

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS LIOFILIZADOS ENCAPSULANDO QUERCETINA

T. TONIAZZO, H. GALESKAS, S.C. PINHO*

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de
Engenharia de Alimentos/FZEA-USP

*e-mail: samantha@usp.br

RESUMO

Alimentos mais saudáveis e que oferecem benefícios à saúde humana são requisitos essenciais para os consumidores que buscam uma vida mais saudável. Dessa forma, a utilização de técnicas de microencapsulação torna-se extremamente interessante para atingir tais exigências. A quercetina é um flavonoide que pode oferecer benefícios para a saúde humana devido à sua capacidade de agir como um antioxidante. Os lipossomas podem ser utilizados como veículos para encapsular bioativos hidrofóbicos como a quercetina. A natureza lipídica dos lipossomas é importante principalmente para aumentar a solubilidade da quercetina no trato gastrointestinal, aumentando assim a biodisponibilidade. O emprego da liofilização para lipossomas é extremamente viável para prolongar a vida de prateleira das vesículas. Quando comparado às dispersões, os lipossomas liofilizados possuem algumas vantagens, como por exemplo, diminuição da contaminação microbiológica, maior facilidade no transporte e armazenamento. O objetivo principal desse trabalho foi produzir dispersões de lipossomas encapsulando 0,3% molar de quercetina pelo método de injeção de etanol. Posteriormente tais dispersões foram submetidas ao processo de liofilização, utilizando a sacarose como crioprotetor, na proporção sacarose:fosfolipídio de (4:1). Finalmente, os lipossomas liofilizados foram caracterizados em relação à microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), isotermas de sorção e higroscopicidade.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Quercetina

A quercetina é um flavonoide que possui efeitos benéficos para a saúde humana, sendo que tais efeitos se devem principalmente a sua capacidade de atuar como um antioxidante. Portanto, são a esta molécula atribuídos efeitos farmacológicos antitumorais, anticancerígeno anti-inflamatório e hepatoprotetor (LANDI-LIBRANDI et al., 2012; GHOSH et al., 2011). Por outro lado, a quercetina possui

baixa biodisponibilidade quando ingerida na sua forma cristalina, e uma ótima alternativa para superar essa dificuldade é a utilização de matrizes lipídicas para encapsular tal bioativo. As técnicas de microencapsulação baseadas em matrizes lipídicas são especialmente interessantes para encapsular, proteger e principalmente aumentar a biodisponibilidade das substâncias bioativas (POUTON, 2006; POOL et al., 2013). Os lipossomas estão entre as matrizes lipídicas utilizadas para encapsular os bioativos.

1.2 Lipossomas: estrutura, aplicações em alimentos e método de produção

Os lipossomas são estruturas esféricas capazes de encapsular ambas as substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas. Eles são especialmente capazes de encapsular substâncias hidrofóbicas, como por exemplo, vitamina E (ZHAO et al., 2011), os óleos essenciais (GORTZI et al, 2008, YOSHIDA et al, 2010), polifenóis (LU et al, 2011) e carotenoides (CARVALHO et al, 2015; TONIAZZO et al, 2014). Devido à sua natureza lipídica e a capacidade de encapsular bioativos hidrofóbicos, os lipossomas são importantes para aumentar a solubilidade no trato gastrointestinal e conseqüentemente à biodisponibilidade dos bioativos (ALEXOPOULOU et al, 2006).

O método de injeção de etanol produz vesículas do tipo unilamelares pequenas (SUVs). Este método apresenta-se promissor para indústria alimentícia devido à facilidade de ser reproduzido em grande escala, bem como a utilização do etanol, que é considerado um solvente orgânico de grau alimentício. Em relação aos custos do sistema de microencapsulação, o método de injeção de etanol pode ser considerado mais econômico para produzir SUVs, pois não é necessária a utilização de homogeneizadores de alta pressão ou de microfluidizadores (JUSTO E MORAES, 2011; CARVALHO et al, 2015).

1.3 Liofilização de lipossomas: crioproteção e parâmetros operacionais

A liofilização é um método prático e utilizado para prolongar a vida de prateleira dos lipossomas. A utilização do processo de liofilização em lipossomas é extremamente interessante, pois o emprego das vesículas liofilizadas possui algumas vantagens quando comparada com o uso dos lipossomas na forma de dispersão; por exemplo, diminui a probabilidade de contaminação microbiológica,

bem como facilita o armazenamento e o transporte.

Para obter lipossomas liofilizados com a intenção de proteger o bioativo, primeiramente é necessário conhecer bem os parâmetros tecnológicos, bem como escolher a melhor formulação (CHEN et al., 2010). A liofilização envolve etapas que podem danificar as vesículas, e para evitar tais danos é necessário o uso de crioprotetores nas formulações (HUA et al., 2003).

Os crioprotetores atuam na proteção dos lipossomas contra os danos causados por cristais de gelo, evitando a agregação das vesículas e prevenindo a fusão dos lipossomas. A ação dos crioprotetores é, portanto, importante para evitar perdas dos compostos encapsulados, evitando o decréscimo da eficiência de encapsulação (VAN WINDEN; CROMMELIN 1999; WOLFE; BRYANT, 1999).

Existem duas teorias propostas na literatura para explicar os efeitos protetores dos carboidratos na membrana dos lipossomas, são elas, a teoria de substituição de água e a vitrificação (CHEN et al., 2010). A primeira é a teoria da substituição das moléculas de água, proposta por CROWE et al. (1984). Tal teoria sugere que as moléculas de açúcares interagem com o grupo da cabeça polar dos fosfolipídios, o que mantém um espaço entre os grupos polares dos fosfolipídios em seu estado desidratado. Este espaço entre os grupos polares dos fosfolipídios é muito semelhante aos lipossomas quando hidratados, o que evitaria uma grande aproximação entre as cabeças polares, e o colapso da estrutura do lipossoma (CROWE et al., 1997, CHEN et al., 2010). A segunda teoria proposta para o efeito protetor dos dissacarídeos sobre os lipossomas é a teoria da vitrificação. Esta teoria sugere que os lipossomas desidratados são estabilizados devido à transformação da solução concentrada contendo o crioprotetor para o estado vítreo (OHTAKE et al., 2004). Em um

determinado ponto do processo de liofilização, a solução de açúcar se torna supersaturada, em seguida, passa para o estado vítreo, prendendo os lipossomas nessa matriz amorfa.

O objetivo principal deste trabalho foi liofilizar e caracterizar as dispersões de lipossomas encapsulando a quercetina.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Para produção das dispersões de lipossomas pelo método de injeção de etanol foi utilizada a lecitina de soja purificada e hidrogenada Phospholipon 90H (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Alemanha) e etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha). A quercetina foi adquirida em sua forma comercial purificada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O carboidrato utilizado como crioprotetor na etapa da liofilização dos lipossomas foi a sacarose (Synth, Diadema, Brasil).

2.2 Métodos

2.2.1 Produção dos lipossomas encapsulando quercetina pelo método da injeção de etanol

Os lipossomas foram produzidos pelo método de injeção de etanol (TREVISAN et al., 2011; ZÔMPERO, 2013). Na fase etanólica foram solubilizados 12 mM de fosfolipídio e 0,3% molar de quercetina a 60° C. Então, esta fase etanólica foi bombeada em água ultra-purificada (Direct-Q® 3, Millipore, Molsheim, França) nas seguintes condições: vazão da fase etanólica de 26 mL/min, intensidade de agitação de 600 rpm (impelidor do tipo Cowles-3 cm de diâmetro) e temperatura de injeção de 60° C.

2.3 Caracterização dos lipossomas

2.3.1 Diâmetro médio hidrodinâmico, distribuição de tamanho e potencial zeta das dispersões de lipossomas

O diâmetro médio hidrodinâmico e a distribuição de tamanho das vesículas foram obtidas por espectroscopia de correlação de fótons utilizando o equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments 27 Company, Holtsville, USA), a 25° C, laser de He-Ne à 627 nm e com o ângulo de incidência de 90°. O potencial zeta foi medido por mobilidade eletroforética através do equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, Holtsville, NY, USA).

2.4 Liofilização das dispersões de lipossomas e caracterização dos pós-liofilizados

2.4.1 Liofilização dos lipossomas

Os lipossomas foram liofilizados após serem congelados em nitrogênio líquido por 2 minutos (YOSHIDA et al., 2010). O processo de secagem foi realizado em um liofilizador modelo L202- Liotop (Liobras, São Carlos, SP, Brasil). O processo ocorreu durante 48 horas, vácuo de 444 µHg e temperatura de congelamento de -53° C. O crioprotetor utilizado nas dispersões de lipossomas foi a sacarose, em uma proporção de sacarose: fosfolipídio de (4:1).

2.4.2 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos lipossomas liofilizados foi visualizada através de um Microscópio Eletrônico de Varredura com Detector de Energia Dispersiva de raios X, (Leo 440i, EDS: 6070, LEO Electron Microscopy/Oxford, Cambridge, Inglaterra).

As partículas foram recobertas com ouro utilizando o equipamento (K450, Sputter Coater EMITECH, Kent, Reino Unido), a espessura da camada de Au nas partículas foi de aproximadamente 200 Å. As imagens foram captadas com uma tensão de aceleração a 5 kV e corrente do feixe a 50 pA.

2.4.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos em varreduras com comprimentos de onda variando de 4000 a 650 cm^{-1} , utilizando o equipamento Perkin Elmer FT-IR Spectrometer (Massachusetts, Estados Unidos), com auxílio do software Spectrum One versão 5.3.1.

2.4.4 Higroscopicidade

A análise de higroscopicidade foi realizada de acordo com CAI E CORKE (2000). Foram pesados 0,17 g dos lipossomas liofilizados. Logo após, os lipossomas liofilizados foram acondicionados em placas de petri e armazenados por sete dias no dessecador contendo solução saturada de cloreto de sódio (UR de 75,3%). O resultado foi medido através da massa de água absorvida pela amostra e expresso em g de água absorvida /100 g da matéria seca.

2.4.5 Isotermas de sorção de umidade

As isotermas de sorção de umidade foram obtidas pelo método gravimétrico (COMUNIAN et al., 2011; SOUZA et al., 2013). Foram pesados 0,17 g dos lipossomas liofilizados, acondicionados em pesa filtros e deixados em equilíbrio em soluções saturadas de sal com a atividade de água variando de 0.143-0.845. A quantidade de água foi determinada através do ganho de massa e a isoterma de sorção de umidade foi construída

a 25° C. Os dados obtidos foram ajustados pelo modelo de GAB através da Equação 1:

$$U_{eq} = \frac{X_m \cdot C_{GAB} \cdot K_{GAB} \cdot a_w}{(1 - K_{GAB} \cdot a_w) \cdot (1 - K_{GAB} \cdot a_w + C_{GAB} \cdot K_{GAB} \cdot a_w)} \quad (1)$$

Sendo: U_{eq} = é a umidade de equilíbrio (g de água/g de matéria seca); X_m = é a umidade da monocamada molecular (g de água/g de matéria seca); a_w = é a atividade de água; C_{GAB} e K_{GAB} = são constantes.

Os parâmetros do modelo de GAB foram determinados através da ferramenta Solver do Microsoft Excel. Tal modelo foi escolhido por apresentar o melhor coeficiente de determinação R^2 e o módulo do desvio relativo médio (DR%), calculado de acordo com a Equação 2:

$$DR = \frac{100}{N} \times \sum \frac{|VE - VP|}{VE} \quad (2)$$

sendo: VE = valor experimental; VP = valor obtido pelo modelo; N = número de observações.

2.4.6 Reconstituição dos lipossomas liofilizados

Foram pesados 0,5 g dos lipossomas liofilizados e reconstituídos em 25 mL de água deionizada. Tais lipossomas foram submetidos ao processo de agitação em uma câmara incubadora com agitação orbital (shaker) (MA-420, Marconi, Piracicaba, Brasil) durante 30 minutos e temperatura de 60° C.

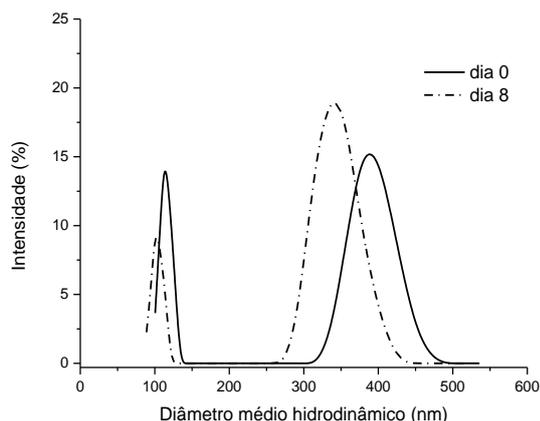
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização das dispersões de lipossomas encapsulando a quercetina produzidos pelo método de injeção de etanol

3.1.1 Diâmetro médio hidrodinâmico e potencial zeta

As distribuições de tamanho das dispersões dos lipossomas encapsulando a quercetina no dia 0 e no dia 8 estão apresentadas na Figura 1. As curvas apresentaram comportamento bimodal e um diâmetro médio hidrodinâmico de 200nm (Tabela 1). Os resultados do diâmetro médio hidrodinâmico, potencial zeta e concentração da quercetina no dia 0 e no dia 8 de armazenamento estão apresentados na Tabela 1.

Figura 1: Curvas de distribuição de tamanho das dispersões de lipossomas encapsulando a quercetina (0,3% molar) ao longo do período de armazenamento.



As características dos lipossomas obtidos, tais como o diâmetro médio e o número de lamelas na bicamada lipídica, dependem de qual método de produção é utilizado. Relata-se que o método de injeção de etanol produz predominantemente

vesículas unilamelares pequenas (SUV), com diâmetros médios entre 150-200 nm (MAITANI et al., 2001; JUSTO; MORAES, 2011), corroborando com os resultados do diâmetro médio hidrodinâmico (Tabela 1).

Tabela 1: Características das dispersões de lipossomas encapsulando a quercetina (0,3% molar) produzidos no dia 0 e no dia 8 de armazenamento.

Parâmetros	Dia 0	Dia 8
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	188±2,1	206±2,7
Zeta potencial (mV)	-13,42±1,77	-10,21±2,25
Quercetina (µg/mL)	0,073±0,006	0,078±0,01

Os valores do potencial zeta (Tabela 1) dos lipossomas foram negativos e variaram no intervalo de -10 até -14 mV. Tais valores indicam que as formulações apresentaram uma boa estabilidade. As partículas das dispersões coloidais que mantêm com um valor grande negativo ou um valor grande positivo de potencial zeta tendem a se repelirem mais fortemente uma das outras, fato que contribui significativamente para sua estabilidade.

Os valores da concentração de quercetina apresentados na Tabela 1 permaneceram praticamente inalterados em todas as dispersões no final do armazenamento. Pode-se considerar baixas as perdas do bioativo encapsulado apresentadas ao final da armazenagem.

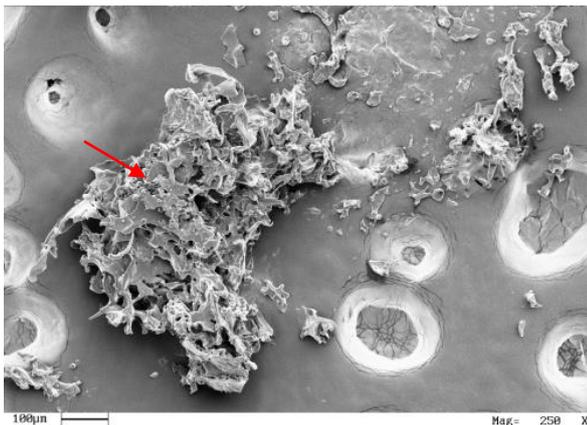
Tais características apresentadas são extremamente importantes para confirmar a estabilidade das dispersões de lipossomas e prosseguir com a etapa de liofilização.

3.2 Caracterização dos lipossomas liofilizados encapsulando a quercetina

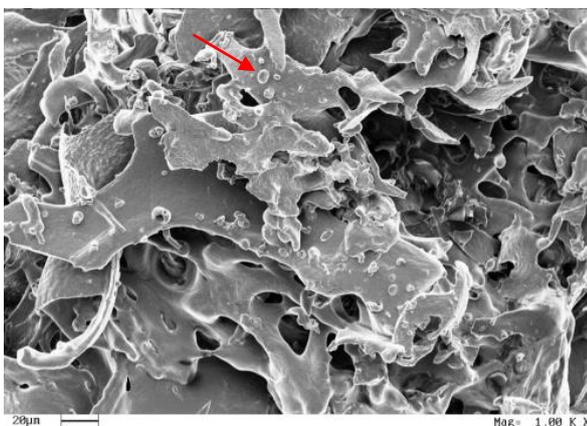
3.2.1 Morfologia por microscopia eletrônica de varredura

As micrografias dos lipossomas liofilizados encapsulando a quercetina na proporção de crioprotetor de sacarose:fosfolípido de (4:1) estão apresentados na Figura 2.

Figura 2 (a), (b) e (c): Micrografias dos lipossomas liofilizados encapsulando a quercetina na proporção de crioprotetor de sacarose:fosfolípido de (4:1).



(a)



(b)



(c)

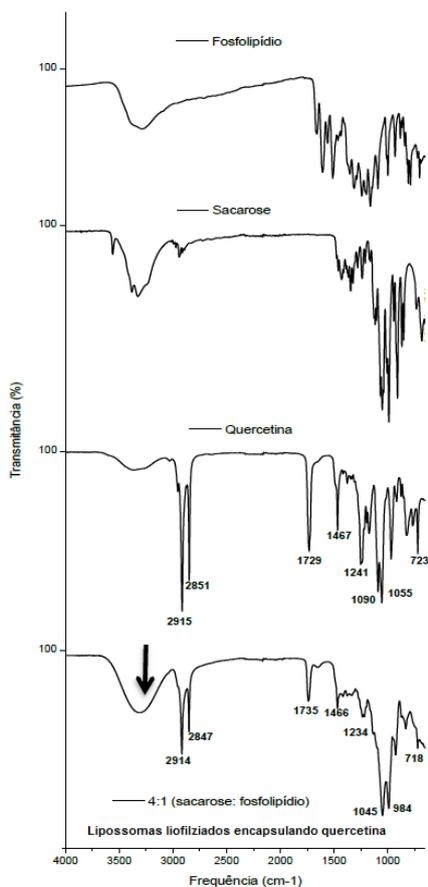
Pode-se observar pela Figura 2 (b) e 2 (c) que foi possível visualizar as estruturas esféricas dos lipossomas liofilizados. O tamanho de partícula dos lipossomas liofilizados apresentou-se heterogêneo, com um dos seus valores de aproximadamente 2 µm. Outro aspecto que pode ser visualizado nas micrografias dos lipossomas liofilizados é devido à sacarose, ou seja, ocorreu uma transformação na estrutura inicial da sacarose e o processo de liofilização originou uma matriz amorfa (Figura 2 a). Esta matriz amorfa protegeu os lipossomas liofilizados contra a fusão das vesículas.

3.2.2 Espectroscopia de infravermelho

Para comprovar as interações moleculares entre a sacarose e os constituintes da membrana lipídica (fosfolípido), foram realizadas análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. Esta análise pode identificar se durante o processo de liofilização ocorrem interações de ponte de hidrogênio entre a ligação P=O da cabeça polar dos fosfolípidos e o grupo OH da sacarose. Após a liofilização, alguns autores encontraram mudanças nas frequências no estiramento assimétrico da ligação P=O (POPOVA; HINCHA, 2003). Outras mudanças similares de frequências que podem ocorrer nos lipossomas liofilizado com

dissacarídeos são nos grupos C=O e C-N (CH₃)₃. (CHEN et al., 2010). Os espectros de infravermelho dos lipossomas liofilizados e das matérias-primas podem ser visualizados na Figura 3.

Figura 3: Espectros de infravermelhos das matérias primas e dos lipossomas liofilizados encapsulando a quercetina



Na formulação de lipossomas liofilizados, nota-se um pico entre 3000 cm⁻¹ - 3600 cm⁻¹, mostrando as ligações de hidrogênio, ou seja, estiramento da ligação O-H da sacarose. Este pico sugere que os grupos O-H da sacarose foram realmente efetivos em criar pontes de hidrogênio com os grupos polares dos fosfolipídios, permitindo assim, a interação entre a sacarose e os fosfolipídios do sistema (YOSHIDA et al., 2010).

3.2.3 Isotermas de sorção de umidade e higroscopicidade

Os dados de umidade de equilíbrio obtidos foram ajustados pelo modelo de GAB. Os parâmetros do modelo de GAB podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros de ajuste para o modelo GAB de isoterma de sorção de umidade nas amostras de lipossomas liofilizados encapsulando a quercetina, na temperatura de 25° C.

Parâmetros	Valor
X _m (% b.s)	4,228
C _{GAB}	0,015
K	1,094
R ²	0,999
DR%	4,09

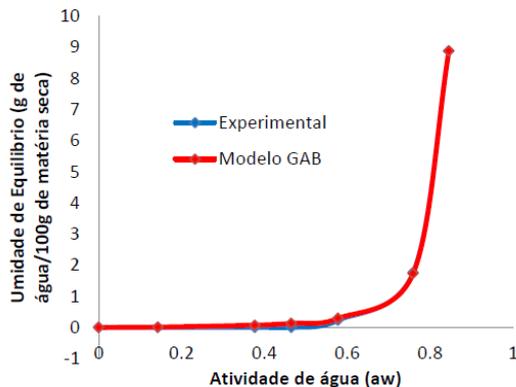
Na Figura 4 pode ser visualizada a isoterma de sorção de umidade dos lipossomas liofilizados encapsulando a quercetina, obtida pelo modelo de GAB.

As isotermas de sorção de umidade são extremamente importantes para prever a estabilidade físico-química dos alimentos quando são submetidos a diferentes condições de umidade, sendo levada em consideração a temperatura de armazenamento dos alimentos (FENNEMA, 2010). Nota-se que o modelo de GAB apresentou um bom ajuste aos dados experimentais, já que foi obtido um valor de R² de 0,999 e um desvio relativo médio de 4,09 %. O modelo de GAB fornece o valor de X_m considerado uma estimativa da umidade da monocamada molecular. Tal valor está relacionado com a estabilidade física e química dos alimentos (FENNEMA, 2010).

O valor de X_m, ou seja, a umidade da monocamada molecular para os lipossomas liofilizados apresentou um valor de 4,228% podendo ser considerado um baixo valor de sorção de água. Nota-se que o valor de X_m apresentou-se favorável mesmo com a adição

da sacarose na formulação das dispersões de lipossomas.

Figura 4: Isoterma de sorção de umidade do lipossoma liofilizado encapsulando quercetina, na temperatura de 25° C: Dados experimentais e ajuste realizado com o modelo de GAB.



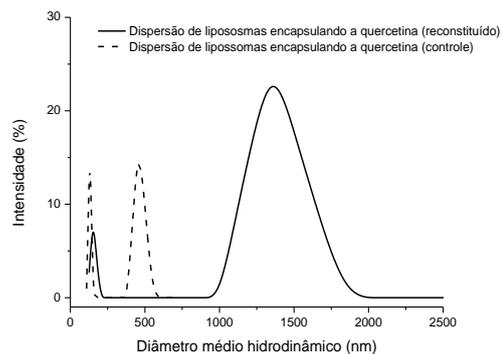
Outro parâmetro que corrobora com o comportamento da isoterma de sorção é o resultado de higroscopicidade dos lipossomas liofilizados encapsulando a quercetina. O valor de higroscopicidade foi de $2,37 \pm 0,97$, indicando que os lipossomas liofilizados são muito pouco higroscópicos, mesmo quando submetidos a uma condição de umidade relativa de 75% a temperatura de 25° C. Tal comportamento é ideal para conservação e estabilidade dos sistemas alimentícios desidratados.

3.2.4 Reconstituição dos lipossomas liofilizados

Através das distribuições de tamanho dos lipossomas reconstituídos (Figura 5), nota-se que os lipossomas se mantiveram somente com as duas populações, porém a segunda população deslocou-se para aproximadamente 1500 nm. Tal fato mostra que houve fusão de parte das vesículas fosfolipídicas, levando a desestabilização do sistema. Por outro lado, a população em aproximadamente 200 nm se manteve,

indicando que, a sacarose foi realmente efetiva na proteção da membrana lipídica.

Figura 5: Distribuição de tamanho da dispersão de lipossomas encapsulando a quercetina reconstituído, após o processo de liofilização e da dispersão de lipossomas encapsulando a quercetina na ausência do processo de liofilização.



4 CONCLUSÕES

- A produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol permitiu a obtenção de vesículas com diâmetros médios hidrodinâmicos de cerca de 250 nm;
- Foi possível obter lipossomas encapsulando quercetina até a porcentagem 0,3 % molar;
- Não houve variação na concentração de quercetina durante oito dias de armazenamento, indicando que não há quase nenhuma tendência de saída do bioativo encapsulado da estrutura lipossomal;
- Foi possível obter lipossomas liofilizados nas condições operacionais utilizadas;
- Os lipossomas liofilizados encapsulando a quercetina apresentaram um valor de X_m de 4,228%, podendo ser considerado um valor baixo de sorção de água.
- O valor de higroscopicidade foi de $2,372 \pm 0,965$, indicando que os lipossomas liofilizados são pouco higroscópicos, comportamento ideal para conservação e

estabilidade dos sistemas alimentícios desidratados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pela bolsa de estudos de Doutorado fornecida (processo 2012/24885-2).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOU, E.; GEORGOPOULOS, A.; KAGKADIS, A.K.; DEMETZOS, C. Preparation and characterization of lyophilized liposomes with incorporated quercetin. **Journal of Liposome Research**, 16, 17-25, 2006.

CAI YZ.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* bethacyanin pigments. **Journal Food Science**, 65, 1248-1252, 2000.

CARVALHO, J.M.P.; TONIAZZO, T.; CALVALCANTI, L. P.; MORAES, I.C.F.; OLIVEIRA, C.L.P.; PINHO, S.C. Physico-chemical stability and structural characterization of thickened multilamellar beta-carotene-loaded liposome dispersions produced using a proliposome method. **Colloid and Polymer Science**. DOI 10.1007/s00396-015-3594-8.

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

COMUNIAN, T.A.; MONTERREY-QUINTERO, E.S.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J.C.C.; PICCONE, P.; PITTIA, P.; FÁVARO-TRINDADE, C.S. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried chlorophyllide, a natural food colourant, using gum Arabic, maltodextrin and soy protein isolate-based carrier systems. **International Journal of Food Science and Technology**, 46, 1259-1265, 2011.

CROWE, J.H.; OLIVER, A.E.; HOEKSTRA, F.A.; CROWE, L.M. Stabilization of dry

membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification. **Cryobiology**, 35, 20-30, 1997.

CROWE, J.H.; WHITTAM, M.A.; CHAPMAN, D.; CROWE, L.M. Interactions of phospholipids monolayers with carbohydrates. **Biochimica et Biophysica Acta**, 769, 151-159, 1984.

FENNEMA, O.R., DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 4 ed. 2010.

GHOSH, A.; MANDAL, A.K.; SARKAR, S.; DAS, N. Hepatoprotective and neuroprotective activity of liposomal quercetin in combating chronic arsenic induced oxidative damage in liver and brain of rats. **Drug Delivery**, 18, 451-459, 2011.

GORTZI, O.; LALAS, S.; CHINO, I.; TSAKNIS J. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. **European Food Research Technology**, 226, 583-590, 2008.

HUA, ZE-ZHAO.; LI, BAO-GUO.; LIU, ZHAN-JIE.; SUN, DA-WEN. Freeze-drying of liposomes with cryoprotectants and its effect on retention rate of encapsulated Ftorafur and vitamin A. **Drying Technology**, 21, 1491-1505, 2003.

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

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

LANDI-LIBRANDI, A.P.; AZZOLINI, A.E.C.S.; DE OLIVEIRA, C.A.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Inhibitory activity of liposomal flavonoids

during oxidative metabolism of human neutrophils upon stimulation with immune complexes and phorbol ester. **Drug Delivery**, 19, 177-187, 2012.

LU, Q.; LI, D-C.; & JIANG, J-G. Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, 13004-13011, 2011.

MAITANI, Y.; SOEDA, H.; JUNPING, W.; TAKAYAMA, K. Modified ethanol injection method for liposomes containing β -sitosterol β -d-glucoside. **Journal Liposome Research**, 11, 115-125, 2001.

OHTAKE, S.; SCHEBOR, C.; PALECEK, S.P. and de PABLO, J.J. Effect of sugar-phosphate mixtures on the stability of DPPC membranes in dehydrated systems. **Cryobiology**, 48, pp. 81-89, 2004.

POOL, H., MENDOZA, S., XIAO, H., McCLEMENTS, D.J. Encapsulation and release of hydrophobic bioactive components in nanoemulsion-based delivery systems: impact of physical form on quercetin bioaccessibility. **Food Function**, 4, 162, 2013.

POPOVA, A.V.; HINCHA, D.K. Intermolecular interactions in dry and rehydrated pure and mixed bilayers of phosphatidylcholine and digalactosylglycerol: a Fourier Transform Infrared Spectroscopy study. **Biophysical Journal**, 85, 1682-1690, 2003.

POUTON, C.W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. **European journal of pharmaceutical sciences**, 29, 278-287, 2006.

SOUZA, V.; B, THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J.C.C.; FÁVARO-TRINDADE, C.;S. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). **Food and bioproducts**

processing.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.11.001>.

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

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

VAN WINDEN, E.C.; CROMMELIN, D.J. Short term stability of freeze-dried, lyoprotected liposomes. **Journal of Controlled Release**, 58, 69-86, 1999.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. **Cryobiology**, 39, 103-129, 1999.

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

ZHAO, L.; XIONG, H.; PENG, H.; WANG, Q.; HAN, D.; BAI, C.; LIU, Z.; SHI, S.; DENG, B. PEG-coated lyophilized proliposomes: preparation, characterization and in vitro release evaluation of vitamin E. **European Food Research and Technology**, 232, pp. 647-654, 2011.

ZÔMPERO, R.H.F. **Desenvolvimento e otimização do método de injeção de etanol para produção de lipossomas contendo β -caroteno visando sua aplicação na indústria de alimentos**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas- (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil, 2013.