

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE LIPOSSOMAS CONTENDO ANTOCIANINAS EXTRAÍDAS DO BAGAÇO DE MIRTILLO

Éricles Forrati Machado¹; Lauren Fresinghelli Ferreira²; Fernanda Reis Favarin³; Tatiana Emanuelli⁴; Vivian Bochi⁵; Aline Ferreira Ourique⁶

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo preparar, caracterizar e avaliar a estabilidade de lipossomas, com e sem vitamina E, contendo antocianinas oriundas do mirtilo. As formulações foram preparadas pelo método de evaporação em fase reversa e caracterizadas de acordo com os seguintes parâmetros: diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH. A estabilidade foi avaliada por 30 dias em duas condições de armazenamento, temperatura ambiente e refrigeração. O método utilizado demonstrou-se eficiente no desenvolvimento dos lipossomas, que se apresentaram na escala nanométrica e com distribuição de tamanho homogêneo. Todas as formulações apresentam boa estabilidade após 30 dias em todos os parâmetros de caracterização, apenas os lipossomas sem vitamina E apresentam um pequeno aumento após 30 dias nos parâmetros de diâmetro e índice de polidispersão, porém, destaca-se que essa diferença não foi significativa a curto prazo, mas possivelmente a longo prazo a vitamina E auxilie na melhora da estabilidade dos lipossomas.

Palavras-chave: Nanotecnologia; Produtos naturais; Caracterização.

ABSTRACT

This work aimed to develop, characterize and evaluate the stability of liposomes with and without vitamin E containing anthocyanins. The formulations were prepared by the reverse phase evaporation method and characterized according to the following parameters: average size, polydispersity index, zeta potential and pH. Stability was evaluated for 30 days under two storage conditions, room temperature and refrigerator. The method used proved to be efficient in the development of liposomes, which were on the nanometric scale and with a homogeneous size distribution. All formulations show good stability after 30 days in all characterization parameters, only the liposomes without vitamin E show a small increase after 30 days in the parameters of diameter

¹ Éricles Forrati Machado – Universidade Franciscana. ericles.forrati@ufn.edu.br.

² Lauren Fresinghelli Ferreira – Universidade Federal de Santa Maria. laurenfferreira@hotmail.com.

³ Fernanda Reis Favarin – Universidade Federal de Santa Maria. fernanda.favarin@live.com.

⁴ Tatiana Emanuelli – Universidade Federal de Santa Maria. tatiana.emanuelli@uol.com.br.

⁵ Vivian Bochi – Universidade Federal de Santa Maria. vivian_bochi@yahoo.com.br.

⁶ Aline Ferreira Ourique – Universidade Franciscana. alineourique@gmail.com.

and polydispersity index, however it is highlighted that this difference was not significant in the short term. term, but possibly in the long term, vitamin E helps to improve the stability of liposomes.

Keywords: Nanotechnology; Natural products; Description.

Eixo Temático: Atenção Integral e Promoção à Saúde (AIPS).

1. INTRODUÇÃO

As antocianinas (ACNs) são compostos bioativos pertencentes a família dos flavonoides, são pigmentos solúveis em água responsáveis pelas cores azul, vermelho e roxo de flores, frutas, vegetais e alguns grãos de cereais (PATRAS *et al.*, 2010; LIMA, 2021). Esses compostos são formados naturalmente nesses produtos, e apresentam grande importância para a reprodução e crescimento, promovendo a proteção do vegetal contra patógenos e predadores, e também contra variações no conteúdo de água, luz e deficiência de nutrientes (BOCHI, 2015; SEBASTIAN *et al.*, 2015).

O mirtilo, fruto pequeno, nativo e economicamente muito importante na América do Norte, possui conteúdo de pigmentos naturais, como os compostos fenólicos de natureza antociânica (ROCHA, 2009). O fruto *in natura* não é muito consumido no Brasil, com isso grande parte da produção dos frutos é destinada para obtenção de sucos e derivados, esse processamento gera subprodutos residuais como sementes e cascas, denominados em conjunto como bagaço que é caracterizado por ser rico em ACNs e outros polifenóis sendo, portanto, considerado uma boa fonte de corantes naturais e compostos antioxidantes (WROLSTAD; CULVER, 2012; ZARDO, 2014).

O interesse no estudo dessas substâncias é estimulado pelo potencial benéfico à saúde que pode estar relacionado à capacidade antioxidante desse grupo de fitoquímicos, além de estarem associados ao melhoramento de propriedades organolépticas importantes de frutas e produtos processados, como cor e sabor (AHAMD *et al.*, 2015; LITVINOV, 2007).

As ACNs têm sido usadas como pigmentos em uma ampla variedade de alimentos e bebidas. Além disso, esse grupo de compostos pode ser eficaz para aumentar a capacidade antioxidante de produtos e, desta forma, melhorar a atividade antimicrobiana e inibidora de enzimas no produto no qual as ACNs sejam adicionadas

(LIMA, 2021). Ainda sobre os seus benefícios, as ACNs podem ser usadas como aditivo natural, desempenhando um papel vital na prevenção e/ou tratamento de doenças graves como câncer, obesidade, cardiopatias, entre outras (WINTER e BICKFORD, 2019).

Devido a importância dos seus potenciais benefícios, prevenir e controlar a degradação das ACNs é fundamental para manutenção de suas propriedades antioxidantes e poder corante (SUI *et al.*, 2016). Embora as ACNs sejam importantes antioxidantes, essas possuem aplicação limitada devido a sua elevada instabilidade, degradabilidade e interação com outros compostos da matriz alimentar. A cor e a estabilidade das ACNs são afetadas por diversos fatores, como pH, temperatura de armazenamento e processamento, estrutura química, concentração, luz ultravioleta, oxigênio, solventes, presença de enzimas, copigmentos, proteínas e íons metálicos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019).

Diante dessas limitações surge a nanotecnologia, a qual pode ser empregada para assegurar que os compostos bioativos permaneçam ativos, protegendo-os da luz, cisalhamento, oxigênio, umidade, calor ou outras condições extremas, prevenindo reações indesejadas e a sua degradação, aumentando assim a sua estabilidade e mantendo a sua viabilidade (DEVI *et al.*, 2017).

Dentre os nanossistemas como potencial de encapsulação para compostos bioativos estão os lipossomas, vesículas com uma ou múltiplas camadas, que envolvem uma fase aquosa através de uma membrana de fosfolipídios. Os lipossomas são estruturas altamente versáteis capazes de carregar compostos lipofílicos e hidrofílicos, possuem uma elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade (LAOUNI *et al.*, 2012).

Com isso, o objetivo desse trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar a estabilidade durante 30 dias de lipossomas contendo antocianinas extraídas do bagaço de mirtilo.

2. METODOLOGIA

2.1 DESENVOLVIMENTO DOS LIPOSSOMAS

Na tabela 1 encontram-se os constituintes utilizados no desenvolvimento dos lipossomais.

Tabela 1 – Composição das formulações lipossomais preparadas através do método de evaporação em fase reversa

Componentes	Quantidade
Fase orgânica (FO)	
Fosfolipídio – Lipoïd S100®	0,80 g
Colesterol	0,15 g
Vitamina E (opcional)	0,02 g
Etanol	40 mL
Fase aquosa (FA)	
Polissorbato 80 – Tween 80®	0,15 g
Extrato de antocianinas	100 mL

Os lipossomais foram preparados de acordo com o método descrito por Mertins *et al* (2005) e Oliveira *et al* (2014), com modificações. Inicialmente foram adicionados em um béquer os componentes da FA com uma barra magnética, e então a solução foi para a agitação em um agitador magnético com temperatura controlada (± 32 °C), até a total homogeneização da FA. Concomitante a homogeneização da FA, em um balão de fundo redondo foram adicionados os componentes da FO e foram levados ao banho de ultrassom por 10 minutos. Após a homogeneização de ambas as fases, foi adicionado 4 mL da FA na FO e a FO foi levada novamente ao banho de ultrassom por mais 10 minutos para a homogeneização e formação das micelas reversas. Após a formação das micelas, a solução foi levada ao evaporador rotatório (± 80 rpm/35 °C) com vácuo, para ocorrer a evaporação do etanol e a formação do organogel. Após a evaporação do solvente o restante da FA foi vertido sobre o organogel, e então a formulação voltou ao evaporador rotatório por mais 30 minutos (± 120 rpm/21 °C), sem vácuo, para agitação e formação dos lipossomais. Após a agitação, a formulação lipossomal passou por um processo de extrusão para a uniformização do tamanho das vesículas lipossomais. As formulações foram preparadas para um volume de 100

mL de lipossomas por lote, em triplicata, foram desenvolvidos 3 lotes com vitamina E e 3 lotes sem vitamina E.

2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS LIPOSSOMAS

As formulações lipossomais foram caracterizadas de acordo com diâmetro de vesícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH.

2.2.1 Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão

O diâmetro médio de vesícula e o índice de polidispersão foram determinados através do espalhamento de luz dinâmico no equipamento Zetasizer® Nano-ZS modelo ZEN 3600. As formulações lipossomais foram diluídas 500 vezes (v/v) em água deionizada, que foi filtrada com o uso de uma seringa e membrana com porosidade de 0,45 µm de diâmetro. Os resultados foram expressos em nanômetros (nm) e analisados através da leitura média de três repetições por lote de formulação.

2.2.2 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado através da técnica de mobilidade eletroforética no equipamento Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600. As soluções lipossomais foram diluídas 500 vezes (v/v) em água deionizada que foi filtrada com o uso de uma seringa e membrana de porosidade de 0,45 µm de diâmetro. Os resultados foram expressos em milivolts (mV) e analisados através da leitura média de três repetições por lote.

2.2.3 Determinação de pH

O pH foi determinado com auxílio de um potenciômetro (DM-22, Digimed®) previamente calibrado, as leituras foram realizadas em triplicata, diretamente nas amostras.

2.3 ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS

Para a determinação da estabilidade, foram preparados três lotes de cada formulação contendo ou não vitamina E (LIP-VE e LIPSVE, n = 3), cada lote foi dividido em dois frascos e cada frasco foi armazenado em uma temperatura diferente,

temperatura ambiente (TA 25 °C) e refrigeração (TG 4 °C). Nos dias 0, 7, 15 e 30 foram analisados os parâmetros de diâmetro da vesícula, IPD, potencial zeta e pH.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, os dados foram demonstrados como a média \pm desvio padrão e submetidos à análise de significância estatística através da análise de variância (ANOVA) seguida de teste Tukey, onde diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$. As análises assim como a elaboração dos gráficos foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na tabela 2 encontram-se os resultados da caracterização e estabilidade dos lipossomas em relação ao diâmetro médio (nm), índice de polidispersão, potencial zeta (mV) e pH.

Tabela 2 – Caracterização e estabilidade das suspensões lipossomais

Diâmetro médio

	Tempo 0	7 dias	15 dias	30 dias
LIP-VE TA	150 \pm 6,6	150 \pm 9,8	144 \pm 0,01	146 \pm 2,2
LIPSVE TA	150 \pm 7,0	151 \pm 12,4	138 \pm 1,7	169 \pm 14,5
LIP-VE TG	*	138 \pm 1,6	137 \pm 1,2	152 \pm 7,0
LIPSVE TG	*	139 \pm 5,3	137 \pm 4,6	152 \pm 12,8

Índice de polidispersão

	Tempo 0	7 dias	15 dias	30 dias
LIP-VE TA	0,27 \pm 0,02	0,25 \pm 0,03	0,26 \pm 0,02	0,31 \pm 0,02
LIPSVE TA	0,29 \pm 0,00	0,27 \pm 0,02	0,24 \pm 0,01	0,36 \pm 0,00
LIP-VE TG	*	0,18 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01	0,26 \pm 0,03
LIPSVE TG	*	0,22 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02	0,29 \pm 0,05

Potencial zeta

	Tempo 0	7 dias	15 dias	30 dias
LIP-VE TA	-8 \pm 1,72	-4 \pm 0,21	-7 \pm 1,07	-9 \pm 1,74
LIPSVE TA	-3 \pm 0,23	-6 \pm 0,45	-7 \pm 0,00	-10 \pm 0,47

LIP-VE TG	*	-6 ± 1,94	-8 ± 2,09	-8 ± 2,09
LIPSVE TG	*	-18 ± 0,91	-10 ± 0,07	-6 ± 0,12
pH				
	Tempo 0	7 dias	15 dias	30 dias
LIP-VE TA	3,2 ± 0,01	3,3 ± 0,01	3,3 ± 0,01	3,3 ± 0,00
LIPSVE TA	3,2 ± 0,00	3,3 ± 0,01	3,3 ± 0,00	3,3 ± 0,00
LIP-VE TG	*	3,3 ± 0,01	3,3 ± 0,01	3,3 ± 0,00
LIPSVE TG	*	3,3 ± 0,01	3,3 ± 0,00	3,3 ± 0,00

(LIP-VE) Lipossoma contendo vitamina E; (LIPSVE) Lipossoma sem vitamina E; (TA) Temperatura ambiente; (TG) Temperatura de refrigeração. Os dados representam média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada via ANOVA seguido de Tukey, onde diferença foi considerada significativa quando *p<0,05.

Em relação ao diâmetro médio dos lipossomas, após o preparo, foi possível afirmar que ambas as formulações, com e sem vitamina E foram produzidos na escala nanométrica. As formulações apresentaram IPD inferior a 0,3, e com isso podem ser consideradas monodispersas, pois apresentam distribuição de tamanho homogênea. Poucos estudos são encontrados que relacionam a encapsulação de ACNs em lipossomas, Lee e Na (2019), empregando método de carregamento ativo com gradiente de pH, desenvolveram lipossomas contendo ACNs, e nesse estudo os lipossomas apresentam tamanho médio de cerca de 120 nm e IPD inferior a 0,3, mantendo-se estáveis por pelo menos 14 dias, que foi o tempo de estabilidade avaliado.

Durante a análise de estabilidade por 30 dias, pode-se observar que LIPSVE TA tiveram um pequeno aumento no diâmetro médio em TA após 30 dias 169 ± 14,5 nm em comparação ao LIP-VE TA, que apresentou 147 ± 2,2 nm de diâmetro após 30 dias em temperatura ambiente. Apesar dessa pequena diferença, a mesma não foi considerada significativa ($p = 0,67$). Os valores de IPD após o período de estabilidade demonstraram que as formulações armazenadas em TG mantiveram melhor a homogeneidade na distribuição de tamanho após 30 dias, onde ambas formulações LIPSVE TG e LIP-VE TG, permaneceram com valores de IPD abaixo de 0,3. Os lipossomas que apresentaram maiores valores de IPD após 30 dias foram LIPSVE TA, no entanto, a formulação ainda pode ser considerada estável. De modo geral, em relação ao tamanho médio e índice de polidispersão todas as formulações

demonstraram-se estáveis após o período de estabilidade analisado em ambas condições de armazenamento, no entanto, as formulações armazenadas em TA, em especial o lipossoma sem vitamina E, apresentou a maior variação nos parâmetros de caracterização, salientando que, nessa condição de armazenamento, em uma análise de estabilidade mais prolongada, a vitamina E pode ser importante na melhora da estabilidade dos lipossomas.

Em relação ao potencial zeta, os resultados demonstraram valores levemente negativos, além disso, não foi observada diferença significativa entre os lipossomas, nem nas condições de armazenamento após 30 dias. No estudo de Lee e Na (2019) os lipossomas desenvolvidos contendo ACNs também apresentaram valor de potencial zeta negativos. Os valores de PZ negativos estão relacionados com as características da formulação, cabe salientar que o PZ de nossas formulações estava próximo da neutralidade, indicando que as vesículas aqui desenvolvidas majoritariamente possuem estabilização estérica, consequência da presença de um tensoativo não iônico na interface vesícula/água (JÄGER, *et al*, 2009).

Outros estudos como o de Guldiken *et al* (2018) também desenvolveram e avaliaram a estabilidade de lipossomas contendo ACNs derivadas do extrato de cenoura preta, nesse trabalho os autores conseguiram obter lipossomas contendo 0,4 % de extrato de ACNs, apresentando diâmetro com cerca de $46,9 \pm 1,26$ nm, IPD de $0,306 \pm 0,02$ e potencial zeta negativo após 21 dias. Apesar da estabilidade em relação ao valor médio de diâmetro dos lipossomas, os mesmos não apresentaram uma distribuição de tamanho homogêneo após os 21 dias, além disso, a proporção de extrato utilizada é considerada relativamente baixa (0,4%), o que pode estar relacionado com o tamanho médio inferior a 50 nm apresentado pelos lipossomas.

A partir da análise de pH pode-se verificar que os lipossomas desenvolvidos nesta pesquisa apresentaram pH ácido, que está relacionado aos constituintes da formulação. Não ouve diferença nos valores de pH entre as formulações, além disso, os mesmos se mantiveram estáveis após 30 dias em ambas as condições de armazenamento testadas.

4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados nesse trabalho, conclui-se que o método utilizado foi eficiente no desenvolvimento dos lipossomas, pois as formulações

apresentaram-se na escala nanométrica e com boa estabilidade após 30 dias. Não houve diferença significativa entre os lipossomas sem e com vitamina E após 30 dias, porém, cabe salientar que os lipossomas sem vitamina E armazenados em temperatura ambiente foram os únicos que apresentaram um pequeno aumento nos parâmetros de caracterização após 30 dias, demonstrando que, a longo prazo, possivelmente a vitamina E auxilie na preservação da estabilidade dos lipossomas.

AGRADECIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Universidade Franciscana e CAPES.

REFERÊNCIAS

AHAMD, A. et al. Therapeutic Potential of Flavonoids and Their Mechanism of Action Against Microbial and Viral Infections-A Review. **Food Research International**, v. 77, p.221–235, 2015.

BOCHI, V. C.; GODOY, H. T.; GIUSTI, M. M. Anthocyanin and other phenolic compounds in Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) fruits. **Food chemistry**, v. 176, p. 234–43, 2015.

DEVI, Nirmala; SARMAH, Mandip; KHATUN, Bably; MAJI, Tarun K. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 239, p. 136–145, 2017.

GULDIKEN, Burcu et al. Physical and chemical stability of anthocyanin-rich black carrot extract-loaded liposomes during storage. **Food research international**, v. 108, p. 491-497, 2018.

JÄGER, Eliézer et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 130-140, 2009.

LAOUINI, A. et al. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 147 – 168, 2012.

Lee, C., & Na, K. Anthocyanin-Loaded Liposomes Prepared by the pH-Gradient Loading Method to Enhance the Anthocyanin Stability, Antioxidation Effect and Skin Permeability. **Macromolecular Research**, 28(3), 289–297, 2019.

LIMA, Kenya Thayres dos Santos et al. **Produção e caracterização físico-química de nanopartículas de amido contendo antocianinas da fruta do jambolão (Syzygium cumini)**. 2021.

LITVINOV, V. P. Chemistry and biological activities of 1,8-naphthyridines. **Russian Chemical Reviews**, v. 73, n. 7, p. 637–670, 2007.

MERTINS, O. **Desenvolvimento e Caracterização de Nanovesículas Lipossômicas Compósitas de Fosfatidilcolina da Lecitina de Soja e Quitosana**. Dissertação de M.Sc., UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2004.

PATRAS, Ankit; BRUNTON, Nigel P.; O'DONNELL, Colm; TIWARI, B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 3–11, 2010.

ROCHA, F. I. G. DA. **Avaliação da cor e da atividade antioxidante da polpa e extrato de mirtilo (Vaccinium myrtillus) em pó**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2009.

RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International**, v. 124, p. 200–205, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.05.028.

SEBASTIAN, R. S. et al. A new database facilitates characterization of flavonoid intake, sources, and positive associations with diet quality among US adults. **Journal of Nutrition**, v. 145, n. 6, p. 1239–1248, 2015.

SUI, X.; BARY, S.; ZHOU, W. Changes in the color, chemical stability and antioxidant capacity of thermally treated anthocyanin aqueous solution over storage. **Food Chemistry**, v. 192, p. 516–524, 2016.

WINTER, Aimee N.; BICKFORD, Paula C. Anthocyanins and Their Metabolites as Therapeutic Agents for Neurodegenerative Disease. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 333, 2019.

WROLSTAD, R. E.; CULVER, C. A. Alternatives to Those Artificial FD&C Food Colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 59–77, 2012.

ZARDO, I. **Extração e microencapsulação de compostos antociânicos do bagaço de mirtilo (Vaccinium corymbosum L.)**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.