



Extrato de bio-resíduo de pinhão nanoencapsulado: caracterização físico-química, capacidade antioxidante e inibição de α -amilase

Nanoencapsulated pinhão bio-residue extract: physicochemical characterization, antioxidant capacity and α -amylase inhibitory activity

Gabrielle D. Marcatto*, Fernanda V. Leimann[†],
Thaysa Fernandes M. Moreira[‡], Anielle de Oliveira[§], Amarilis S. Carvalho[¶],
Luis Gustavo Médice A. Costa^l

RESUMO

As cascas do pinhão, sementes da *Araucaria Angustifolia* (Bertol.) Kuntze, são descartadas após seu consumo. Há diversos relatos na literatura de que o pinhão é uma fonte de compostos bioativos, principalmente a casca, considerado um bio-resíduo. No presente trabalho objetivou-se nanoencapsular esses compostos bioativos naturais, sendo utilizada uma estratégia de minimização do uso de solventes, com a extração simultânea ao processo de encapsulação por nanoprecipitação. Para tanto, uma mistura de etanol:água (80:20) foi usada como solvente, zeína com encapsulante e caseinato de sódio como surfactante. Foram realizadas as análises de caracterização físico-químicas: calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espalhamento dinâmico de luz (DLS). Também foram avaliados a capacidade antioxidante por DPPH ($IC_{50} = 0,182 \pm 0,010$ extrato e $4,052 \pm 0,710$ nanopartículas) e inibição da enzima α -amilase ($98,55 \pm 0,50$ % extrato e $6,57 \pm 0,50$ % nanopartículas, ambos a $2.000 \mu\text{g/mL}$). Os resultados indicaram que o extrato foi efetivamente encapsulado, resultando em nanopartículas esféricas com diâmetro médio em intensidade de $307,26 \pm 2,06$ nm, levando até a reticulação da zeína pelos compostos fenólicos do extrato (FTIR).

Palavras-chave: Nanoprecipitação, *Araucaria Angustifolia* (Bertol.) Kuntze, DPPH, α -amilase.

ABSTRACT

Pinhão, the seeds of *Araucaria Angustifolia* (Bertol.) Kuntze, are discarded after consumption. There are several reports in the literature that *pinhão* is a source of bioactive compounds, especially its shell, which is considered a bio-residue. This work aimed to nanoencapsulate these natural bioactive compounds, using a strategy to minimize the use of solvents, with simultaneous extraction and encapsulation process by nanoprecipitation. For that, a mixture of ethanol: water (80:20) was used as solvent, zein with encapsulant and sodium caseinate as surfactant. The physicochemical characterization analyzes were carried out: Differential Scanning Calorimetry (DSC), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Transmission Electron Microscopy (TEM) and Dynamic Light Scattering (DLS). Antioxidant capacity by DPPH ($IC_{50} = 0.182 \pm 0.010$ extract and 4.052 ± 0.710 nanoparticles) and inhibition of α -amylase enzyme (98.55 ± 0.50 % extract and 6.57 ± 0.50 % nanoparticles, both at $2,000 \mu\text{g/mL}$). The results indicated that the extract was effectively encapsulated, resulting in spherical nanoparticles with intensity mean diameter of 307.26 ± 2.06 nm, leading to zein crosslinking by the extract's phenolic compounds (FTIR).

Keywords: Nanoprecipitation, *Araucaria Angustifolia* (Bertol.) Kuntze, DPPH, α -amylase.

* Engenharia química, Universidade tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil; donatogabrielle111@gmail.com

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão; fevitoria@gmail.com

[‡] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão; thaysa.moya@gmail.com

[§] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão; ani.028@hotmail.com

[¶] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão; amarilis.flor@hotmail.com

^l Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão; luiscosta@alunos.utfpr.edu.br



1 INTRODUÇÃO

A *Araucaria Angustifolia* (Bertol.) Kuntze é uma espécie de árvore unissexuada, conhecida como “Pinheiro do Paraná” devido a sua localização predominante, pois é no sul do Brasil que se encontra esta vegetação podendo também ser encontrada em locais com áreas elevadas. O pinhão é um dos alimentos tradicionais da Região Sul, está presente em eventos culturais e é utilizado como fonte de renda de agricultores e comerciantes (SCHVEITZER *et al.*, 2014). A semente de araucária, chamada pinhão, é um produto sazonal e tem grande valor nutricional. Muitos compostos têm sido estudados para inibição de enzimas associadas a doenças como o Diabetes Mellitus, no caso as α -amilases. Essas moléculas bioativas têm gerado grande interesse como um resultado de seus benefícios potenciais, em grande parte devido sua atividade antioxidante. Estes compostos podem ser extraídos de várias fontes naturais e também de bio-resíduos. O consumo do pinhão é responsável por uma parte significativa da economia do sul do Brasil, e os bio-resíduos gerados durante o preparo da sementes de pinhão são descartados. Tanto o revestimento residual (tegumento externo ou casca) e o extrato de água que resultam do processo de cozimento são ricos em compostos fenólicos e podem ser explorados como bioresíduos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Apesar dos compostos bioativos oferecerem diversas vantagens, sua utilização na indústria pode ser um desafio devido à sua alta volatilidade, limitação de solubilidade de acordo com a polaridade apresentada, além de baixa estabilidade térmica e oxidativa (ADEL *et al.*, 2019). A nanotecnologia é uma ferramenta que está crescendo no âmbito de proteção de compostos ativos, sendo que dentre tantos métodos de produção de partículas, uma das que vem ganhando espaço no campo das pesquisas, por ser um método de simples aplicação é a técnica de nanoprecipitação, que oferece bom rendimento, é ecologicamente amigável e pode ser aplicada à nível industrial (BERTOLINO *et al.*, 2020). A zeína, é uma proteína insolúvel em água (devido ao seu alto conteúdo >50% de aminoácidos não polares, como leucina, prolina, alanina e fenilalanina) (Li *et al.* 2019) e pode ser aplicada como encapsulante na técnica de nanoprecipitação (LE CORRE; ANGELLIER-COUSSY, 2014). Além disso, é classificada como geralmente reconhecido como seguro (*Generally Recognized as Safe*- GRAS) pela FDA (Food and Drug Administration). Esta proteína pode ser facilmente solúvel em até 70% etanol ou em soluções altamente alcalinas ($\text{pH} > 11$) (Li *et al.* 2019). Sabendo que um elevado teor de compostos bioativos pode ser recuperado a partir de matrizes vegetais com soluções etanólicas em proporções semelhantes às da solubilização da zeína, propõe-se recuperar os compostos bioativos do bioresíduo casca de pinhão, bem como nanoencapsular tal extrato em zeína, por nanoprecipitação em um processo integrado. Por fim, pretende-se caracterizar as nanopartículas com relação à possível encapsulação, tamanho, morfologia, estabilidade térmica e bioatividades (capacidade antioxidante e inibição de α -amilase). Desta forma pretende-se responder a seguinte questão: a extração/encapsulação *in situ* é capaz de produzir nanopartículas com características de proteção do extrato e bioatividade?

2 MÉTODO EXPERIMENTAL

O pinhão utilizado no presente trabalho foi adquirido no mercado local de Campo Mourão (Abril/2018). A casca do pinhão foi obtida após o cozimento da semente (previamente cozida e após a retirada da parte comestível), a casca foi seca em estufa de convecção 60 °C por 24h e triturada em moinho de facas (Solab). Para a extração/nanoencapsulação foram utilizados 43,75 g de casca do pinhão, 15 g de zeína (Sigma Aldrich) em uma mistura de etanol (Dinâmica, Brasil) e água (500 mL, 80:20 v/v). Esta mistura foi mantida sob agitação (12.000 rotações por minuto por 15 minutos) em sistema rotor-estator (Ultra-turrax, T25, IKA). Após esta etapa, o sobrenadante coletado da centrifugação (10 minutos) foi gotejado com auxílio de uma bureta, em 500 mL de uma solução aquosa com caseinato de sódio (2% p/v, surfactante, Sigma Aldrich) a 12.000 rpm para que a nanoprecipitação



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

ocorresse. Por fim, a dispersão das nanopartículas é levada a uma forma de teflon e seca em estufa de convecção forçada a 60°C. O mesmo procedimento foi realizado para obtenção do extrato, porém sem a adição de zeína no procedimento de extração e após a centrifugação a amostra foi levada para uma forma de teflon para secar. O rendimento da extração e da nanoencapsulação foram determinados gravimetricamente. Aliquotas de 5 mL de cada experimento, obtidas após a nanoprecipitação no caso das nanopartículas e após a centrifugação no caso do extrato, foram colocadas em placas de Petri previamente pesadas em balança analítica. Após a secagem em estufa de circulação a 60 °C até evaporação completa do solvente, as placas foram pesadas novamente para determinação do teor de sólidos secos (m_{ss} (g)). O cálculo do rendimento foi expresso em porcentagem é determinado através da Equação 1, onde V_{TS} (mL) refere-se ao volume total de solvente utilizado na extração, V_a (mL) é o volume da alíquota utilizada para o cálculo do rendimento, m_{si} (g) é a massa de sólidos inicial presente no processo (cascas de pinhão no caso da extração; cascas de pinhão, zeína e caseinato de sódio no caso da extração/encapsulação).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_{ss} \times V_{TS}}{V_a \times m_{si}} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

As análises termogravimétricas (TGA) e as análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizadas em analisador térmico simultâneo (STA 6000, Perkin Elmer, EUA). Foram analisadas as amostras: extrato, nanopartículas, zeína, caseinato de sódio e mistura física do extrato, zeína e caseinato de sódio. Estas foram colocadas em um dessecador com sílica por 72 h. As amostras (de 8 a 10 mg) foram acondicionadas em porta amostra de platina e aquecidas até 600 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ e atmosfera de nitrogênio (50 mL min⁻¹).

Para a determinação das características e interações moleculares realizou-se o ensaio de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Para a formação da pastilha, foram triturados aproximadamente 10 mg de amostra com 0,2 g de brometo de potássio (KBr), com o auxílio de um pistilo e um almofariz de ágata. As pastilhas foram produzidas em um pastilhador submetido a 7 kgf/cm² de pressão em prensa hidráulica (Bovenau, P15 ST). A leitura do espectro foi realizada em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (IR AFFINITY-1, Shimadzu), na faixa de 4000 a 500 cm⁻¹ de número de onda, utilizando 32 acumulações e resolução de 4 cm⁻¹. As bandas foram normalizadas e as linhas de base corrigidas para comparação dos espectros.

A morfologia das nanopartículas foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM, Jeol JEM 2100, 200 kV). Logo após a etapa de nanoprecipitação, uma amostra da solução contendo as nanopartículas foi solução gotejada em grades de cobre revestidas com formar/filme de carbono (300 mesh). As grades foram mantidas em dessecador com sílica até o momento da análise. A análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) foi realizada para determinar o tamanho médio em intensidade (D_z , nm) e o índice de polidispersão (PDI, adimensional) das nanopartículas em um instrumento Malvern Zetasizer – Nano Series. As amostras previamente secas, foram diluídas em água (0,1%p/v) e analisadas em seguida.

A avaliação de capacidade antioxidante foi feita seguindo a metodologia por Brand-Williams, utilizando como radical livre o DPPH, sendo realizado em triplicata. Para tanto foram adicionados 10 µL de extrato (previamente diluído em etanol, 8 mg.mL⁻¹) em 140 µL de solução metanólica de DPPH 80 µmol.L⁻¹ em um tubo de ensaio, e 50 µL de etanol em 1.950 µL de DPPH em um outro tubo (controle negativo). Os tubos então foram armazenados de forma a evitar qualquer luz do ambiente, mantendo assim as soluções por 30 minutos. Por fim, foram feitas as leituras das absorvâncias em um espectrofotômetro (USB650UV, Ocean Optics), no comprimento de onda de 515 nm, utilizando como branco o metanol. Os resultados finais foram obtidos por meio da curva de calibração de trolox ($y = 0,0905 x + 0,8656$) e expressos em µmol de equivalente de trolox por 100 gramas de extrato ($\mu\text{mol}_{ET.100g_{extrato-1}}$).



No caso da inibição da enzima α -amilase, o teste *in vitro* (De Oliveira *et al.* 2022, com algumas modificações) a α -amilase pancreática suína (Sigma Aldrich), foi solubilizada em 40 mmol.L⁻¹ de tampão fosfato e 13,4 mmol/L de NaCl, com pH de 6,9. O amido de batata, foi utilizado como substrato, formando assim uma solução de 1%p/v em água. O extrato e as nanopartículas foram avaliados na concentração final de 2000 μ g/mL, e a reação foi iniciada com a adição da enzima (74 U/mL), sendo mantida por 15 minutos, em um banho com temperatura controlada a 37 °C. A absorbância foi medida espectrofotômetro a 540 nm e os resultados expressos como porcentagem de inibição, de acordo com a Equação (2), onde T_i é a média aritmética da absorbância lida no teste de inibição, B_i é o branco de inibição, C_e o controle da enzima e B_e o branco da enzima

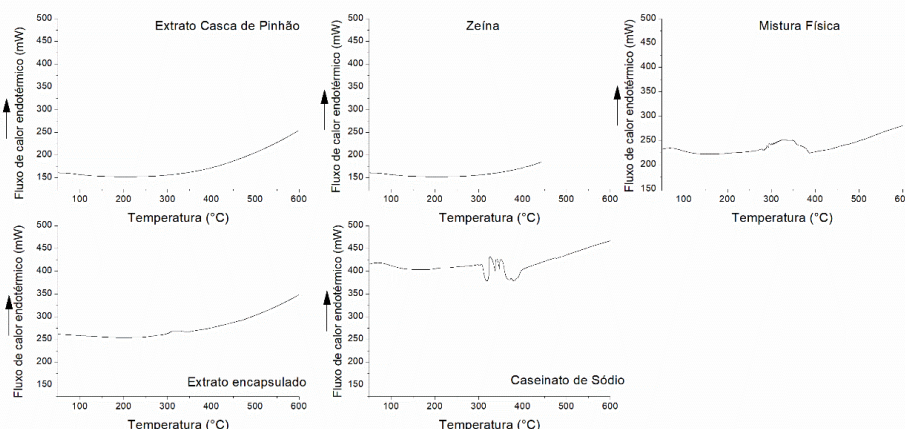
$$\text{Porcentagem de inibição (\%)} = 100 - \frac{(T_i - B_i)}{(C_e - B_e)} \times 100 \quad \text{Equação(2)}$$

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos para o rendimento da extração e da extração nanoencapsulação foram iguais a 5,9% e 27,6%. Sabendo que para as nanopartículas o teor de zeína e de caseinato correspondem a 54,4% e 36,2% da massa total obtida ao final do processo, determinou-se uma massa de extrato nas nanopartículas equivalente a 9,4% da massa total. Isso é um indicativo de que houve um aumento do rendimento de extração quando a encapsulação foi realizada em conjunto, quase dobrando a quantidade de extrato obtida. Outros autores observaram o mesmo efeito para a extração/encapsulação de extrato de *Sideritis* spp. em ciclodextrina por complexo de inclusão (KOROMPOKIS *et al.* 2017).

A caracterização térmica realizada com um Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC) é demonstrada com os termogramas da Figura 1.

Figura 1 – Termogramas de DSC das amostras: Extrato da casca de pinhão, zeína (encapsulante), Caseinato de sódio (surfactante), mistura física e extrato encapsulado.

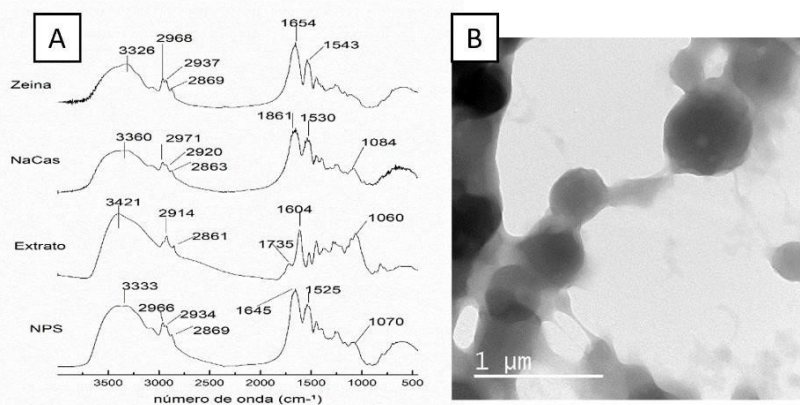


Fonte: Autoria própria (2021).

Para o extrato de casca de pinhão e para a zeína pura não são observados eventos térmicos significativos. Porém, nota-se que o termograma da mistura física apresenta um pico de transição largo que inicia em 280 °C e termina em 390 °C, mesmo comportamento observado para o caseinato de sódio. Na amostra de nanopartículas (extrato encapsulado) houve uma redução significativa da intensidade deste pico, bem como da

largura do mesmo (290 °C até 340 °C) indicando que houve alterações na conformação dos compostos envolvidos na encapsulação, e um consequente aumento na estabilidade térmica dos compostos encapsulados. O mesmo comportamento foi observado por Kaithunvakarn, Sakloetsakun e Pongjanyakul (2018), que detectaram dois picos de degradação exotérmica 290 e 357 °C para o caseinato de sódio puro, porém quando um filme foi produzido com este utilizando glicerol como plastificante, houve uma redução significativa do pico. Os resultados da Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), estão apresentados na Figura 2 (A).

Figura 2 – (A) Espectros do FTIR das amostras: Zeína, NaCas- caseinato de sódio, Extrato de casca de pinhão e NPS-extrato encapsulado; (B) – Imagem das nanopartículas feita por microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: Autoria própria (2021).

Percebe-se que as bandas características dos grupamentos -OH (3421 cm⁻¹) do extrato puro e encapsulado, bem como do grupamento NH da zeína (1654 cm⁻¹) tiveram redução na intensidade para o espectro do extrato encapsulado, indicando reticulação da zeína pela interação com os fenólicos do extrato (FREITAS *et al.*, 2018). Ainda, observa-se a presença da banda característica do estiramento -OH, nas duas amostras de extrato, em 3421 cm⁻¹ para nanopartículas e 3300 cm⁻¹, fornece informações preliminares sobre a ocorrência de um processo de polimerização destes compostos fenólicos. Uma imagem de MET pode ser observada na Figura 2 (B), onde observam-se nanopartículas com morfologia esférica e com diâmetros de 100 a 500 nm.

Os resultados da análise de DLS indicaram um índice de polidispersão (PDI) de 0,35 ± 0,01 e um diâmetro médio em intensidade Dz igual a 307,26 ± 2,06 nm. Tais resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Lemes *et al.* (2017) que encapsularam curcumina em nanopartículas de zeína pela mesma técnica, contudo os autores realizaram somente o processo de encapsulação. Destaca-se ainda que o resultado confirma que o processo simultâneo de extração e encapsulação forneceu nanopartículas com tamanho e características físico-químicas adequadas para futuras aplicações em alimentos.

Foi realizada uma avaliação da capacidade antioxidante, frente o radical DPPH, tendo como resultados o IC₅₀, que é a mínima concentração necessária para inibir 50% do radical. Os resultados determinados foram de 0,182 ± 0,100 para o extrato do pinhão e de 4,052 ± 0,71 (mg.mL⁻¹) para o extrato encapsulado. A análise de inibição da enzima α-amilase pancreática suína indicou uma inibição igual a 98,55 ± 0,50 % para o extrato e de 6,57 ± 0,50 % para o encapsulado, ambos a 2.000 μg.mL⁻¹. Possivelmente a menor inibição do encapsulado se deve à interação entre os compostos e a zeína, que ao longo de uma aplicação *in vivo* poderia prolongar o efeito inibitório pela liberação dos compostos a partir da matriz encapsulante.



4 CONCLUSÃO

Foi possível avaliar a viabilidade de nanoencapsular o extrato do pinhão, o rendimento é uma das análises que corroboram para tal afirmação, pois a massa do extrato na nanopartícula equivale 9,4% da massa total. De acordo com a microscopia eletrônica de transmissão, os aspectos morfológicos da partícula são esféricos com diâmetro de 100 a 500 nm, tornando visível a efetividade da aplicação da técnica de nanoprecipitação. Foi realizado também uma avaliação antioxidante o IC₅₀, o radical utilizado foi o DPPH para o encapsulado a inibição foi de $4,052 \pm 0,71$ (mg.mL⁻¹) e no teste *in vitro* houve uma menor inibição do encapsulado, talvez pela interação entre os compostos. Conclui-se que foi possível aplicar a metodologia integrada de extração/nanoencapsulação com sucesso, garantindo proteção do extrato e ainda bioatividade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Chamada Universal - MCTI / CNPq nº 28/2018, Processo 421541 / 2018-0) e à Fundação Araucária (convênio 039/2019) pelo apoio financeiro e também à Central Analítica Multiusuário da UTFPR Campo Mourão (CAMulti-CM) pelas análises.

REFERÊNCIAS

- ADEL, A. M. *et al.* **Inclusion complex of clove oil with chitosan/ β -cyclodextrin citrate/oxidized nanocellulose biocomposite for active food packaging.** Food Packaging and Shelf Life, 2019.
- BERTOLINO, V. *et al.* Polysaccharides/Halloysite nanotubes for smart bionanocomposite materials. **Carbohydrate Polymers**, 2020.
- DE FREITAS, T. B. *et al.* **Antioxidants extraction from Pinhão (Araucariaangustifolia (Bertol.) Kuntze) coats and application to zein films.** Food Packaging and Shelf Life, v. 15, n. July 2017, p. 28–34, 2018.
- DE OLIVEIRA, Anielle *et al.* Bioactivity screening of pinhão (Araucaria Angustifolia (Bertol.) Kuntze) seed extracts: the inhibition of cholinesterases and α -amylases, and cytotoxic and anti-inflammatory activities. **Food & Function**, p. 1-9. 5 ago. 2021
- KAJTHUNYAKARN, Wanassnant; SAKLOETSAKUN, Duangkamon; PONGJANYAKUL, Thaned. Sodium caseinate-magnesium aluminum silicate nanocomposite films for modified-release tablets. **Materials Science and Engineering: C**, v. 92, p. 827-839, 2018.
- KOROMPOKIS, K. *et al.* Green extraction and simultaneous inclusion complex formation of Sideritis scardica polyphenols. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 3, p. 1233, 2017.
- SCHVEITZER, B. *et al.* Caracterização Química de Pinhões – Sementes de Araucária angustifolia – em diferentes formas de preparo. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde**. v.3, n.1, p. 93-104, 2014.