

ESTUDO DA ENCAPSULAÇÃO DE EXTRATO DE ERVA-MATE EM LIPOSSOMAS PARA A APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

CAROLINE MAYUMI TAMURA^{1,2*} VANDRESSA ALVES^{3*}

VANIA ZANELLA PINTO^{4*} YASMINE MIGUEL SERAFINI MICHELETTO^{5*}

1 INTRODUÇÃO

Lipossomas são estruturas coloidais, contendo um núcleo interno aquoso e uma membrana formada pela auto-associação de moléculas fosfolipídicas em solução. Eles têm sido muito utilizados como sistemas carreadores em função da capacidade de reter substâncias hidrofílicas no seu núcleo aquoso e substâncias hidrofóbicas nas bicamadas lipídicas (HERNÁNDEZ-BORRELL, 1988; MICHELETTO et al., 2015). Além disso, devido a sua composição lipídica, os lipossomas apresentam toxicidade mais baixa em relação a outras matrizes, sendo não-tóxicos, não imunogênicos e biodegradáveis (DARAEI et al., 2016).

A erva-mate, muito encontrada no sul do Brasil, vêm sendo aplicada industrialmente em decorrência de estudos que apontam uma grande diversidade de fitoquímicos em sua composição com propriedades funcionais, como os compostos fenólicos, alcalóides, flavonóides e terpenóides. Estes compostos encontrados na erva-mate são responsáveis por efeitos antioxidantes e funcionais. Atualmente, tem-se verificado que fitoquímicos tidos como bioativos, a exemplo dos compostos fenólicos, podem ser protegidos por diferentes materiais empregados no processo de encapsulação (DELADINO et al., 2008). Neste contexto, os lipossomas podem vir a apresentar um grande potencial para à sua aplicação como sistemas protetores, na conservação de compostos bioativos com atividade antioxidante e antimicrobiana, como é o caso do extrato de erva-mate.

2 OBJETIVOS

Preparação e caracterização de lipossomas, contendo extrato de erva-mate encapsulado, obtidos a partir da lecitina de soja purificada.

¹ Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Laranjeiras do Sul, contato: carolinemtamura@gmail.com

² Grupo de Pesquisa: Química Tecnológica e Ambiental

³ Mestra em química, Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO)

⁴ Professora adjunta, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Laranjeiras do Sul

⁵ Professora adjunta, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Laranjeiras do Sul, **Orientadora.**

3 METODOLOGIA

3.1 Purificação da lecitina de soja

A lecitina de soja utilizada foi cedida pela empresa Gebana[®]. A purificação da lecitina de soja foi feita conforme a metodologia de Mertins et al. (2008) e Malheiros et al. (2010). 10g de lecitina de soja bruta foi dissolvida em 10g em 50 ml de acetato de etila. Após a dissolução, sob agitação, adicionou-se 2 ml de água destilada, que resultou na formação de duas fases. A fase gel foi separada da fase líquida, e então dispersa em 30 ml de acetona, formando aglomerados que foram triturados com o auxílio de um bastão de vidro. A acetona foi separada por decantação e uma nova porção de 30 ml de acetona foi adicionada, repetindo o processo de trituração. O precipitado foi filtrado sob vácuo, seco em dessecador e pesado.

3.2 Preparação da erva mate

A erva-mate foi adquirida em mercado local. Para a obtenção do extrato, foi feita uma infusão de 2 g de erva mate em 40 ml de água ultrapura a 90 °C, por 5 minutos. Então a infusão foi sonicada em banho ultrassônico por 15 minutos. O extrato foi filtrado e armazenado em recipiente sem exposição a luz.

3.3 Preparação dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados de acordo com a metodologia de hidratação do filme lipídico, com algumas modificações (ZAVAREZE, et al, 2014). Pesou-se 1 g da lecitina de soja purificada a qual foi dissolvida em 10 ml de clorofórmio e após a sua completa dissolução, removeu-se o clorofórmio em rota evaporador, na temperatura de 50 °C, formando-se um filme lipídico no balão de fundo redondo. O filme lipídico foi dissolvido em uma solução contendo 1 ml do extrato de erva mate, filtrado em membrana de nylon com porosidade de 0,22 µm, e 20 ml de água ultrapura. A mistura do frasco foi submetida ao aquecimento a 60 °C por 3 minutos, em agitação lenta para não formar espuma. Depois os lipossomas foram submetidos a rápida agitação em vórtex por 1 minuto, com posterior repouso por mais 3 minutos e então aquecidos a 60 °C durante 2 minutos. Após esta etapa, a suspensão foi submetida a 10 ciclos em banho ultrassônico por 1 minuto, ficando em repouso por mais 3 minutos, em cada intervalo, em banho de gelo.

3.4 Caracterização

Para avaliar a eficiência de encapsulamento dos lipossomas, contendo erva-mate, uma alíquota contendo 0,5 ml da solução contendo os lipossomas e 4 ml de água ultrapura foi centrifugada na velocidade de 15000 g por 40 minutos, em temperatura ambiente. Foi feita a leitura do sobrenadante em um UV-VIS (Thermo Scientific/ Evolution 2001) e após o

processo adicionou-se água ultrapura a amostra. Repetiu-se todo o procedimento até que a absorbância do sobrenadante fosse próxima a zero, indicando a presença apenas de lipossomas. Para romper os lipossomas, foram adicionados 4 ml de etanol 99,9 % e homogeneizado em um vórtex com alta velocidade, até a completa solubilização dos lipossomas com posterior leitura no UV-VIS em uma faixa de 150 a 750 nm. A alíquota da solução contendo os lipossomas com o extrato de erva mate foi também analisada em um HPLC-DAD (L 201048, Shimadzu). A separação foi feita usando uma coluna C18 (250 x 4,6 mm x 0,5 μ m, NST). A fase móvel consistiu de água ultrapura (solvente A) e metanol (solvente B) ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. A eluição do gradiente começou em 14% do solvente B, aumentando para 55% em 16 minutos e 100% em 21 minutos, o qual se manteve até 24 minutos, com retorno aos 14% em 24,1 até o final da corrida (27 minutos). A temperatura da coluna foi mantida em 40 °C com a taxa do fluxo de fase móvel em 1,2 ml/min e volume de injeção de 10 μ l. A identificação dos picos foi realizada pela comparação dos picos do extrato de erva mate em relação ao tempo de retenção das soluções padrões de ácidos clorogênicos (Sigma-Aldrich) na faixa de comprimento de onda em 325 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da análise de UV-VIS, estão apresentados na Figura 1:

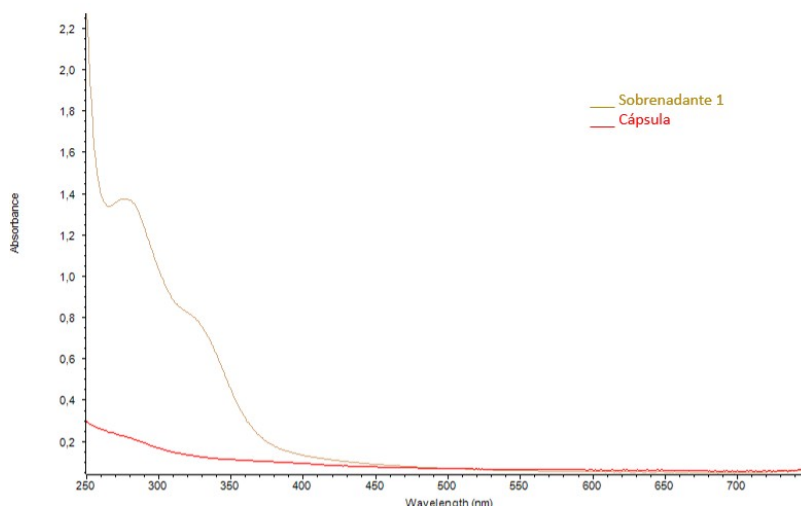


Figura 1: Gráfico de absorvância e comprimento de onda (nm).

A linha de coloração amarela (sobrenadante 1) mostra o resultado obtido para a amostra que contém o sobrenadante da primeira centrifugação, ou seja, os compostos de erva-mate que não foram encapsulados e estão em solução aquosa. Pode-se observar que esta amostra apresenta absorção no comprimento de onda 325nm característico da presença de clorogênicos da erva-mate (PILATTI-RICCIO, 2019). A curva de coloração vermelha

(cápsula) refere-se a amostra analisada após o rompimento da membrana dos lipossomas com o etanol, em que se pode notar a ausência da absorção no comprimento de onda característicos dos clorogênicos (325nm). Sendo assim, os resultados obtidos sugerem que não houve o encapsulamento dessas moléculas nos lipossomas. Outra hipótese é que a taxa de encapsulamento seja muito baixa. Com intuito de verificar se uma pequena quantidade dos ácidos clorogênicos poderia ter sido encapsulada nos lipossomas, utilizou-se a técnica de HPLC-DAD para a análise dos compostos do extrato de erva-mate, e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 2.

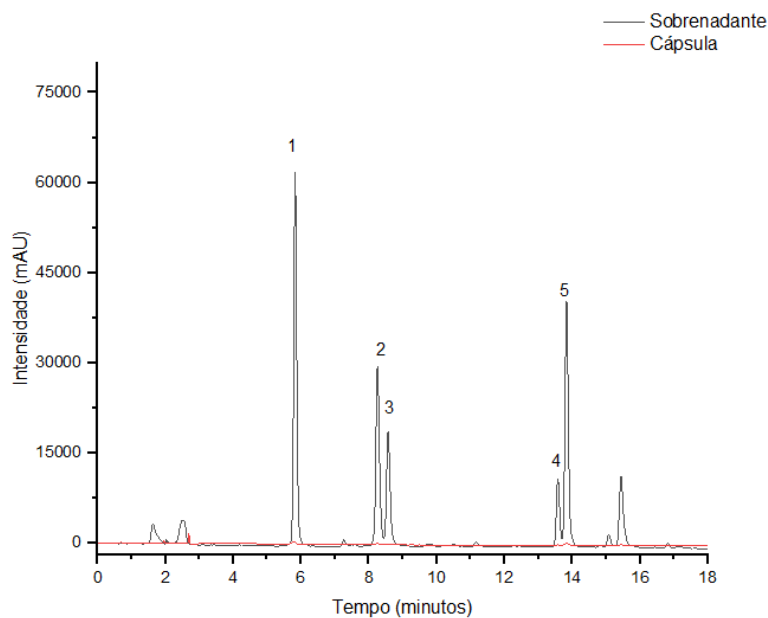


Figura 2: Cromatograma hplc -uv da eficiência do encapsulamento. Os números nos picos correspondem a identificação dos clorogênicos (1. 3-CQA; 2. 5-QCA; 3. 4-CQA; 4. 3,4-DQA; 5. 4,5-DQA).

Pela análise do gráfico 2, é possível verificar que não ocorreu o encapsulamento da erva-mate no núcleo dos lipossomas, já que após o rompimento da membrana dos mesmos, não foi possível verificar a presença dos picos característicos dos compostos da erva-mate, em comparação com a sobrenadante da primeira centrifugação. Entretanto, estudos estão sendo realizados para se verificar se a limitação do encasulamento nos lipossomas está no método ou na amostra de erva-mate.

5 CONCLUSÃO

Comparando os resultados obtidos no presente trabalho com os objetivos propostos, pode-se afirmar, que até o momento, não foi possível encapsular o extrato de erva-mate nos

lipossomas preparados a partir da purificação da lecitina de soja, utilizando-se o método da hidratação de filme lipídico. Portanto, mais estudos devem ser realizados com intuito de se obter uma taxa de encapsulamento satisfatória do extrato de erva-mate em lipossomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DARAE, H; EATEMAD, A.; ABBASI, E.; AVAL, Sf.; KOUHI, M.; AKBARZADEH, A. Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 410-422, 17 set. 2014

DELADINO, Lorena; ANBINDER, Pablo S.; NAVARRO, Alba S.; MARTINO, Miriam N. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 1, p. 126-134, jan. 2008.

HERNÁNDEZ-BORRELL, J. A new confirmation of selective action of liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 47, p. 129-132, 1988.

MALHEIROS, OS.; DAROIT, DJ.; BRANDELLI, A. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 284-292, jun. 2010.

MERTINS, O.; SEBBEN, M.; SCHNEIDER, P.; POHLMANN, A.; SILVERIA, N. Characterization of soybean phosphatidylcholine purity by ¹H and ³¹P NMR. *Química Nova*. v. 31, p.1856-1859. 22 set. 2008

MICHELETTO, YMS.; SILVEIRA, NP.; BARBOZA, DM.; SANTOS, MC.; LIMA, VR.; GIACOMELLI, FC.; MARTINEZ, JCV.; FRIZON, TEA.; BÓ, AG. Investigation of self-association between new glycosurfactant N -acetyl-β- d -glucosaminyl-PEG-docosanate and soybean phosphatidylcholine into vesicles. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S.L.], v. 467, p. 166-172, fev. 2015.

PILATTI-RICCIO, D.; SANTOS, DF.; MEINHART, AD.; KNAPP, MA.; HACKBART, HCS.; PINTO, VZ. Impact of the use of saccharides in the encapsulation of *Ilex paraguariensis* extract. **Food Research International**, [S.L.], v. 125, p. 108600, nov. 2019.

ZAVAREZE, ER.; TELLES, AC.; HALAL, SLMEI.; ROCHA, M.; COLUSSI, R.; ASSIS, LM.; CASTRO LAS.; DIAS, ARG.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 59, n. 2, p. 841-848, dez. 2014.

Palavras-chave: lectina de soja; lipossomas modificados; erva mate; compostos fenólicos.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2020-0389.

Financiamento: Fundação Araucária.