

Área: Ciência de Alimentos

CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS ELABORADOS PARA A NANOENCAPSULAÇÃO DE BIOATIVOS

Letícia Marques de Assis*¹, Adriana Rodrigues Machado, Leonor Almeida de Souza-Soares

Laboratório de Ciência de Alimentos e Micotoxinas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS

¹Instituto Federal Sul-Rio-Grandense, Campus Pelotas, Visconde da Graça, Pelotas, RS

**E-mail: leticiamassis@gmail.com*

RESUMO – Uma variedade de técnicas de encapsulação é usada para alimentos, incluindo o uso de lipossomas, que consistem em vesículas únicas ou em multicamadas que envolvem uma fase aquosa dentro de uma membrana de fosfolípidos. Em comparação com outras tecnologias de encapsulamento, lipossomas podem geralmente proporcionar maior estabilidade química e proteção para bioativos sensíveis. O objetivo do trabalho foi caracterizar lipossomas elaborados pelo método de hidratação do filme lipídico, utilizando lecitina de soja, para possível aplicação em nanoencapsulação de compostos bioativos. Para a elaboração do filme lipídico foi utilizado 1g de lecitina dissolvida em 10 mL de clorofórmio, sendo este disperso pela adição de 20 mL de tampão fosfato pH 7,0 (0,2 M). Posteriormente, as suspensões foram submetidas a ciclos de agitação em vórtex, descanso e aquecimento, até completa solubilização, recebendo tratamento final de sonicação em banho ultrassônico. Os lipossomas foram avaliados quanto ao tamanho médio e índice de polidispersão através da técnica do espalhamento dinâmico de luz (laser de He-Ne, $\lambda = 632,8$ nm); e micrografia utilizando microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Como resultado, os lipossomas apresentaram tamanho médio de 211nm e índice de polidispersão de 0,283, e as imagens obtidas por microscopia mostraram uma estrutura esférica e aparentemente organizada. Com base nos resultados obtidos deve ser considerada a adição de compostos bioativos nesta estrutura, visto que, estes se apresentaram satisfatórios quanto ao tamanho nanométrico e organização estrutural.

Palavras-chave: nanoencapsulação, lipossomas, bioativos

1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo da encapsulação é proteger uma substância sensível na cápsula ou parede, isolando fisicamente o ingrediente do meio ambiente. Esta barreira pode conferir proteção contra o oxigênio, água e/ou luz; permitir uma liberação controlada da substância e/ou prevenir o contato com outros componentes em uma mistura. Dentre as técnicas utilizadas para a encapsulação está o uso de lipossomas. Os lipossomas são vesículas compostas basicamente por uma ou mais bicamadas de fosfolípidos encapsulando um volume aquoso. O mecanismo de formação dos lipossomas é essencialmente baseado nas interações desfavoráveis que ocorrem

entre os fosfolípidos e as moléculas de água, em que os grupos de cabeça polares de fosfolípidos são expostos às fases aquosas (interior e exterior), e as caudas de hidrocarbonetos hidrofóbicos são forçadas a ficarem em uma bicamada (JESORKA & ORWAR, 2008). Devido às suas propriedades únicas, como por exemplo, regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, podem aprisionar, entregar e libertar tanto o material solúvel em água como solúvel em lipídeos (MOZAFARI, 2005). Os lipossomas são basicamente classificados com base no seu número de bicamadas e tamanho. De acordo com a sua estrutura de bicamada, as vesículas podem ser classificadas basicamente como vesículas unilamelares (LUV) ou multilamelares (MLV), que consistem de um ou mais bicamada lipídica concêntrica. Quanto ao tamanho, como vesículas unilamelares pequenas (SUV), com uma estreita distribuição de tamanho, caracterizada por diâmetros variando entre 20 e 100 nm, e vesícula unilamelar grande (LUV) com tamanho de partículas superior a 100nm, atingindo até alguns micrômetros (FATHI et al., 2012).

Em comparação com outras tecnologias de encapsulamento, lipossomas podem geralmente proporcionar maior estabilidade química e proteção para bioativos sensíveis. O uso de lipossomas apresenta como vantagens: facilidade de incorporação de bioativos, independentemente da sua carga ou

massa molecular (SANTOS & CASTANHO, 2002), possibilidade de produção em larga escala, entrega de compostos anfífilos, além do fato destas estruturas se assemelharem à membrana das células, por isso, interagem mais intimamente e com maior eficiência com as células e tecidos do organismo (FATHI et al., 2012).

Tradicionalmente, os lipossomas vêm sendo utilizados na área farmacêutica como sistemas direcionado de transporte de fármacos, com o objetivo de aumentar o potencial terapêutico de um composto, impedindo que este se perca no trajeto para um alvo específico (SANTOS & CASTANHO, 2002). No entanto, devido as suas vantagens, seu uso na área de alimentos já está sendo explorado e pesquisas vêm sendo feitas (MALHEIROS et al., 2010; SANT'ANNA et al., 2011; MARSANASCO et al., 2011; WECHTERSACH et al., 2012) para o estudo da sua utilização. O objetivo do trabalho foi caracterizar lipossomas elaborados pelo método de hidratação do filme lipídico para possível aplicação em nanoencapsulação de compostos bioativos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

A lecitina de soja utilizada para o preparo dos lipossomas foi adquirida da Attivos Magistrais, Barueri, Brasil, em forma de pó.

2.2 MÉTODOS

Os lipossomas foram elaborados de acordo com a metodologia de hidratação do filme lipídico, baseado na metodologia descrita por Malheiros *et al.*, (2010), com algumas modificações. Primeiramente, 1g da lecitina foi dissolvida em 10 mL de clorofórmio em balão de fundo redondo, após sua completa dispersão, o solvente

orgânico foi removido em evaporador rotatório até que fosse observado um filme lipídico depositado nas paredes do balão. Os traços de solvente orgânico foram removidos através da estocagem do balão por 18 h em dessecador a vácuo. O filme lipídico resultante no balão foi disperso pela adição de 20 mL de tampão fosfato pH 7,0 (0,2 M). As suspensões foram submetidas à ciclos de leve agitação manual e descanso, seguida de ciclos de agitação em vórtex, descanso e aquecimento a 60 °C, até completa solubilização. Após, os lipossomas foram submetidos ao tratamento final de sonicação, utilizando banho ultrasônico (40 kHz, Unique USC 700) durante 10 ciclos de 1min e 3 min de descanso em água fria. Os lipossomas foram avaliados quanto ao tamanho médio e índice de polidispersão utilizando a técnica do espalhamento dinâmico de luz (laser de He-Ne, $\lambda = 632,8$ nm, goniômetro BI-200M, e correlador digital BI-9000AT da Brookhaven Instruments), conforme descrito por Teixeira *et al.*, (2008). A morfologia dos lipossomas foi examinada com um microscópio eletrônico de varredura (modelo DSM 940 A ZEISS) e microscópio eletrônico de transmissão (modelo EM 900 ZEISS), sendo os lipossomas primeiramente centrifugados durante 10 min à 5000 rpm, e o sobrenadante descartado.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm Erro Padrão (EP), realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 1 estão demonstrados os resultados obtidos para o tamanho médio e índice de polidispersão dos lipossomas elaborados pelo método de hidratação do filme lipídico utilizando lecitina de soja bruta.

Tabela 1. Tamanho médio e índice de polidispersão dos lipossomas.

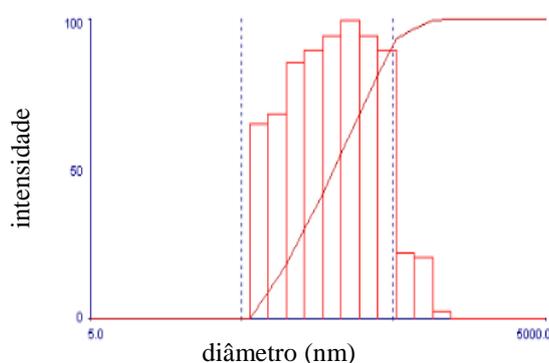
Amostra	Tamanho médio (nm)	Índice de polidispersão
Lipossoma	211 \pm 2,82	0,283
média (n=3) \pm EP		

Foram obtidas vesículas unilamelares grandes (LUV), que se caracterizam por tamanho de partículas superior a 100nm. Em geral, as LUV são mais homogêneas do que as MLV e têm maior eficiência de encapsulação do que as SUV, além de serem muitas vezes os lipossomas mais úteis (PEGG & SHAHIDI, 2007). É amplamente aceito que vesículas unilamelares grandes são mais adequadas para aplicações em alimentos, devido a maior eficiência de encapsulação (acima de 45%), maior estabilidade contra a sua fusão, e facilidade de produção. No entanto, lipossomas menores de 50 nm de diâmetro provaram ser eficazes para a encapsulação

simultânea de compostos hidrofílicos (dentro da vesícula) e antioxidantes hidrofóbicos (α -tocoferol) solubilizados na parte hidrofóbica da bicamada lipídica (ACOSTA, 2008).

Ferreira *et al.* (2005) relatam que as LUV são muito estáveis fisicamente quando mantidos à temperatura de 4 °C não apresentando alteração do diâmetro médio ao fim de 5 dias; quando armazenados à temperatura ambiente apresentam aumento de diâmetro médio de 10% ao fim do mesmo tempo. O gráfico de distribuição de tamanho está apresentado na Figura 1.

Figura 1. Gráfico de distribuição de tamanho do lipossoma



O índice de polidispersão, que fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, foi baixo ($< 0,3$), indicando a formação de sistemas monodispersos (NEMEN & LEMOS-SENN, 2011) ou faixa estreita de tamanhos.

As micrografias obtidas para os lipossomas na microscopia de varredura e de transmissão estão demonstradas na Figura 2 e 3, respectivamente.

Figura 2. Imagem dos lipossomas obtida na microscopia eletrônica de varredura

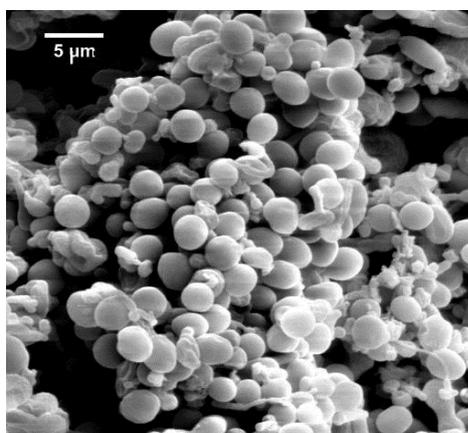
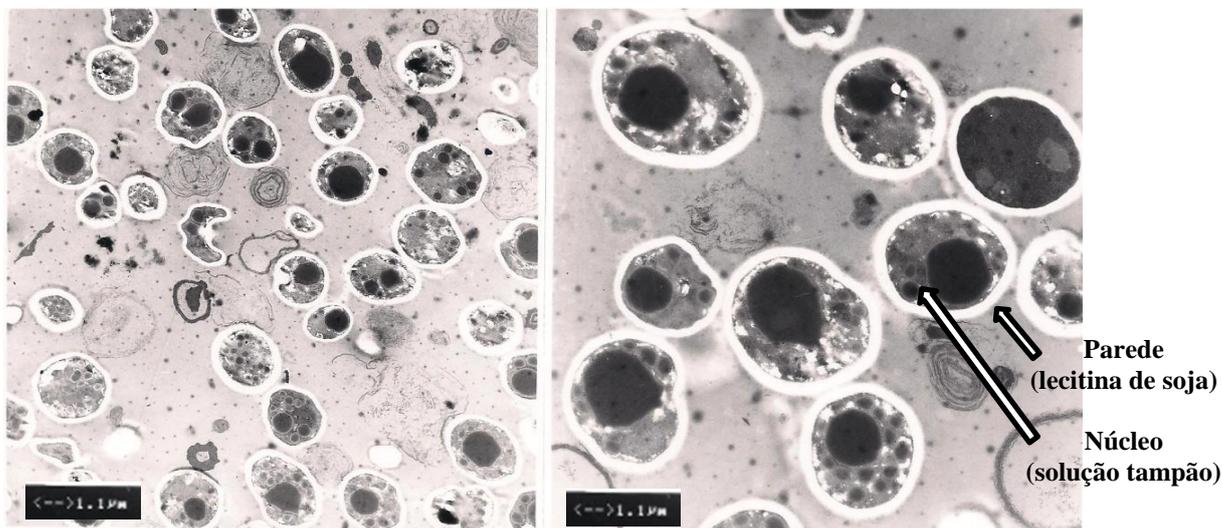


Figura 3. Imagens dos lipossomas obtidas na microscopia eletrônica de transmissão



De acordo com as imagens, pode-se verificar que foi possível obter uma estrutura organizada e esférica utilizando a lecitina de soja para obtenção de lipossomas. Estas estruturas poderão servir como carreadoras de compostos bioativos que irão permanecer no núcleo, no caso de compostos hidrofílicos, ou aderidos a membrana, no caso de compostos com características lipofílicas.

Verifica-se na imagem que, provavelmente, obteve-se uma estrutura do tipo nanocápsula, que caracteriza-se pela separação entre um invólucro superficial (o lipídio), e o núcleo que contém o material ativo, diferentemente da estrutura do tipo nanoesfera. Nas nanoesferas os compostos ativos podem ser absorvidos na superfície, ficando estes mais expostos e não totalmente cercados por um material de parede (FANG & BHANDARI, 2010). A microscopia de transmissão pode permitir também a determinação da espessura da parede das nanocápsulas.

4 CONCLUSÃO

Os lipossomas elaborados pelo método de hidratação do filme lipídico apresentaram-se satisfatórios quanto ao tamanho nanométrico e micrografia, utilizando as condições descritas neste estudo. Com base nestes resultados deve ser considerada a adição de compostos bioativos nesta estrutura, principalmente quanto à eficiência de encapsulação e o local onde estes compostos estariam predominantemente localizados.

5 REFERÊNCIAS

ACOSTA, S.E.; Regulatory aspects of nutrient delivery. Part IV: **Regulatory issues and future trends**. University of Toronto, Canada (2008).

- FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 510-523, 2010.
- FATHI, M.; MOZAFARI, M.R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, p. 13-27, 2012.
- FERREIRA, H.; LÚCIO, M.; SIQUET, C.; REIS, S. Utilização de modelos membranares na avaliação da actividade de fármacos. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, p. 39-51, 2005.
- JESORKA, A.; ORWAR, O. Liposomes: technologies and analytical applications. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 1, p. 801-832, 2008.
- MALHEIROS, P. S.; MICHELETTO, Y.M. S., SILVEIRA, N. P.; BRANDELLI, A. Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. **Food Research International**, v. 43, p.1198-1203, 2010.
- MARSANASCO, M.; MÁRQUEZ, A.L.; WAGNER, J.R.; ALONSO, S.V.; CHIARAMONI, N.S. Liposome as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. **Food Research International**, 2011,
- MOZAFARI, M. R. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 10, p. 711-719, 2005.
- NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, p. 408-413, 2011.
- PEGG, R.B.; SHAHIDI, F. Encapsulation, Stabilization, and Controlled Release of Food Ingredients and Bioactives. **Handbook of Food Preservation**, Second Edition (2007).
- SANT'ANNA, V.; MALHEIROS, P.S.; BRANDELLI, A. Liposome encapsulation protects bacteriocin-like substance P34 against inhibition by Maillard reaction products. **Food Research International**, v. 44, p. 326-330, 2011.
- SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. Lipossomas: a bala mágica acertou. **Química nova**, v. 25, p. 1181-1185, 2002.
- TEIXEIRA, M.L.; SANTOS, J.; SILVEIRA, N.P.; BRANDELLI, A. Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 49–53, 2008.
- WECHTERSACH, L.; ULRICH, N.P.; CIGIC, B. Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, p. 43-49, 2012.