

## Encapsulação e caracterização de bioativos naturais

## Encapsulation and characterization of natural bioactive

### RESUMO

**Byanca Pereira Moreira de Oliveira**  
[byancaoliveira@alunos.utfpr.edu.br](mailto:byancaoliveira@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

**Fernanda Vitória Leimann**  
[fernandaleimann@utfpr.edu.br](mailto:fernandaleimann@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

**Odinei Hess Gonçalves**  
[odinei@utfpr.edu.br](mailto:odinei@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Os alcalóides constituem um grande grupo de metabólitos com uma vasta diversidade estrutural, são substâncias nitrogenadas, de origem vegetal, com ação farmacológica e que em sua maioria possuem caráter alcalino, a berberina pertence ao grupo dos alcalóides. Flavonóides são uma classe de compostos fenólicos de origem natural, possuem uma série de propriedades farmacológicas, são capazes de reagir com vários tipos de radicais livres, formando compostos estáveis e retardando o envelhecimento das células, a hesperidina pertence a esse grupo. Apesar de todos os benefícios que os compostos bioativos utilizados no trabalho apresentam, eles são pouco solúveis em água, sensíveis e apresentam baixa biodisponibilidade, portanto a nanoencapsulação foi necessária para a melhora na entrega dos compostos. Este trabalho teve como objetivo obter nanopartículas de berberina e hesperidina, além de realizar a caracterização das partículas por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Foi demonstrado que a encapsulação dos compostos foi efetiva. Os dados obtidos no trabalho servirão de base para estudos subsequentes.

**PALAVRAS-CHAVE:** Alcalóides. Flavonóides. Nanopartículas. Farmacêuticos.

### ABSTRACT

Alkaloids are a large group of metabolites with a wide structural diversity, they are nitrogenous substances, of vegetable origin, with pharmacological action and which mostly have an alkaline character, berberine belongs to the group of alkaloids. Flavonoids are a class of phenolic compounds of natural origin, have a series of pharmacological properties, are able to react with various types of free radicals, forming stable compounds and slowing cell aging, hesperidin belongs to this group. Despite all the benefits that the bioactive compounds used in the work present, they are poorly soluble in water, sensitive and have low bioavailability, therefore nanoencapsulation was necessary to improve the delivery of the compounds. This work aimed to obtain nanoparticles of berberine and hesperidin, in addition to characterizing the particles by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). It was demonstrated that the encapsulation of the compounds was effective. The data obtained in the work will serve as a basis for subsequent studies.

**KEYWORDS:** Alkaloids. Flavonoids. Nanoparticles. Pharmacists.

**Recebido:** 19 ago. 2020.

**Aprovado:** 01 out. 2020.

**Direito autoral:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO

Alcalóides são compostos derivados das aminas, ou seja, são aminas de cadeias fechadas que possuem nitrogênio entre carbonos do ciclo. Eles são responsáveis pelo sabor amargo de diversas plantas. Por apresentarem uma estrutura complexa, são muito usados em medicamentos, atuando como estimulantes do sistema nervoso central, podendo causar uma dependência física e psíquica, além de possuírem características alucinógenas (KUO et. al, 2004). A berberina pertence ao grupo dos alcalóides.

Flavonóides são compostos de origem natural e possuem diversas propriedades que possibilitam o uso deles em medicamentos, como capacidade antioxidante, anti-inflamatória, vasodilatadora, analgésica, anticancerígena, e outros diversos benefícios à saúde humana (XIONG, 2019). Os flavonóides são encontrados em diversos alimentos, como morango, brócolis, linhaça, além de ser encontrado também em bebidas, vinho tinto, chás, cerveja, entre outras. A hesperidina é classificada como um flavonóide, abundantemente presente na laranja (BYUN et. al, 2019) e que apresenta alta atividade biológica.

Os dois compostos escolhidos para realização do trabalho possuem propriedades farmacológicas, mas apresentam baixa biodisponibilidade, baixa dissolução em água, e mudam sua composição facilmente em função da luz e calor, portanto, a encapsulação desses compostos se apresenta como uma alternativa para a melhora da entrega dos benefícios à saúde humana (DAMMAK; JOS, 2018). O objetivo do presente trabalho foi o de encapsular em partículas nanométricas a berberina e a hesperidina, bem como proceder a caracterização das nanopartículas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAIS

Berberina (99,8%, Sigma-Aldrich), etanol (99,8%, Neon), Kolliphor® Poloxamer 407 (massa molar de 12.000 g/gmol, Sigma-Aldrich) e Tween 80 (Dinâmica) foram usados na nanoencapsulação da berberina. Hesperidina (80%, Sigma), Dimetilsulfóxido, zeína, água destilada, Kolliphor® Poloxamer 407 (massa molar de 12.000 g/gmol, Sigma-Aldrich), poli (vinil pirrolidona) (PVP, 40.000 g/gmol, SigmaAldrich) e Tween 80 (Dinâmica) foram usados na nanoencapsulação da hesperidina. Brometo de potássio (KBr, Sigma-Aldrich, grau espectroscópico) foi usado nas análises de Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).

### MÉTODOS DE ENCAPSULAÇÃO

Para a encapsulação da berberina pelo método de dispersão sólida, Tween 80 (0,036 g) e a berberina (0,356 g) foram dissolvidos em etanol (150,0 mL) por 5 minutos em banho de ultrassom. Foi então adicionado o encapsulante (Poloxamer 407, 3,596 g) sendo mantida a agitação branda por 5 minutos. A solução foi sonicada (Fisher Scientific, 120W, ponteira de 1/8") em banho de gelo por 3 minutos (30 segundos ligado e 10 segundos desligado). Após esse tempo, o etanol

foi evaporado em estufa de circulação forçada a 50°C. O sólido resultante foi armazenado a 10°C sob abrigo da luz.

Para a encapsulação da hesperidina, foram utilizados dois métodos dependendo do solvente a ser utilizado.

Inicialmente foi avaliado qual seria o melhor solvente para a encapsulação da hesperidina, ou seja, qual solvente possibilitaria uma completa solubilização do composto bioativo, foram analisados o dimetilsulfóxido, o acetato de etila, o diclorometano e o clorofórmio.

No primeiro método (nanoprecipitação) foram utilizados dois microtubos, com 1,25 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) em cada, em um adicionou-se 20 mg de hesperidina e em outro 50 mg de zeína (encapsulante). Em um béquer, foram adicionados 5 mL de água destilada e 50 mg de Poloxamer 407 (surfactante), então colocou-se o béquer no ultrassom sob banho de gelo, juntou-se a solução dos dois microtubos em uma seringa e seguido pelo gotejamento no béquer com o ultrassom ligado. Após todo o conteúdo da seringa estar no béquer, desligou-se o ultrassom e o béquer foi mantido em agitação magnética por 24 horas para evaporação do DMSO. Após esse tempo, o material foi congelado a -80°C e em seguida liofilizado (Liotop, modelo L101).

O segundo método foi o de dispersão sólida. Em um béquer foram adicionados 50 mL de água destilada, 10,0 g de PVP (polivinilpirrolidona) (encapsulante), 1,0 g de Tween 80 e 250 mg de hesperidina. Este foi mantido em agitação magnética por 24 horas. Após esse tempo, o material foi congelado a -80°C e em seguida liofilizado (Liotop, modelo L101).

## MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, Perkin Elmer 4000) foi empregada para avaliar o estado físico da berberina, da hesperidina, dos encapsulantes e das nanopartículas. Cerca de 5 a 10 mg do analito foram alocadas em porta-amostras de alumínio fechados e aquecidas de 0 a 350°C com taxa de 20°C.min<sup>-1</sup> e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min<sup>-1</sup>.

Análises de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR, Shimadzu-IRAffinity<sup>1</sup>) foram realizadas para observar a existência de possíveis interações químicas entre os reagentes utilizados no processo da produção de nanopartículas de berberina e de hesperidina. Para as análises, utilizou-se cerca de 3 mg de composto para produção de pastilhas de brometo de potássio (100 mg). As pastilhas foram então analisadas com resolução de 2 cm<sup>-1</sup> entre 4750 e 450 cm<sup>-1</sup> com 32 scans cumulativos. Os picos foram normalizados para possibilitar a comparação entre as amostras.

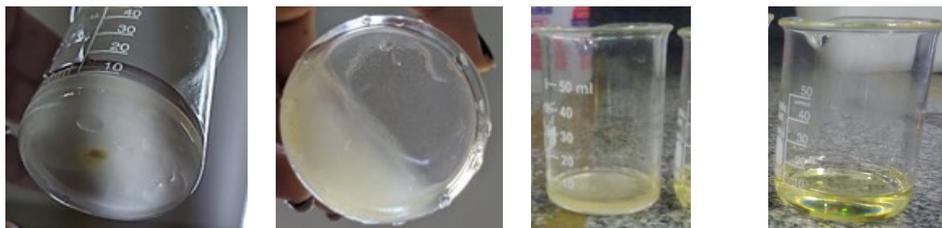
Em alguns casos, uma mistura física entre os compostos bioativos e o encapsulante foi obtida pela simples mistura manual desses componentes em cadinho para comparação com as nanopartículas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ENSAIOS DE SOLUBILIDADE DA HESPERIDINA

A Figura 1 apresenta as dispersões realizadas a fim de encontrar um solvente que solubilizasse totalmente a hesperidina. A Figura 2 demonstra a encapsulação em andamento, pelos dois métodos sob agitação magnética.

Figura 1- Dispersões com a hesperidina



(a) Solvente: acetato de etila.

(b) Solvente: diclorometano.

(c) Solvente: clorofórmio.

(d) Solvente: dimetilsulfóxido.

Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 2- Encapsulação da hesperidina por nanoprecipitação (esquerda) e por dispersão sólida (direita).



Fonte: Autoria própria (2020).

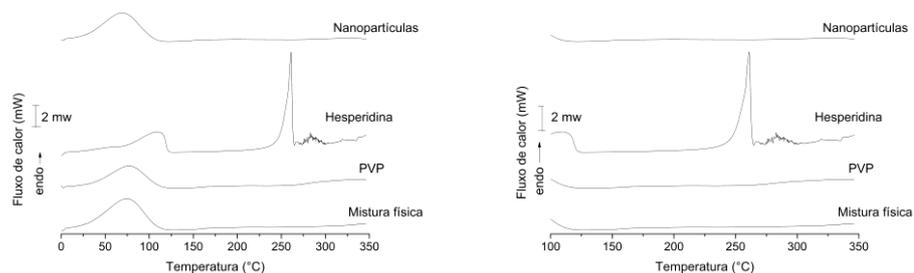
Após as análises, concluiu-se o dimetilsulfóxido (DMSO) foi o melhor solvente, então foi realizada a técnica de nanoprecipitação para encapsular o composto.

### OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A Figura 3 apresenta os gráficos resultantes das análises do DSC para as nanopartículas de hesperidina pelo método de dispersão sólida e do PVP, a Figura 4 para as nanopartículas de hesperidina pelo método de nanoprecipitação e da zeína, e a Figura 5 para as nanopartículas de berberina e de seu encapsulante, o Poloxamer 407.

Na Figura 6 são apresentados os resultados das análises realizadas na Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) para as amostras de nanopartículas de berberina e hesperidina, bem como para os respectivos compostos que as constituem (PVP e zeína) e as misturas físicas obtidas.

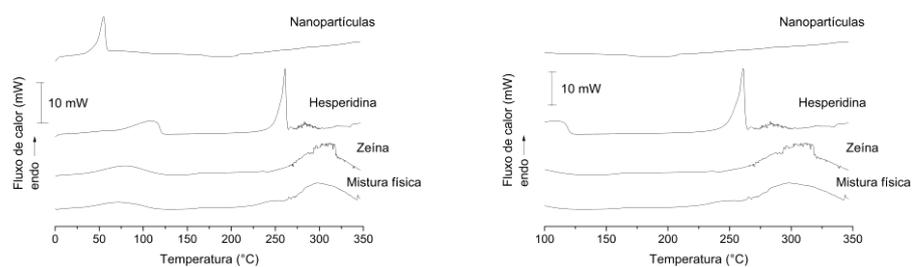
Figura 3- Nanopartículas de hesperidina pelo método de dispersão sólida (PVP como encapsulante).



(a) Curvas de DSC para temperatura de 0 a 350°C. (b) Detalhe do termograma de DSC (100 a 350°C).

Fonte: Autoria própria (2020).

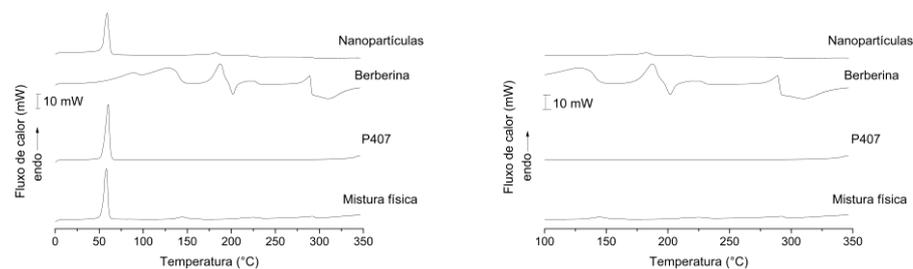
Figura 4- Nanopartículas de hesperidina pelo método de nanoprecipitação (zeína como encapsulante).



(a) Curvas de DSC para temperatura de 0 a 350°C. (b) Detalhe do termograma de DSC (100 a 350°C).

Fonte: Autoria própria (2020).

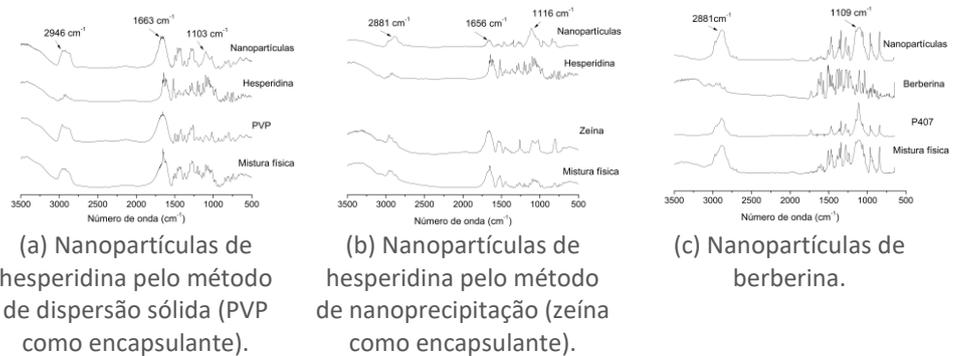
Figura 5- Nanopartículas de berberina pelo método de dispersão sólida (Poloxamer 407 como encapsulante).



(a) Curvas de DSC para temperatura de 0 a 350°C. (b) Detalhe do termograma de DSC (100 a 350°C).

Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 6- Espectros de FTIR para as nanopartículas e para os respectivos compostos (encapsulante e bioativo).



Fonte: Autoria própria (2020).

Nas análises de DSC das nanopartículas de hesperidina foi observada a presença do pico de fusão da hesperidina em 262°C, o que está de acordo com a literatura (GUO et. al, 2019). A temperatura de fusão do Poloxamer 407 foi detectada em 60°C. Um pico largo em cerca de 100°C foi encontrado para o PVP, que corresponde à evaporação de água adsorvida, pois este composto é altamente hidrofílico. Para as nanopartículas de hesperidina não foi possível observar o pico de fusão do composto, sugerindo que a hesperidina pode se encontrar disperso de forma homogênea no interior das nanopartículas formando uma fase amorfa. A berberina não apresentou pico de fusão definido quando analisada separadamente, contudo picos largos foram encontrados a partir de 150°C, que podem indicar a degradação da sua estrutura química. Esses picos não foram encontrados nas nanopartículas, novamente sugerindo a sua encapsulação eficiente. Nas misturas físicas não foi possível detectar picos de fusão dos compostos, provavelmente devido à sua baixa concentração nas partículas.

Com relação aos espectros do FTIR foi possível observar uma banda em 1651cm<sup>-1</sup> para o PVP referente ao grupamento carbonila, para o Poloxamer 407, notou-se uma banda em 2900 cm<sup>-1</sup>(C-H) e em 1100 cm<sup>-1</sup> (C-O) e para a zeína grupamentos em 1745 cm<sup>-1</sup> referente às carboxilas, e entre 2800 e 3100 cm<sup>-1</sup> mostraram vibrações e estiramentos dos grupos funcionais CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub>. Essas bandas devem ter surgido devido ao fato de que a zeína obtida comercialmente contém mais óleo residual que as demais, em razão do processo de extração. Para o composto bioativo hesperidina identificou-se uma banda em 3440 cm<sup>-1</sup> referente ao grupamento OH (LIU et. al, 2020), e para a berberina em 3000cm<sup>-1</sup>, referente as ligações de hidrocarbonetos e em 1550-1600 cm<sup>-1</sup> caracterizando as vibrações aromáticas (C=C, C=N).

## CONCLUSÃO

A encapsulação da hesperidina e da berberina foi realizada pelas técnicas de dispersão sólida e de nanoprecipitação, utilizando poli (vinil pirrolidona) e zeína como encapsulantes, que são compostos biocompatíveis com uso aprovado na produção de fármacos e aditivos alimentares. A análise de Calorimetria Diferencial

de Varredura (DSC) foi utilizada para avaliar indiretamente a encapsulação dos compostos, sugerindo que estes foram encapsulados na matriz do composto encapsulante na forma de uma solução sólida amorfa. O mesmo ocorreu com a análise de Espectroscopia de Infravermelho (FTIR). Pode-se considerar que a encapsulação dos compostos bioativos utilizados no trabalho foi eficiente, embasando os próximos passos dos trabalhos do grupo de pesquisa que devem compreender a formulação de fármacos e de alimentos nutraceuticos.

### AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

### REFERÊNCIAS

BYUN, E. B., KIM, H. M., SONG, H. Y., & KIM, W. S. Hesperidin structurally modified by gamma irradiation induces apoptosis in murine melanoma B16BL6 cells and inhibits both subcutaneous tumor growth and metastasis in C57BL/6 mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.127, p.19–30, 2019.

DAMMAK, I.; JOS, P. Formulation optimization of lecithin-enhanced pickering emulsions stabilized by chitosan nanoparticles for hesperidin encapsulation do Amaral Sobral. **Journal of food engineering**, v. 229, p. 2–11, 2018.

GUO, Jieli; LUO, Shengmin; LIU, Zhe; TANG, Weimin; TU, Kang. Solubilization of hesperidin with octenyl succinic anhydride modified sweet potato starch. **Food Chemistry**. China, p. 180-185. jan. 2019.

KUO, C.; CHI, C.; LIU, T. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. **Cancer letters**, v. 203, p. 127–137, 2004.

LIU, Jin; MA, Xiaoyan; WANG, Ling. Modulating effect of graphine oxide loaded hesperidin nanocomposite on the 1,2- dimethylhydrazine provoked colon carcinogenesis in rats via inhibiting the iNOS and COX-2 pathways. **Arabian Journal Of Chemistry**. China, p. 6708-6723. jun. 2020.

XIONG, H. Hesperidin: A Therapeutic Agent For Obesity. **Drup design, development and therapy**, p. 3855–3866, 2019.