

FORMULAÇÃO INTERMEDIÁRIA E SISTEMAS PARA A VEICULAÇÃO DE ATIVOS DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (AQUIFOLACEAE).

Palavras-Chave: *Ilex paraguariensis*, estabilidade, sistemas de veiculação

Autores:

ALICE SIQUEIRA DE FIGUEIREDO, DBV – IB-UNICAMP
MS. TAÍSE FONSECA PEDROSO (co-orientadora), BMM – IB-UNICAMP
Prof. Dr. MARCOS JOSÉ SALVADOR (orientador), DBV – IB-UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil (Aquifolaceae), conhecida como erva-mate, é uma planta nativa da América do Sul, presente no Brasil, utilizada pela população no preparo de bebidas tradicionais como chimarrão, tererê e chá-mate (Heck e Mejia, 2007). A *I. paraguariensis* apresenta como constituintes majoritários as substâncias fenólicas, seguidos das saponinas e metilxantinas (Filip et al., 2001). Devido a sua composição, esta planta apresenta efeitos benéficos aos consumidores, como, por exemplo, efeitos hepatoprotetor e neuroprotetor (Tamura et al., 2013; Branco et al., 2013). No entanto, estes compostos possuem baixa absorção e rápida biotransformação e excreção (Schaffer e Halliwell, 2012; Gómez-Juaristi et al., 2018), dessa forma, a inclusão em sistemas de veiculação de ativos mostra-se como uma boa alternativa para superar estas dificuldades químicas e biológicas. Assim, esta pesquisa teve como objetivos o desenvolvimento e avaliação da composição química, estabilidade e eficiência de encapsulação (EE%) de formulações contendo ativos de *I. paraguariensis* (Athmouni et al, 2019; Garcia-Garcia et al., 2005).

METODOLOGIA:

Preparo da formulação intermediária: O preparo da formulação intermediária (FI-Ilex) de *I. paraguariensis* foi feito de forma mimética ao preparo do chimarrão (Mesquita et al., 2021) com modificações. A FI-Ilex resultante deste processo, foi armazenada a -20°C.

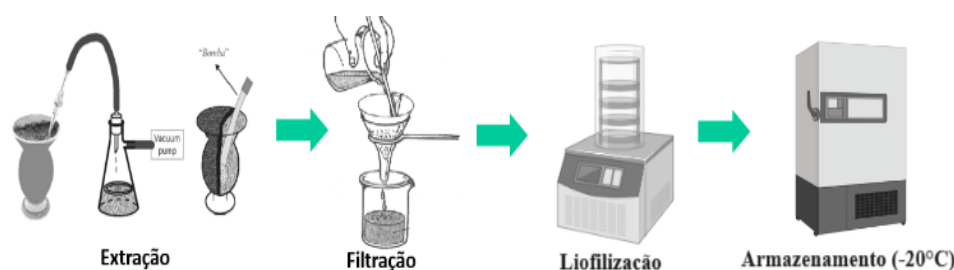


Figura 1 - Preparo do extrato de *I. paraguariensis*.

Análise da composição química de FI-Ilex empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV/DAD): Foi feita a quantificação dos constituintes majoritários presentes na FI-Ilex por CLAE-UV/DAD, utilizando o método descrito por Mesquita et al. (2021). Dessa forma, a

análise cromatográfica foi realizada, em triplicata, em modo de eluição por gradiente linear com uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min, utilizando uma fase móvel A (Água MiliQ + 0,3% ácido acético) e uma fase móvel B (Metanol para CLAE), seguindo o gradiente: 15–20% B por 20 min; 20–85% B por 5 min; 85% B por 10 min (Filip et al., 2001). O volume da injeção foi de 20 µL e o sistema CLAE operou a 25 ± 1 °C. A detecção pelo sistema PDA foi monitorada a 325 nm para os ácidos cafeico, clorogênico e gálico, e a 265 nm para cafeína, teobromina e rutina. Para validação de método e quantificação dos compostos, foram utilizados seis padrões (ácido cafeico, ácido clorogênico (5-O-ácido cafeoilquinico, 5-CQA), ácido gálico, cafeína, rutina e teobromina) e crisina como padrão interno.

Fotoestabilidade: O estudo de fotoestabilidade forçada da FI-Ilex foi realizado durante 48 horas (com análise nos tempos de 0, 12, 24 e 48 horas) em temperatura ambiente, sob iluminação UV, utilizando frascos âmbar, transparente e blackout (papel alumínio) em triplicata (Figura 2 e 3). Foi quantificada a concentração dos constituintes majoritários da formulação (ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, cafeína, rutina, teobromina) por CLAE-UV/DAD.



Figura 2 - Esquema do Teste de Fotoestabilidade.



Figura 3 - Frascos transparente, âmbar e blackout.

Termoestabilidade: Para o estudo da termoestabilidade, foram preparados, em triplicata, frascos transparentes contendo FI-Ilex na concentração de 12 mg/mL, os quais foram mantidos em 3 diferentes temperaturas (4, 25 e 45°C), as análises foram realizadas em uma curva de tempo de 60 dias (0, 1, 3, 7, 15, 30 e 60 dias).



Figura 5 - Frascos para teste de termoestabilidade.

Para isso, foram analisados diferentes parâmetros, sendo estes: quantificação por CLAE-UV/DAD, modificação da cor, pH, capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC), teor de polifenóis totais (Folin Ciocalteu) e determinação de capacidade antioxidante (DPPH).

- **CLAE-UV/DAD:** a análise da concentração dos constituintes majoritários foi feita através do método descrito por Mesquita et al. (2021).
- **Modificação de cor:** análise visual através de fotos dos frascos nos dias 0, 1, 3, 7, 15, 30 e 60.
- **pH:** foi verificado utilizando papel indicador 0-14,0 pH.
- **ORAC:** a atividade antioxidante foi avaliada pelo método descrito por Prior et al. (2003) com modificações.
- **Folin Ciocalteu:** feito através do método descrito por Duais et al. (2009) com alterações. Foram utilizados ácido gálico para curva e quercetina como controle.

Preparo do sistema de veiculação nanoestruturado: Os sistemas de veiculação nanoestruturados contendo *I. paraguariensis* (SVN-Ilex) foram preparados utilizando o método de

solvente/evaporação descrito por Quintanar Guerrero et al. (1998), com modificações. Para fins de comparação, foram preparadas nanopartículas em branco (NPb), com todos os controles experimentais previstos.



Figura 4 - NPb (esquerda) e SVN-Ilex (direita).

Caracterização do SVN- ILEX: Foi feita a quantificação dos constituintes majoritários por CLAE (Mesquita et al., 2021), e avaliada a Eficiência de Encapsulação (EE%). Colocou-se uma alíquota em uma centrífuga de 10.000 MW (Amicon®Ultra, Millipore) para que os compostos fenólicos e as nanoestruturas fossem separados por ultrafiltração/ultracentrifugação a 2200g por 10 minutos. A EE% é a diferença entre as concentrações total e livre de compostos, determinados nas nanoestruturas e no ultrafiltrado.

$$EE\% = (\text{concentração total} - \text{concentração livre} / \text{concentração total}) \times 100$$

Preparo do sistema de veiculação em ciclodextrina: O preparo do sistema de veiculação em formulação com ciclodextrina (SVB) foi feito de acordo com o método descrito por Godugu et al., 2014, com alterações, utilizando spray dryer para secagem.

Caracterização do SVB: A quantificação dos constituintes majoritários foi feita por CLAE, assim como realizado para o SVN-Ilex.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Durante o teste de fotoestabilidade, a FI-Ilex apresentou estabilidade, sem alterações significativas para nenhum dos diferentes frascos e tempos de exposição ao UV. Quanto à termoestabilidade, o pH manteve-se estável durante os 60 dias e o conteúdo de fenólicos totais, avaliado pelo teste de Folin, também não apresentou alterações. Além disso, observou-se maior modificação de cor nos frascos armazenados à 4 e 45°C. Com os demais testes, foi possível verificar uma diminuição da concentração de constituintes majoritários da FI-Ilex e também uma diminuição na atividade antioxidante. Deste modo, acreditamos que pode estar ocorrendo a degradação dos constituintes majoritários, visto que houve diminuição da concentração destes, o que reflete na diminuição da atividade antioxidante da formulação. Quanto aos sistemas de veiculação desenvolvidos os resultados sugerem que não ocorreram perdas significativas na concentração dos constituintes majoritários da FI-Ilex.

CONCLUSÕES:

Durante os estudos de fotoestabilidade, foi possível observar a estabilidade da constituição da FI-Ilex nos diferentes recipientes e tempos analisados, indicando a possibilidade de utilizar qualquer um dos três tipos de frascos. Quanto à termoestabilidade, verificou-se alterações de cor, concentração de constituintes majoritários e atividade antioxidante. Os sistemas de veiculação desenvolvidos não

afetaram significativamente a concentração dos constituintes da formulação, a com EE% maior para um dos sistemas desenvolvidos.

BIBLIOGRAFIA

HECK, CI; , de Mejia EG. **Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations.** J Food Sci, v.72(9), p.138-51, 2007.

Filip, R; López, P; Giberti, G; Coussio, J; Ferraro, G. **Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species.** Fitoterapia, v.72(7), p.774-, 2001.

Tamura, A; Sasaki, M; Yamashita, H; Matsui-Yuasaa, I; Sakub, T; Hikimab, T; Tabuchic, M; Munakata, H; Kojima-Yuasaa, A. **Yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) extract prevents ethanol-induced liver injury in rats.** Journal of Functional Foods, v.5, p.1714-1723, 2013.

Branco, C dos S; Scola G; Rodrigues, AD; Cesio, V; Laprovitera, M; Heinzen, H; Dos Santos, MT; Fank, B; de Freitas, SC; Coitinho, AS; Salvador, M. **Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats.** Brain Res Bull, v.92, p.60-68, 2013.

Athmouni, K; Belhaj, D; Gammoudi, S; El Feki, A; Ayadi, H. **Nano-encapsulation using macrocyclic carbohydrate polymers (β -cyclodextrins) of *Periploca angustifolia* extract: Physical stability and protective effect against cadmium-induced alterations in HepG2 cells.** Int J Biol Macromol, v.125, p.711-720, 2019.

Garcia-Garcia, E; Andrieux, K; Gil, S; Couvreur, P; **Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain?** Int J Pharm, v.298(2), p.274-292, 2005.

Mesquita, M; Santos, E; Kassuya, CA; Salvador, MJ. **Chimarrão, terere and mate-tea in legitimate technology modes of preparation and consume: A comparative study of chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-anxiety properties of the mostly consumed beverages of *Ilex paraguariensis* St. Hil.** J Ethnopharmacol, v. 28, p. 279:114401, 2021.

Quintanar-Guerrero, D; Allémann, E; Fessi, H; Doelker, E. **Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers.** Drug Development and Industrial Pharmacy, v.24(12), 1113–1128, 1998.

Godugu, C; Patel, A. R; Doddapaneni, R; Somagoni, J; Singh, M. **Approaches to Improve the Oral Bioavailability and Effects of Novel Anticancer Drugs Berberine and Betulinic.** PLoS ONE, v. 9(3), p. e89919, 2014.

Duais, M; Müller, L; Böhm, V; Jetschke, G. **Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: Use of different assays.** European Food Research and Technology, v. 228, p. 813–821, 2009.