449879	8	56235	1,42	0,297	0,261	0,077
Quadrático	156720	3	52240	293159	5	58632	0,89	0,506	0,519	0,038
Total Ajustado	609176	10	60918							
<i>Índice de polidispersão</i>										
<i>MODELO</i>	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
	Linear	0,028	2	0,014	0,516	8	0,065	0,215	0,811	0,051
Quadrático	0,181	3	0,060	0,335	5	0,067	0,901	0,502	0,384	0,00
Total Ajustado	0,544	10	0,054							

Anexo 6. Ajuste de modelos matemáticos para características físicas das misturas de β -sitosterol respectivo ao 4º e 7º dia de avaliação de estabilidade a 25°C.

<i>4º dia</i>										
<i>MODELO</i>	<i>Diâmetro médio (nm)</i>									
	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
Linear	2730	2	1365	7289	8	911	1,50	0,280	0,272	0,091
Quadrático	2314	3	771	4976	5	995	0,78	0,556	0,503	0,007
Total Ajustado	10019	10	1002							
<i>MODELO</i>	<i>Índice de polidispersão</i>									
	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
Linear	0,049	2	0,024	0,040	8	0,005	4,82	0,042	0,547	0,433
Quadrático	0,024	3	0,008	0,016	5	0,003	2,48	0,176	0,818	0,635
Total Ajustado	0,089	10	0,009							
<i>7º dia</i>										
<i>MODELO</i>	<i>Diâmetro médio (nm)</i>									
	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
Linear	76908	2	38454	97395	8	12174	3,16	0,097	0,441	0,302
Quadrático	69868	3	23289	27527	5	5506	4,23	0,077	0,842	0,684
Total Ajustado	174303	10	17430							
<i>MODELO</i>	<i>Índice de polidispersão</i>									
	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
Linear	0,040	2	0,020	0,294	8	0,037	0,55	0,599	0,120	0,000
Quadrático	0,208	3	0,069	0,086	5	0,017	4,05	0,083	0,743	0,487
Total Ajustado	0,334	10	0,033							

Anexo 7. Ajuste de modelos matemáticos para características físicas das misturas de β -sitosterol respectivo ao 14º e 30º dia de avaliação de estabilidade a 25°C.

<i>14º dia</i>										
<i>MODELO</i>	<i>Diâmetro médio (nm)</i>									
	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
Linear	1071968	2	535984	445888	8	55736	9,62	0,007	0,706	0,633
Quadrático	444793	3	148264	1094	5	219	677,44	0,000	0,999	0,999
Total Ajustado	1517856	10	151786							
<i>MODELO</i>	<i>Índice de polidispersão</i>									
	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
Linear	0,471	2	0,236	0,587	8	0,073	3,21	0,095	0,445	0,306
Quadrático	0,573	3	0,191	0,015	5	0,003	64,74	0,000	0,986	0,972
Total Ajustado	1,058	10	0,106							
<i>30º dia</i>										
<i>MODELO</i>	<i>Diâmetro médio (nm)</i>									
	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
Linear	1128534	2	564267	398811	8	49851	11,32	0,005	0,739	0,674
Quadrático	398210	3	132737	601	5	120	1105	0,000	1,000	0,999
Total Ajustado	1527345	10	152735							
<i>MODELO</i>	<i>Índice de polidispersão</i>									
	<i>Efeitos</i>			<i>Erros</i>			<i>F</i>	<i>p</i>	<i>R²</i>	<i>R²_{ajustado}</i>
	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>	<i>S.Q</i>	<i>G.L</i>	<i>M.Q</i>				
Linear	0,365	2	0,182	0,649	8	0,081	2,25	0,168	0,360	0,200
Quadrático	0,615	3	0,205	0,034	5	0,007	30,22	0,001	0,967	0,933
Total Ajustado	1,014	10	0,101							

Anexo 8. Análise de variância dos modelos matemáticos dos valores de diâmetro médio e de índice de polidispersão para as misturas contendo colesterol e β -sitosterol no 4º dia de avaliação de estabilidade a 25°C.

<i>4º dia</i>										
	<i>Colesterol</i>									
	<i>Diâmetro médio (nm)</i>					<i>Índice de polidispersão</i>				
	S.Q	G.L	M.Q	F	p	S.Q	G.L	M.Q	F	P
Regressão	726	2	863	22,7	0,001	0,029	2	0,015	35,48	0,000
Erro Total	1009	8	126			0,003	8	0,000		
Falta de ajuste	1008	6	168	232,2	0,004	0,003	6	0,001	5,00	0,176
Erro puro	1,4	2	1,0			0,000	2	0,000		
Total Ajustado	6735	10	674			0,032	10	0,003		
	<i>β-sitosterol</i>									
	<i>Diâmetro médio (nm)</i>					<i>Índice de polidispersão</i>				
	S.Q	G.L	M.Q	F	p	S.Q	G.L	M.Q	F	P
Regressão	5043	5	1009	1,01	0,494	0,073	5	0,015	4,48	0,063
Erro Total	4976	5	995			0,016	5	0,003		
Falta de ajuste	4399	3	1466	5,09	0,167	0,012	3	0,004	1,65	0,399
Erro puro	576	2	288			0,005	2	0,002		
Total Ajustado	10019	10	1002			0,089	10	0,009		

Anexo 9. Análise de variância dos modelos matemáticos dos valores de diâmetro médio e de índice de polidispersão para as misturas contendo colesterol e β -sitosterol no 7º dia de avaliação de estabilidade a 25°C.

<i>7º dia</i>										
	<i>Colesterol</i>									
	<i>Diâmetro médio (nm)</i>					<i>Índice de polidispersão</i>				
	S.Q	G.L	M.Q	F	p	S.Q	G.L	M.Q	F	p
Regressão	4331	2	2165	3,68	0,074	0,036	2	0,018	7,78	0,013
ErroTotal	4708	8	588			0,019	8	0,002		
Falta de ajuste	3860	6	643	1,52	0,449	0,013	6	0,002	0,72	0,679
Erro puro	848	2	424			0,006	2	0,003		
Total Ajustado	9038	10	904			0,055	10	0,005		
	<i>β-sitosterol</i>									
	<i>Diâmetro médio (nm)</i>					<i>Índice de polidispersão</i>				
	S.Q	G.L	M.Q	F	p	S.Q	G.L	M.Q	F	p
Regressão	146776	5	29355	5,33	0,045	0,249	5	0,050	2,90	0,134
ErroTotal	27527	5	5506			0,086	5	0,017		
Falta de ajuste	27526	3	9176	18725	0,000	0,085	3	0,028	67,33	0,015
Erro puro	1,0	2	0,49			0,001	2	0,000		
Total Ajustado	174303	10	17430			0,334	10	0,033		

Anexo 10. Análise de variância dos modelos matemáticos dos valores de diâmetro médio e de índice de polidispersão para as misturas contendo colesterol e β -sitosterol no 14º dia de avaliação de estabilidade a 25°C.

<i>14º dia</i>										
	<i>Colesterol</i>									
	<i>Diâmetro médio (nm)</i>					<i>Índice de polidispersão</i>				
	S.Q	G.L	M.Q	F	p	S.Q	G.L	M.Q	F	p
Regressão	7947	2	3974	19,00	0,001	0,045	2	0,022	17,30	0,001
Erro Total	1673	8	209			0,010	8	0,001		
Falta de ajuste	1125	6	188	0,68	0,696	0,008	6	0,001	0,95	0,594
Erro puro	548	2	274			0,003	2	0,001		
Total Ajustado	9621	10	962			0,055	10	0,005		
	<i>β-sitosterol</i>									
	<i>Diâmetro médio (nm)</i>					<i>Índice de polidispersão</i>				
	S.Q	G.L	M.Q	F	p	S.Q	G.L	M.Q	F	p
Regressão	1516761	5	303352	1386	0,000	1,044	5	0,209	70,8	0,000
Erro Total	1094	5	219			0,015	5	0,003		
Falta de ajuste	1000	3	333	7	0,126	0,009	3	0,003	1,0	0,541
Erro puro	94	2	47			0,006	2	0,003		
Total Ajustado	1517856	10	151786			1,058	10	0,106		

Anexo 11. Análise de variância dos modelos matemáticos dos valores de diâmetro médio e de índice de polidispersão para as misturas contendo colesterol e β -sitosterol no 30º dia de avaliação de estabilidade a 25°C.

<i>30º dia</i>										
	<i>Colesterol</i>									
	<i>Diâmetro médio (nm)</i>					<i>Índice de polidispersão</i>				
	S.Q	G.L	M.Q	F	p	S.Q	G.L	M.Q	F	p
Regressão	159297	2	79649	1,42	0,297	0,028	2	0,014	0,22	0,811
Erro Total	449879	8	56235			0,516	8	0,064		
Falta de ajuste	449727	6	74955	988	0,001	0,513	6	0,086	64,18	0,015
Erro puro	152	2	76			0,003	2	0,001		
Total Ajustado	609176	10	60918			0,544	10	0,054		
	<i>β-sitosterol</i>									
	<i>Diâmetro médio (nm)</i>					<i>Índice de polidispersão</i>				
	S.Q	G.L	M.Q	F	p	S.Q	G.L	M.Q	F	P
Regressão	1526744	5	305349	2542	0,000	0,980	5	0,196	28,9	0,001
Erro Total	601	5	120			0,034	5	0,007		
Falta de ajuste	538	3	180	5,8	0,151	0,033	3	0,011	27,5	0,035
Erro puro	62	2	31			0,001	2	0,000		
Total Ajustado	1527345	10	152735			1,014	10	0,101		

REFERÊNCIAS

ARON, P. M.; KENNEDY, J. A. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 52, p. 79-104. 2008.

AZUMA, K.; IPPOUSHI, K.; ITO, H.; HIGASHIO, H.; TERAJO J. Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 50, p. 1706-1717. 2002.

BATISTA, C.M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 43. n. 2. 2007.

BHENDRICH, A. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 1. p.27-40. 2006.

CHAN, Y.H.; CHEN, B-H.; CHIU, C.P.; LU, Y.F.; The influence of phytosterols on the encapsulation efficiency of cholesterol liposomes. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 39. p. 985-995. 2004.

CHERN, C-S.; CHIU, H-C.; YANG, Y-S. Interactions between nonionic Triton X surfactants and cholesterol-containing phosphatidylcholine liposomes. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 302. p. 335-430. 2006.

CHIN, Y-W.; CHAI, H-B.; KELLER, W. J.; KINGHORN, A. D.; Lignans and other constituents of fruits of *Euterpe oleracea* (açai) with antioxidant and cytoprotective activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56. p. 7759-7764. 2008.

COPELAND, R. A. **Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis**. 2nd edition. p. 32-36. New York: Wiley-VCH, Inc. 2000.

COSTA, C. A. M. **Preparação e caracterização de lipossomas encapsulando ácido azelaico, bleomicina e 5-fluorouracil para a aplicação na terapia de melanomas**. 2000. 125 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – UNICAMP. Campinas. 2000.

CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**. v. 26. n. 8. p. 965-1096. 2009.

DAHER, C.F.; BAROODY, G.M.; HOWLAND, R.J. Effect of a surfactant, Tween 80, on the formation and secretion of chylomicrons in the rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41. p. 575-582. 2003.

DING, B.; XIA, S.; HAYAT, K.; ZHANG, X. Preparation of pH stability of ferrous glycinate liposomes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57. p.2938-2944. 2009.

FADDA, A. M.; BAROLI, B.M.; MACCIONI, A.M.; SINICO, C.; VALENTI, D.; ALHAIQUE, F. Phospholipid-detergent systems: effects of polysorbates on the release of liposomal caffeine. **Il Farmaco**. v. 53. p. 650-654. 1998.

FAN, M.; XU, S.; XIA, S.; ZHANG, X. Preparation of salidroside nano-liposomes by ethanol injection method and in vitro release study. **Europe Food Research Technology**. v. 227. p. 167-177. 2008.

FAN, M.; XU, S.; XIA, S.; ZHANG, X. Effect of different preparation methods on physicochemical properties of salidroside liposomes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55. p. 3089-3095. 2007.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO, S.C.; ROCHA, G.A. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 11. n. 2 p. 103-112. 2008.

FLEURIET, A.; MACHEIX, J.J. Phenolic acids in fruits and vegetables. In: RICE-EVANS, C.; PACKER, LESTER. **Flavonoids in health and disease**. 2nd edition. New York: Marcel Dekker, Inc. p. 1-42. 2003.

HĄC-WYDRO, K. WYDRO, P., JAGODA, A., KAPUSTA, J. The study of the interaction between phytosterols and phospholipids in model membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 150, p. 22-34. 2007.

HASIRCI, N. Micro and nano systems in biomedicine and drug delivery. In: MOZAFARI, M.R. **Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications**. Dordrecht: Springer. p. 1- 26. 2007.

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

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 19. p. 73-82. 2008.

HOPE, M.J.; BALLY, M.B.; WEBB, G.; CULLIS, P.R. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 812. p. 55-65. 1985.

HORTON, H. R.; MORAN, L.A.; SCRIMGEOUR, K. G.; PERRY, M D.; RAWN, J. D. **Principles of biochemistry**. 4th edition. New Jersey: Prentice Hall. 2006.

HUANG, Y-B.; TSAI, M-J.; WU, P-C.; TSAI, Y-H.; WU, Y-H.; FANG, J-Y. Elastic liposomes as carriers for oral delivery and the brain distribution of (+)-catechin. **Journal of Drug Targeting**. p.1-10. 2011.

JEFFREY, G. A.; SAENGER, W. **Hydrogen bonding in biological structures**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1991.

JESORKA, A.; ORWAR, O. Liposomes: Technologies and analytical applications. **Annual Reviews of Analytical Chemistry**. v. 1. p. 801-832. 2008.

JUSTO, O. R. **Produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol encapsulando agentes tuberculostáticos e avaliação do potencial de escalonamento do processo**. 2003. 253 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – UNICAMP. Campinas. 2003.

KAJIYA, K.; ICHIBA, M.; KUMAZAWA, S.; NAKAYAMA, T. Role of lipophilicity and hydrogen peroxide formation in the cytotoxicity of flavonols. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**. v. 65. p. 1227-1229. 2001.

KATO, R.; KAJIYA, K.; TOKUMOTO, H.; KUMAZAWA, S.; NAKAYAMA, T. Affinity of isoflavonóides for lipid bilayers evaluated with liposomal systems. **Biofactors**. v. 19. p. 179-187. 2003.

KELLER, B.C. Liposomes in nutrition. **Trends in Food Science & Technology**. v.12. p. 25-31. 2001.

KHOSRAVI-DARANI, K.; PARDAKHTY, A.; HONARPISHEH, H.; MALLESWARA RAO, V.S.N.; MOZAFARI, M. R. The role of high-resolution imaging in the evaluation of nanosystems for bioactive encapsulation and targeted nanotherapy. **Micron**. v. 38. p. 804-818.

2007.

KOH, E.; MITCHELL, A. E. Trends in the Analysis of Phytochemicals – Flavonoids and carotenoids. In: MESKIN, S.M.; BIDLACK, W.R.; RANDOLPH, R. K. **Phytochemicals – Aging and Health**. Buena Park: CRC Press. p. 39-76. 2006.

LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A. Bioavailability of phenolic acids. **Phytochemistry Review**. v. 7. p. 301-311. 2008.

LAGARDA, M.J.; GARCÍA-LLATAS, G.; FARRÉ, R. Analysis of phytosterols in foods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 41. p. 1486-1496. 2006.

LASCH, J.; WEISSIG, V.; BRANDL, M. Preparation of liposomes In: TORCHILIN, V.P.; WEISSIG, V. **Liposomes: A Practical Approach**. 2nd edition. p. 3-29. New York: Oxford University Press, 2003.

MALMSTEN, M. **Surfactants and polymers in drug delivery**. p. 1-17. New York: Marcel Dekker, Inc. 2002.

MANACH ET AL., C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Society for Clinical Nutrition**. v. 79. p. 727-747. 2004.

MATEUS, N.; DE FREITAS, V. Anthocyanins as food colorants. In: GOULD, K.; DAVIES, K.; WINEFIELD, C. **Anthocyanins – biosynthesis, functions and applications**. New York: Springer Science+Business Media, 2009. p. 283-304.

MAZZA, G. J. Anthocyanins and heart health. **Ann Ist Super Sanità**. v. 43. p. 369-374. 2007.

MERTEN-TALCOTT, S. U.; RIOS, J. JILMA-STOHLAWETZ, P.; PACHECO-PALENCIA, L. A.; MEIBOHM, B.; TALCOTT, S.T; DERENDORF, H. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich açai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56. p. 7796-7802. 2008.

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

MOZAFARI, M.R.; KHOSRAVI-DARANI, K.; BORAZAN, G.G.; CUI, J.; PARDAKHTY, A.; YURDUGUL, S. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. **International Journal of Food Properties**. v. 11. p. 833-844, 2008a.

MOZURAITYTE, R.; RUSTAD, T.; STORRØ, I. Oxidation of cod phospholipids in liposomes: Effects of salts, pH and zeta potential. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 108. p. 994-950. 2006.

MUI, B.; CHOW, L.; e HOPE, M. J. Extrusion technique to generate liposomes of defined size. In: DÜZGÜNES, N. **Methods In Enzymology: Liposomes – Part A**. v. 367. p. 3-14. San Diego: Elsevier Academic Press. 2003.

NAKAYAMA, T.; KAJIYA, K.; KUMAZAWA, S. Interaction of plant polyphenols with liposome. In: Liu, A. L.; Tien, H.T. **Advance in planar bilayers and liposomes**. v.6. San Diego: Elsevier Inc. v. 4. p. 107-133. 2006.

NAKAYAMA, T.; ONO, K. HASHIMOTO, K. Affinity of antioxidative polyphenols for lipid bilayers evaluated with a liposome system. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**. v. 62. p. 1005-1007. 1998.

NELSON, D.; COX, M. **Lehninger: Princípios de bioquímica**. 3ª ed. Sarvier. p. 64-85, p. 280-300. 2002.

O'KEFFE, S.F. Nomenclature and classification of lipids. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**. 3rd edition. p. 3-37. Boca Raton: CRC Press, 2008.

OLSON, F.; HUNT, C.A.; SZOKA, F.C.; VAIL, W.J; PAPAHAJIOPOULOS. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 557. p. 9-23. 1979.

OTEIZA, P.I.; ERLEJMAN, A.G.; VERSTRAETEN, S.V.; KEEN, C.L.; FRAGA, C.G. Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface? **Clinical & Developmental Immunology**. v. 12. p. 19-25. 2005

PACHECO-PALENCIA, L.A.; TALCOTT, S.T.; SAFE, S. MERTENS-TALCOT, S. Absorption and biological activity of phytochemical-rich extract from açáí (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and oil in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56. p. 3593-

3600. 2008.

PETER WELFING, W.; KOSUDA, K.; TEMPLETON, A.C.; HARMAN, A.; MOWERY, M.D.; REED, R.A. Polysorbate 80 UV/vis spectral and chromatographic characteristics – defining boundary conditions for use the surfactant in dissolution analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 41. p. 774-782. 2006.

PORKONÝ, J. Phospholipids. In: SIKORSI, Z. E.; KOŁAKOWSKA, A. **Chemical and functional properties of food lipids**. Boca Raton: CRC Press. p.76-89. 2003.

PRETÉ, P.S.C. **Solubilização de membranas de eritrócitos por surfactantes da série Tween**. 2000. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – UNICAMP. 2000.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolics compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**. v. 66. p. 401-436. 1999.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, composição e melhoramento da conservação**, Belém-PA: EDUFPA. 2000.

ROTHWELL, J. A.; DAY, A. J.; MORGAN, M. R. A. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetina and related flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53. p. 4355-4360. 2005.

ROZNER, S.; GARTI, N. The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 283-284. p. 435-456. 2005.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**. v. 130. p. 2073S-2085S. 2000.

SCHAUSS, A. G.; WU, X. PRIOR, R.; OU, B.; HUANG, D. OWENS, J.; AGARWAL, A.; JENSEN, G. S.; HART, A. N.; SHANBROM, E. Antioxidant capacity and other bioactivities of freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe olearecea* Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54. p. 8604-8610. 2006.

SELMA, M.V.; ESPÍN, J.C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 57. p.

6885-6501. 2009.

SILVA, E. M.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**. v. 55. p. 381-387. 2007a.

SPENCER, J.P.E. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. **Journal of Nutrition**. v. 133. p. 3255S-3261S. 2003.

STOBIECKI, M.; KACHLICKI, P. Isolation and identification of flavonoids In: GROTEWOLD, E. In: GROTEWOLD, E. **The Science of Flavonoids**. Ohio: Springer Science and Business Media. p. 47-69. 2006.

STONE, W. L.; SMITH, M. Therapeutic uses of antioxidant liposomes. **Molecular Biotechnology**. v. 27. p. 217-230. 2004.

SUNTRES, Z. E.; OMRI, A. The role of liposomal antioxidants in oxidative stress. In: MOZAFARI, M.R. **Nanocarrier Technologies: Frontiers of Nanotherapy**. Springer. p. 191-205. 2006.

TALCOTT, S. T.; DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S. S. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 1222-1229. 2006.

TASI, L. M.; LIU, D. Z.; CHEN, W. Y. Microcalorimetric investigation of the interaction of polysorbate surfactants with unilamellar phosphatidylcholines liposomes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**. v. 213. p. 7-14. 2003.

TAYLOR, T.M.; DAVIDSON, P.M.; BRUCE, B.D.; WEISS, J. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. **Critical reviews in food science and nutrition**. v. 43. p. 587-605. 2005.

TURANÉK, J.; KAŠNA, A.; ZÁLUSKÁ, D.; NEČA, J. Preparation of sterile liposome by proliposome-liposome method. In: DÜZGÜNES, N. **Methods In Enzymology: Liposomes – Part A**. v. 367. p. 111-125. 2003. San Diego: Elsevier Academic Press. 2003.

VALENZUELA, S.M. Liposomes Techniques for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes In: FERRARI, M.; MARTIN, D. K. **Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes**. p. 75-87. New York: Springer Science+Business Media, 2007.

VAN WINDEN, E.; ZUIDAM, N.J.; CROMMELIN, D.J.A. Strategies for large scale production and optimized stability of pharmaceutical liposomes developed for parenteral use. In: LASIC, D.D.; PAPAHAADJOPOULOS, D. **Medical applications of liposomes**. p. 567-604. Amsterdam: Elsevier. 1998.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery system: a review. **Pharmaceutica Acta Helveticae**. v. 70. p. 95-111. 1995.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. Chemical properties of phenolic compounds. In: **Phenolic compound biochemistry**. p.35-61. Dordrecht: Springer. 2006.

WAŚOWICZ, E. Cholesterol and Phytosterol. In: SIKORSKI, Z.E.; KOŁAKOWSKA, A. **Chemical and functional properties of food lipids**. p. 90-104. New York: CRC PRESS, 2003.

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

XIA, S.; XU, S.; ZHANG, X. ZHONG, F. Effect of coenzyme Q₁₀ incorporation on the characteristics of nanoliposomes. **Journal of Physic-Chemistry B**. v. 111. p. 2200-2207. 2007.

ZUIDAM, N.J.; VAN WINDEN, E.; CROMMELIN, D.J.A. Stability, storage, and sterilization of liposomes In: TORCHILIN, V.P.; WEISSIG, V. **Liposomes: A Practical Approach**. 2nd edition. p. 149-164. New York: Oxford University Press, 2003.