

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO EXTRATO DE ERVA-MATE ENCAPSULADO

BRENDA VIEIRA DE JESUS ^{1*} VANIA ZANELLA PINTO^{2*} GISELE LOURO PERES^{3*}
YASMINE MIGUEL SERAFINI MICHELETTO^{4*}

1 Introdução

Lipossomas são estruturas coloidais, contendo um núcleo interno aquoso e uma membrana formada pela auto-associação de moléculas fosfolipídicas em bicamadas. (HERNÁNDEZ-BORRELL, 1988). Devido a sua composição lipídica, os lipossomas apresentam baixa toxicidade, atóxicos, não imunogênicos e biodegradáveis (DARAE et al., 2016). Muitos compostos ativos podem ser encapsulados no núcleo aquoso dos lipossomas ou dispersos no meio fosfolipídico, junto à bicamada.

A erva-mate vem sendo aplicada industrialmente em decorrência de estudos que apontam uma grande diversidade de fitoquímicos, em sua composição, com propriedades funcionais, responsáveis por efeitos antioxidantes e funcionais. Esses fitoquímicos, tidos como bioativos, podem ser protegidos por diferentes materiais empregados no processo de encapsulação (DELADINO et al., 2008; LAINE et al., 2008). Neste contexto, os lipossomas apresentam um grande potencial para serem aplicadas como sistemas protetores e de conservação de compostos bioativos.

2 Objetivos

Preparação e caracterização de lipossomas contendo o extrato de erva-mate disperso na membrana lipídica.

3 Metodologia

3.1 Materiais

A lecitina de soja utilizada foi cedida pela empresa Gebana. A fosfatidilcolina (PC) pura

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

² Professora adjunta, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Laranjeiras do Sul;

³ Professora adjunta, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Laranjeiras do Sul;

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

foi obtida da empresa Acros Organics e o colesterol foi obtido na empresa Sigma Aldrich Brasil LTDA. A erva-mate foi adquirida no mercado local.

3.2 Purificação da lectina de soja

A purificação da lecitina de soja foi realizada conforme descrito na literatura (MERTINS et al., 2008). Dissolveu-se 10 g da lectina de soja em 50 mL de acetato de etila e, sob agitação, adicionou-se 2 mL de água destilada, resultando 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 utilizando um bastão de vidro. Separou-se a acetona por decantação e uma nova porção de 30 mL de acetona foi adicionada, repetindo o processo de trituração. O precipitado foi filtrado sob vácuo e mantido em dessecador. A lecitina de soja purificada contém majoritariamente fosfatidilcolina (PC) em sua composição.

3.3 Preparação da erva mate

O extrato de erva-mate foi preparado, utilizando-se 0,058 g de erva mate e 15 mL de álcool etílico (95% P.A). A mistura foi aquecida até 82 °C e mantida em fervura por 3 h, seguida de agitação em um agitador magnético (150 rpm) com posterior filtragem para separação dos sólidos insolúveis.

3.4 Preparação dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados pelo método de evaporação em fase reversa (SZOKA; PAPAHADJOPOULOS, 1978; MERTINS et al., 2005). Primeiramente, a fosfatidilcolina (PC), pura ou a purificada (0,04 g), o colesterol (0,02 g) e o extrato de erva-mate (200 , 500 ou 1000 µL) foram dissolvidos em solvente orgânico. Nesta etapa, foram testados dois solventes orgânicos, o clorofórmio e o hexano (de grau alimentício). Após a dissolução, adicionou-se a água ultrapura, ocorrendo a formação de duas fases. Em seguida, sonicou-se por dois minutos para a formação de micelas reversas que, após a evaporação do solvente orgânico em rotaevaporador, obteve-se um filme lipídico, denominado organogel. Por fim, adicionou-se água ultrapura, sob constante agitação, para a formação de uma suspensão concentrada de lipossomas.

3.5 Caracterização

As amostras de lipossomas, na presença e na ausência do extrato de erva-mate, foram analisadas por meio da técnica de espectroscopia no ultravioleta e visível (UV-VIS), no equipamento Thermo Scientific, Multiskan GO, em temperatura ambiente, empregando-se cubeta de quartzo, com caminho óptico de 1 cm.

As leituras foram realizadas na faixa de 200 a 600 nm. Utilizou-se, também, a técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier sob refletância total atenuada (ATR-FTIR) (IRTracer-100, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) para a caracterização das amostras de lipossomas. Os espectros foram obtidos na faixa de 4000-400 cm^{-1} , à temperatura ambiente, com 100 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

As análises de DLS e potencial zeta (PZ) foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano series ZS90 (Malvern), locado no campus Realeza-UFFS, e para tanto, utilizou-se uma cubeta de poliestireno DTS0012. Essas análises foram realizadas em temperatura ambiente, obtendo-se o diâmetro médio das partículas e o potencial zeta.

4 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos da análise de UV-VIS, estão apresentados na figura 1. Primeiramente, realizou-se um estudo de comparação dos dois solventes (clorofórmio e hexano) empregados na primeira etapa de preparação dos lipossomas (3.4). A partir da figura 1 a), pode-se observar que não houve diferença significativa entre os espectros obtidos para as duas amostras (clorofórmio-linha vermelha e hexano-linha azul). Portanto, optou-se pela utilização do hexano para a preparação das demais amostras de lipossomas, por se tratar de um solvente de grau alimentício.

Além disso, também não foi possível observar uma diferença significativa entre os espectros obtidos para as amostras de lipossomas preparadas com PC pura e a PC purificada.

A amostra contendo apenas o extrato erva-mate (linha preta), apresentou uma absorção no comprimento de onda 325 nm, característico da presença de clorogênicos da erva-mate (PILATTI-RICCIO, 2019). Contudo, esse comprimento de onda não foi observado nos lipossomas contendo o extrato de erva-mate na concentração de 200 μL (Lip PC pura erva 200 e Lip PC purificada erva 200), sugerindo que os clorogênicos presentes na erva-mate foram inseridos (dispersos) na bicamada lipídica e, portanto, fazem parte da composição da membrana dos lipossomas, não estando livres em solução. Já nas amostras de lipossomas com concentrações de 500 μL e 1000 μL de erva-mate, observou-se a presença desse comprimento de onda, indicando a possível presença de clorogênicos em solução.

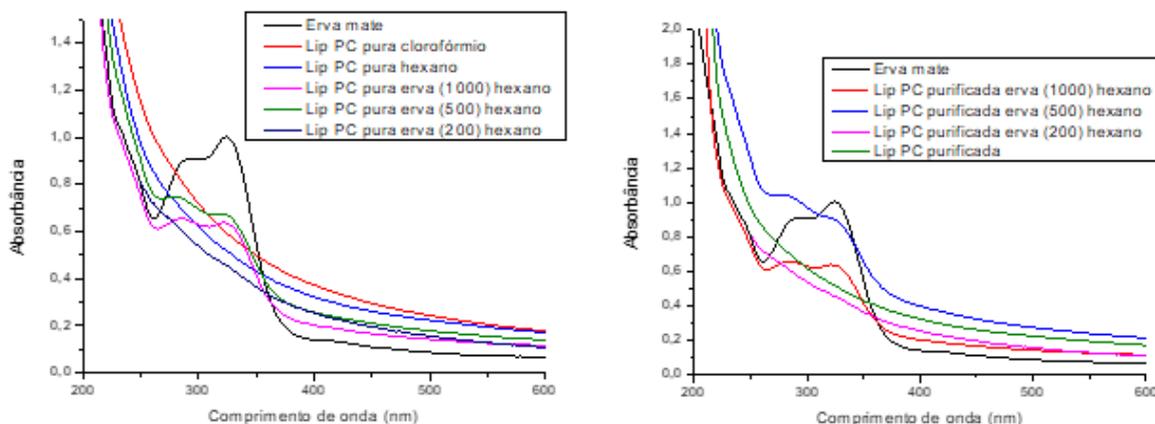


Figura 1: a) Espectros de UV das amostras de lipossomas, na presença e na ausência do extrato de erva-mate, utilizando-se a fosfatidilcolina (PC) pura. b) Espectros de UV das amostras de lipossomas, na presença e na ausência do extrato de erva-mate, utilizando-se a fosfatidilcolina (PC) purificada da lecitina de soja.

Com intuito de estudar uma possível inserção das moléculas da erva-mate na membrana dos lipossomas, empregou-se a espectroscopia no infravermelho e os espectros das amostras de encontram-se na figura 2. Pode-se observar que o espectro da amostra de extrato de erva-mate (linha preta) apresenta muitas bandas (vibrações e estiramentos) que podem ser de mais de um grupo funcional, dificultando sua identificação (PILATTI-RICCIO, 2019). Contudo, essas bandas não estão presentes nas amostras de lipossomas na presença do extrato de erva-mate, nas diferentes concentrações estudadas, sugerindo que as moléculas presentes no extrato estão dispersas na membrana dos lipossomas.

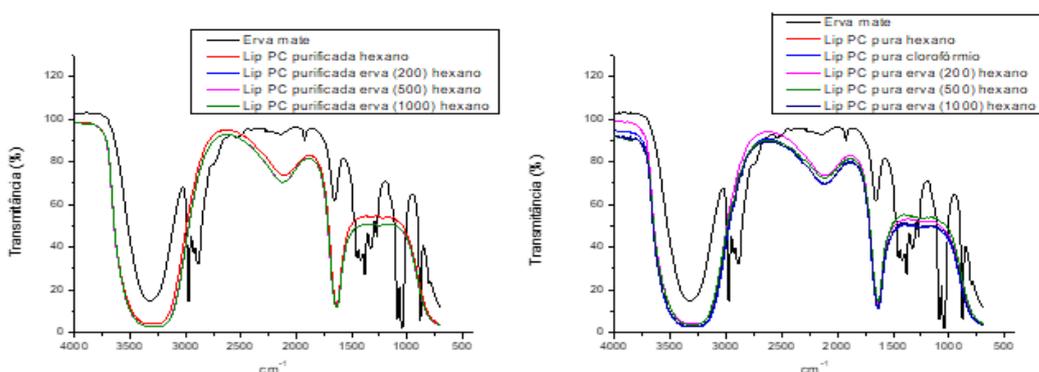


Figura 2: a) Espectros de infravermelho das amostras de lipossomas, na presença e na ausência do extrato de erva-mate, utilizando-se a fosfatidilcolina (PC) purificada da lecitina de soja. b) Espectros de infravermelho das amostras de lipossomas, na presença e na ausência do extrato de erva-mate, utilizando-se a fosfatidilcolina (PC) pura.

Por fim, a técnica de potencial zeta (PZ) indicou um valor -51,3 mV para os lipossomas preparados a partir da PC pura e com o solvente hexano. O valor negativo de PZ indica que as vesículas apresentam superfície externa com predominância de cargas negativas, indicando relativa estabilidade coloidal em relação aos processos de agregação, ou seja, quando uma vesícula em difusão se encontra com outra na suspensão, elas irão se repelir.

Para essa mesma amostra o valor de diâmetro obtido foi de 625 nm. O valor do PZ para os lipossomas preparados a partir da PC purificada e com solvente hexano foi de -65,8 mV e diâmetro de 637 nm. Os valores de PZ obtidos para as amostras de lipossomas na presença de erva-mate se mantiveram muito semelhantes aos valores dos lipossomas na ausência de erva-mate. Entretanto, para os diâmetros, observou-se uma diminuição na presença da erva-mate (em torno de 400 nm), sugerindo uma reorganização da membrana lipossômica em função da presença da erva-mate.

5 Conclusão

Os resultados obtidos das análises de ultravioleta, infravermelho e potencial zeta, sugerem que houve uma dispersão das moléculas presentes no extrato de erva-mate na membrana dos lipossomas.

Referências Bibliográficas

- DARAE, H. et al. A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 44, p. 381-391, 2016.
- DELADINO, L. et al. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, n. 1, p. 126–134, 2008.
- HERNÁNDEZ-BORRELL, J. A new confirmation of selective action of liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 47, p. 129-132, 1988.
- LAINÉ, P. et al. Storage stability of microencapsulated cloudberry (*Rubus chamaemorus*) phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 23, p. 11251–11261, 2008.
- MERTINS, O. et al. Production of soybean phosphatidylcholine–chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 138, p. 29- 27, 2005.
- MERTINS, O. et al. Caracterização da pureza de fosfatidilcolina da soja através de RMN de ¹H e de ³¹P. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1856-1859, 2008.
- PILATTI-RICCIO, D., dos Santos, D. F., Meinhart, A. D., Knapp, M. A., Hackbart, H. C. dos S., & Pinto, V. Z. (2019). Impact of the use of saccharides in the encapsulation of *Ilex paraguariensis* extract. *Food Research International*, 125, 108600.
- SZOKA, F.C.; PAPAHDJOPOULOS, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of American*, v.140, p. 4194-4198, 1978.

Palavras-chave: lipossomas; erva mate; clorogênicos; membrana lipídica.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2020-0430 / **Financiamento:** UFFS