

JOHANA CAROLINA ANDRADE CHAPAL

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA
LIPOSSOMAL PARA A ENCAPSULAÇÃO DE EUGENOL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de
Viçosa - Campus Viçosa

T

A553d
2017
Andrade Chapal, Johana Carolina, 1989-
Desenvolvimento de caracterização de um sistema lipossomal
para a encapsulação de eugenol / Johana Carolina Andrade Chapal. -
Viçosa, MG, 2017.
v, 37f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Nilda de Fátima Ferreira Soares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Antioxidantes. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos.
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
II. Título.

CDD 22 ed. 547.71

JOHANA CAROLINA ANDRADE CHAPAL

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA
LIPOSSOMAL PARA A ENCAPSULAÇÃO DE EUGENOL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 09 de fevereiro de 2017.

Ana Clarissa dos Santos Pires
(Coorientadora)

Afonso Mota Ramos
(Coorientador)

Eber Antonio Alves Medeiros

Nilda de Fátima Ferreira Soares
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas pessoas, os lugares e as experiências que tem me permitido conhecer ao longo do maior dos seus presentes, a vida.

À minha mãe, mulher que com sabedoria tem formado uma família unida pela força do amor.

Ao meu Pai, que está pertinho de Deus me ajudando do céu.

Aos meus irmãos JuanFe e Migue, a maior fonte de inspiração e alegria.

À minha orientadora, a professora Nilda, por me permitir fazer parte da sua equipe de trabalho, o que abriu as portas do mundo da ciência pra mim. Muito obrigada pela confiança e as palavras cheias de conhecimento que levarei comigo pra sempre.

Aos meus co-orientadores, a professora Ana Clarissa e o professor Afonso, pessoas que sempre tiveram a palavra certa no momento certo, palavras de ciência, mas também de vida que me encheram de força durante o caminho que percorremos juntos.

Ao professor Eber, por acompanhar de perto cada dia da minha formação como mestre, pelo carinho, pelo apoio inesquecível e por aquelas conversas com as quais aprendi 80 % do meu português e grande parte da cultura do Brasil.

À minha família do Labem, porque do seu lado aprendi amar a ciência, conheci o grande valor da amizade e fui realmente feliz. Gostaria de expressar minha gratidão com palavras, mas isto é realmente impossível, porque as palavras só podem descrever o que tem limite e este não é o caso.

À minha amiga Michele, por ser meu apoio desde o momento que nos conhecemos, por tantos momentos compartilhados, pela paciência e o grande carinho que só podem nascer de um nobre coração.

Aos meus amigos colombianos, porque a distância nunca foi impedimento para estarem presentes na minha vida. Muito obrigada por me escutarem, por seus conselhos e as orações que encheram de benção minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPITULO I	
REVISÃO DE LITERATURA.....	2
1.1. Encapsulação.....	2
1.1.1. Técnicas de encapsulação.....	3
1.1.2. Lipossomas.....	4
1.1.3. Técnicas de produção de lipossomas.....	5
1.1.4. Composição dos lipossomas.....	5
1.1.5. Capacidade de encapsulação.....	7
1.1.6. Compostos encapsulados na área alimentar.....	8
1.1.6.1. Óleos Essencias.....	9
1.1.6.2. Eugenol.....	11
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
CAPITULO II	
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA LIPOSSOMAL PARA A ENCAPSULAÇÃO DE EUGENOL.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1. Material.....	20
2.2. Delineamento experimental de otimização.....	20
2.3. Preparação de lipossomas.....	20
2.4. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta (ζ).....	21
2.5. Eficiência de encapsulação.....	21
2.6. Espectrofotometria no infravermelho por transformada de Fourier-FTIR.....	21
2.7. Estabilidade do sistema lipossomal.....	22
2.8. Liberação in vitro.....	22
2.9. Capacidade antioxidante por inibição do DPPH.....	22
2.10. Capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).....	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
3.1. Otimização do tratamento.....	23
3.2. Eficiência de encapsulação.....	24
3.3. Estabilidade cinética lipossomal.....	25
3.4. Liberação In vitro.....	27
3.5. Capacidade antioxidante.....	29
4. CONCLUSÕES.....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
CONCLUSÃO GERAL.....	34

RESUMO

Chapal, Johana Carolina Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro, 2017. **Desenvolvimento e caracterização de um sistema lipossomal para a encapsulação de eugenol.** Orientadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Coorientadores: Ana Clarissa dos Santos Pires e Afonso Mota Ramos

Neste trabalho estudou-se o desenvolvimento de vesículas lipossomais utilizando o método de hidratação de filme lipídico para a nanoencapsulação do eugenol. Lipossomas elaborados a partir de diferentes concentrações de lecitina de soja, esfingomiéline e colesterol foram avaliados em função do diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e eficiência de encapsulação, para a determinação do tratamento de maior estabilidade cinética e poder de encapsulação. O sistema escolhido (com e sem eugenol) foi avaliado durante 2 meses na temperatura de 4 °C, para monitorar alterações vesiculares no tamanho e a carga superficial, estudou-se também a liberação *in vitro* e a capacidade antioxidante do eugenol livre e encapsulado. O sistema lipossomal desenvolvido atingiu $80,9 \pm 2,5$ % de eficiência de encapsulação, estruturou-se por vesículas com 98,6 nm de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta de -49,5 mV, mantendo sua estabilidade durante o período total de avaliação. O estudo de liberação *in vitro* do eugenol, demonstrou que este processo ajustou-se ao modelo matemático de Higuchi que descreve a liberação como um processo controlado pela difusão. Finalmente, o estudo revelou que o sistema lipossomal desestabilizou-se nas soluções de DPPH e ABTS utilizadas para a avaliação da capacidade antioxidante.

ABSTRACT

Chapal, Johana Carolina Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro, 2017. **Desenvolvimento e caracterização de um sistema lipossomal para a encapsulação de eugenol.** Adviser: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Co-advisers: Ana Clarissa dos Santos Pires e Afonso Mota Ramos

This work studied the development of the vesicle population of liposomes using the method of lipid film hydration to the nanoencapsulation of eugenol. Liposomes prepared from different concentrations of soy lecithin, sphingomyelin and cholesterol were assessed in the light of the hydrodynamic diameter, zeta potential and efficiency of encapsulation, for determining the treatment of greater stability and kinetic power of encapsulation. The system chosen (with and without eugenol) was evaluated during 2 months in the temperature of 4° C, to monitor changes in the vesicular size and surface charge, also studied *in vitro* release and the antioxidant capacity of eugenol free and encapsulated. The liposomal system developed has reached $80.9 \pm 2.5\%$ efficiency of encapsulation, structured by vesicles with 98.6 nm in diameter and zeta potential of hydrodynamic -49.5 mV, keeping your stability during the total period of evaluation. The study of *in vitro* release of eugenol, demonstrated that this process set to mathematical model of Higuchi describing the release as a diffusion-controlled process. Finally, the study revealed that the liposomal system destabilized the DPPH solutions and ABTS used for assessment of antioxidant capacity. Finally, the study revealed that the liposomal system destabilized the DPPH solutions and ABTS used for assessment of antioxidant capacity.

INTRODUÇÃO GERAL

A encapsulação é uma das principais alternativas de entrega de compostos ativos utilizados na área de alimentos para o desenvolvimento de produtos funcionais e embalagens ativas. Com este propósito, várias técnicas tem-se desenvolvido, dentre elas, uma das mais recentes dentro da área de alimentos corresponde à encapsulação em lipossomas, vesículas que por suas características estruturais podem carregar diversos compostos, ponto neurálgico, que faz desta técnica um potencial objeto de estudo.

A capacidade de encapsulação dos lipossomas é consequência principalmente da sua composição, a qual baseia-se em fosfolipídios e aditivos, sendo sua escolha e proporção fatores preponderantes, pois cada composto, quanto a sinergia entre eles vai determinar a eficiência de encapsulação, a estabilidade cinética no tempo, a dinâmica de liberação e o grau de proteção dos compostos encapsulados.

Na área de alimentos, os compostos bioativos geralmente são encapsulados em resposta a sua elevada sensibilidade ante fatores externos que afetam a funcionalidade, disponibilidade e tempo de ação, dificultando consequentemente seu uso. Este é o caso do eugenol, composto majoritário do óleo essencial de cravo, com comprovada capacidade antimicrobiana e antioxidante, no entanto, altamente sensível (à temperatura, umidade, oxigênio, etc.) e volátil, fatores que limitam sua utilização ao nível comercial.

Neste contexto, a presente pesquisa estudou o desenvolvimento e caracterização de um sistema lipossomal para a encapsulação do eugenol utilizando o método de hidratação de filme lipídico, com o intuito de conhecer a estabilidade cinética do sistema no tempo, a eficiência de encapsulação, o mecanismo de liberação do eugenol encapsulado, assim como sua capacidade antioxidante.

CAPITULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1.1. ENCAPSULAÇÃO

A encapsulação é um processo que utiliza um material de suporte para conter determinadas substâncias denominadas, geralmente, agentes ativos ou núcleo, se consolidando como uma ferramenta útil para melhorar a liberação de moléculas e células vivas por meio de partículas que possuem diâmetros que vão desde alguns nanômetros (nm) até micrômetros (μm) (NEDOVIC et al., 2011).

Originalmente esta tecnologia foi introduzida na área de biotecnologia para melhorar a eficiência nos processos de separação das células produtoras de seus metabólitos, alcançando especial relevância no setor de alimentos e farmacêutico. Na indústria de alimentos tem sido aplicado para fornecer ingredientes líquidos e sólidos proporcionando uma barreira física eficaz entre estes e o meio externo (matriz alimentar), sendo que frequentemente são afetados por fatores, tais como o oxigênio, luz, radicais livres, pH, umidade, etc. (DESAI e PARK, 2005; SALDAÑA et al., 2015).

Nos últimos anos a encapsulação tem sido amplamente aplicada devido à crescente demanda por alimentos funcionais, mais saudáveis e seguros que gerem bem-estar ao consumidor além das suas funções nutricionais básicas, perspectiva que requer indiscutivelmente a inclusão de compostos bioativos (carotenóides, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, co-enzimas, polifenóis, entre outros) nos diferentes produtos.

No entanto, estes compostos geralmente apresentam baixa solubilidade nas matrizes alimentares a qual limita a absorção e a biodisponibilidade, além disso muitos desses compostos ao serem extraídos das suas fontes animais ou

vegetais são quimicamente instáveis aos diferentes fatores externos (RAY et al., 2016).

Desta maneira é crucial o estudo da encapsulação como uma medida de proteção, aumento do desempenho e disponibilidade dos bioativos se tornando uma medida cada vez mais importante devido à capacidade de liberar de forma efetiva e controlada os compostos do núcleo, além de poder ressaltar atributos desejáveis e mascarar os indesejáveis preservando suas propriedades físico-químicas, promovendo o desenvolvimento de produtos com alto valor agregado e um desempenho superior, que garante a versatilidade tanto nos alimentos e bebidas quanto nas embalagens que os contem.

1.1.1. Técnicas de encapsulação

Dentro da área de alimentos tem-se estudado várias técnicas de encapsulação divididas em métodos físicos (extrusão, liofilização, secagem por atomização), métodos químicos (polimerização interfacial, inclusão molecular) e métodos físico-químicos (coacervação simples, coacervação complexa, emulsão, partículas lipídicas sólidas, lipossomas) (GIBBS et al., 1999; DESAI e PARK, 2005; AUGUSTIN e HEMAR, 2009; ROCHA et al., 2012; RAY et al., 2016).

A escolha da técnica adequada de encapsulação implica a análise de uma série de fatores na procura de um processo seguro e efetivo. Dentre os fatores em consideração se encontram: características físico-químicas do composto a encapsular, condições de processamento, mecanismo de liberação, tamanho de partícula e densidade necessários para incorporá-lo corretamente no produto final (RODRIGUEZ et al., 2016).

Assim, também a escolha do material de encapsulação é um fator importante pois tem influência sobre a eficiência de encapsulação, a morfologia final e a estabilidade do sistema (RAY et al., 2016). O material ideal deve ser biodegradável, ter boas propriedades reológicas, ser de fácil manipulação, liberar completamente os solventes ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação, ser estável para não apresentar reatividade química com os materiais do núcleo, ter a capacidade de manter o material ativo dentro de sua

estrutura durante o processamento e armazenamento e fornecer proteção máxima para o material ativo contra as condições ambientais (DESAI e PARK, 2005).

Os fosfolipídios se destacam entre os materiais estudados pois formam estruturas organizadas denominadas lipossomas, capazes de conter diversos compostos, sendo uma alternativa com alto potencial de encapsulação especialmente dos compostos lipofílicos.

1.1.2. Lipossomas

O estudo dos lipossomas começou com a descoberta feita por Alec Bangham em 1965, sobre o comportamento de determinados lipídios anfílicos chamados fosfolipídios, os quais por ter uma cabeça polar e caudas apolares mostraram capacidade de se organizarem em bicamadas e formarem vesículas esféricas em meio aquoso, capazes de oferecer barreira para a difusão do soluto, sendo este o ponto de partida no estudo de lipossomas, o qual tem sido profundamente estudado na área farmacêutica, sendo ainda recente na indústria de alimentos (SAKATA et al., 2007).

Estes correspondem a sistemas carregadores coloidais, sob a forma de vesículas esféricas que geralmente se apresentam em escala nanométrica e podem ser constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídios, que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (GREGORIADIS e RYMAN, 1972; FRÉZARD et al., 2005; FANG et al., 2006). De este modo as caudas hidrofóbicas dos lipídios estão voltadas para interior das vesículas em quanto suas cabeças polares estão para o exterior da bicamada, mantendo o contato com a fase aquosa (RANADE, 1989).

O composto encapsulado é orientado pela sua hidrofílicidade ou lipofílicidade; os compostos hidrofílicos tendem a permanecer no compartimento central aquoso e os compostos lipofílicos encontram-se dispersos na bicamada lipídica (GILLET et al., 2009). Enquanto a liberação das moléculas controlada pela membrana lipídica geralmente por meio de um processo de difusão lenta.

O grande valor dos lipossomas se dá pelo fato das vesículas poderem ser preparadas a partir de fontes naturais e seguras, tais como gema de ovo, soja ou leite, com a finalidade de se obter uma estrutura idêntica à porção lipídica das

membranas biológicas, promovendo uma boa absorção, aumentando a disponibilidade dos compostos protegendo-os da degradação e no caso dos compostos lipofílicos aumentando sua solubilidade.

O conjunto de características dos lipossomas fazem deles um sistema de potencial aprovação para seu uso em alimentos (JUVERIYA et al., 2016), o que implica uma demanda crescente por estudos que caracterizem estes sistemas de encapsulação, desde sua composição, mecanismos de liberação, capacidade de carga de diferentes biocompostos, técnicas de produção, entre outros.

1.1.3. Técnicas de produção de lipossomas

Várias técnicas tem-se estudado entre elas as mais destacadas são: injeção de etanol, evaporação em fase reversa, liofilização, congelamento e descongelamento, rápida expansão da solução supercrítica, processo de secagem solução gás-saturado (GSS) e hidratação de filme lipídico; esta última a mais utilizada e profundada na área de alimentos.

1.1.3.1. Hidratação de filme lipídico

Este processo consiste na dissolução dos fosfolípidios em solvente orgânico, o qual evapora-se para a formação de um filme lipídico fino com a subsequente hidratação deste filme com água ou uma solução tampão sob agitação mecânica vigorosa e uma temperatura a baixo da temperatura de transição de fase dos fosfolípidios, o que leva à formação das vesículas, geralmente, este processo é seguido por agitação por ultrassom, onde a energia liberada promove a redução do raio das vesículas (BANGHAM et al., 1965).

1.1.4. Composição dos lipossomas

Os lipossomas convencionais são compostos de fosfolípidios e colesterol, geralmente possuem carga positiva ou negativa para evitar a agregação das vesículas, aumentando a estabilidade da dispersão.

Dependendo dos objetivos que se deseja obter com a encapsulação se determinará a composição da membrana, pois as características dos fosfolipídios que a compõem quanto a presença de aditivos nela vai determinar propriedades das membranas tais como espessura, fluidez, permeabilidade e polaridade, relacionados diretamente com a eficiência de encapsulação, controle do vazamento durante o armazenamento e a liberação eficaz do composto ativo (GALVÃO et al., 2016).

Cada fosfolipídio tem uma geometria diferencial que marca um padrão individual de empacotamento membranal, padrão determinado principalmente pelo comprimento das caldas apolares, assim fosfolipídios de cadeias mais longas geram lipossomas mais estáveis e com bom controle de vazamento devido a maior força de atração de Van der Waals entre as cadeias o que promove uma boa coesão (HUNTER et al., 2001). Igualmente, o grupo de cabeça apresenta um papel principal, pois determina a carga superficial negativa ou positiva das vesículas influenciando o potencial zeta e conseqüentemente a estabilidade dos lipossomas (SEELIG et al., 1987). Esta é a razão que explica o prolongado tempo de vida útil dos sistemas lipossomais baseados em fosfolipídios fortemente carregados, os quais apresentam maior repulsão eletrostática entre as vesículas, fato que evita a agregação e mantém a biodisponibilidade dos compostos encapsulados.

Outro fator importante é o grau de saturação destes fosfolipídios o qual está associado com a temperatura de transição de fase (temperatura na qual tem-se uma troca de uma fase cristalina líquida desordenada para uma fase gel ordenada), que afeta de perto as propriedades membranais e conseqüentemente seu grau de empacotamento (BOWMAN et al., 2013).

Do mesmo modo é possível a inclusão de aditivos à membrana lipossomal. Dentre os aditivos mais utilizados, está o colesterol, esterol que reduz a liberdade rotacional das cadeias de hidrocarboneto dos fosfolipídios o que contribui na organização, dinâmica e função da bicamada lipídica, minimizando a perda do material encapsulado durante o armazenamento (ZHAO et al., 2015). Um exemplo específico é a associação de esfingomielina-colesterol que gera um condensado complexo fortemente estabilizado por ligações de hidrogênio, utilizado geralmente na formulação de lipossomas que vão se incorporar em

potenciais matrizes alimentares com elevada concentração de açúcares ou sais (MANOJLOVIC et al., 2008).

Os fitoesteróis: β -sitosterol, estigmasterol e 6-ketocolesterol, esteroides naturais similares em estrutura e função ao colesterol, foram testados na elaboração de lipossomas. O 6-ketocolesterol apresentou menor tamanho de partícula e um empacotamento melhorado frente ao colesterol, o que mostra a possibilidade da utilização de fitoesteróis para suprir o colesterol (ZHAO et al., 2015b).

Igualmente tem-se estudado a modificação da composição tradicional da bicamada lipídica de lipossomas expostos às forças mecânicas geradas durante a elaboração de alimentos por meio da inclusão de biopolímeros como quitosana, alginato, poli ácido láctico entre outros, os quais originam uma camada superficial no lipossoma utilizando a técnica eletrostática “camada a camada” onde a carga superficial dos lipossomas pode atrair biopolímeros de carga oposta melhorando sua estabilidade física.

1.1.5. Capacidade de encapsulação

São dois os fatores importantes em relação à capacidade de encapsulação de substâncias em lipossomas: a taxa de encapsulação e a capacidade de carga. Com a finalidade de atingir os melhores valores deve-se levar em consideração as características tanto do material estruturador do lipossoma quanto do composto do núcleo, assim como a técnica de elaboração, sendo todas elas determinantes no êxito do processo.

Como foi mencionado no item anterior a estrutura do lipossoma está relacionada diretamente com a fluidez, permeabilidade, espessura e carga da membrana marcando indiscutivelmente a capacidade de encapsulação. Igualmente, a interação molecular entre o composto encapsulado e a membrana lipídica é outro fator em discussão, sendo importante entender as interações que se produzem para explicar os mecanismos que intervêm no processo de carga.

Nesse contexto, a natureza do núcleo é um fator categórico, assim taxas de encapsulação próximas a 100% podem ser obtidas com substâncias lipofílicas incorporadas na membrana dos lipossomas por meio de diferentes métodos de

elaboração. O método mais utilizado é hidratação de filme lipídico, no entanto, no caso de substâncias hidrofílicas é improvável atingir esses níveis de encapsulação com este mecanismo, devido à coexistência dos compartimentos aquosos interno e externo, de maneira que uma grande quantidade do composto tende a permanecer no meio de hidratação devido à afinidade molecular com água gerando uma baixa eficiência de encapsulação (RAMAZANI et al, 2016).

Neste caso é recomendável utilizar outros métodos como evaporação em fase reversa, ciclos de congelamento e descongelamento e desidratação e hidratação de vesículas vazias, os quais tem melhorado a eficiência de encapsulação de compostos hidrofílicos (RAMAZANI et al, 2016).

Também, deve-se verificar se a substância está efetivamente incorporada na membrana e não simplesmente adsorvida na sua superfície ou auto-associada na forma de microcristais em suspensão com os lipossomas, se torna um fator chave na eficiência de encapsulação.

1.1.6. Compostos encapsulados na área alimentar

O uso de lipossomas como um meio de liberação controlada de saborizantes, pigmentos e compostos ativos naturais é uma alternativa promissora devido à capacidade de proteção ante as diferentes condições ligadas às matrizes alimentares e aos processos de elaboração envolvidos, além do aumento da disponibilidade e bioatividade destes compostos.

Isto desencadeia uma série de estudos na encapsulação de compostos de importância na indústria de alimentos dentre os quais se destaca a encapsulação do ácido ascórbico e tocoferol, os quais foram carregados em lipossomas e posteriormente incorporados em suco de maçã, suco de laranja e em produtos lácteos melhorando sua bioatividade (MARSANASCO et al., 2011; WECHTERSACH et al., 2012). O óleo de peixe também foi encapsulado num sistema lipossomal utilizando o método de injeção de etanol, que mascarou as características indesejáveis próprias deste produto como cheiro e odor, obtendo um suplemento alimentício com elevado conteúdo de ômega-3 (AMNUAIKIT et al., 2016). Da mesma forma, nanolipossomas de fosfatidilcolina foram uma boa alternativa para evitar a perda de tiamina durante a elaboração de alimentos num

sistema que apresentou estabilidade durante três meses inclusive frente a elevadas temperaturas (JUVERIYA et al., 2016).

Lipossomas recobertos também foram estudados; elaborados a partir de fosfolipídios de soja e recobertos com proteína isolada de soro (WPI) foram utilizados no encapsulamento de quercetina, para ser aplicados numa bebida láctea funcional, conseguindo mascarar as desagradáveis características sensoriais do composto ativo. Além disso o recobrimento permitiu uma maior estabilidade dos lipossomas ao protegê-los das forças osmóticas que surgem das quantidades consideráveis de açúcares e sais contidos na bebida mantendo a estabilidade por três meses sob temperatura de refrigeração (FRENZEL e STEFFEN-HEINS, 2015).

Polifenóis obtidos do extrato de sementes de uva também foram encapsulados em lipossomas (1,1 % m/m lecitina de soja) recobertos com quitosana (1 % m/m), utilizando o método de homogeneização a alta pressão. Os lipossomas recobertos permitiram maior controle na liberação dos polifenóis, mantendo sua bioatividade por um tempo prolongado quando comparados com o encapsulado em lipossomas simples e com o composto livre, esses lipossomas geraram um sistema mais estável que permitiram sua utilização em alimentos a com elevado conteúdo de água (GIBIS et al., 2016).

1.1.6.1. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são basicamente tocoferóis e polifenóis sintetizados como metabólitos secundários das plantas aromáticas (BAKKALI et al., 2008). Seus componentes principais apresentam amplo espectro de atividade biológica, destacando-se a atividade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante (NYCHAS, 1995; BURT, 2004), fato que leva a sua aplicação nas diferentes áreas, especialmente farmacêutica e de alimentos (CRISTIANI et al., 2007).

No entanto, se caracterizam por um aroma forte e uma elevada volatilidade, além da sua sensibilidade ao oxigênio, luz, umidade e temperatura o que leva à perda dos princípios ativos durante a estocagem, esses fatores têm dificultado a aplicação de óleos essenciais em escala comercial (LAGUERRE et al., 2007; THEODOULOU e EASTMOND, 2012; RODRIGUEZ et al., 2016).

É por isso que a encapsulação tem sido aplicada como uma alternativa de solução viável, sendo o sistema lipossomal um dos métodos mais eficientes, conseguindo controlar a volatilidade dos óleos essenciais por meio da liberação modulada, aumenta a estabilidade física, melhora a bioatividade e mascara odores e sabores, que se não forem controlados limitam seu uso, pois mudam as características sensoriais próprias do alimento (SHI et al., 2012; BILIA et al., 2016).

Um exemplo disto é a encapsulação num sistema lipossomal baseado em fosfatidilcolina de carvacrol e timol, compostos obtidos do óleo essencial de *Origanum dictamnus* L.. Neste estudo foi testada a capacidade antioxidante bem como a sua atividade antimicrobiana sobre as bactérias gram negativas e positivas, e também sobre a patogenicidade da *Listeria monocytogenes* presente em alguns alimentos. Os resultados mostraram maior capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana quando estes compostos se foram encapsulados do que na sua forma pura, sendo o timol um antimicrobiano mais potente que o carvacrol contra a maioria dos micro-organismos testados (LIOLIOS et al., 2009). Este fato também foi verificado em óleo essencial de cravo encapsulado em lipossomas elaborados a partir da lecitina de soja e colesterol (5:1), melhorando a estabilidade química do óleo essencial, prolongando assim, seu tempo de ação antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* em tofu (CUI et al., 2015). Os resultados expostos, junto a outros realizados no mesmo campo de pesquisa podem indicar o uso deste tipo de compostos como potentes agentes de conservação na indústria de alimentos.

Do mesmo modo, na área de embalagens para alimentos, também tem-se estudos desenvolvidos, fomentados principalmente pelo crescente interesse em produtos minimamente processados sem aditivos, nem conservantes artificiais, especialmente na Europa, que após a publicação de novos regulamentos sobre o uso deste tipo de materiais em contato com alimentos, implica em maior demanda de antimicrobianos e antioxidantes naturais contidos na embalagem, para estender o período de vida útil dos alimentos, contribuindo para sua qualidade e segurança (GOÑI et al., 2016).

Entre os estudos realizados se destaca a encapsulação do óleo essencial de canela em lipossomas elaborados com lecitina de soja e colesterol, pelo método

de hidratação de filme lipídico com eficiência de encapsulação do 92% e tamanho de partícula de 107 nm, que posteriormente, foram incorporados num filme de gelatina sem apresentar nenhuma reação química. O estudo demonstrou aumento na estabilidade antimicrobiana junto com a diminuição da velocidade de liberação do óleo essencial dos filmes elaborados com lipossomas quando comparados com os tratamentos que continham o óleo livre. Estes resultados indicam que lipossomas são uma alternativa potencial no desenvolvimento de embalagens ativas pois promovem a liberação controlada dos compostos ativos o que leva a um aumento no tempo de vida útil dos alimentos embalados (WU et al., 2015).

1.1.6.2. Eugenol

O Eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$; 4-alil-2-metoxi fenol) (Figura 1) é um composto aromático encontrado em óleos essenciais de canela, louro, noz-moscada, manjerição e cravo (MALLAVARAPU et al., 1995; ABAUL et al., 1995; MALLAVARAPU e RAMESH, 1998). Apresenta atividade antifúngica, antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória (MANOHAR et al., 2001 e GAYOSO et al., 2005). É reconhecido como seguro pela Food and Drug Administration (BASKARAN et al., 2010), e aprovado pela Comissão Europeia como agente aromatizante em alimentos (BURT, 2004).

No entanto apresenta as mesmas limitações que os óleos essenciais, por conseguinte, a encapsulação é considerado um método adequado para superar as limitações e permitir o aproveitamento integral de suas propriedades (CHATTERJEE et al., 2013). Assim, vários estudos tem-se desenvolvido na encapsulação deste composto em diferentes sistemas entre os quais estão as nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas de quitosana, micelas, nanocapsulados de maltodextrina e goma arábica, entre outros (CHEN et al., 2010 ; SINGH, 2011; CHATTERJEE, 2013).

Sebaaly (2015) utilizou o método de injeção por etanol para a obtenção de lipossomas carregados com eugenol obtendo uma melhoria na bioatividade do composto, visando sua aplicação na indústria de alimentos e farmacêutica. No entanto, ainda restam muitos fatores por avaliar frente a estes sistemas de

encapsulação, sendo a pesquisa, a melhor resposta aos questionamentos que contornam a temática.

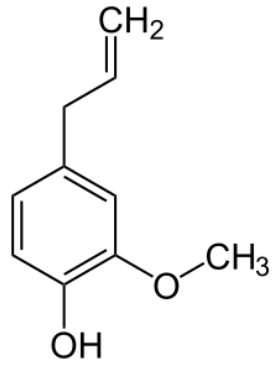


Figura 1. Estrutura química do eugenol

Referências Bibliográficas

ABAUL, J.; BOURGEOIS, P.; BESSIERE, J. Chemical composition of the essential oils of chemotypes of *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (P. Miller) J. W. Moore of Guadeloupe (F. W. I.). **Flavour and Fragrance Journal**, v.10, p.319-321, 1995.

AMNUAIKIT, T. Formulation development and preparation of fish oil liposome by using high pressure homogenizer for food supplement product. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, v.11, p.126-127, 2016.

AUGUSTIN, M.; HEMAR, Y. Nano and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society Reviews**, v.38, p.902-912, 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils-A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.

BANGHAM, D.; STANDISH, M.; WATKINS, J. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v.13, p.238-252, 1965.

BASKARAN, Y.; PERIYASAMY, V.; VENKATRAMAN, A. Investigation of antioxidant, antiinflammatory and DNA protective properties of eugenol in thioacetamide induced liver injury in rats. **Toxicology**, v.268, p.204-212, 2010.

BILIA, A.; BERGONZI, M.; GUCCIONE, C.; MANCONI, M.; FADDA, A.; SINICO, CH. Vesicles and micelles: Two versatile vectors for the delivery of natural products. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.32, p.241-255, 2016.

BOWMAN, B.; OFNER, C.; SCHOTT, H.; PERRIE, Y. Colloidal dispersions, **Remington essentials of pharmaceuticals**, London: Pharmaceutical Press, ed.1, 2013, pp. 343-364.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

CHATTERJEE, D.; BHATTACHARJEE, P. Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: Shelf-life and frying stability of soybean oil. **Journal of Food Engineering**, v.117, p.545-550, 2013.

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

CUI, H.; ZHAO, CH.; LIN, L. The specific antibacterial activity of liposome encapsulated Clove oil and its application in tofu. **Food Control**, v.56, p.128-134, 2015.

LAGUERRE, M.; CRISTIANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v.46, p.244-282, 2007.

DESAI, K. e PARK, H. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. **Journal of Micro-encapsulation**, v.22, p.179-192, 2005.

FANG, J.; HWANG, T.; HUANG, Y.; FANG, C. Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and etanol. **International Journal of Pharmaceutics**, v.310(1), p.131-138, 2006.

FRENZEL, M. e STEFFEN-HEINS, A. Whey protein coating increases bilayer rigidity and stability of liposomes in food-like matrices. **Food Chemistry**, v.173, p.1090-1099, 2015.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.; ROCHA, O.; DEMICHELI, C. Liposomes: Physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony based chemotherapy. **Química Nova**, v.28 (3), p.511-518, 2005.

GAYOSO, C.; LIMA, E.; OLIVERIRA, V.; PEREIRA, F.; SOUZA, E.; LIMA, I.; NAVARRO, D. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to Eugenia caryophyllata essential oil and eugenol. **Fitoterapia**, v.76, p.247-249, 2005.

GIBBS, B.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.50, p.213-224, 1999.

GIBIS, M.; RUEDT, CH.; WEISS, J. In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. **Food Research International**, 2016.

GILLET, A.; GRAMMENOS, A.; COMPÈRE, P.; EVRARD, B.; PIEL, D. Development of a new topical system: Drugin cyclodextrin-in-deformable liposome. **International Journal of Pharmaceutics**, v.380 (1-2), p.174-180, 2009.

GOÑI, M; GAÑAN, N.; STRUMIA, M.; MARTINI, R. The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. **Journal of Supercritical Fluids**, v.111, p.28-35, 2016.

GREGORIADIS, G.; RYMAN, B. Lysosomal localization of β -fructofuranosidase- containing liposomes injected into rats. **Biochemical Journal**, v.129(1), p.123-133, 1972.

HUNTER, R.; MIDMORE, B.; ZHANG, H. Zeta potential of highly charged thin double-layer systems. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.237(1), p.147-149, 2001.

JUNG, J. E PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. **Journal of Supercritical Fluids**, v.20, p.179-219, 2001.

JUVERIYA, F., FATHIMA, I.; ABHISHEK, V.; KHANUM, F. Phosphatidylcholine, an edible carrier for nanoencapsulation of unstable thiamine. **Food Chemistry**, v.197, p.562-570, 2016.

MALLAVARAPU, G.; RAMESH, S.; CHANDRASEKHARA, R.; RAO, B.; KAUL, P.; BHATTACHARYA, A. Investigation of the essential oil of cinnamon leaf grown at Bangalore and Hyderabad. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 10, p. 239-242, 1995.

MALLAVARAPU, G. e RAMESH, S. Composition of essential oils of nutmeg and mace. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v.20, p.746-748, 1998.

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N.; ECHARD, B.; BAGCHI, D.; PREUSS, H. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.228, p.111-117, 2001.

MANOJLOVIC, V.; WINKLER, K.; BUNJES, V.; NEUB, A.; SCHUBERT, R.; BUGARSKI, B.; LENEWEIT, G. Membrane interactions of ternary phospholipid/cholesterol bilayers and encapsulation efficiencies of a RIP II protein. **Colloids Surfaces, B: Biointerfaces**, v. 64, p.284-296, 2008. a

MARSANASCO, M.; MÁRQUEZ, A.; WAGNER, J.; CHIARAMONI, N. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. **Food Research International**, v.44, p. 3039-3046, 2011.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v.1, p.1806-1815, 2011.

NYCHAS, G. Natural antimicrobials from plants. **New methods of food preservation**, London: Blackie Academic Professional. 1995, p. 58-89.

RAMAZANI, F.; CHEN, W.; VAN, C.; STORM, G.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T.; HENNINK, W.; KOK, R. Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: State-of-the-art and challenges. **International Journal of Pharmaceutics**, v.499, p.358-367, 2016.

- RANADE, W. Drug delivery systems. Site specific drug delivery using liposomes as carriers. **Journal Clinical Pharmacology**, v.29, p.685-694, 1989.
- RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, v.13, p.76-83, 2016.
- ROCHA, G.; FAVARO-TRINDADE, C.; GROSSO, C. Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, v.90(1), p.37-42, 2012.
- RODRÍGUEZ, J.; MARTÍN, M.; RUIZ, M.; CLARES, B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v.83, p.41-59, 2016.
- SAKATA, S.; UCHIDA, K.; KAETSU, I.; KITA, Y. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signal using sensor and electroresponsive hidrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v.76, p.733-737, 2007.
- SALDAÑA, M.; COIMBRA, J.; CARDOZO, L. Recovery, encapsulation and stabilization of bioactives from food residues using high pressure techniques. **Current Opinion in Food Science**, v.5, p.76-85, 2015.
- SEBAALY, C.; CHARCOSSET, C.; STAINMESS, S.; FESSI, H.; GREIGEGERGES, H. Clove essential oil-in-cyclodextrin-in-liposomes in the aqueous and lyophilized states: From laboratory to large scale using a membrane contactor. **Carbohydrate Polymers**, v.138, p.75-85, 2016.
- SEELIG, J.; MACDONALD, P.; SCHERER, P. Phospholipid head groups as sensors of electric charge in membranes. **Biochemistry**, v.26(24), p.7535-7541, 1987.
- SHI, F.; ZHAO, J.; LIU, Y.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; FENG, N. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with frankincense and myrrh oil. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p.2033-2043, 2012.
- SINGH, M.; HEMANT, K.; RAM, M.; SHIVAKUMAR, H. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v.5, p.65-77, 2011.
- THEODOULOU, F.; EASTMOND, P. Seed storage oil catabolism: a story of give and take. **Current Opinión in Plant Biology**, v.15, p.322-328, 2012.
- WECHTERSACH, L.; POKLARULRIH,N.; CIGIC, B. Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices. **Food Science and Technology**, v.45, p.43-49, 2012.

WU, j.; LIU, J.; GE, S.; WANG, S.; QIN, Z.; CHEN, L.; ZHENG, Q.; LIU, Q.; ZHANG, Q. The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. **Food Hydrocolloids**, v.43, p.427-435, 2015.

ZHAO, L.; TEMELLI, F. Preparation of liposomes using a modified supercritical process via depressurization of liquid phase. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.100, p.110-120, 2015.

ZHAO, L.; TEMELLI, F.; CURTIS, J.; CHEN, L. Preparation of liposomes using supercritical carbon dioxide technology: Effects of phospholipids and sterols. **Food Research International**, v.77, p.63-72, 2015.

CAPITULO II

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM SISTEMA LIPOSSOMAL PARA A ENCAPSULAÇÃO DE EUGENOL

RESUMO

Neste trabalho estudou-se o desenvolvimento de vesículas lipossomais utilizando o método de hidratação de filme lipídico para a nanoencapsulação do eugenol. Lipossomas elaborados a partir de diferentes concentrações de lecitina de soja, esfingomiéline e colesterol foram avaliados em função do diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e eficiência de encapsulação, para a determinação do tratamento de maior estabilidade cinética e poder de encapsulação. O sistema escolhido (com e sem eugenol) foi avaliado durante 2 meses na temperatura de 4 °C, para monitorar alterações vesiculares no tamanho e a carga superficial, estudou-se também a liberação *in vitro* e a capacidade antioxidante do eugenol livre e encapsulado. O sistema lipossomal desenvolvido atingiu $80,9 \pm 2,5$ % de eficiência de encapsulação, estruturou-se por vesículas com 98,6 nm de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta de -49,5 mV, mantendo sua estabilidade durante o período total de avaliação. O estudo de liberação *in vitro* do eugenol, demonstrou que este processo ajustou-se ao modelo matemático de Higuchi que descreve a liberação como um processo controlado pela difusão. Finalmente, o estudo revelou que o sistema lipossomal desestabilizou-se nas soluções de DPPH e ABTS utilizadas para a avaliação da capacidade antioxidante.

Palavras chave

Lipossoma, eugenol, capacidade antioxidante, liberação *in vitro*, modelo de Higuchi

1. Introdução

Os lipossomas têm sido investigados como sistemas de suporte para a encapsulação de agentes bioativos aplicados na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar. São estruturas coloidais sob a forma de vesículas esféricas, que geralmente, apresentam-se em escala nanométrica e podem ser constituídos de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídios, que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (Gregoriadis e Ryman, 1972; Frézard et al., 2005; Fang et al., 2006). Enquanto, o composto encapsulado é orientado por sua afinidade; os compostos hidrofílicos tendem a permanecer no compartimento aquoso e os lipofílicos encontram-se dispersos na bicamada lipídica (Gillet et al., 2009).

O constituinte principal dos lipossomas são os fosfolipídios, lipídios anfílicos que possuem uma cabeça polar e caudas apolares, cada fosfolipídio apresenta particularidades estruturais ligadas principalmente ao comprimento das

caudas, isomeria geométrica e grau de saturação dos seus ácidos graxos, características que geram um padrão individual de empacotamento membranar. Assim fosfolipídios de cadeias longas constituídas de ácidos graxos saturados geram lipossomas com uma boa coesão devido à maior força de atração de Van der Waals entre as cadeias, o que promove maior organização estrutural e redução da permeabilidade da membrana em quanto, fosfolipídios de cadeias curtas, com ácidos graxos insaturados em configuração *cis* aumentam a fluidez da membrana (Hunter et al., 2001).

Igualmente, o grupo de cabeça dos fosfolipídios apresenta grande importância, pois determina a carga superficial negativa ou positiva das vesículas influenciando sua estabilidade cinética, pois determina o nível de repulsão eletrostática entre as partículas, promovendo ou não sua agregação, fato que influencia a proteção e funcionalidade dos compostos encapsulados (Seelig et al., 1987).

Do mesmo modo é possível a inclusão de aditivos à membrana lipossomal. Dentre os aditivos mais utilizados, está o colesterol, esterol de estrutura anelar plana e rígida que ao associar-se com os fosfolipídios reduz a liberdade rotacional das cadeias de hidrocarboneto o que contribui na organização, dinâmica e função da bicamada lipídica dando lugar a estruturas mais estáveis, minimizando a perda do material encapsulado durante o armazenamento (Zhao et al., 2015). Um caso especial é a associação de esfingomielina-colesterol, complexo estruturado por ligações de hidrogênio que ao distribuir-se na bicamada promove a integridade membranar (Manojlovic et al., 2008; Kishimoto et al., 2016).

Neste contexto, a escolha dos constituintes lipossomais é preponderante, pois vai definir propriedades membranais tais como espessura, fluidez, permeabilidade e polaridade, relacionados diretamente com a eficiência de encapsulação, controle do vazamento durante o armazenamento, estabilidade cinética no tempo, dinâmica de liberação do composto encapsulado e grau de proteção dos mesmos. Igualmente, entender a interação intermolecular entre o composto encapsulado e a vesícula é outro fator de importância para explicar os mecanismos que intervêm tanto no processo de carga, quanto de liberação (Ramazani et al., 2016).

Na área de alimentos os sistemas lipossomais têm sido aplicados na encapsulação de compostos de interesse, entre eles, os óleos essenciais e seus compostos majoritários constituem o centro de estudo devido a sua ampla gama de atividades biológicas, um exemplo destacável é o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), composto aromático encontrado em óleos essenciais de canela, louro, noz-moscada, manjerição e cravo (Mallavarapu e Ramesh, 1998), caracterizado por suas propriedades antibacterianas (Catherine et al., 2012), antifúngicas (Vazquez et al., 2001) e antioxidantes (Sebaaly et al., 2015; Ogata et al., 2000), contudo, a sensibilidade à luz, a volatilidade e a fraca solubilidade em água limitam sua aplicação (Reiner et al., 2013), desvantagens que tem sido contornadas utilizando a encapsulação, destacando-se o método de encapsulação em sistemas lipossomais.

A encapsulação em lipossomas foi estudada por Sebaaly et al. (2015) na avaliação de lipossomas elaborados pelo método de injeção de etanol a partir de fosfolipídios de soja hidrogenados e não hidrogenados, neste estudo, verificou-se o efeito protetor da encapsulação, frente à degradação do eugenol induzida pela exposição aos raios UV. Um trabalho subsequente liofilizou os lipossomas obtidos previamente, conseguindo estruturas com características similares às desenvolvidas em suspensão aquosa, as quais, após da sua reconstituição mantiveram a estabilidade

cinética por um mês na temperatura de 4 °C sem apresentar diferença significativa na capacidade antioxidante do eugenol livre e encapsulado (Sebaaly et al. 2016).

As características e vantagens oferecidas pelos lipossomas fazem deles um sistema de potencial aprovação para seu uso em alimentos (Juveriya et al., 2016), o que implica uma demanda crescente por estudos que caracterizem estes sistemas de encapsulação, desde sua composição, mecanismos de liberação, capacidade de carga de biocompostos, técnicas de produção, entre outros. Neste sentido, esta pesquisa teve como objetivo desenvolver e caracterizar um sistema lipossomal para a encapsulação do eugenol utilizando o método de hidratação de filme lipídico, com o intuito de conhecer a estabilidade cinética do sistema no tempo, a eficiência de encapsulação, o mecanismo de liberação do eugenol encapsulado, assim como sua capacidade antioxidante.

2. Material e Métodos

2.1. Material

Esfingomielina de gema de ovo de galinha (TLC) (98 %), colesterol (99 %), colato de sódio hidratado (99 %), 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH), 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolona-6-sulfônico (ABTS), ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox), Tween-80, eugenol (98 %) e membrana de celulose para dialise 12 KDa, obtidos de Sigma–Aldrich (São Paulo, SP, Brasil), lecitina de soja PUREX classificação GHS obteve-se de InLab (São Paulo, SP, Brasil), clorofórmio grau HPLC, álcool metílico P.A. álcool metílico absoluto HPLC e persulfato de potássio foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), álcool etílico absoluto P.A. e cloreto de sódio obtidos da Merck (Alemanha), filtro PVDF Millipore® de 0,45 DF MDurante todo experimento foi utilizado água ultrapura (resistividade elétrica igual a 18,2 MΩ·cm, Millipore Inc., Milli-Q, USA).

2.2. Delineamento experimental de otimização

Com a finalidade de avaliar o efeito de diferentes concentrações de lipídios estruturadores de lipossomas e otimizar estes valores, aplicou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR), segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC). O estudo considerou três fatores individuais com cinco níveis para cada um deles: colesterol (0; 49; 120; 191; 240 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), esfingomielina (60; 72; 90; 108; 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e lecitina de soja (120; 144; 180; 216; 240 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); as combinações destes níveis mais seis repetições no ponto central geraram um total de 20 tratamentos, avaliados por meio de três variáveis resposta: eficiência de encapsulação (calculada após 24 horas da elaboração das suspensões lipossomais), tamanho lipossomal e potencial zeta (ζ) (calculados após 15 dias de armazenamento).

2.3. Preparação de lipossomas

A obtenção dos sistemas lipossomais baseou-se no método de hidratação de filme lipídico exposto por Bangham et al. (1965) com algumas modificações. Quantidades correspondentes de esfingomielina, lecitina de soja, colesterol, colato de sódio (15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e Tween-80 (15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram solubilizadas em 5 mL de clorofórmio sob agitação magnética (300 rpm), em seguida a mistura foi submetida a

um fluxo de nitrogênio até a eliminação total do solvente orgânico, obtendo uma fina camada lipídica. Subsequentemente, uma suspensão aquosa de eugenol ($240 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) previamente homogeneizada (12.000 rpm; 15 minutos; dispersor T25 Digital ULTRA-TURRAX[®]) hidratou a película lipídica. As suspensões formadas foram submetidas a ondas ultrassônicas em banho de gelo, mediante um desruptor de células (Unique R2D091109, São Paulo, Brasil) com 90 W de potência, durante 20 minutos. Finalmente, as suspensões lipossomais filtradas (filtro PVDF Millipore[®] de $0,45 \mu\text{m}$), foram armazenadas em frascos de cor âmbar a $4 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.4. Determinação do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta (ζ)

A distribuição de tamanho baseado no diâmetro hidrodinâmico (D_h) e o índice de polidispersão (PDI) foram obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmico-DLS. O ζ -Potencial foi calculado pela equação de Henry a partir da mobilidade electroforética das vesículas. As medições se realizaram a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando 1 mL da amostra sem diluição disposta na cubeta DTS 1070 do Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Zen 3600, Reino Unido).

2.5. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando o cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu modelo, Kyoto, Japão), equipado com bomba LC-10AT, detector de arranjo de diodos SPD-M10A e coluna LC-18 ($4,6 \times 250 \text{ mm}$, 5 mm). O método utilizado foi: fase móvel metanol/água desionizada 70/30 (v/v), taxa de fluxo de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, volume de injeção da amostra de $20 \mu\text{L}$, comprimento de onda da detecção em 280 nm . Para determinar a concentração do eugenol a área do pico correspondente a este composto foi substituída na equação de regressão da curva analítica construída a partir de diferentes concentrações de eugenol ($10\text{-}1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ($y = 16072x + 906285$, $R^2 = 0,998$). A eficiência de encapsulação (EE) foi determinado pela Equação 1.

$$EE (\%) = \frac{[\text{Eug}]_t - [\text{Eug}]_f}{[\text{Eug}]_t} \times 100 \quad (1)$$

$[\text{Eug}]_t$ corresponde à concentração total de eugenol contido na suspensão lipossomal, $[\text{Eug}]_f$ representa a concentração do eugenol que não foi encapsulado, para sua obtenção a suspensão lipossomal foi ultracentrifugada ($12.000 \times g$, 2 h , $4 \text{ }^\circ\text{C}$), promovendo a agregação e sedimentação dos lipossomas, o sobrenadante foi filtrado (PVDF Millipore[®] de $0,45 \mu\text{m}$) e injetado no HPLC para análise.

2.6. Espectrofotometria no infravermelho por transformada de Fourier-FTIR

Os espectros de infravermelho foram obtidos no modo de absorção em um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da Nicolet, utilizando 32 varreduras por amostra (eugenol puro e lipossomas contendo eugenol) na faixa de $500\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$, resolução de 4 cm^{-1} e intervalo de 2 cm^{-1} .

2.7. Estabilidade do sistema lipossomal

Suspensões aquosas de lipossomas com e sem eugenol permaneceram armazenados sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) em frascos de vidro âmbar hermeticamente fechados durante 60 dias. Em diferentes períodos, alíquotas de 1 mL foram analisadas determinando-se o diâmetro hidrodinâmico D_h , o índice de polidispersão de tamanhos Pdl e o ζ -Potencial, utilizando a metodologia exposta no item 2.4.

2.8. Liberação *in vitro*

O perfil de liberação do eugenol livre e encapsulado foi avaliado utilizando o método de diálise exposto por Andrade et al. (2015). No qual 10 mL do meio de liberação (suspensão aquosa de eugenol livre/suspensão lipossomal) foi colocado em membranas de diálise de 12 KDa hermeticamente fechadas, estas membranas foram dispostas em 250 mL de meio receptor (tampão fosfato 0,01 M, pH 7).

A avaliação realizou-se com três repetições em duplicata, mantendo-se na temperatura de $10 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, e agitação magnética lenta (300 rpm). Em tempos pré-determinados 1 mL do meio receptor foi retirado para a quantificação do eugenol por HPLC, utilizando o método descrito na seção 2.5, imediatamente a mesma quantidade de meio novo ingressou no sistema para manter a condição *sink*. Os resultados foram expressados em porcentagem acumulativo de eugenol liberado utilizando a Equação 2.

$$L (\%) = \sum_{t=0}^t \frac{[\text{Eug}]_t}{[\text{Eug}]_0} \times ug\zeta \quad (2)$$

$[\text{Eug}]_t$ corresponde à quantidade de eugenol liberado em cada ponto de amostragem e $[\text{Eug}]_0$ a quantidade inicial carregada de eugenol no sistema.

2.9. Capacidade antioxidante por inibição do DPPH

Este método baseia-se na transferência de elétrons do composto antioxidante para o radical livre DPPH, o qual apresenta uma forte coloração púrpura em solução metanólica com o máximo de absorção num comprimento de onda de 515 nm, que ao reduzir-se perde sua coloração, diminuindo a absorbância, o que permite registrar o progresso da reação por espectrofotometria (Brand-Williams et al., 1995).

Para o desenvolvimento da metodologia uma alíquota de 0,1 mL de eugenol livre ou eugenol contido no sistema lipossomal foi transferida para um balão volumétrico com 3,9 mL de solução metanólica de DPPH ($60\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). A mistura foi mantida a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), ao abrigo da luz por 10 minutos, uma vez transcorrido o tempo de reação realizou-se a leitura da absorbância no comprimento de onda de 515 nm, utilizando o espectrofotômetro UV/VIS (UV-18000, Shimadzu Co., Kyoto, Japão). Os resultados foram expressos de duas formas, em porcentagem de inibição conforme a Equação 3.

$$I(\%) = \frac{Abs_{controle} - Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (3)$$

E em concentração inibitória IC₅₀, alusiva à concentração do antioxidante necessária para eliminar 50 % dos radicais DPPH no período de tempo especificado, para isto utilizou-se a equação da curva analítica de DPPH, elaborada em diferentes concentrações do radial (10 aM - 60 μM) ($y = -0,013x - 0,0071$, $R^2 = 0,9988$), este resultado foi expresso em μM de eugenol por μp de DPPH.

2.10. Capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) pela captura do radical livre ABTS^{o+}

A primeira etapa da metodologia compreendeu a formação do radical ABTS^{o+} a partir da reação da solução de ABTS 7 mmol·L⁻¹ (2,2-azinobis-3-etil-benzolína-6-sulfônico) e persulfato de potássio 2,45 mmol·L⁻¹, mistura que foi mantida em repouso durante 16 h protegida da luz. Após deste período a solução foi diluída em etanol 99,5 % até se obter uma absorbância de 0,70 (± 0,05), no comprimento de onda 734 nm.

Em seguida, alíquotas de 30 μL das amostras foram adicionadas a 3 mL da solução ABTS^{o+}, transcorrido o tempo de reação de 6 minutos, em ausência de luz, determinou-se a absorbância no comprimento de onda de 734 nm utilizando-se um espectrofotômetro UV/VIS (UV-18000, Shimadzu Co., Kyoto, Japão). A quantificação da capacidade antioxidante total foi mensurada a partir de curva analítica do antioxidante padrão Trolox (0 - 0,15 μmol·L⁻¹) ($y = -0,0002x + 0,68$, $R^2 = 0,98807$) nas mesmas condições das amostras. Os resultados foram expressos em μM de Trolox por μM da amostra.

3. Resultados e Discussão

3.1. Otimização do tratamento

A etapa de otimização envolveu 20 tratamentos nos quais variou-se a concentração de lipídios da estrutura lipossomal. Todos os casos resultaram em sistemas conformados por lipossomas com diâmetro hidrodinâmico em escala nanométrica, o que representa uma vantagem para aplicações diversas na indústria de alimentos, pois sugere um considerável incremento na área superficial das partículas, que resulta na potencialização da funcionalidade do composto encapsulado.

Os diferentes tratamentos apresentaram carga superficial negativa, associada principalmente à carga elétrica do grupo de cabeça dos fosfolipídios que estruturam a membrana lipídica, entre os quais destaca-se a fosfatidilcolina e o ácido fosfatídico, principais componentes da lecitina de soja, neste sentido, os sistemas correspondentes aos 20 tratamentos apresentaram valores de ζ-Potencial superiores a $|-30 \text{ mV}|$, carga a partir da qual a repulsão existente entre as partículas gera resistência à agregação, fato que contribui na estabilidade cinética da dispersão (Sou, 201; Lu et al., 2014) condição de extrema importância na aplicação tecnológica deste tipo de sistemas.

No caso da eficiência de encapsulação, os diferentes tratamentos apresentaram resultados variáveis, compreendidos entre 27 % e 79 %, faixa ampla que provavelmente atribuiu-se às propriedades membranais inerentes à conformação estrutural de cada lipossoma como: espessura, fluidez, permeabilidade e polaridade, que em conjunto determinam o poder de encapsulação destas vesículas (Ramazani et al., 2016).

Tabela 1. Caracterização dos tratamentos lipossomais determinados pelo DCCR

Tratamento	Colesterol ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Esfingomiélinea ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Lecitina ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	D_h (nm)	ζ -Potencial (mV)	Eficiência de encapsulação (%)
T1	49	72	144	263,39	-47,65	29,75
T2	49	108	144	107,14	-37,79	34,58
T3	49	72	216	106,93	-42,74	63,00
T4	49	108	216	118,80	-45,06	59,26
T5	191	72	144	102,32	-38,27	62,47
T6	191	108	144	100,61	-35,65	66,24
T7	191	72	216	118,47	-46,48	71,89
T8	191	108	216	101,42	-46,49	72,21
T9	120	60	180	82,69	-40,26	68,00
T10	120	120	180	109,44	-38,03	73,90
T11	120	90	120	91,25	-43,60	43,58
T12	120	90	240	106,20	-45,60	78,63
T13	0	90	180	134,10	-37,70	27,92
T14	240	90	180	154,70	-39,47	61,73
T15	120	90	180	93,80	-43,50	63,63
T16	120	90	180	93,61	-43,52	63,47
T17	120	90	180	93,24	-43,55	64,87
T18	120	90	180	93,82	-43,42	63,97
T19	120	90	180	93,70	-43,48	62,98
T20	120	90	180	93,74	-43,56	63,12

Contudo, o análise de variância do delineamento experimental aplicado neste estudo, mostrou que as concentrações de esfingomiélinea, lecitina de soja e colesterol avaliadas nos níveis estabelecidos pelo DCCR, não apresentaram efeito significativo sobre o tamanho das vesículas, o ζ -Potencial e a eficiência de encapsulação do eugenol. Portanto, a escolha do tratamento mais apropriado para o objetivo desta pesquisa baseou-se na eficiência de encapsulação. Conseqüentemente, o tratamento escolhido foi o T12, obtido a partir de $90 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de esfingomiélinea, $240 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de lecitina de soja e $120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de colesterol, concentrações que resultaram em um sistema lipossomal conformado por partículas com diâmetro hidrodinâmico de $106,2 \pm 3 \text{ nm}$ e ζ -Potencial de $-45,6 \pm 2 \text{ mV}$.

3.2. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação do eugenol no sistema lipossomal escolhido e reproduzido foi de $80,9 \pm 2,5$ %. Um dado relevante desta análise realizada por HPLC radicou na variação no tempo de retenção do eugenol não encapsulado (3,83 min) e do eugenol total presente no sistema lipossomal (4,12 min). Esta diferença no tempo de retenção, considera-se um comprovante da encapsulação do eugenol. Afirmação que foi confirmada pelos resultados do análise lipossomal por espectroscopia FTIR, que indicaram a presença de um pico de absorvância em $1513,51 \text{ cm}^{-1}$, banda proveniente do estiramento vibracional típico de enlaces aromáticos C=C, característicos do eugenol (material suplementar).

3.3. Estabilidade cinética lipossomal

O tratamento escolhido foi reproduzido e sua estabilidade com e sem eugenol, foi avaliada em função do tamanho representado pelo diâmetro hidrodinâmico D_h , índice de polidispersão PdI, e ζ -potencial durante 60 dias, sob condições de refrigeração (4 ± 1 °C).

Os sistemas lipossomais sem e com eugenol analisados individualmente apresentaram estabilidade no tamanho vesicular durante o período de estudo (Fig. 1.), tempo no qual as variações no D_h no interior de cada sistema foram não significativas ($p > 0,05$). No entanto, destacou-se a diferença de tamanho apresentada ao comparar os dois sistemas, onde o D_h do sistema sem eugenol foi $86,45 \pm 3,0$ nm e do sistema com eugenol foi $98,66 \pm 3,8$ nm, incremento que sugere mudanças na estrutura lipossomal, provavelmente atribuídas à incorporação deste composto na vesícula (Gibis et al., 2014). Portanto, a encapsulação do eugenol gerou um aumento significativo no tamanho das vesículas avaliadas, efeito que também foi reportado por Seebadely et al. (2015) e Seebadely et al. (2016), em lipossomas de lecitina de soja contendo diferentes concentrações de eugenol.

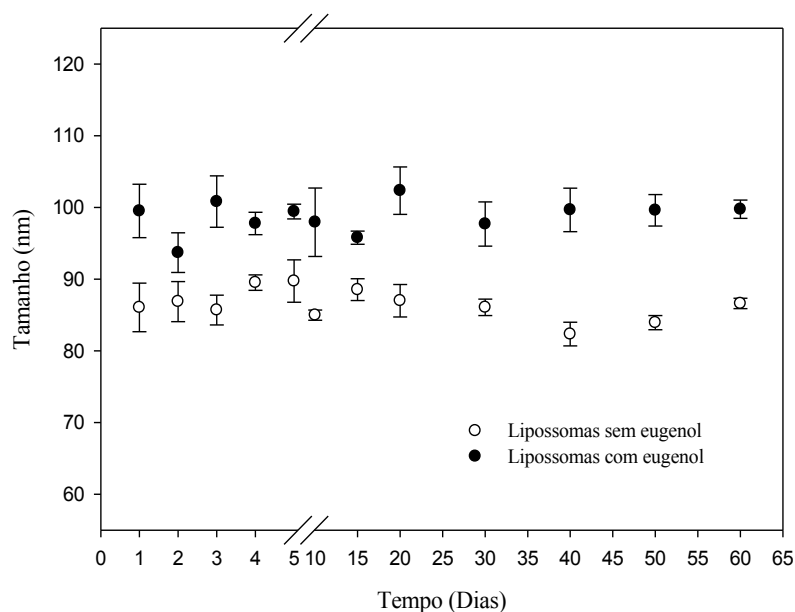


Fig. 1. Tamanho lipossomal de lipossomas com e sem eugenol

O PDI não apresentou diferença significativa entre os dois sistemas avaliados ($p > 0,05$). Para ambos casos o PDI (Fig. 2.) teve um aumento no tempo, no entanto, não houve mudanças relevantes até o dia 20, a partir do qual o incremento foi mais marcado chegando a 0,33 no final da avaliação, contudo, este valor indicou que o tamanho das vesículas manteve-se numa estreita faixa de diâmetros e descreve uma distribuição praticamente homogênea para os dois sistemas, fato que evitou a ocorrência de fenômenos de desestabilização cinética dirigidos pela variação de potenciais químicos entre partículas de diferentes tamanhos, como é o caso da maturação de Ostwald.

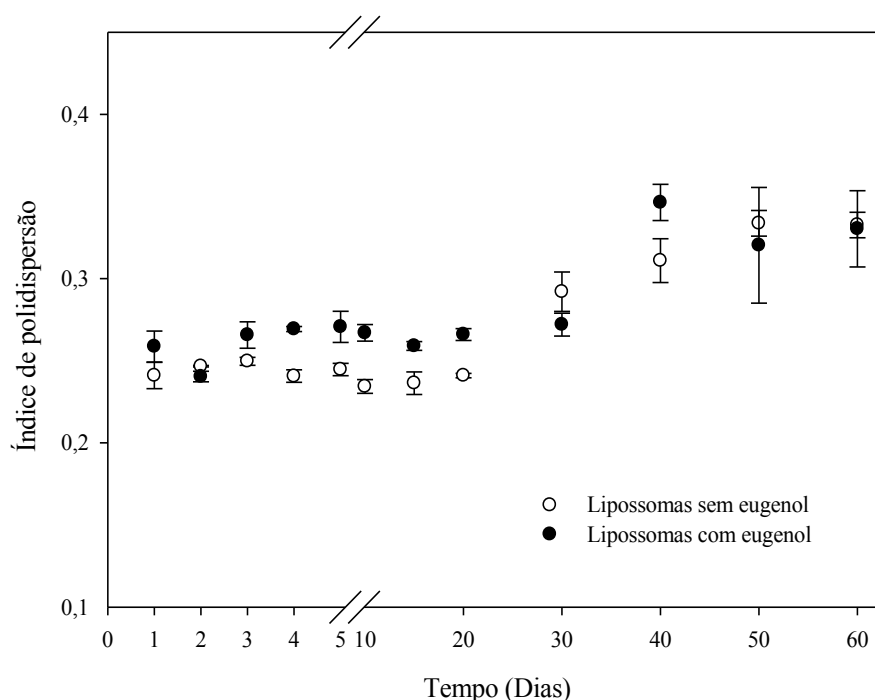


Fig. 2. Índice de polidispersão para lipossomas com e sem eugenol

Tanto lipossomas vazias, quanto cheias apresentaram carga superficial negativa, associada ao grupo de cabeça (PO_4^{-3}) dos fosfolipídios e ao grupo hidroxilo (OH^-) do colesterol. O valor inicial do ζ -potencial para lipossomas sem e com eugenol foi $-45,5 \pm 2,32$ mV e $-49,5 \pm 0,7$ mV, respectivamente (Fig. 3.). Estes resultados demonstraram que o eugenol incrementou significativamente ($p < 0,05$) a carga superficial das vesículas $|\pm \zeta|$.

Este incremento atribuiu-se à reorganização membranar provocada pela incorporação do eugenol na estrutura lipossomal, reorganização que foi estudada por Reiner et al. (2013) mediante espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H and ^{13}C NMR), análise que mostrou a associação do eugenol na região intermembranar do lipossoma, especificamente entre o grupo polar (molécula de colina), o esqueleto de glicerol e os primeiros átomos das cadeias de acilo estabelecendo uma forte interação hidrofóbica mediante seu grupo alilo ($-\text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH}_2$) (Fujisawa et al., 1988), isto perturbou as interações entre as caudas hidrofóbicas dos fosfolipídios promovendo mudanças conformacionais na bicamada lipídica (Wink,

2010), fato que justifica tanto o aumento na carga superficial $|\pm\zeta|$ quanto no D_h dos lipossomas contendo eugenol, tendência que também foi reportada por Seebadely et al. (2016).

No entanto, destaca-se que as mudanças no tamanho e no ζ -potencial são particulares de cada composto e depende das propriedades físico-químicas, polaridade, solubilidade, tamanho e forma molecular de cada composto (Rafiee et al., 2017).

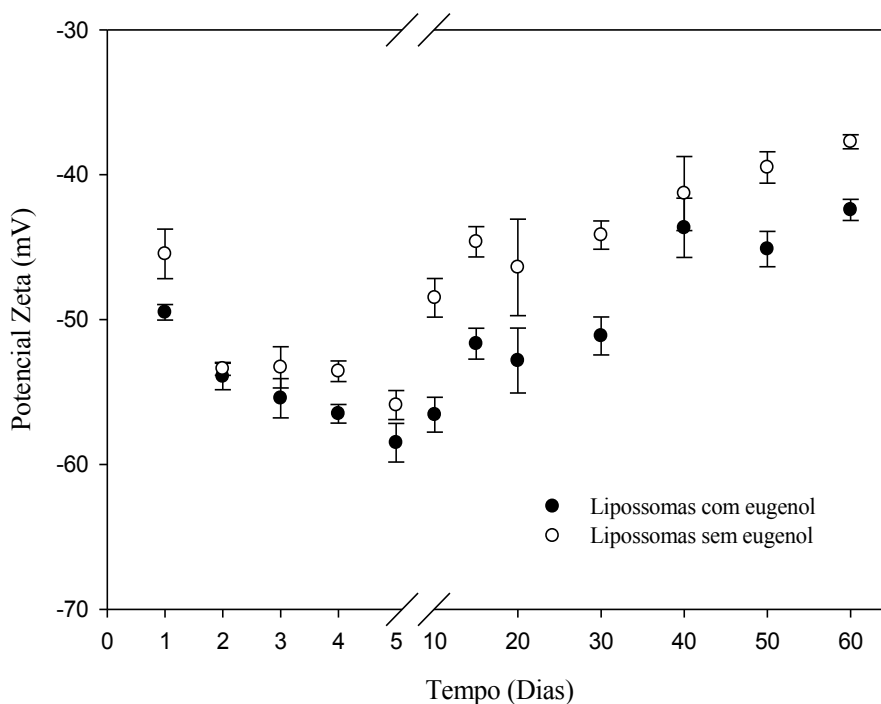


Fig. 3. ζ -potencial de lipossomas com e sem eugenol

De forma integral, esta série de análises mostraram que ambos sistemas foram cineticamente estáveis durante os 60 dias de avaliação sob condições de refrigeração, período no qual o tamanho lipossomal foi mantido devido ao alto índice de homogeneidade de tamanho e existência de forças de repulsão que impediram que as partículas agregarem-se.

3.4. Liberação *In vitro*

Com a finalidade de comparar a dinâmica de liberação *in vitro* do eugenol livre e encapsulado, as porcentagens de liberação correspondentes foram calculadas e ilustradas em função do tempo.

Descritivamente, o perfil de liberação *in vitro* do eugenol sem encapsular indicou uma rápida liberação durante as duas primeiras horas de avaliação, tempo no qual a porcentagem de liberação foi de $42,85 \pm 0,68$ %, uma vez decorridas três horas do teste, apresentou-se uma paulatina desaceleração que continuou até o final da avaliação atingindo uma porcentagem de $80,94 \pm 1,23$ %. No caso do eugenol encapsulado apresentou-se uma importante redução na porcentagem de liberação, a

qual alcançou $29,27 \pm 0,62$ % após duas horas do teste, e chegou no final da avaliação com uma porcentagem de $42,85 \pm 1,07$ %.

Perfis de rápida liberação inicial, seguida por uma liberação mais lenta, como os apresentados neste estudo, são frequentemente descritos pelo modelo matemático de Higuchi, que descreve o mecanismo de liberação como um processo de difusão baseado na lei de Fick dependente da raiz quadrada do tempo. A Equação 4 refere o modelo de Higuchi:

$$f_t = K_H \sqrt{t} \quad (4)$$

Nesta equação, f_t representa a porcentagem acumulativa de liberação e K_H corresponde à constante de liberação Higuchi, valor que reflete as características do perfil.

Considerando a primeira lei de Fick, o fluxo de partículas é consequência direta do gradiente de potencial químico $\Delta\mu_n$, como pode-se observar nos perfis de liberação deste estudo (Fig. 4.). No tempo zero de análise, o eugenol encontrou-se unicamente no interior da membrana de diálise, o que envolve um forte $\Delta\mu_{Eug}$, promovendo a difusão acelerada e quase constante nos primeiros minutos de análise, que resulta na passagem do eugenol desde o interior da membrana até o meio receptor, dinâmica que ilustra um comportamento quase linear. Na medida que o equilíbrio foi sendo atingindo, o $\Delta\mu_{Eug}$ diminui, logo a velocidade de liberação sofre uma desaceleração.

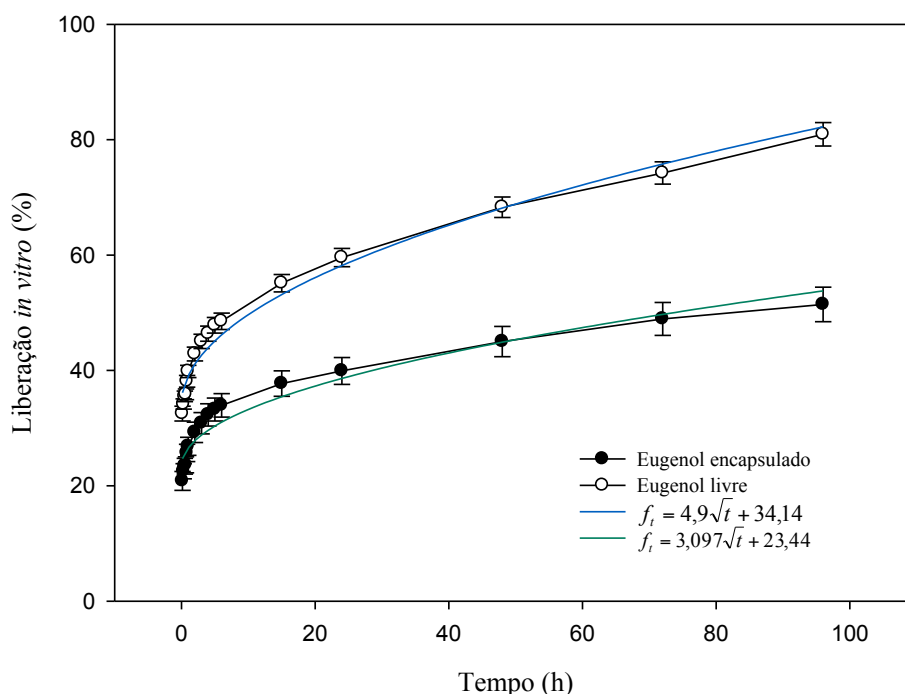


Fig. 4. Perfil de liberação *in vitro* do eugenol livre e encapsulado

Os dados apresentados na Tabela 2 corroboraram o ajuste do perfil de liberação do eugenol livre e encapsulado no modelo matemático de Higuchi, utilizando como referência os valores do coeficiente de correlação. Por outro lado, a K_H para eugenol encapsulado, teve uma considerável redução com respeito a K_H para eugenol livre, fato que permitiu inferir que a encapsulação modulou a liberação do eugenol, composto que deveu-se liberar primeiro da nanoestrutura para depois difundir-se pelo meio e finalmente atravessar a membrana de dialise até o meio receptor.

Tabela 2. Dados de ajuste do perfil de liberação *in vitro* de eugenol ao modelo matemático de Higuchi

	K_H	R^2	a
Eugenol livre	4,91	0,98	34,17
Eugenol encapsulado	3,10	0,95	23,44

A redução da K_H do eugenol encapsulado, esta relacionada diretamente com a encapsulação. Especificamente, atribui-se ao impedimento gerado pelas interações químicas na membrana lipossomal, a qual em presença de colesterol conforma domínios que distribuem-se na membrana tornando-a mais densa e menos fluida, características que regem o controle da difusão (Gibis et al., 2016). Igualmente, esta diminuição associou-se com a localização do eugenol, composto que ao incorporar-se na seção intermembranar da vesícula, pode interagir por meio de forças hidrofóbicas com as cadeias de acilo dos fosfolípidios, dificultando sua liberação.

3.5. Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante do eugenol na sua forma livre e encapsulada foi avaliada em função da capacidade de eliminação dos radicais sintéticos: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazol-ácido sulfônico).

Os resultados de capacidade antioxidante para eugenol apresentados na Tabela 3, seguem uma tendência similar, porém as diferentes condições de tempo de reação, meio de reação e tratamento dos resultados geraram dificuldade na comparação dos resultados obtidos para o mesmo composto.

Os resultados indicaram que excetuando o primeiro dia de análise, o eugenol tanto na sua forma livre quanto encapsulada apresentou capacidade antioxidante semelhante, uma vez que não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Resultados similares foram reportados por Sebaaly et al. (2015) e Sebaaly et al. (2016) em pesquisas sucessivas com lipossomas elaborados a partir de lecitina de soja e colesterol em suspensão aquosa e liofilizados respectivamente, nas quais avaliaram a capacidade antioxidante do eugenol livre e encapsulado utilizando a

metodologia de DPPH, explicando este fato, pela natureza hidrofóbica do radical DPPH, condição que permitiria sua entrada na seção intermembranar, na qual o grupo hidroxilo ativo e livre do eugenol presente nesta região reduziria o radical.

Tabela 3. Capacidade antioxidante de eugenol livre e encapsulado

Tempo (Dias)	I (%)		IC50 (M Eug·M DPPH-1)		TEAC (M Trolox· M Eug-1)	
	Eug-Livre	Eug-Lip	Eug-Livre	Eug-	Eug-Livre	Eug-Lip
1	78,98 ± 0,80a*	77,92 ± 0,70b	224,59 ± 2,38a	232,85 ± 2,79b	9,13 ± 0,55a	8,52 ± 0,10b
5	75,02 ± 0,76a	74,09 ± 0,69 ^a	226,69 ± 2,94 a	232,23 ± 2,68a	7,51 ± 0,46a	7,51 ± 0,09 a
10	73,98 ± 0,75a	73,24 ± 0,68 a	231,46 ± 3,47 a	231,17 ± 2,66 a	7,47 ± 0,45a	7,38 ± 0,08 a
30	70,05 ± 0,71a	70,11 ± 0,67 a	265,09 ± 6,12 a	265,97 ± 2,93 a	7,27 ± 0,44a	7,26 ± 0,08 a
60	65,95 ± 0,64a	66,09 ± 0,63 a	301,02 ± 8,98 a	298,54 ± 3,13 a	6,76 ± 0,41a	6,96 ± 0,08 a

*Letras diferentes representam diferenças significativas entre eugenol livre (Eug-Livre) e eugenol encapsulado (Eug-Lip) pelo Test de Tukey (p < 0.05).

No entanto, os resultados apresentados na seção 3.4. mostraram que a encapsulação exerce controle sobre a liberação do eugenol contido nos lipossomas, portanto, a quantidade do eugenol disponível para agir como antioxidante deveria ser diferente ao apresentado pelo sistema de eugenol livre, resultado que não foi reflexo neste análise, ante esta discordância, a presente pesquisa sugeriu uma repentina liberação do eugenol encapsulado diante a desestabilização do sistema lipossomal nas condições dos dois métodos utilizados na avaliação da capacidade antioxidante, pois esta medição requer a utilização de soluções metanólicas de DPPH e soluções etanólicas de ABTS, que ao entrar em contato com a dispersão lipossomal modificaram as condições nas quais o sistema lipossomal foi caracterizado.

Para comprovar esta hipótese, foi determinado o tamanho e o ζ-Potencial da suspensão de lipossomas nos solventes de DPPH e ABTS, simulando as condições de tempo e temperatura da análise de capacidade antioxidante. Os resultados mostraram a desestabilização do sistema lipossomal para ambos casos, derivada da anulação de cargas das vesículas e mudanças no tamanho vesicular por causa da agregação e sedimentação das vesículas tanto em etanol, quanto em metanol (material complementar). A desestabilização do sistema lipossomal provavelmente foi acompanhada pela desestruturação das lipossomas, fato que levou à liberação parcial ou inclusive total do eugenol encapsulado, disponibilizando-o para reagir com os radicais livres, resultando em valores de capacidade antioxidante de alta similaridade com os apresentados pelo eugenol livre.

Estes resultados foram suportados pelos reportados por Santos et al. (2004) na avaliação do efeito do etanol na liberação do antibiótico antraciclina encapsulado em lipossomas de dipalmito-fosfatidilcolina (DPPC), no qual provou-se que a partir da

concentração de etanol 30 % (v/v) no meio, a liberação era favorecida devido ao rompimento e fusão das vesículas. Portanto, a desestabilização do sistema e desestruturação das lipossomas no meio de etanol e metanol absoluto é uma consequência lógica.

4. Conclusões

O presente estudo desenvolveu um sistema lipossomal, estruturado por nanovesículas lipídicas, com carga superficial negativa, que manteve a estabilidade cinética durante dois meses sob condições de refrigeração.

A eficiência de encapsulação do eugenol foi de 80,9 %. A incorporação do eugenol no sistema gerou mudanças significativas tanto no tamanho quanto no ζ -Potencial das vesículas que o possuíam, como consequência da reorganização membranar.

A encapsulação no sistema lipossomal desenvolvido controlou a liberação do eugenol, mediante um processo de difusão ajustado ao modelo matemático de Higuchi.

As soluções metanólicas e etanólicas ABTS e DPPH desestabilizaram o sistema lipossomal gerando desestruturação das vesículas, impedindo realizar uma comparação efetiva da capacidade antioxidante do eugenol encapsulado e livre.

Agradecimentos

Agradecimento especial ao Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos e o Laboratório de Virologia Vegetal Molecular do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - Bioagro da Universidade Federal de Viçosa.

Referências Bibliográficas

- Andrade, D., Zuglianello, C., Raffin, A., Stanisçuaski, S., Ruver, R. (2015). Assessing the *In Vitro* Drug Release from Lipid-Core Nanocapsules: a New Strategy Combining Dialysis Sac and a Continuous-Flow System. *AAPS PharmSciTech*, 16, 1409-1417.
- Bangham, D., Standish, M., e Watkins, J. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13, 238-252.
- Brand-Williams, M., Cuvelier M., e Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity W. *Carbohydrate Polymers*, 138, 25-30.

- Catherine, A., Deepika, H., e Negi, P. S. (2012). Antibacterial activity of eugenol and peppermint oil in model food systems. *Journal of Essential Oil Research*, 24, 481–486.
- Fang, J., Hwang, T., Huang, Y., e Fang, C. (2006). Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and etanol. *International Journal of Pharmaceutics*, 310(1), 131-138.
- Fujisawa, S., Kadoma, Y., & Komoda, Y. (1988). ¹H and ¹³C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposomes as a model system for odontoblast membranes. *Journal of Dental Research*, 67, 1438–1441.
- Frézard, F., Schettini, D., Rocha, O., e Demicheli, C. (2005). Liposomes: Physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony based chemotherapy. *Química Nova*, 28 (3), 511-518.
- Gibis, M., Thellmann, K., Thongkaew, C., e Weiss, J. (2014). Interaction of polyphenols and multilayered liposomal-encapsulated grape seed extract with native and heat-treated proteins. *Food Hydrocolloids*, 41, 119–131.
- Gibis, M., Ruedt, C., e Weiss, J. (2016). *In vitro* release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. *Food Research International*, 88, 105–113.
- Gillet, A., Grammenos, A., Compère, P., Evrard, B., e Piel, D. (2009). Development of a new topical system: Drugin cyclodextrin-in-deformable liposome. *International Journal of Pharmaceutics*, 380 (1-2),174-180.
- Gregoriadis, G., e Ryman, B. (1972). Lysosomal localization of β -fructofuranosidase-containing liposomes injected into rats. *Biochemical Journal*, 129(1),123-133.
- Hasan, M., Belhaj, N., Benachour, H., Barberi-Heyob, M., Kahn, C. J. F., Jabbari, E., E Arab-Tehrany, E. (2014). Liposome encapsulation of curcumin: physicochemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *International Journal of Harmaceutics*, 461, 519–528.
- Hunter, R., Midmore, B., e Zhang, H. (2001). Zeta potential of highly charged thin double-layer systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 237(1), 147-149.
- Kishimoto, T., Ishitsuka, R., e Kobayashi, T. (2016). Detectors for evaluating the cellular landscape of sphingomyelin- and cholesterol-rich membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861, 812–829.
- Lu, Q., Lu, P. M., Piao, J. H., Xu, X. L., Chen, J., Zhu, L., e Jiang, J. G. (2014). Preparation and physicochemical characteristics of an allicin nanoliposome and its release behavior. *LWT – Food Science and Technology*, 57, 686–695.
- Manojlovic, V., Winkler, K., Bunjes, V., Neub, A., Schubert, R., Bugarski, B., e Leneweit, G. (2008). Membrane interactions of ternary phospholipid/cholesterol bilayers and encapsulation efficiencies of a RIP II protein. *Colloids Surfaces, B: Biointerfaces*, 64, 284-296.

- Ogata, M., Hoshi, M., Urano, S., e Endo, T. (2000). Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48, 1467–1469.
- Rafiee, Z., Barzegar, M., Ali, M., e Maherani, B. (2017). Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high-valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. *Food Chemistry*, 220, 115–122.
- Ramazani, F., Chen, W., Van, C., Storm, G., Kiessling, F., Lammers, T., Hennink, W., e Kok, R. (2016). Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: State-of-the-art and challenges. *International Journal of Pharmaceutics*, 499, 358-367.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., e Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Reiner, G. N., Perillo, M. A., e Garcia, D. A. (2013). Effects of propofol and other Gabaergic phenols on membrane molecular organization. *Colloids Surfaces B*, 101, 61–67.
- Santos, N., Cox, K., McKenzie, C., Baarda, F., Gallagher, R., Karlsson, G., e Edwards, K., Lawrence D. (2004). pH gradient loading of anthracyclines into cholesterol-free liposomes: enhancing drug loading rates through use of ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1661, 47–60.
- Sebaaly, C., Jraij, A., Fessi, H., Charcosset, C., e Greige-Gerges, H. (2015). Preparation and characterization of clove essential oil loaded liposomes. *Food Chemistry*, 178, 52–62.
- Sebaaly, C., Greige, H., Stainmesse, S., Fessi, H., e Charcosset, C. (2016). Effect of composition, hydrogenation of phospholipids and lyophilization on the characteristics of eugenol-loaded liposomes prepared by ethanol injection method. *Food Bioscience*, 15, 1–10.
- Sebaaly, C., Charcosset, C., Stainmess, S., Fessi, H., e Greige-Gerges, H. (2016). Clove essential oil-in-cyclodextrin-in-liposomes in the aqueous and lyophilized states: From laboratory to large scale using a membrane contactor. *Carbohydrate Polymers*, 138, 75-85.
- Seelig, J., Macdonald, P., e Scherer, P. (1987). Phospholipid head groups as sensors of electric charge in membranes. *Biochemistry*, 26(24), 7535-7541.
- Vazquez, B. I., Fente, C., Franco, C. M., Vazquez, M. J., e Cepeda, A. (2001). Inhibitory effects of eugenol and thymol on penicillium citrinum strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 157–163.
- Zhao, L., Temelli, F., Curtis, J., e Yun Chen, L. (2015). Preparation of liposomes using supercritical carbon dioxide technology: Effects of phospholipids and sterols. *Food Research International*, 77, 63–72.

CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo desenvolveu um sistema lipossomal para a encapsulação de eugenol composto por $90 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de esfingomielina, $240 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de lecitina de soja, $120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de colesterol, $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de colato de sódio e $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Tween-80, concentrações que resultaram em um sistema conformado por partículas com diâmetro hidrodinâmico de $106,2 \pm 3 \text{ nm}$ e ζ -Potencial de $-45,6 \pm 2 \text{ mV}$. A eficiência de encapsulação do eugenol foi de 80.9 %, incorporação que promoveu mudanças significativas tanto no tamanho quanto no ζ -Potencial das vesículas que o possuíam, como consequência da reorganização membranar. O sistema lipossomal desenvolvido foi cineticamente estável durante os 60 dias de avaliação sob condições de refrigeração. A liberação do eugenol contido nos lipossomas foi um processo controlado pela difusão, processo que ajustou-se ao modelo matemático de Higuchi. O sistema lipossomal desenvolvido sofreu desestruturação e desestabilização ao contato com etanol absoluto e metanol absoluto dissolventes utilizados na avaliação da capacidade antioxidante, fato que levou à liberação do material encapsulado.

ANEXOS
MATERIAL COMPLEMENTÁR

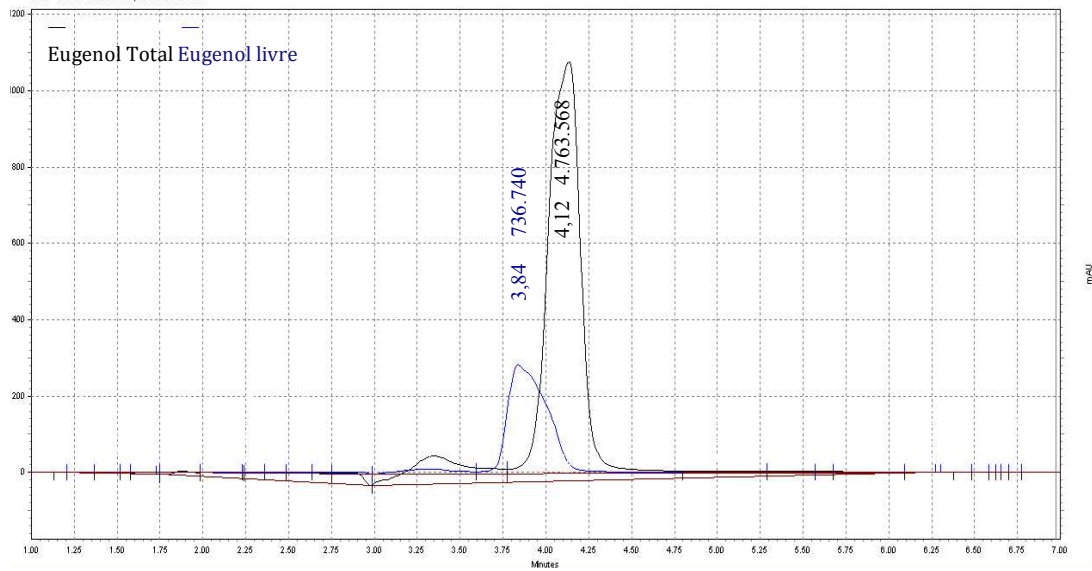


Fig. 1 Cromatograma correspondente ao análise de eficiência de encapsulação

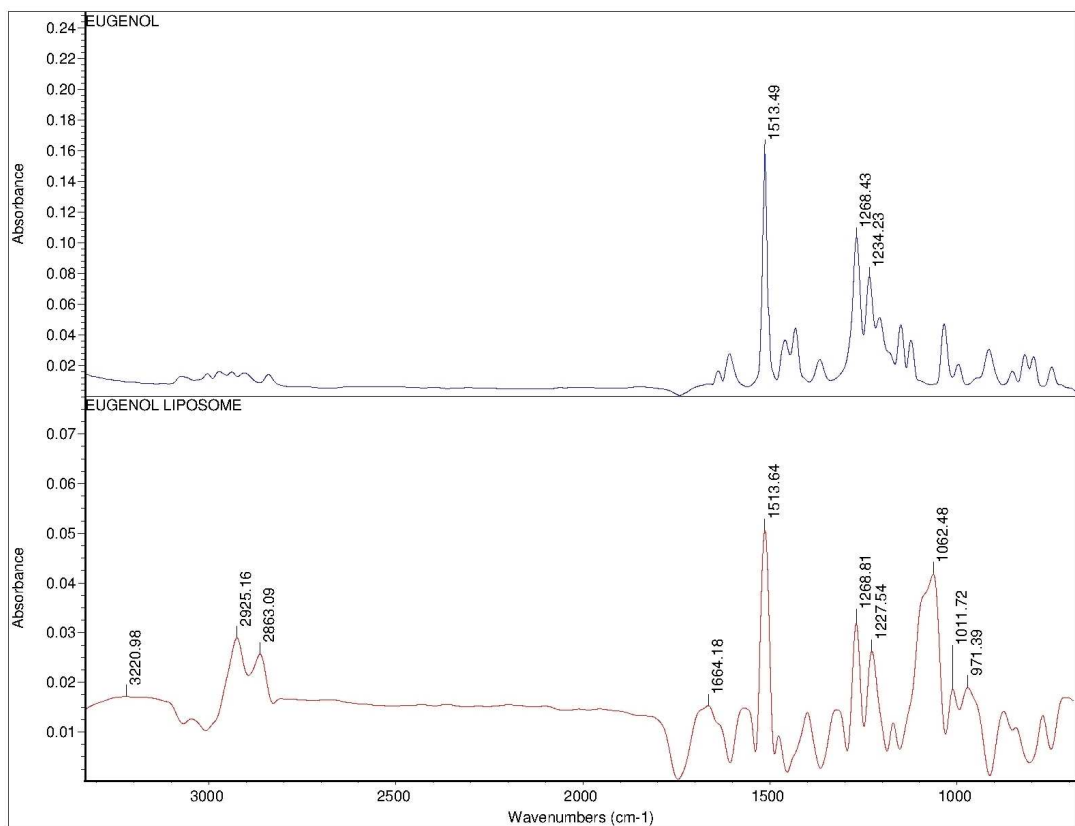


Fig. 2. Espectro FT-IR de eugenol puro e liposomas encapsulando eugenol

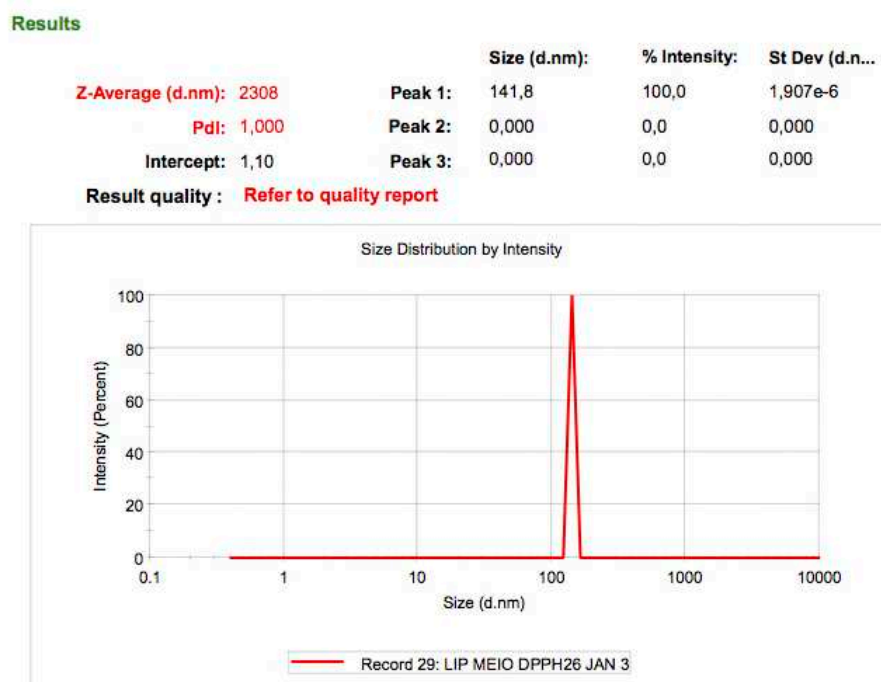


Fig. 3. Analise de tamanho do sistema lipossomal submetido à condições de analise DPPH

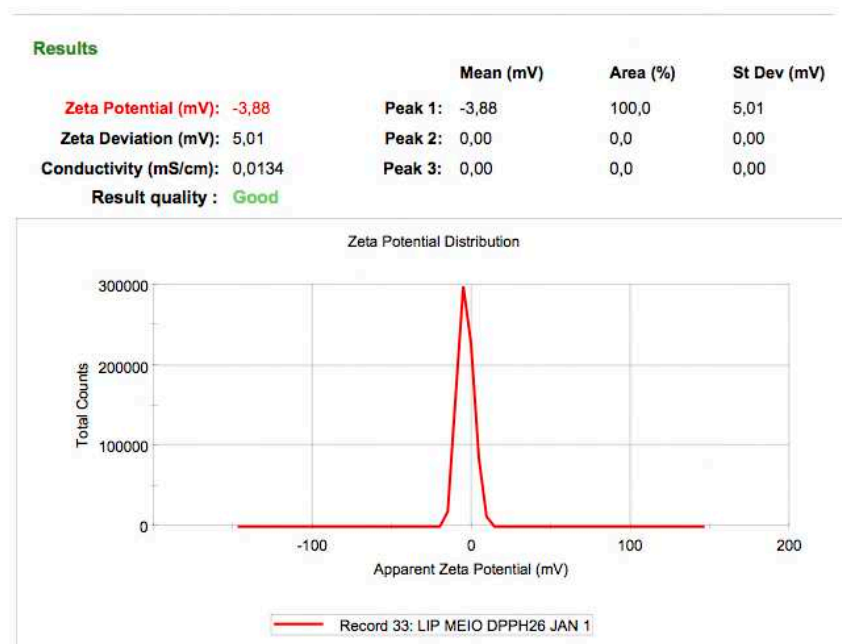


Fig. 4. Analise de potencial zeta do sistema lipossomal submetido à condições de analise DPPH

Results

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 1896	Peak 1: 182,8	100,0	11,67
Pdl: 1,000	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,935	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report

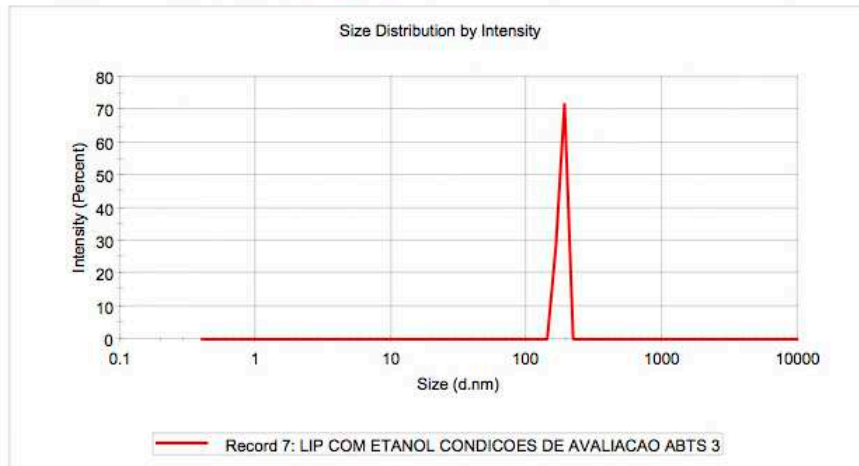


Fig. 5. Análise de tamanho do sistema lipossomal submetido à condições de análise ABTS

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -0,679	Peak 1: -0,679	100,0	2,92
Zeta Deviation (mV): 2,92	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0139	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good

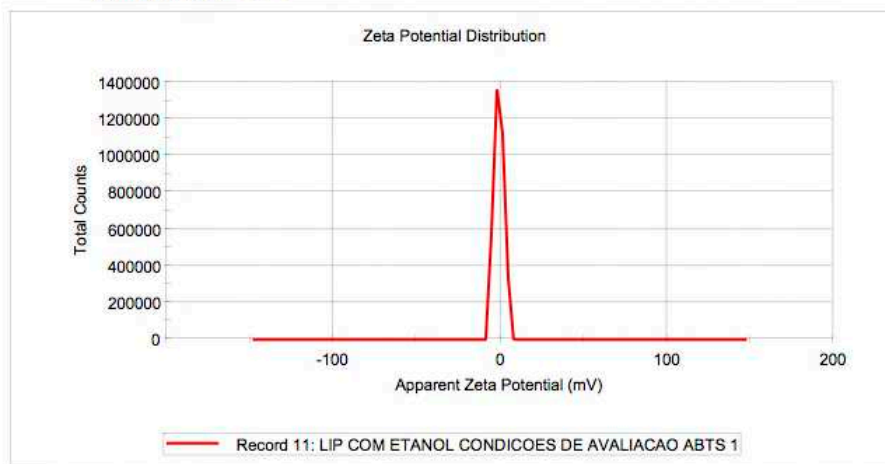


Fig. 6. Análise de potencial zeta do sistema lipossomal submetido à condições de análise ABTS