



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

FLÁVIO CUNHA MONTEIRO

Lipossomos formulados a partir de lecitina de soja com extrato de *Ilex guayusa* L. como drug delivery para ação antioxidante.

VITÓRIA, ES
2022

FLÁVIO CUNHA MONTEIRO

Lipossomos formulados a partir de lecitina de soja com extrato de *Ilex guayusa* L. como drug delivery para ação antioxidante.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marco César Cunegundes Guimarães.

VITÓRIA, ES

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

M7721 Monteiro, Flavio Cunha, 1991-
Lipossomos formulados a partir de lecitina de soja com extrato de *Ilex guayusa* L. como drug delivery para ação antioxidante. / Flavio Cunha Monteiro. - 2022.
118 f. : il.

Orientador: Marco César Cunegundes Guimarães.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Chá - Uso terapêutico. 2. Antioxidantes. 3. Colóides. I. Guimarães, Marco César Cunegundes. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

Flávio Cunha Monteiro

“Lipossomos formulados a partir de lecitina de soja com extrato de *Ilex guayusa* L. como *drug delivery* para ação antioxidante”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado(a) em 6 de julho de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães – Orientador

Prof. Dr. André Romero da Silva – Examinador Interno

Prof^a. Dr^a. Gloria Maria de Farias Viégas Aquije – Examinador Externo

**Vitória/ES
2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por MARCO CESAR CUNEGUNDES GUIMARAES - SIAPE 2622289
Departamento de Morfologia -
DM/CCSEm 14/07/2022 às 16:39

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original
acesse o link:[https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-
assinados/515901?tipoArquivo=O](https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-
assinados/515901?tipoArquivo=O)



Emitido em 17/07/2022

**FOLHA DE ROSTO Nº folha - Defesa - Flavio - PPGBF/2022 - UFES - UNIVERSIDADE FEDERAL DO
ESPÍRITO SANTO (ES - FEDERAL)**

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 17/07/2022 00:35)

ANDRE ROMERO DA SILVA

PRO-REITOR(A) - TITULAR

REI-PRPPG (11.02.37.15)

Matrícula: 1653769

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ifes.edu.br/documentos/> informando seu número: **folha - Defesa - Flavio - PPGBF**, ano: **2022**, tipo: **FOLHA DE ROSTO**, data de emissão: **17/07/2022** e o código de verificação: **c0224569b8**



Emitido em 06/07/2022

FOLHA DE ROSTO Nº 7/2022 - VVL-CEX (11.02.34.01.07.04)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 19/07/2022 09:19)

GLORIA MARIA DE FARIAS VIEGAS AQUIJE

*PROFESSOR DO ENSINO BASICO TECNICO E
TECNOLOGICOVVL-CEX (11.02.34.01.07.04)*

Matrícula: 1204758

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ifes.edu.br/documentos/>
informando seu número: 7, ano: **2022**, tipo: **FOLHA DE ROSTO**, data de emissão: **19/07/2022** e o
código de verificação: **aea5a5a646**

Dedico este projeto a todos os professores que me influenciaram na minha trajetória. Em especial ao professor Marco Cesar Cunegundes Guimarães, meu orientador, com quem compartilhei minhas dúvidas e angústias a respeito da pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

Durante estes anos de mestrado, de muito esforço, estudo e empenho, gostaria de agradecer a algumas pessoas especiais que me ajudaram ao longo dessa jornada.

Agradeço primeiramente a Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes) pela oportunidade de cursar um curso de pós-graduação. Ao professor Marco Cesar Cunegundes Guimarães por ter me aceito na pós-graduação como seu aluno, ter me orientado e me dado suporte necessário para a realização deste trabalho, e acima de tudo por não ter me deixado desistir todas as vezes que eu fui até a sua sala certo de que o mestrado não era para mim.

Agradeço aos colegas de laboratório do LUCAR e do Laboratório de nano materiais funcionais pelo companheirismo e pela ajuda durante os experimentos, em especial à Laryssa, Wanderson, Ariany, Thais, Luis Alberto, Rafaela e Letícia. Um agradecimento especial ao meu colega de trabalho Tadeu por ter me ajudado para que eu pudesse realizar experimentos, por ter me dado caronas e por ter me ajudado na perspectiva sobre o trabalho.

Aos meus pais Josi e Ubaldo por todo carinho e amor incondicional que me dão, pela educação a mim concedida durante os anos de vida e por todas as oportunidades que eles batalharam arduamente para me dar.

Um agradecimento às minhas amigas que foram companheiras durante vários anos e ciclos de estudo, desde o ensino técnico no Ifes, passando pela faculdade na Ufes e agora juntos na pós-graduação. Obrigado Jessica por ler e reler versões sem fim da minha qualificação e da dissertação final, por corrigir todos os erros de português, as faltas de vírgulas e faltas de atenção quando eu estava cansado demais para perceber. Obrigado Julyana por me dar forças todos os dias para aguentar as aulas, dar conta das atividades, por passar os finais de semana me acompanhando em experimentos, incluindo uma ida ao Ifes *campus* Aracruz no meu aniversário apenas para abrir a porta do laboratório para que eu realizasse o meu experimento. Obrigado Barbara por ter sido a primeira de nós a desbravar a pós-graduação, nos dando segurança de que era possível, obrigado por todas as idas à cafeteria para me distrair, por todos os dias que você passou

no laboratório fazendo hora comigo para que eu não ficasse sozinho e todos os puxões de orelha e choques de realidade da maneira que só você sabe fazer. Obrigado Débora por me entender, me ligar e ficar horas a fio no telefone enquanto eu esperava as etapas do meu experimento me fazendo companhia, pelas caronas, por ter aberto o laboratório no meio da pandemia para que eu conseguisse fazer análise, por ser uma grande ouvinte. Obrigado as quatro por estarem na minha vida.

Um agradecimento a todos os professores do programa de pós-graduação em bioquímica que me deram aulas, que me cederam seu tempo tirando dúvidas e ajudando no planejamento de experimentos. Obrigado professor Jairo de Oliveira Pinto por ser quase um segundo orientador, por disponibilizar equipamentos, levar amostrar minhas até outro *campus*, por me ajudar no planejamento e na interpretação de vários resultados. Obrigado professor Alexandre Martins por ter sido solícito, tentado me ajudar e sanado minhas dúvidas a respeito do calorímetro sempre que bati em sua sala. Obrigado professor Lucas Cunha por ter feito parte da minha banca de qualificação assim como banca de graduação.

Obrigado aos meus amigos e colegas de curso do programa de pós-graduação em bioquímica pela ajuda e companheirismo durante as aulas, os cursos de férias, trabalhos e seminários que fizemos juntos.

Um agradecimento ao Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM) pelos equipamentos disponibilizados para a análise e às técnicas Natércia, Caroline e Priscila por me ajudarem na utilização e nas dúvidas. Obrigado ao Laboratório de Sistemas de Liberação Controlada (LSLC) do Ifes e ao professor André Romero pela utilização do equipamento para as análises de DLS. Obrigado ao laboratório de Instrumentação do LABPETRO e a professora Glória pela utilização do microscópio de força atômica. Obrigado ao laboratório de Caracterização de petróleo do LABPETRO, às técnicas Cristina e Mayara e ao professor Eustáquio pela utilização do equipamento de espalhamento dinâmico de luz com microimagem. Obrigado ao CPID pela utilização do ultrassom de ponta. Obrigado ao Laboratório de Produtos Naturais da Universidade de Vila Velha (UVV), coordenado pelo professor Márcio Fronza por ter cedido que eu utilizasse para fazer ensaio de componentes fenólicos e a síntese dos lipossomos.

Obrigado à Ingrid Augusto, ao Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, e ao laboratório multiusuário CENABIO da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Ufrj) pelo preparo da amostra e utilização do microscópio eletrônico de cryotransmissão.

Por último agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram no meu caminho para que eu conseguisse concluir esta etapa.

“A experiência é o nome que damos aos nossos erros.”

Oscar Wilde

RESUMO

Lipossomos têm sido utilizado cada vez mais como um método otimizado em sistemas de liberação controlada de fármacos para alvos terapêuticos. Neste trabalho foram sintetizados lipossomos constituídos de fosfatidilcolina originado de lecitina de soja, com colesterol e polietilenoglicol carreando extrato com alto poder antioxidante a partir de folhas secas de *Ilex guayusa* L. A caracterização química das amostras foi realizada através de espectroscopia Infravermelha com transformada de Fourier, espectroscopia de Raman, análise de componentes fenólicos através do método Folin-Ciocalteu, onde foi provado a presença do extrato nos lipossomos sintetizados. A análise de potencial antioxidante através do método de ABTS e DPPH onde foi comprovado o alto poder antioxidante do extrato ($IC_{50\%}$ 0,33 e 0,23 mg/mL) e dos lipossomos ($IC_{50\%}$ 0,42 e 0,78 mg/mL). A caracterização físico-química estrutural e morfológica das amostras foi realizada através de espalhamento dinâmico de luz (DLS), microscopia eletrônica de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de transmissão (MET), criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryoTEM) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) para analisar forma, tamanho e análise térmica das partículas. O diâmetro hidrodinâmico médio dos lipossomos foi de 80 nm, e através da criomicroscopia percebemos que os lipossomos são pequenos, monodispersos, unilamelares e bem estabilizados quanto a convallescência.

Palavras chave: *Ilex guayusa*; Lipossomo; Poder antioxidante.

ABSTRACT

Liposome have been increasingly used as an optimized method in targeted drug delivery systems. In this work liposomes compound by phosphatidylcholine derived from soy lecithin, cholesterol and polyethylene glycol content extract with high antioxidant capacity from dried leaves of *Ilex guayusa* L. The chemical structure of the samples were characterized through Fourier transform infrared spectroscopy, raman spectroscopy, phenolic compounds by Folin-Ciocalteu method, where the presence of extract in liposomes was proven. Antioxidant potential was measured through ABTS and DPPH method. Through this analysis, the high antioxidant potential of guayusa extract ($IC_{50\%}$ 0,33 e 0,23 mg/mL) and liposomes ($IC_{50\%}$ 0,42 e 0,78 mg/mL) was proven. The physicochemical and morphologic characterization of samples was performed by dynamic light scattering (DLS), atomic force electron microscopy (AFM), transmission electronic microscopy (TEM), transmission electronic cryomicroscopy (cryoTEM) and differential scanning calorimetry (DSC) to analyze shape, size and thermal analysis of particles. The hydrodynamic diameter was approximately 80 nm, and trough cryomicroscopy perceive it was possible to optimize a synthesis route with the smallest possible dispersion of small, unilamellar vesicles and stabilized to coalescence.

Key words: Liposome; *Ilex guayusa*; Antioxidant potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapeamento da planta Ilex guayusa L.....	26
Figura 2 - Polifenóis, onde A - Ácido clorogênico; B - Taninos; C – Flavonoides.	28
Figura 3 - Metilxantinas, onde D - Teobromina. E - Cafeína. F – Teofilina.....	28
Figura 4 - Estruturas de lipídios anfífilos organizados em solução aquosa.	31
Figura 5 - Vesículas lipossomais quanto a tamanho e quantidade de lamelas. ..	32
Figura 6 – Fosfatidilcolina.....	33
Figura 7 – Fosfocolina.	33
Figura 8 – Colesterol.	34
Figura 9 - Dispersão de partículas em espectroscopia de luz.	36
Figura 10 - Equipamento de espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	40
Figura 11 – Imagem de AFM esquematizando a interação do cantilever com a amostra.	43
Figura 12 - Esquema do aparelho de Infravermelho com transformada de Fourier.....	45
Figura 13 - Estrutura química do ácido gálico.	46
Figura 14 - Esquema do gráfico de varredura de calorimetria.....	47
Figura 15 - Reação do radical ABTS.	50
Figura 16 - Reação do radical DPPH.	53
Figura 17 - Histograma da primeira síntese (3000 rpm, sem extrato) que representa o diâmetro da população.....	56
Figura 18 - Histograma da segunda síntese (9000 rpm, sem extrato) que representa o diâmetro da população.....	57
Figura 19 - Histograma da terceira síntese (15000 rpm, sem extrato) que representa o diâmetro da população.....	58
Figura 20 - Histograma da quarta síntese (3000 rpm, com extrato) que representa o diâmetro da população.....	60
Figura 21 - Histograma da quinta síntese (9000 rpm, com extrato) que representa o diâmetro da população.....	61
Figura 22 - Histograma da sexta síntese (15000 rpm, com extrato) que representa o diâmetro da população.....	62
Figura 23 - Contrastação com ácido fosfotúngstico, onde as setas destacam os particulados do contrastante.	65

Figura 24 - Contrastação com ácido fosfotúngstico, onde há a aglomeração de vesículas.	65
Figura 25 - Contrastração com acetato de uranila, onde a imagem A e a imagem B são duas áreas diferentes da mesma amostra.	66
Figura 26 - Reação de oxidação de alcenos por tetróxido de ósmio.	67
Figura 27 - Contrastação com tetróxido de ósmio.	67
Figura 28 – Contrastação com tetróxido de ósmio onde é possível observar lipossomo multilamelar.	68
Figura 29 – Microscopia ótica indicando a área a ser analisada pela AFM.	69
Figura 30 - Imagem de topografia por AFM da sexta síntese (15000 rpm, com extrato).	70
Figura 31 - Corte da seção transversal de uma vesícula da Figura 30 por AFM, onde A – Topografia da amostra, indicando a vesícula a ser tratado, B – Gráfico da seção transversal da vesícula indicado em A.	71
Figura 32 - Corte da seção transversal de outra vesícula da Figura 30 por AFM, onde A – Topografia da amostra, indicando a vesícula a ser tratada, B – Gráfico da seção transversal da vesícula indicada em A.	72
Figura 33 – Aspecto geral da topografia por AFM da terceira síntese (15000 rpm, sem extrato).	73
Figura 34 – Topografia de uma seção da Figura 33, onde A – Imagem da topografia, indicando a vesícula a ser tratado em C e D, B – 3D com setas indicando as vesículas a ser tratadas em C e D, C – Gráfico da seção transversal da vesícula indicada pela seta azul e D – Gráfico seção transversal da vesícula indicada pela seta verde.	73
Figura 35 - Área de 1 μ m x 1 μ m da mica clivada.	74
Figura 36 - DLS da primeira síntese (3000 rpm, sem extrato).	75
Figura 37 - DLS da segunda síntese (9000 rpm, sem extrato).	75
Figura 38 - DLS da terceira síntese (15000 rpm, sem extrato).	76
Figura 39 - Imagem das partículas da terceira síntese (15000 rpm, sem extrato).	76
Figura 40 - DLS da quarta síntese (3000 rpm, com extrato).	77
Figura 41 - DLS da quinta síntese (9000 rpm, com extrato).	77
Figura 42 - DLS da sexta síntese (15000 rpm, com extrato).	78
Figura 43 - Imagem das partículas da síntese 6 (15000 rpm, com extrato).	78

Figura 44 - Raman: extrato de Ilex guayusa.....	80
Figura 45 - Raman: Picos do extrato suavizados.	80
Figura 46 - Ramam: Comparação lipossomo com extrato (curvas suavizadas), onde a curva preta é referente ao extrato e a vermelha ao lipossomo.....	81
Figura 47 - Aproximação da Figura 46.	82
Figura 48 - Espectro de IFTR do extrato de Ilex guayusa.	83
Figura 49 - Destaques para os picos de IFTR que representam ligações chave do extrato.	84
Figura 50 - Gráfico da curva padrão de ácido gálico.	86
Figura 51 - Gráfico de DSC dos lipossomos vazios.	88
Figura 52 - Gráfico de DSC para os lipossomos com extrato.....	89
Figura 53 - Gráfico de UV-Vis dos lipossomos com extrato submetidos a extrusão.....	91
Figura 54 – Leitura de 400 a 850 nm, após a banda da Figura 52.	92
Figura 55 - Histograma do lipossomo após reidratação.	93
Figura 56 - Histograma do lipossomo com extrato após reidratação e passar 50 vezes pela membrana extrusora.	95
Figura 57 - Imagem de criomicroscopia eletrônica de transmissão dos lipossomos, onde A - Imagem geral da amostra, B - Aproximação de uma região de A.....	97
Figura 58 - Imagem de criomicroscopia eletrônica de transmissão do lipossomo, onde A - Imagem geral da amostra, B - Aproximação de uma região de A onde podemos ver efeito de aglutinação da vesícula e multilamelas.....	98
Figura 59 - Imagens de criomicroscopia eletrônica de transmissão utilizadas para quantificação de dados através de ImageJ.	99
Figura 60 - Gráfico do histograma dos lipossomos por dados de ImageJ através da criomicroscopia eletrônica de transmissão.....	100
Figura 61 - Gráfico da curva padrão de trolox.	101
Figura 62 - Gráfico da determinação antioxidante do extrato de Ilex guayusa através do radical ABTS.....	103
Figura 63 - Gráfico de determinação antioxidante do lipossomo através do radical ABTS.....	105
Figura 64 - Gráfico da curva padrão de DPPH.....	106

Figura 65 - Gráfico da determinação antioxidante do extrato de guayusa através do radical DPPH.....	108
Figura 66 - Gráfico da determinação antioxidante do extrato de guayusa através do radical DPPH utilizando 3 pontos.	109
Figura 67 - Determinação da atividade antioxidante do lipossomo através do radical DPPH.....	111
Figura 68 - Determinação da atividade antioxidante do lipossomo através do radical DPPH utilizando 4 pontos.	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Curva padrão de Trolox.	50
Tabela 2. Curva de determinação de atividade antioxidante da guayusa por ABTS.....	51
Tabela 3. Curva de determinação da atividade antioxidante do lipossomo por ABTS.....	52
Tabela 4. Tabela da curva padrão de DPPH.	53
Tabela 5. Curva de determinação da amostra.	54
Tabela 6. Esquema de síntese dos lipossomos.....	55
Tabela 7. Distribuição de tamanho da primeira síntese (3000 rpm, sem extrato). 56	
Tabela 8. Distribuição de tamanho da segunda síntese (9000 rpm, sem extrato).	57
Tabela 9. Distribuição de tamanho da terceira síntese (15000 rpm, sem extrato).	59
Tabela 10. Distribuição de tamanho da quarta síntese (3000 rpm, com extrato). 60	
Tabela 11. Distribuição de tamanho da quinta síntese (9000 rpm, com extrato). 61	
Tabela 12. Distribuição de tamanho da sexta síntese (15000 rpm, com extrato). 63	
Tabela 13. Curva padrão de ácido gálico.	85
Tabela 14. Curva analítica de extrato de guayusa.....	86
Tabela 15. Tabela de diluição de lipossomos para DSC.	87
Tabela 16. Integração da área abaixo da curva das extrusões.....	93
Tabela 17. Distribuição de tamanho das partículas do lipossomo reidratado.	94
Tabela 18. Distribuição de tamanho das partículas do lipossomo com extrato reidratado que passou 50 vezes pela membrana extrusora.....	96
Tabela 19. Tabela da curva padrão de trolox.....	101
Tabela 20. Tabela da determinação antioxidante do extrato de Ilex guaysa através do radical ABTS.	102
Tabela 21. Tabela da determinação antioxidante do lipossomo através do radical ABTS.....	104
Tabela 22. Curva padrão de DPPH.	106
Tabela 23. Determinação da atividade antioxidante do extrato de guayusa através do radical DPPH.....	107
Tabela 24. Determinação da atividade antioxidante do lipossomo através do radical DPPH.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS

Hormônio luteinizante - (LH)

Hormônio folículo estimulante (FSH)

Polietilenoglicol – (PEG)

Depois de Cristo – (d.C.)

Potencial hidrogeniônico – (pH)

Porcentagem – (%)

Sistema Nervoso Central – (SNC)

Pequenas vesículas unilamelares - (SUV)

Nanômetros - (nm)

Grandes vesículas unilamelares (LUV)

2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) diamônio - (ABTS)

2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil – (DPPH)

Ultravioleta – Visível – (UV-Vis)

Espalhamento Dinâmico de Luz - (DLS).

Ácido etilenodiaminotetracético - (EDTA)

Padrão analítico – (Pa)

6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid – (Trolox)

Miligrama – (mg)

Mililitro - (mL)

Kilovolt – (Kv)

Porcentagem massa por volume - %(m/V)

Grama – (g)

Molar – (M)

Micrometro – (μm)

Graus célsius - ($^{\circ}\text{C}$)

Capacidade calorífica – (C_p)

Temperatura em que metade da transição foi completa – (T_m)

Variação de entalpia – (ΔH)

Microlitro – (μL)

Milimolar – (mM)

Micromolar – (μM)

Rotação por minuto – (rpm)

Largura de banda a meia altura – (width)

Centímetro – (cm)

Microscopia Eletrônica de Transmissão - (MET)

Microscopia de Força Atômica – (AFM)

Infravermelho com transformada de Fourier – (IFTR)

Calorimetria Diferencial de Varredura – (DSC)

Porcentagem volume por volume – $\%(V/V)$

Micrograma – (μg)

Caloria – (cal)

Quantidade necessária para inibir 50% da quantidade inicial – ($IC_{50\%}$)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	24
2. Revisão de literatura.....	26
2.1. Extrato de <i>Ilex guayusa</i> L.....	26
2.2. Lipossomos.....	30
2.3. Aplicação de lipossomos como drug delivery.....	34
2.4. Caracterização.....	35
3. Objetivos.....	37
3.1. Objetivo Geral.....	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
4. Material e Métodos.....	38
4.1. Reagentes.....	38
4.2. Métodos.....	38
4.2.1. Preparo do extrato de <i>Ilex guayusa</i> L.....	38
4.2.2. Síntese do Lipossomo.....	39
4.2.3. Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	39
4.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	41
4.2.5. Microscopia de força atômica (AFM).....	42
4.2.6. Espalhamento dinâmico de luz com microimagem (DLS).....	44
4.2.7. Espectroscopia de Raman.....	44
4.2.8. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IFTR).....	44
4.2.9. Determinação de polifenóis totais no extrato.....	45
4.2.10. Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	46
4.2.11. Método de armazenamento e reidratação do lipossomo.....	47
4.2.12. Criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryoTEM).....	48
4.2.13. Determinação de atividade antioxidante total do radical livre ABTS ⁺	49
4.2.14. Determinação de atividade antioxidante total do radical livre DPPH.....	52
4.3. Softwares.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1. Síntese do lipossomo.....	55
5.2. Espalhamento dinâmico da luz (DLS).....	55
5.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	64

5.4.	Microscopia de Força Atômica (AFM)	69
5.5.	Espalhamento de luz com microimagem	74
5.6.	Espectroscopia de Raman	79
5.7.	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IFTR).....	83
5.8.	Determinação de polifenóis totais no extrato	85
5.9.	Calorimetria (DSC).....	87
5.10.	Reidratação dos lipossomos.....	90
5.11.	Criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryoTEM).....	96
5.12.	Determinação de antioxidantes totais através da atividade do radical livre ABTS+..	101
5.13.	Determinação de antioxidantes totais através da atividade do radical DPPH.....	106
6.	CONCLUSÃO	114
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

1. INTRODUÇÃO

A *Ilex guayusa*, comumente conhecida como guayusa, é uma planta da Família Aquifoliaceae, Família que tem como principal gênero, o gênero *Ilex*, composto por mais de quinhentas espécies (Dueñas *et al.*, 2016). A guayusa é detectada em toda a extensão amazônica, sendo predominantemente encontrada na Amazônia Andina, principalmente na porção que diz respeito aos países Equador, Peru, Colômbia e Bolívia, destacando-se por ser encontrada em metade do território Equatoriano (Radice, Scalvenzi e Sablón Cossio, 2017; Dueñas *et al.*, 2016; Sequeda-Castañeda *et al.*, 2016).

O consumo da guayusa origina-se de tempos ancestrais pelos povos nativos pré-colombianos e é amplamente difundida atualmente. O cultivo da planta é tão presente na cultura andina que Dueñas propõe que a planta seja classificada como espécie doméstica (Dueñas *et al.*, 2016). Historicamente o consumo se dá pela infusão de folhas secas da planta, assim como sua prima erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e outros chás popularmente utilizados. A utilização do chá de guayusa possui objetivos tanto estimulantes quanto medicinais, e é considerada uma planta sagrada em culturas indígenas (Lewis *et al.*, 1991).

O uso medicinal do chá de guayusa tem diferentes aplicações. Registros relatam que historicamente o chá foi utilizado popularmente para tratar diabetes, infertilidade, doenças venéreas, inflamações, obesidade e retenção de líquido. Por mais que o consumo do chá seja milenar, há poucas pesquisas realizadas sobre a planta (Sequeda-Castañeda *et al.*, 2016). Pesquisas recentes provam a eficácia do extrato de guayusa sobre diabetes tipo 2 (Swanston-Flatt SK *et al.*, 1989), aumento dos níveis de estrogênio e ação reguladora nos níveis de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (Contero *et al.*, 2015), alta atividade antibacteriana (Gamboa *et al.*, 2018; Sequeda-Castañeda *et al.*, 2016), atividade antifúngica (Sequeda-Castañeda *et al.*, 2016), além de um alto poder antioxidante capaz de atuar contra inflamações e prevenir doenças cardíacas, câncer e Alzheimer (Higdon e Frei, 2003; Pardau *et al.*, 2017; Radice, Scalvenzi e Sablón Cossio, 2017; Dou, 2019; Almudena *et al.*, 2017; Villacis-Chiriboga *et al.*, 2018; Fan *et al.*,

2017; Wise e Negrin, 2020; Liguori *et al.*, 2018). A teofilina, componente presente no chá de guayusa é utilizada em xaropes para desobstrução das vias áreas em doenças respiratórias crônicas, uma vez que é inibidora da fosfodiesterase resultando em broncodilatação (Telles, Pierre d’Almeida Filho, 2020).

A utilização do chá de guayusa como componente medicinal geralmente está associado à ingestão do extrato. Com o refinamento da ciência, a humanidade conseguiu purificar princípios ativos e criar sistemas de liberação prolongada de fármacos, como pílulas e comprimidos. Então, para provir outras vias de tratamento que não por ingestão, foram desenvolvidos sistemas de carregamento de fármacos. Estes sistemas transportam os fármacos até suas respectivas áreas de atuação, esta técnica de liberação controlada de fármacos é amplamente conhecida Drug Delivery. Tiwari define Drug Delivery como “Método ou processo de administrar compostos farmacêuticos para alcançar efeitos terapêuticos em humanos ou animais” (Tiwari *et al.*, 2012). Existem diferentes sistemas de Drug Delivery, como uso de lipossomas (Weiner, Martin e Riaz, 1989; Faraji e Wipf, 2009), proteolipossomas (Ciancaglini *et al.*, 2012), nanopartículas (Faraji e Wipf, 2009), prodrugs (Stella e Himmelstein, 1980), géis (Böttcher, Slowik e Süß, 1998), microesferas (Varde e Pack, 2004), ciclodextrinas (Uekama, 1999) além de outros sistemas (Tiwari *et al.*, 2012).

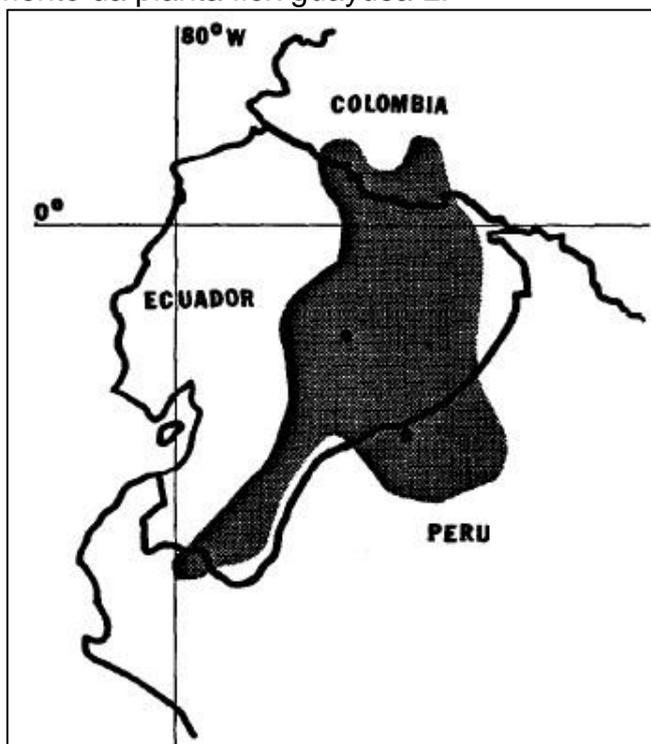
Na literatura, sistemas de entrega via lipossomas tem mostrado aumento na taxa de entrega de substâncias em alvos terapêuticos, quando comparados com métodos clássicos (Weiner, Martin e Riaz, 1989). Tendo em vista a maior estabilização que os sistemas de drug delivery revestidos com polietilenoglicol, como lipossomas PEGLados, têm sobre o extrato, com aumento do tempo de circulação e o protegendo de reações com o meio externo, optou-se por utilizar este método de carregamento. Este trabalho propõe a síntese e caracterização de lipossomas formados por fosfatidilcolina e colesterol, envolvidos por uma camada protetora de polietilenoglicol (PEG) como sistema de drug delivery. Estes lipossomas terão o papel de carrear o extrato da planta *Ilex guayusa* L. que possui elevado poder antioxidante para neutralizar agentes oxidantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Extrato de *Ilex guayusa* L

A *Ilex guayusa*, comumente conhecida como guayusa, é uma planta da Família Aquifoliaceae, Família que tem como principal gênero, o gênero *Ilex*. A guayusa é encontrada na região amazônica, sendo predominantemente encontrada na Amazônia Andina, na porção que diz respeito aos países Equador, Peru, Colômbia e Bolívia (Radice, Scalvenzi e Sablón Cossio, 2017; Dueñas *et al.*, 2016; Sequeda-Castañeda *et al.*, 2016). O país de maior destaque no cultivo de guayusa é o Equador, onde a planta é encontrada na maior parte do território nacional. Além disso, o Equador é o maior consumidor, produtor e exportador da planta (Almundena *et al.*, 2017).

Figura 1 - Mapeamento da planta *Ilex guayusa* L.



Fonte: (Dueñas *et al.*, 2016).

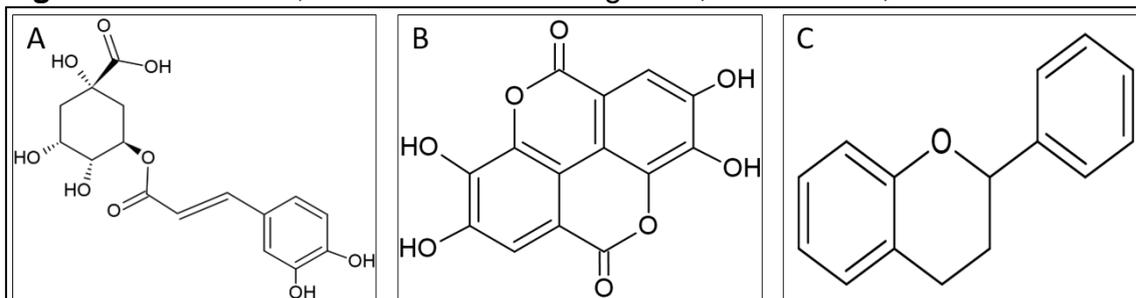
O consumo do chá de guayusa origina-se de tempos ancestrais pelos povos nativos pré-colombianos, registros mostram que a planta era utilizada como

infusão medicinal desde 500 d.C. podendo ter seu uso ainda anterior a isso (Dueñas *et al.*, 2016). A guayusa é amplamente utilizada até os dias de hoje, sendo apenas um dos chás utilizados em larga escala diariamente pelos povos amazônicos juntamente com o guaraná (*Paullinia cupana*) e a erva mate (*Ilex paraguariensis*) (Kapp *et al.*, 2016). O cultivo da planta é tão presente na cultura andina que Dueñas *et al.* (2016) propõe que a planta seja classificada como espécie doméstica. Historicamente o consumo se dá pela infusão de folhas secas da planta, assim como sua prima erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e outros chás popularmente utilizados. Porém alguns povos, como a tribo Kichua em Napo – Equador tem o costume de consumir a folha através da mastigação (Kapp *et al.*, 2016).

A guayusa é considerada uma planta sagrada em culturas indígenas do Peru e Equador, e utilizada em cerimônias e rituais pelas tribos Shuar, Achuar e Kichwa (Lewis *et al.*, 1991)(Almundena *et al.*, 2017)(Kapp *et al.*, 2016). A tribo Achuar pratica o consumo ritualístico através do consumo exagerado de grandes quantidades de chá em curtos períodos seguido da indução de vômito para que sejam induzidos efeitos estimulantes (Lewis *et al.*, 1991).

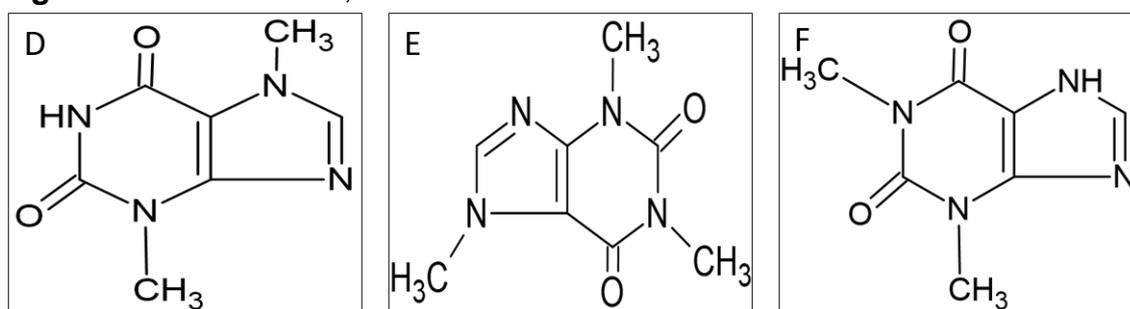
A utilização do chá de guayusa possui objetivos tanto estimulantes quanto medicinais. A literatura mostra que seu pH varia entre 6,3 e 6,5, e os principais componentes do chá de guayusa são polifenóis como taninos, flavonoides e ácido clorogênico; metilxantinas como cafeína, teobromina e teofilina; alcaloides, terpenos, cumarina, quininas, catequinas, açúcares redutores, óleos essenciais, caroteno e Vitaminas B₁, B₂ e C (Sequeda-Castañeda *et al.*, 2016) (Kapp *et al.*, 2016). Destes metabólitos, destacam-se os polifenóis e as metilxantilas.

Figura 2 - Polifenóis, onde A - Ácido clorogênico; B - Taninos; C – Flavonoides.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software ChemSketch.

Figura 3 - Metilxantinas, onde D - Teobromina. E - Cafeína. F – Teofilina.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software ChemSketch.

Alguns estudos mostram que o chá da planta possui mais cafeína que o café, e Kapp et al. (2016, p. 233) mostrou através de cromatografia gasosa que a composição química dos metabólicos secundários consiste em 3% de cafeína, além de quantidades consideráveis de ácido clorogênico, teofilinas e outros polifenóis. Já Pardau et al. (2017) mostrou que estatisticamente os teores de cafeína são os mesmos que os teores presentes no chá preto e chá verde. Wise e Negrin (2020) explica que realmente há uma grande variação na quantidade de cafeína no chá de guayusa dependendo da região onde a planta foi cultivada e do processo de tratamento para venda ao consumidor.

O uso medicinal do chá de guayusa tem diferentes aplicações. Pesquisas relatam que historicamente o chá foi utilizado popularmente para tratar diabetes, infertilidade, doenças venéreas, inflamações, obesidade e retenção de líquido. Por mais que o consumo do chá seja milenar, poucas pesquisas ainda foram feitas sobre a planta (Sequeda-Castañeda et al., 2016). Pesquisas

recentes provam a eficácia do extrato de guayusa sobre diabetes tipo 2 (Swanston-Flatt SK et al., 1989), sucesso como agente cicatrizante e hipoglicêmico (Sequeda-Castañeda et al., 2016), aumento dos níveis de estrogênio e ação reguladora nos níveis de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (Contero et al., 2015), alta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Gamboa et al., 2018; Sequeda-Castañeda et al., 2016; Pardau et al., 2017), atividade antifúngica contra *Cândida albicans* (Sequeda-Castañeda et al., 2016), capacidade de diminuir o nível de triglicerídeos, colesterol e lipoproteínas de baixa densidade na corrente sanguínea (Kapp et al., 2016), além de um alto poder antioxidante capaz de atuar contra inflamações e prevenir doenças cardíacas, câncer e Alzheimer (Higdon e Frei, 2003; Pardau et al., 2017; Radice, Scalvenzi e Sablón Cossio, 2017; Dou, 2019; Almudena et al., 2017; Villacis-Chiriboga et al., 2018; Fan et al., 2017; Wise e Negrin, 2020; Liguori et al., 2018). A teofilina, componente presente no chá de guayusa é ainda utilizada em xaropes para desobstrução das vias áreas em doenças respiratórias crônicas, uma vez que é inibidora da fosfodiesterase resultando em broncodilatação (Telles, Pierre d'Almeida Filho, 2020).

A procura por bebidas estimulantes mais saudáveis e com propriedades medicinais e de bem-estar tem se tornado maior na atualidade. Ela é responsável por um aumento projetado de 4,5% do consumo no mercado de chá mundial para o período de 2018 a 2024 (Infinium Global Research 2018). A guayusa começou a ser comercializada em mercados já estabelecidos de grandes consumidores mundiais como uma alternativa aos chás da *Camellia* (Hao et al., 2013). Uma de seus principais apelos é a falta de gosto amargo que o chá verde e preto possuem (Wise e Negrin, 2020).

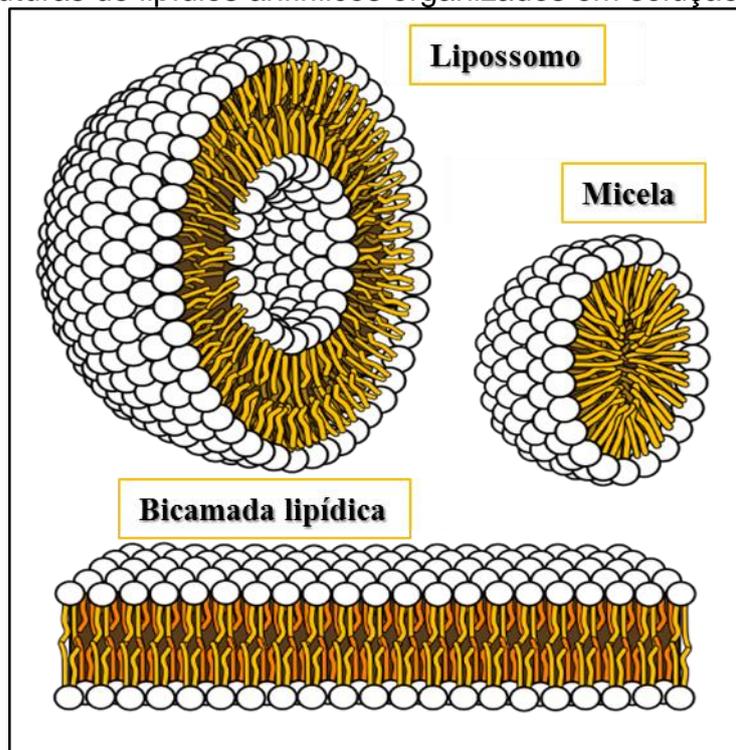
Os efeitos estimulantes do chá de guayusa se devem à grande quantidade de cafeína e teofilina que são compostos do grupo das xantinas. Essas duas substâncias se diferem estruturalmente apenas por uma amina secundária da teofilina para uma amina terciária que possui um ligante metil na cafeína. Ambas são conhecidamente estimulantes do sistema nervoso central (SNC), vaso dilatantes e aceleradores de metabolismo. Após a ingestão, a cafeína é

metabolizada no fígado, sendo uma das formas de metabólito a teofilina (Moreira, Diego Marques, 2021) (Telles, Pierre d'Almeida Filho, 2020.).

2.2. Lipossomos

Lipossomos são membranas formadas por duas camadas de fosfolipídios que circundam-se formando uma vesícula. A estrutura lisossômica foi descrita pela primeira vez em 1961 pelo hematologista britânico Alec D. Bangham, enquanto este hidratava filmes lipídicos na parede de um instrumento de vidro. Porém somente em 1965 Weissman utiliza o termo para designar estruturas vesiculares formadas por bicamadas de fosfolipídios (Sessa e Weissmann, 1968). Os lipossomos são estruturas que mimetizam biomembranas proveniente da característica anfifílica de fosfolipídios. Os fosfolipídios são moléculas químicas que possuem uma cabeça polar hidrofílica e uma calda apolar hidrofóbica. Esta estrutura quando presente em meio aquoso leva a formação de membranas permeáveis, uma vez que por interação as cabeças polares se voltam para o meio aquoso e as cadeias apolares procuram ficar fora de contato com o meio pelas forças de repulsão, interagindo entre si mesmas. Quando as cadeias carbônicas ficam próximas umas das outras ocorrem interações intermoleculares conhecidas como forças de Van der Waals, que as estabilizam formando bicamadas (Sebinelli, 2016).

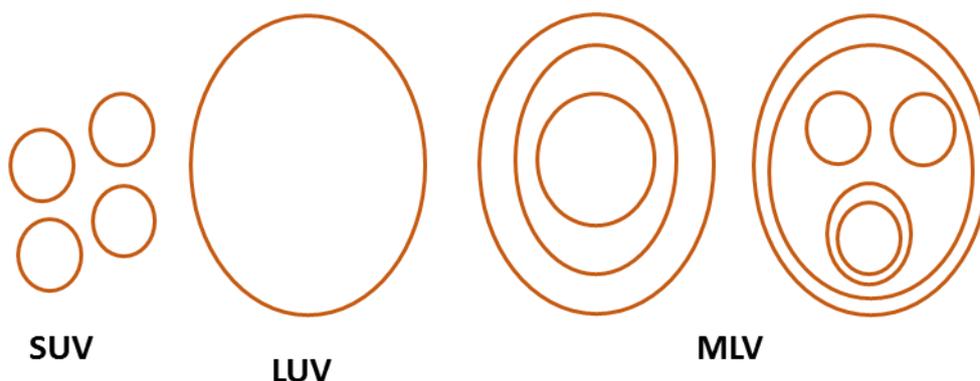
Figura 4 - Estruturas de lipídios anfifílicos organizados em solução aquosa.



Fonte: (Villareal, Mariana Ruiz, 2011).

Os lipossomos podem ser caracterizados pelo tamanho de suas estruturas esféricas. O processo de formação de lipídios pode gerar vesículas com diferentes tamanhos ou lamelaridades: pequenas vesículas unilamelares (SUV), são vesículas de 10 a 100 nanômetros (nm) com apenas uma bicamada de fosfolipídios, grandes vesículas unilamelares (LUV), são vesículas de 200 a 1000 nm com apenas uma bicamada fosfolipídica, e vesículas multilamelares (MVL), que são vesículas com várias camadas de fosfolipídios concêntricas e variam de 1000 a 3500 nm (Müller-Goymann, 2004). Os fosfolipídios constituintes também influenciam na macroestrutura lipídica. Lipídios cilíndricos favorecem a formação de bicamadas planas, os lipídios cônicos favorecem a formação de tubos hexagonais de fase invertida e os lipídios cônicos invertidos ou convexos favorecem a formação de micelas (Sebinelli, 2016).

Figura 5 - Vesículas lipossomais quanto a tamanho e quantidade de lamelas.



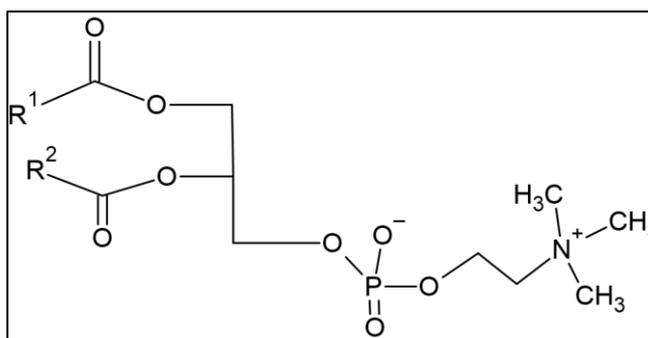
Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software ChemSketch.

As membranas planares dobram-se entre si espontaneamente formando vesículas para evitar contato da região hidrofóbica com o meio aquoso. Durante este processo é possível a formação de vesículas com multilamelas de bicamadas. Para isso existem processos de diminuição das vesículas que obtêm a formação de vesículas menores e unilamelares. Primeiramente, Alec Bangham (1965) disse que lipossomos esféricos tinham de 80 nm a 400 μm , porém através de processos físicos de sonicação vesículas multilamelares podem ser fragmentadas em vesículas unilamelares de 10 a 80 nm (Weiner, Martin e Riaz, 1989).

Lipossomos são essencialmente um subtipo de nanopartícula constituído de fosfolípido de membrana. São um análogo fisiológico as membranas celulares tendo uma maior biocompatibilidade quando comparado a nanopartículas metálicas ou poliméricas (Müller, Mäder e Gohla, 2000).

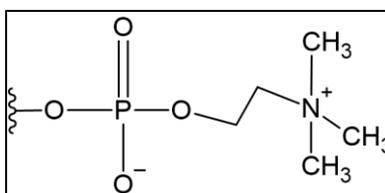
Fosfolípidios são formados estruturalmente por uma cadeia primária de glicerol, onde através dos oxigênios estão ligadas três radicais, dois dos três radicais são cadeias de ácidos graxos podendo ser saturados ou insaturados, o terceiro radical geralmente é um grupo de cabeça polar (Nelson e Cox, 2014). O fosfatidilglicerol mais abundante em plantas e animais é a fosfatidilcolina, também conhecida como lecitina, sendo o maior constituinte das membranas celulares (Weiner, Martin e Riaz, 1989).

Figura 6 – Fosfatidilcolina.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software ChemSketch.

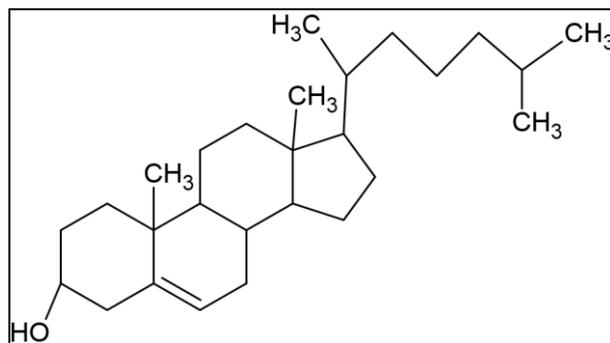
Figura 7 – Fosfocolina.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software ChemSketch.

Outro componente de membrana muito importante é o colesterol. É bem conhecido o papel do colesterol na membrana lipossomal, controlando a permeabilidade, fluidez, elasticidade, a resistência, retenção de fármacos e a rigidez na transição de fase por efeitos de temperatura (Nakhaei *et al.*, 2021). O colesterol é uma molécula orgânica de esteroide com característica anfifílica. Possui um ligante hidroxil capaz de fazer ligações de hidrogênio e uma volumosa cadeia carbônica com quatro cadeias cíclicas de hidrocarbonetos. Ele é encontrado na membrana das células eucariontes numa proporção de 30 a 50% da compostos lipídicos (Berg, Tymoczko e Stryder, 2014). O esteroide fica localizado na parte interna da membrana. A cadeia de dezessete carbonos fica misturada a cauda dos ácidos graxos e a hidroxila fica ligada a cabeça polar dos fosfolipídios. Outro fator importante da presença de colesterol nas vesículas lipossomais é a prevenir a agregação das mesmas (Nakhaei *et al.*, 2021).

Figura 8 – Colesterol.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software ChemSketch.

2.3. Aplicação de lipossomos como drug delivery

Os lipossomos foram utilizados pela primeira vez como um sistema de entrega de fármaco (drug delivery) no começo dos anos 90. A encapsulação de moléculas em lipossomos é um mecanismo biológico recorrente nas células, e a biocompatibilidade de interação da bicamada fosfolipídica do lipossomo com a membrana celular, que também é formada por uma bicamada fosfolipídica, é o responsável por este sistema tão interessante.

Lipossomos são a nanopartícula mais utilizada na biomedicina. O interior hidrofílico das vesículas pode proteger fármacos de fatores degradantes e destrutivos do meio externo (corpo) minimizando efeitos indesejáveis. A redução desta permeabilidade passiva é resultado da interação do colesterol com fosfolipídios de membrana, aumentando a coesão da membrana. A quantidade ideal de colesterol presente na membrana depende da natureza da membrana e do conteúdo do lipossomo (Nakhaei *et al.*, 2021).

Pesquisas utilizando lipossomos como drug delivery têm adicionado alterações para aumentar a eficiência da entrega ou diagnóstico, como adição de proteínas ligantes na superfície lipídica para focar células com receptores específicos (Weiner, Martin e Riaz, 1989), adição lipídeos fluorescentes como marcadores (Kamaly *et al.*, 2009), entre outras modificações. Na literatura, lipossomos tem mostrado aumento na taxa de entrega de substâncias em alvos terapêuticos, quando comparados com métodos clássicos (Weiner, Martin e Riaz, 1989).

Existem dois tipos diferentes de carreamento de fármacos em lipossomos. O carreamento passivo é mais comum, onde o lipossomo é formado na solução aquosa em que o fármaco está dissolvido e o carreamento ativo, onde o lipossomo já sintetizado passa por processos estressantes de pH e carga em sua superfície para temporariamente aumentar sua permeabilidade e a passagem dos fármacos para o interior da vesícula.

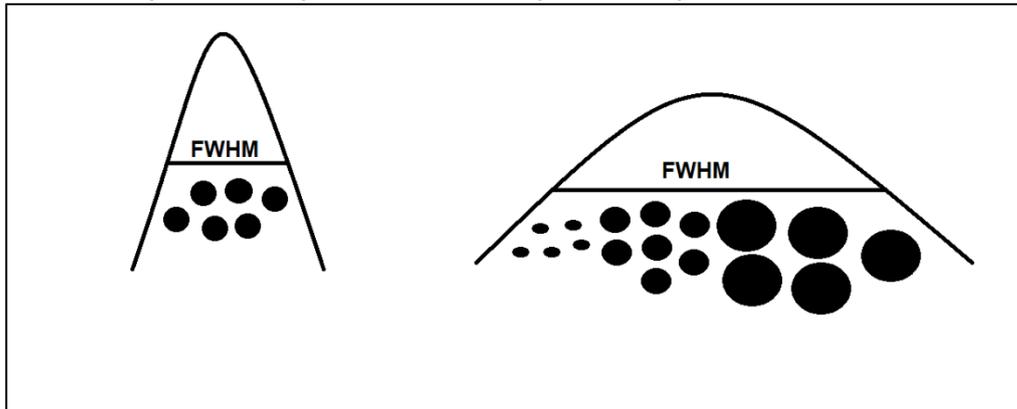
2.4. Caracterização

Extratos vegetais são normalmente caracterizados pela composição química, através de ensaios colorimétricos da quantidade de algumas estruturas específicas como polifenóis totais (Wojdyło, Oszmiański e Czemerys, 2007), antioxidantes através de neutralização de radicais livres como ABTS (Arteaga-Crespo *et al.*, 2020) e DPPH (Tavera *et al.*, 2022). Outros métodos de análise de composição química são através de outras técnicas de espectroscopia além de UV-VIS, como Infravermelho (ALVAREZ, 2018) e Raman (Annamalai *et al.*, 2013) que conseguem nos dar informações sobre os grupos funcionais e uma ideia qualitativa de sua quantidade presente no extrato.

Lipossomos são vesículas lipídicas que podem ser caracterizadas como nanopartículas, e como nanopartículas possuem propriedades muito interessantes para caracterização. A caracterização físico-química dessas partículas pode ser feita através de tamanho e forma através de técnicas como microscopia eletrônica de varredura (Vangala *et al.*, 2010), transmissão (Chetanachan *et al.*, 2008), força atômica (Ruozi *et al.*, 2007) e cryotransmissão.(Ruozi *et al.*, 2011) Também é possível analisar dispersão de tamanho da população através de técnicas de dispersão de luz como espalhamento dinâmico de luz (Briuglia *et al.*, 2015) e alguns parâmetros de UV-VIS (Nguyen *et al.*, 2016).

Todas as técnicas acima foram utilizadas para caracterização do sistema de liberação controlada ou para o extrato propostos neste trabalho.

Figura 9 - Dispersão de partículas em espectroscopia de luz.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software ChemSketch.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar lipossomos constituídos de fosfatidilcolina e colesterol contendo o extrato aquoso de *Ilex guayusa*.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar o potencial antioxidante do extrato de guayusa quanto à neutralização de agentes oxidantes;
- Avaliar a melhor formulação lipossomal quanto ao menor tamanho e dispersão possíveis;
- Caracterizar quanto a tamanho e estabilidade coloidal;
- Desenvolver um método para armazenagem e reidratação;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes

- Folhas secas de *Ilex guayusa*;
- Fosfatidilcolina;
- Colesterol;
- Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA);
- Polietilenoglicol;
- 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) diamônio (ABTS) (99,9% sigma);
- Persulfato de Potássio (99% sigma);
- Álcool Metílico (PA sigma);
- Álcool Etílico Absoluto (PA didática);
- Tetróxido de Ósmio (Electron Microscopy Science);
- Acetato de Uranila (Electron Microscopy Science);
- Ácido Fosfotúngstico hidratado (Electron Microscopy Science);
- Resina Formvar (Electron Microscopy Science);
- Hidróxido de sódio (PA didática);
- 6-hidroxi-1,5,7,8-tetrametilcromano-2 ácido carboxílico. (Trolox);
- 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH);
- Reagente de Folin-Ciocalteu

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo do extrato de *Ilex guayusa* L.

As folhas de *Ilex guayusa* foram colhidas em uma fazenda na cidade de Macas, província de Morona Santiago, na Amazônia equatoriana. As folhas foram então secas e trituradas para formar pó. Para manter a mesma proporção da preparação do chá consumido na região, foram pesados 50 miligramas (mg) de folha triturada para posteriormente ser infundida por 10 mL de água ultrapura, obtida pelo equipamento Synergy UV, Merck Millipore.

Em um banho-maria, foi aquecida uma quantidade suficiente de água para levar à fervura 10 mL de água ultrapura contida dentro de um béquer de 25 mL. A temperatura do solvente no béquer foi administrada com auxílio de um

termômetro, uma vez que a temperatura de ebulição foi atingida, foram adicionadas as 50 mg de guayusa seca. Foram cronometrados cinco minutos, então levou-se a infusão à bancada para descansar até temperatura ambiente. A solução foi filtrada em papel quantitativo para retirada dos resíduos sólidos e foi armazenada na geladeira em frasco âmbar, protegida da luz. Pardau *et al.* (2017) mostrou que condições normais de infusão do chá são capazes de retirar a capacidade máxima de compostos antioxidantes fenólicos da planta.

4.2.2. Síntese do Lipossomo

O método de preparo do lipossomo não poderá ser descrito de forma extensa, pois o mesmo está submetido em processo de aquisição de patente. Portanto, sua síntese será descrita de forma sucinta e as quantidades não serão mencionados.

A formação de lipossomo acontece através da interação de duas fases: a fase lipofílica e a fase aquosa. A fase aquosa é formada por água ultrapura, EDTA e o extrato aquoso. A fase lipofílica consiste em: fosfolipídios (fosfatidilcolina, glicerol, colesterol) incorporados em uma mistura de polietilenoglicol e etanol sob alta agitação. A reação acontece com a adição lenta da fase líquida, gota a gota, na fase lipofílica, sob constante agitação durante quinze minutos e à temperatura ambiente. Ao final, é obtida uma emulsão homogênea.

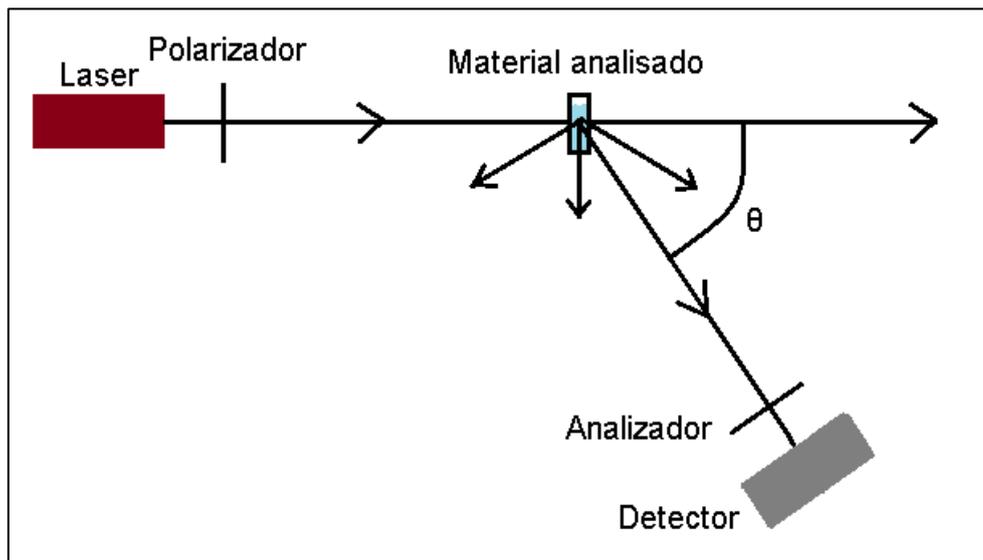
4.2.3. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz é um método eficiente para determinar o tamanho de partículas dispersas em uma solução ou coloide. A técnica baseia-se no monitoramento da intensidade de luz espalhada ao atravessar o meio aquoso, em microssegundos, em dado ângulo específico. A mudança na intensidade da luz é gerada devido ao movimento browniano das partículas do soluto, onde são geradas interferências construtivas e destrutivas nas ondas eletromagnéticas devido à distância entre as partículas com o tempo (Sebinelli, 2016). Este fenômeno é conhecido como Espalhamento de Rayleigh, os raios das partículas sendo gerados através da equação abaixo.

$$I = I_0 = \frac{1 + \cos^2 \theta}{2r^2} \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right) \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}\right) \left(\frac{d}{2}\right)^6 \quad \text{Equação 1.}$$

- I : Intensidade da radiação espalhada;
- I_0 : Intensidade da radiação incidente;
- λ : Comprimento de onda incidente;
- r : Distância até o centro espalhador;
- θ : Ângulo da luz espalhada;
- n : Índice de refração;
- d : Diâmetro da partícula.

Figura 10 - Equipamento de espalhamento dinâmico de luz (DLS).



Fonte: Wikimédia Commons (Letícia, 2017).

As emulsões sintetizadas foram levadas ao aparelho Microtrac para que fosse determinado o diâmetro das partículas, e assim caracterizar o lipossoma formado. O coloide foi inserido na cuba de leitura, por onde passa o laser de emissão de luz. O resultado é fornecido em uma tabela e um histograma de tamanho de particulado. O equipamento utilizado foi um NPA152 Zetatrac, Microtrac, USA, presente no laboratório de físico-química do IFES de Aracruz.

4.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão consiste em uma fonte de elétrons que são direcionados contra uma amostra, num ambiente de alto vácuo. Os elétrons que atravessarem a amostra são captados por um detector que irá traduzir os dados em imagem. As áreas da amostra por onde os elétrons não conseguiram atravessar, devido a fenômenos de reflexão ou refração, são lidas pelo detector como áreas pretas. Quanto maior for a quantidade de elétrons que atravessarem, mais clara será a imagem. Assim, áreas onde ocorrem diferente absorção dos elétrons terão uma coloração diferente na escala de branco, preto e cinza compondo a imagem. O equipamento utilizado foi um microscópio Jeol JEM1400, com filamento de tungstênio e aceleração de até 120kV, no laboratório multiusuário LUCAR - CCS.

A superfície em que as amostras são depositadas para análise se chama Grid, que é um disco circular vazado e gradeado. Podem ser compostos de Cobre, Zinco, Níquel, etc. Para que a amostra seja depositada sobre eles, é necessário recobrir os Grids com uma película de carbono chamada Formvar (Uma resina termoplástica à base de PVA). Então foi pipetado, sob o grid recoberto, uma gota da emulsão diluída, e guardada over night numa placa de petri para secar.

Devido à natureza da amostra orgânica, que faz com que os elétrons a atravessem diretamente, foi necessária uma técnica de contrastação das amostras. Para isso testou-se três contrastantes: acetato de uranila, tetróxido de ósmio e ácido fosfotúngstico.

4.2.4.1. Contrastação por acetato de uranila 5% (m/v)

Em uma capela, com luva e máscara, foram diluídos 5 g de acetato de uranila em 100 mL de água ultrapura, e a solução foi filtrada em papel quantitativo. No filtrado foi então adicionado uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 molar (M) em pHmetro até atingir pH 5,0 e a solução foi armazenada em frasco âmbar envolto em papel alumínio.

Em uma placa de petri recoberta por papel alumínio, foi colocada uma tira de parafilm, e nela pipetado uma gota da solução de acetato de uranila 5% (m/v).

O grid foi depositado por cima da gota, de modo que a superfície onde estavam as amostras ficasse em contato com a solução durante trinta minutos. Após isso, o grid foi mergulhado em uma sequência de três béqueres com água destilada, durante trinta segundos em cada um, com movimentos verticais, para a retirada do excesso de acetato de uranila presente. O excesso de água do grid foi retirado pelo contato com um papel de filtro quantitativo, e então deixado para secar numa placa de petri dentro da capela.

4.2.4.2. Contrastação por ácido fosfotúngstico 1%(m/v)

Foram pesados 10 mg de ácido fosfotúngstico, diluídos em 1 mL de água ultrapura e estocados em um microtubo eppendorf de 1,5 mL. Foi então pipetada uma gota do contrastante e depositada sobre o grid, em contato com a superfície da amostra. O contrastante ficou em contato durante uma hora, e então o grid foi mergulhado em um béquer com água, em seguida foi retirado o excesso de água através do contato com um papel de filtro quantitativo.

4.2.4.3. Contrastação por tetróxido de ósmio 2% (m/v)

Dentro da capela, com luva e máscara, uma ampola de 1 g de tetróxido de ósmio foi esmagada com uma vareta de vidro dentro de um frasco de vidro âmbar de 100 mL, então foram adicionados 50 mL de água ultrapura. Por ser extremamente tóxica, a solução é armazenada no frasco âmbar, dentro de uma lata de metal e congelada.

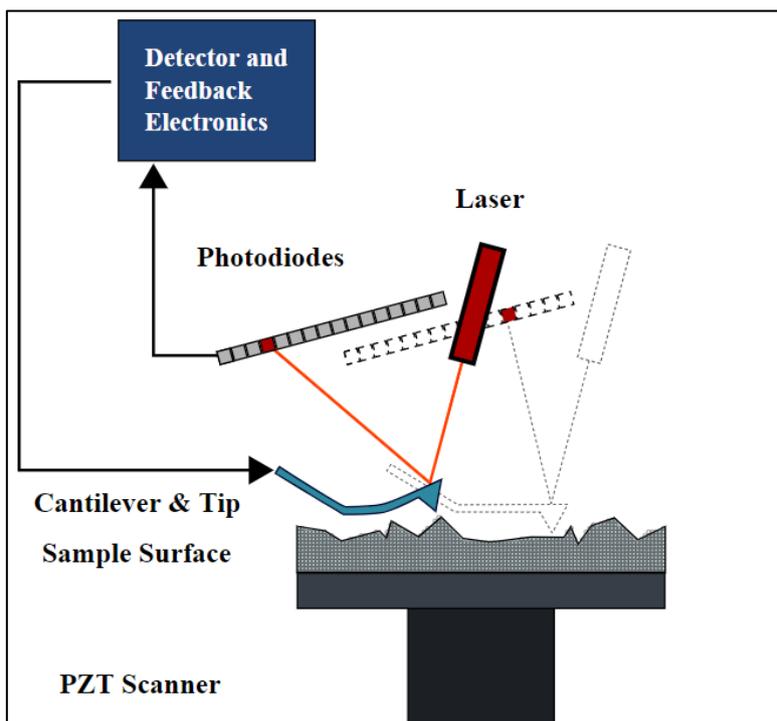
Dentro da capela, em placa de petri recoberta de papel alumínio, foi pipetada uma gota de tetróxido de ósmio sobre uma tira de parafilm. Posicionou-se então o grid contendo a amostra próximo da gota, para que a evaporação do contrastante fosse condensada sobre a amostra.

4.2.5. Microscopia de força atômica (AFM)

A técnica de microscopia de força atômica se baseia nas interações intermoleculares de uma ponta com uma superfície. Uma ponteira que termina em uma espessura de 1 a 3 átomos é fixada num suporte metálico chamado cantiléver. Incidindo sobre o cantiléver, temos um laser que reflete num fotodiodo. Quando a ponta está afastada da matéria, as forças resultantes são atrativas devido à interação intermolecular de Van der Waals. Quando a ponta

se aproxima da matéria, as forças resultantes passam a ser repulsivas, devido às repulsões dos orbitais eletrônicos dos átomos. A força resultante dessas interações faz com que o cantiléver sofra deflexões, e essas deflexões são captadas através da incidência do laser. Uma ilustração está esquematizada na Figura 11.

Figura 11 – Imagem de AFM esquematizando a interação do cantilever com a amostra.



Fonte: Autor desconhecido, Wikimédia Commons, 2008.

O preparo da amostra ocorreu através da deposição de uma gota da emulsão sobre uma lâmina de mica clivada. Posteriormente, uma segunda lâmina foi utilizada para espalhamento do líquido. A amostra decantou por 30 minutos, sendo em seguida levada ao AFM. Foi utilizado o modo de contato intermitente, onde a ponteira vibra numa frequência de ressonância, praticamente o tempo todo interagindo com a superfície da amostra. O equipamento utilizado foi Raman com módulo AFMA α 300 com software Witec do laboratório de instrumentação – Labpetro.

4.2.6. Espalhamento dinâmico de luz com microimagem (DLS)

A técnica é a mesma descrita anteriormente, porém este equipamento é capaz de tirar foto micrométrica das emulsões, onde foi possível observar tamanho e forma das microemulsões. Para este equipamento, dispersou-se o lipossoma num reservatório de água deionizada que em seguida atravessou um sensor de DLS que faz uma imagem toda vez que o ângulo de incidência que chega no detector é alterado. O limite de detecção das imagens é de 3 micrometros (μm). O equipamento utilizado foi Microtrac ZYNC.

4.2.7. Espectroscopia de Raman

A técnica se baseia na emissão de um laser que ao incidir sobre a amostra, é espalhado, gerando uma luz de mesma energia ou de energias diferentes. O feixe de luz que possui a mesma energia é o espalhamento de Rayleigh, explicada anteriormente. O feixe de energia diferente é chamado de efeito Raman e possibilita o acesso a informações de composição química da amostra, através da diferença dos dois. Esse efeito ocorre devido à energia que é absorvida pelas moléculas, gerando um movimento vibracional, sendo emitida em seguida.

Uma alíquota de emulsão foi adicionada a um vial, por onde o feixe de luz atravessou, e o feixe de retorno foi lido pelo detector. O equipamento utilizado foi o Handheld Raman RS4, localizado no laboratório de Nanoestruturas funcionalizadas, na UFES - CCS.

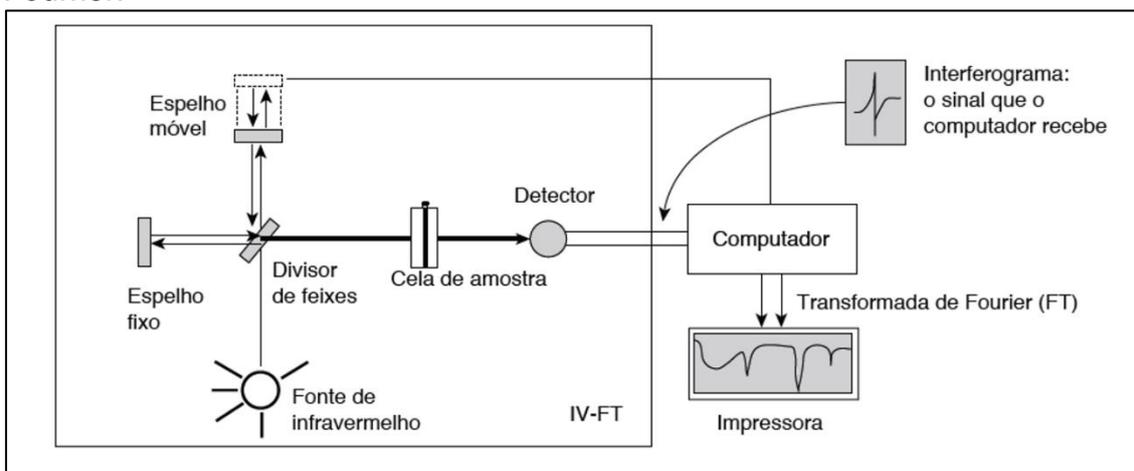
4.2.8. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IFTR)

Todos os compostos que possuem ligações covalentes absorvem energia de ondas eletromagnéticas na região de frequência do espectro de infravermelho. As moléculas quando excitadas por absorção de energia na frequência de infravermelho, tem suas ligações covalentes sendo submetidas a dois diferentes processos de movimento vibracionais: estiramento e dobramento.

Contudo, apenas as ligações em que o movimento dos elétrons é assimétrico, ou seja, ligações afetadas por momento dipolo, podem absorver radiação no infravermelho (Pavia *et al.*, 2015).

A amostra liofilizada sólida foi adicionada sobre um prisma cristalino (divisor de feixes) e então prensada. O prisma é bombardeado por uma fonte geradora de radiação infravermelha, gera ondas construtivas e destrutivas, fazendo com que a amostra absorva todos os comprimentos de onda do espectro de infravermelho. A energia que transmitiu através da amostra chega até o detector, e então o interferograma modificado é comparado com o interferograma incidido, que posteriormente é tratado por um processo matemático chamado Transformada de Fourier, e apresentado pelo software como um desenho gráfico das frequências absorvidas.

Figura 12 - Esquema do aparelho de Infravermelho com transformada de Fourier.



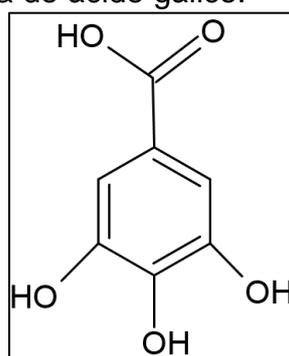
Fonte: Introdução a espectroscopia. 5^o edição (Paiva et al 2015).

4.2.9. Determinação de polifenóis totais no extrato

A quantificação de componentes fenólicos totais foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu (Krepesky *et al.*, 2012). Para a determinação de fenólicos totais é preparada uma solução do reagente de Folin-Ciocalteu e este reage com substâncias redutoras (ânion fenolato), levando à composição de óxido do reagente que tem leitura na região de 720nm à 760nm (Pires *et al.*, 2017). Foi

utilizado como curva padrão ácido gálico, como reagente de referência. Os teores de fenólicos totais foram determinados através da leitura das absorvâncias realizada em espectrofotômetro (Molecular Devices Spectra MAX 190 localizado na Universidade de Vila Velha) a 720 nm e foram expressos em gramas equivalentes de ácido gálico por 100 g de extrato. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 13 - Estrutura química do ácido gálico.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software ChemSketch.

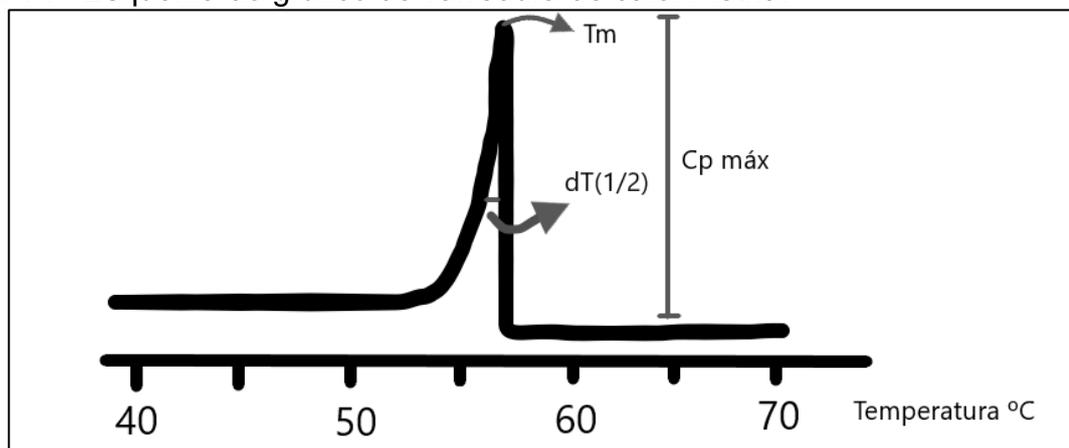
4.2.10. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria é uma técnica utilizada para medir o efeito do aquecimento em sistemas. Assim, é possível medir a entalpia de processos, como por exemplo a transição de fases de uma bicamada. Bicamadas de fosfolipídios possuem polimorfismos relacionados a transição da fase gel para fase de líquido cristalino. (Demetzos, 2008). A mudança de temperatura ou pH pode interferir na interação das moléculas e conseqüentemente alterar a estrutura da bicamada.

A calorimetria diferencial de varredura consiste em um equipamento que transfere calor a uma taxa constante para um sistema com uma amostra e uma referência inerte, que estão posicionadas em cubas diferentes, sob pressão constante. As celas possuem eletrodos de aquecimento e sensores de temperatura individuais. A amostra é induzida termicamente a eventos, e os sensores registram a diferença de temperatura, fornecendo energia para aquecimento ou resfriamento, de acordo com o evento decorrente. Assim, é

possível calcular quanta energia é necessária para que a amostra passe por uma mudança de um grau celsius (1°C), que é a capacidade calorífica (C_p) (Sebinelli, 2016).

Figura 14 - Esquema do gráfico de varredura de calorimetria.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software Office 2016.

Um modelo de curva de uma leitura de DSC pode ser observado na Figura acima. T_m sendo a temperatura em que a amostra possui o maior C_p , C_p é capacidade calorífica. $\Delta T_{1/2}$ é a largura da banda em metade da altura do pico de T_m , é a temperatura em que metade da transição foi completa. A área embaixo da curva corresponde a entalpia do processo.

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} C_p \partial T \text{ Equação 2.}$$

4.2.11. Método de armazenamento e reidratação do lipossomo

Pensando em um armazenamento da amostra por um tempo prolongado, foi proposto um método de armazenamento dos lipossomos através de liofilização. Os lipossomos foram congelados em ultrafreezer -80°C Panasonic, localizado no laboratório multiusuário LUCCAR – CCS, dentro de tubos de centrifugação falcon de 50 mL por 24h. Posteriormente as amostras foram levadas ao

liofilizador K108 Liotop, localizado no laboratório multiusuário LABIOM, UFES – CCS, durante cinco dias. Depois de seco, o filme lipídico formado foi armazenado no ultrafreezer -80°C até ser utilizado.

A reidratação do filme lipídico foi feita com água ultrapura, numa concentração de 50mg/mL do filme de lipídico. A mesma então foi homogeneizada com auxílio de um vórtex e levado a um homogeneizador ultrassônico de ponta, Ultrasonic Homogenizer VT300 localizado no CPID-ES. A mostra foi sonicada com uma potência de 40%, utilizando 20% de ciclo durante 4 minutos. O processo foi feito duas vezes, para que não ocorresse a lise das vesículas (Ohtake *et al.*, 2005).

Após homogeneização os lipossomos foram submetidos a diferentes quantidades de extrusões através de membranas de 100nm de porosidade utilizando a extrusora Avanti Polar Lipids, localizado no laboratório de nanoestrutura funcionalizada UFES – CCS, para homogeneizar a dispersão das vesículas (Ohtake *et al.*, 2005).

4.2.12. Criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryoTEM)

A amostra que passou pelo processo de liofilização e posteriormente pelo protocolo de reidratação proposto em 4.2.11 foi então levada à criomicroscopia eletrônica de transmissão. Um grid de cobre de 400 mesh com um filme de *holey carbon* para sustentação da amostra, sofreu uma descarga de energia *Glow discharge*. Então foram aliquoteados 3 µL do coloide e foram depositados sobre o grid, em seguida foram encubados por 10 minutos a 22 °C com 100% de umidade. Após o tempo de encubação, a amostra foi congelada através do equipamento vidrobot FEI com *blot force* de 4 durante um *time blot* de 2,5 segundos. Após isso, outra alíquota de 3 µL foi adicionada ao grid com encubação de 20 segundos, a seguir passou por *blot time* 2,5 segundos com *blot force* de 4. Por fim, amostra foi congelada em etano líquido por imersão, e posteriormente transferida para o nitrogênio líquido e levado ao microscópio (Almgren, Edwards e Karlsson, 2000).

As imagens foram feitas utilizando dois criomicroscópios eletrônicos de transmissão diferentes, o TECNAI T20 de 200 kV com câmera megaview 1k e o TECNAI SPIRIT 120 kV com câmera megaview de 2k, ambos da Thermofisher.

4.2.13. Determinação de atividade antioxidante total do radical livre ABTS⁺

É o método mais utilizado para medir a atividade antioxidante. Ele é baseado numa reação de oxirredução onde o radical ABTS⁺ é reduzido pelo analito a ser estudado (Brito, Edy Souza, 2007).

- Preparo da solução estoque de ABTS 7 mM

Foram pesados 38,4 mg de ABTS e dissolvidos num balão volumétrico de 10 mL com água ultrapura. Após homogeneização, a solução foi transferida para um frasco âmbar e armazenada em geladeira por até no máximo um mês antes do uso.

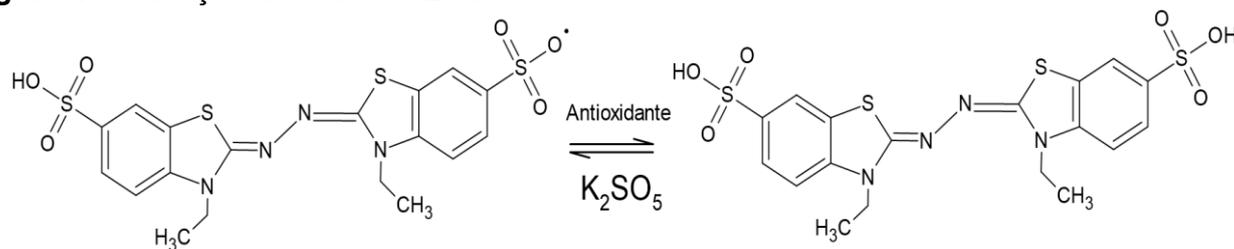
- Preparo da solução estoque de persulfato de potássio 140 mM

Foram pesados 378,4 mg de persulfato de potássio e dissolvidos num balão volumétrico de 10 mL com água ultrapura. Após a homogeneização, a solução foi transferida para um frasco âmbar e armazenada em temperatura ambiente fora do alcance da luz por até um mês antes do uso.

- Preparo da solução radical ABTS⁺

O radical ABTS⁺ é preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução estoque de persulfato de potássio. A mistura deve ser mantida em temperatura ambiente e no escuro por 16 horas. Em seguida, 500 µL dessa mistura são diluídos em aproximadamente 45 mL de álcool etílico absoluto, até que a leitura de absorvância no espectrofotômetro de UV-VIS à 734nm dê uma absorvância na faixa de $0,7 \pm 0,05$

Figura 15 - Reação do radical ABTS.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software ChemSketch.

- Preparação da solução padrão de Trolox 2 mM

Foram dissolvidos 25 mg de trolox em álcool etílico absoluto, num balão volumétrico de 50 mL. A solução foi preparada no dia da análise.

- Preparação da curva padrão de Trolox

Foram feitas diluições seriadas da solução estoque de trolox, em balões de 10 mL conforme a Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Curva padrão de Trolox.

Ponto da curva	Trolox (mL)	Álcool Etílico (mL)	Concentração Final (µM)
1	0,5	9,5	100
2	2,5	7,5	500
3	5,0	5,0	1000
4	7,5	2,5	1500
5	10	0	2000

Foram transferidas alíquotas para tubos de centrifugação do tipo falcon de 15 mL, contendo cada um 3,0 mL de radical ABTS e 30µL de solução trolox. Cada ponto foi lido no espectrofotômetro de UV-VIS, após seis minutos da mistura, em 734nm de comprimento, utilizando cubeta de quartzo de 1cm de caminho ótico. O espectrofotômetro utilizado foi Ocean Optics USB 2000+, localizado no laboratório de Nanoestruturas Funcionalizadas da UFES - CCS.

- Determinação da atividade antioxidante total do extrato

O extrato de guayusa foi liofilizado, e posteriormente pesado 10 mg de amostra e dissolvidos em balão volumétrico de 10 mL com álcool metílico. A partir desta amostra estoque foram feitos doze pontos numa curva de calibração, conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Curva de determinação de atividade antioxidante da guayusa por ABTS.

Ponto	Amostra (μL)	Etanol (μL)
1	1500	0
2	1350	150
3	1200	300
4	1050	450
5	900	600
6	750	750
7	600	900
8	450	1050
9	300	1200
10	150	1350
11	100	1400
12	50	1450

Utilizando os pontos da Tabela 2, foram pipetadas para uma placa de 96 poços com tampa, em triplicata, 200 μL de radical ABTS e 2 μL de cada ponto. Após cinco minutos da mistura, a placa foi levada à leitora de placas Synergy H1, localizado no laboratório multiusuário LABIOM – CCS, onde foi agitado durante um minuto em modo duplo orbital, e depois foram feitas leituras em 734nm.

- Determinação de atividade antioxidante total do Lipossomo

O Lipossomo contendo o extrato foi liofilizado, e posteriormente pesado 10 mg de amostra e dissolvidos em balão volumétrico de 10 mL com álcool metílico. A

partir desta amostra estoque foram feitos doze pontos numa curva de calibração, conforme a tabela abaixo.

Tabela 3. Curva de determinação da atividade antioxidante do lipossomo por ABTS.

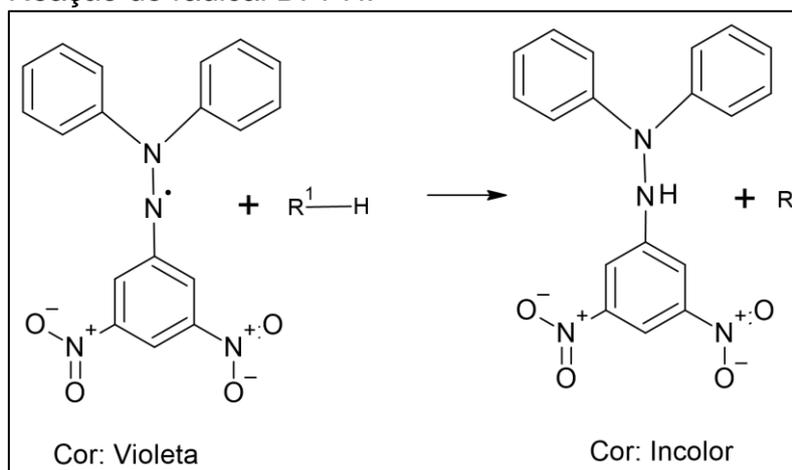
Ponto	Amostra (μL)	Etanol (μL)
1	1500	0
2	1350	150
3	1200	300
4	1050	450
5	900	600
6	750	750
7	600	900
8	450	1050
9	300	1200
10	150	1350
11	100	1400
12	50	1450

Utilizando os pontos da Tabela 3, foram pipetadas para uma placa de 96 poços com tampa, em triplicata, 200 μL de radical ABTS e 2 μL de cada ponto. Após cinco minutos da mistura, a placa foi levada à leitora de placas.

4.2.14. Determinação de atividade antioxidante total do radical livre DPPH

A molécula de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) é conhecida por ser um radical estável devido a deslocalização das ligações π dos anéis aromáticos juntamente ao par de elétrons livres do nitrogênio. Esta deslocalização confere uma coloração violeta, característica de uma banda no comprimento de 515 nm quando a mesma está solubilizada em solução alcóolica de metanol (Harb *et al.*, 2016).

Figura 16 - Reação do radical DPPH.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software ChemSketch.

Este método é baseado na capacidade do reagente antioxidante de doar átomos de hidrogênio e reduzir o radical a hidrazina. A redução do radical faz com que a cor violeta vire amarela pálida ou incolor. Este é o método ideal para medição de flavonoides e terpenoides (Alves *et al.*, 2010).

- Preparo da solução estoque de DPPH

Foram diluídos 2,4 mg de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil em 100 mL de álcool metílico, em um balão volumétrico, para formar uma solução estoque de 60 μM . Depois, utilizando da solução estoque e fazendo diluições seriadas como na tabela abaixo, preparou-se soluções de 10 a 50 μM .

Tabela 4. Tabela da curva padrão de DPPH.

Solução de DPPH (mL)	Álcool metílico (mL)	Concentração final de DPPH (μM)
0	10	0
1,7	8,3	10
3,3	6,7	20
5,0	5,0	30
6,7	3,3	40
8,3	1,7	50
10	0	60

- Determinação da curva de DPPH

Em ambiente escuro, 4 mL de cada solução de DPPH foi transferido para cubeta de quartzo e levada para o espectrofotômetro de UV-VIS para leitura de absorbância em 515 nm de comprimento de onda, sendo utilizado álcool metílico como branco.

- Determinação da atividade antioxidante total

Em um ambiente escuro, adicionou-se 0,1 mL de cada diluição da amostra em 3,9 mL de radical DPPH a 60 μ M preparado anteriormente, homogeneizado e então levado ao espectrofotômetro de UV-VIS até que a leitura se estabilizasse. Foram preparados uma amostra de 1 mg / mL de extrato e 6,5 mg / mL de lipossomo, diluídas na proporção abaixo.

Tabela 5. Curva de determinação da amostra.

Amostra (mL)	Metanol (mL)
0,5	9,5
2,5	7,5
5,0	5,0
7,5	2,5
10	0

4.3. Softwares

- OriginPro 8.5
- Office 2016
- ImageJ
- ChemSketch
- Gatan
- Witec

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese do lipossomo

Para preparação do lipossoma foi utilizado o método descrito no tópico 4.3.2. Nas sínteses em que não há presença de extrato aquoso, foi utilizado apenas água ultrapura. A fim de investigar o efeito da alteração do parâmetro de agitação e presença do extrato na formulação do lipossoma, o seguinte desenho experimental foi feito.

Tabela 6. Esquema de síntese dos lipossomos.

	3000 RPM	9000 RPM	15000 RPM
Sem extrato	1°	2°	3°
Com extrato	4°	5°	6°

Com este desenho experimental, contendo seis sínteses, gostaríamos de visualizar se o aumento da agitação formaria lipossomos menores e se a presença ou não do extrato alteraria os parâmetros de tamanho.

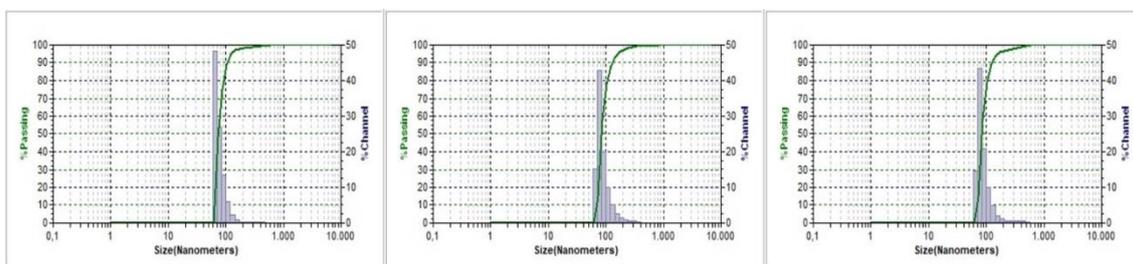
5.2. Espalhamento dinâmico da luz (DLS)

Padronizou-se que antes da primeira leitura, e após a leitura de cada amostra, a cuba de leitura seria lavada cinco vezes com água destilada e uma vez com álcool 70% (V/V). O resultado gerado pelo equipamento é um histograma de dispersão de população, onde é computado o número de partículas presentes em determinadas faixas de tamanho de diâmetro estipuladas. As leituras da primeira à sexta síntese foram feitas em triplicatas e os resultados encontram-se abaixo nas Figuras 17,18,19,20,21 e 22 respectivamente, e as faixas de população nas Tabelas 7,8,9,10,11 e 12 respectivamente.

Para a 1° síntese percebeu-se que as três leituras foram muito próximas umas das outras. Os diâmetros médios das populações foram respectivamente: 99,30; 98,30; e 85,20 nm. Quando observamos os picos, que representam a moda amostral, ou seja, faixa de tamanho onde está inserida a maior

quantidade de partículas, temos: 83,10; 83,10; e 72,90 nm respectivamente. Quando observamos a largura da banda de dispersão, conseguimos analisar outro parâmetro que é se a amostra está monodispersa ou polidispersa. Quanto maior for a largura, maior é a quantidade de faixa de tamanhos em que as partículas se encontram, então maior é a diferença entre os particulados da mesma síntese. As larguras das bandas a meia altura são respectivamente: 37,30; 39,10; e 29,92.

Figura 17 - Histograma da primeira síntese (3000 rpm, sem extrato) que representa o diâmetro da população.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

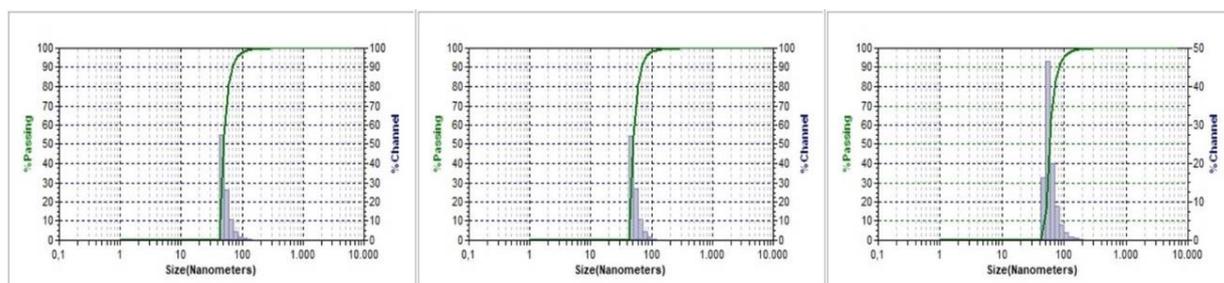
Tabela 7. Distribuição de tamanho da primeira síntese (3000 rpm, sem extrato).

Faixa de tamanho (nm)	% Partículas	% Partículas	% Partículas
1156	0,01	0,09	0,02
972,0	0,02	0,09	0,01
818,0	0,07	0,07	0,02
687,0	0,14	0,05	0,04
578,0	0,32	0,07	0,14
486,0	0,48	0,12	0,29
409,0	0,60	0,28	0,41
344,0	0,51	0,43	0,30
289,0	0,44	0,59	0,20
243,0	0,58	0,90	0,21
204,4	1,02	1,47	0,36
171,9	2,11	2,64	0,87

144,5	4,72	5,09	2,39
121,5	10,10	10,07	6,05
102,2	20,79	20,07	13,50
85,90	43,39	42,88	26,83
72,30	14,67	15,02	48,28

Para a 2ª síntese percebeu-se que as três leituras foram muito próximas umas das outras. Os diâmetros médios das populações foram respectivamente: 56,18; 64,70; e 55,70 nm. Quando observamos os picos, temos: 50,40; 57,80; e 50,40 nm respectivamente. Quando observamos a largura da banda a meia altura de dispersão temos respectivamente: 17,37; 22,55; e 17,17.

Figura 18 - Histograma da segunda síntese (9000 rpm, sem extrato) que representa o diâmetro da população.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

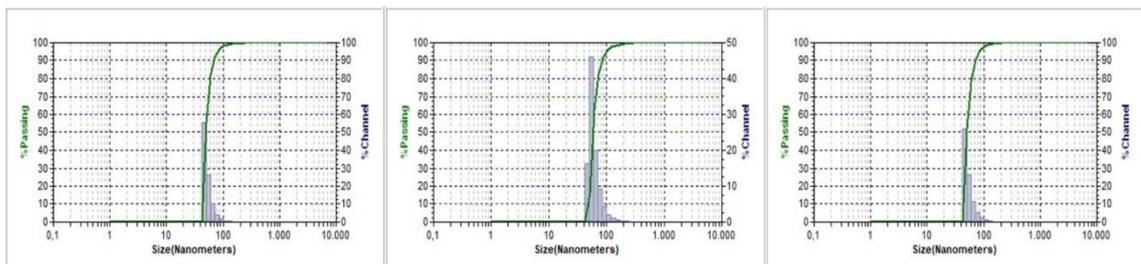
Tabela 8. Distribuição de tamanho da segunda síntese (9000 rpm, sem extrato).

Faixa de tamanho (nm)	% Partículas	% Partículas	% Partículas
818,0	0,01	0,01	0,00
687,0	0,01	0,03	0,00
578,0	0,03	0,05	0,01
486,0	0,05	0,06	0,03
409,0	0,08	0,06	0,08
344,0	0,07	0,06	0,10

289,0	0,06	0,07	0,08
243,0	0,06	0,12	0,08
204,4	0,10	0,23	0,08
171,9	0,19	0,47	0,13
144,5	0,43	0,96	0,28
121,5	0,94	1,95	0,70
102,2	1,99	4,13	1,79
85,90	4,40	8,91	4,47
72,30	10,61	19,96	11,00
60,80	26,32	46,66	26,60
51,10	54,65	16,26	54,57

Para a 3ª síntese notou-se que as três leituras foram muito próximas umas das outras. Os diâmetros médios das populações foram respectivamente: 55,90; 65,10; 56,90 nm. Quando observamos os picos, temos: 50,30; 57,90; 50,80 nm respectivamente. Quando observamos a largura da banda de dispersão temos respectivamente: 17,00; 23,19; 19,15.

Figura 19 - Histograma da terceira síntese (15000 rpm, sem extrato) que representa o diâmetro da população.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

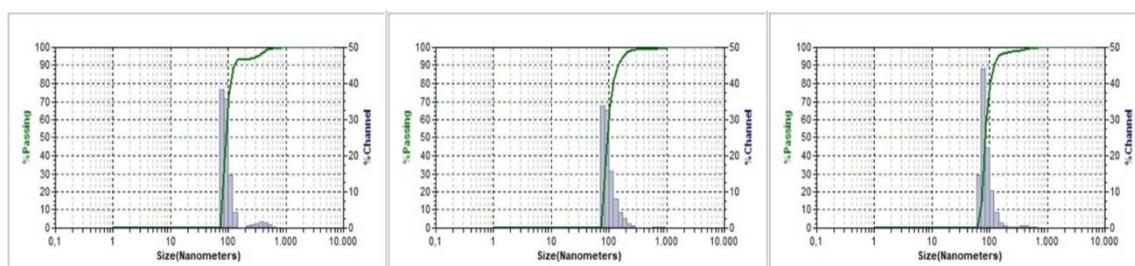
Tabela 9. Distribuição de tamanho da terceira síntese (15000 rpm, sem extrato).

Faixa de tamanho (nm)	% Partículas	% Partículas	% Partículas
818,0	0,00	0,01	0,00
687,0	0,00	0,01	0,01
578,0	0,01	0,01	0,02
486,0	0,02	0,02	0,04
409,0	0,06	0,04	0,06
344,0	0,09	0,07	0,05
289,0	0,09	0,12	0,04
243,0	0,10	0,22	0,06
204,4	0,13	0,37	0,10
171,9	0,21	0,60	0,23
144,5	0,40	1,04	0,52
121,5	0,83	1,99	1,17
102,2	1,81	4,17	2,46
85,90	4,22	9,00	5,16
72,30	10,47	19,98	11,55
60,80	26,29	46,07	26,43
51,10	55,27	16,23	52,10

Percebeu-se a partir das sínteses sem extrato, onde houve apenas alteração da agitação do sistema, que quando aumentamos a agitação de 3000 rpm para 9000 rpm, obtivemos menor diâmetro médio das partículas do coloide, o pico foi deslocado para esquerda e diminuiu a largura de banda a meia altura do histograma. Isto pode ser interpretado como quanto maior a agitação do sistema, menor é o tamanho da população das partículas e mais monodispersas o coloide é. Porém não foi observado o mesmo fenômeno no aumento de 9000 rpm para 15000 rpm, levando a entender que o efeito da velocidade sobre a diminuição da partículas se estabiliza em determinada velocidade máxima. Agora observamos se o mesmo fenômeno ocorre nas sínteses com extrato.

Para a 4ª síntese notou-se que as três leituras foram próximas, porém se diferem mais que as outras leituras até agora. Os diâmetros médios das populações foram respectivamente: 116,00; 110,70; e 98,40 nm. Quando observamos os picos, temos: 89,00; 92,70; e 82,60 nm respectivamente. Quando observamos a largura da banda de dispersão temos respectivamente: 27,62; 44,20; e 31,20. Para os três gráficos temos também uma segunda banda à direita sinalizando o efeito de agregação dos lipossomos, formando lipossomos maiores.

Figura 20 - Histograma da quarta síntese (3000 rpm, com extrato) que representa o diâmetro da população.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

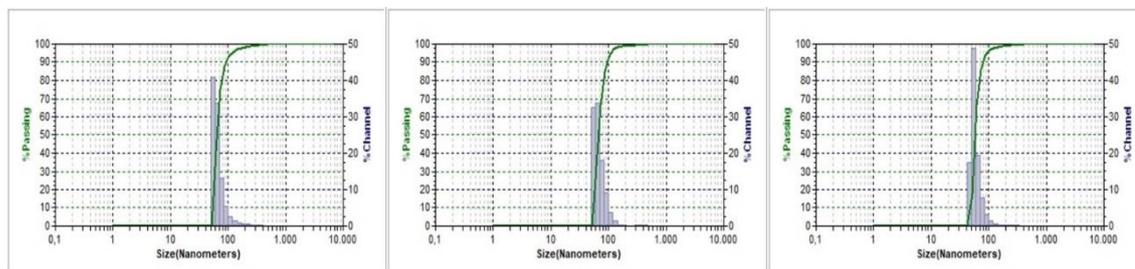
Tabela 10. Distribuição de tamanho da quarta síntese (3000 rpm, com extrato).

Faixa de tamanho (nm)	% Partículas	% Partículas	% Partículas
1156	0,04	0,09	0,02
972,0	0,05	0,24	0,03
818,0	0,11	0,34	0,09
687,0	0,26	0,24	0,18
578,0	0,74	0,14	0,37
486,0	1,34	0,00	0,49
409,0	1,71	0,00	0,50
344,0	1,22	0,11	0,33
289,0	0,74	0,58	0,24
243,0	0,66	1,24	0,29
204,4	0,00	2,43	0,58

171,9	0,00	4,39	1,52
144,5	4,41	8,07	4,20
121,5	14,62	15,74	10,34
102,2	35,61	32,63	22,20
85,90	38,33	33,72	43,97
72,30	0,00	0,00	14,57

Para a 5ª síntese percebeu-se que as três leituras foram muito próximas umas das outras. Os diâmetros médios das populações foram respectivamente: 73,60; 74,40; e 64,00 nm. Quando observamos os picos, temos: 63,20; 66,10; e 57,20 nm respectivamente. Quando observamos a largura da banda de dispersão temos respectivamente: 24,86; 29,19; e 19,64.

Figura 21 - Histograma da quinta síntese (9000 rpm, com extrato) que representa o diâmetro da população.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

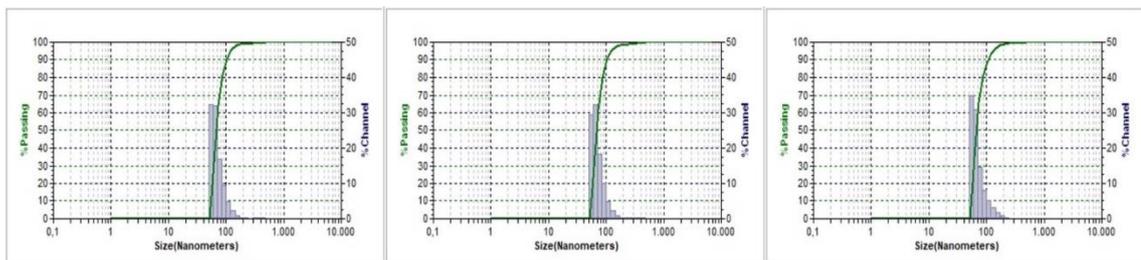
Tabela 11. Distribuição de tamanho da quinta síntese (9000 rpm, com extrato).

Faixa de tamanho (nm)	% Partículas	% Partículas	% Partículas
818,0	0,02	0,01	0,01
687,0	0,02	0,02	0,01
578,0	0,04	0,07	0,02
486,0	0,10	0,17	0,06
409,0	0,24	0,25	0,14
344,0	0,34	0,18	0,19

289,0	0,37	0,10	0,20
243,0	0,45	0,09	0,21
204,4	0,56	0,15	0,25
171,9	0,80	0,40	0,35
144,5	1,33	1,30	0,61
121,5	2,53	3,82	1,29
102,2	5,49	9,07	3,05
85,90	13,00	17,99	7,66
72,30	33,70	33,76	19,42
60,80	40,90	32,56	48,96
51,10	0,00	0,00	17,51

Para a 6° síntese notou-se que as três leituras foram muito próximas umas das outras. Os diâmetros médios das populações foram respectivamente: 76,40; 78,20; e 76,80 nm. Quando observamos os picos, temos: 66,50; 67,60; e 65,60 nm respectivamente. Quando observamos a largura da banda de dispersão temos respectivamente: 33,50; 34,20; 36,10.

Figura 22 - Histograma da sexta síntese (15000 rpm, com extrato) que representa o diâmetro da população.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

Tabela 12. Distribuição de tamanho da sexta síntese (15000 rpm, com extrato).

Faixa de tamanho (nm)	% Partículas	% Partículas	% Partículas
972,0	0,01	0,01	0,02
818,0	0,02	0,01	0,05
687,0	0,04	0,03	0,09
578,0	0,11	0,11	0,11
486,0	0,20	0,25	0,10
409,0	0,23	0,36	0,08
344,0	0,15	0,26	0,07
289,0	0,11	0,19	0,10
243,0	0,15	0,23	0,26
204,4	0,33	0,42	0,72
171,9	0,89	0,94	1,71
144,5	2,30	2,23	3,20
121,5	4,98	4,93	5,08
102,2	9,44	10,01	8,08
85,90	16,87	18,36	14,47
72,30	31,88	32,22	30,97
60,80	32,25	29,42	34,88

Analisando as sínteses 4, 5 e 6 onde ocorre a formação do lipossoma com extrato aquoso, percebemos a mesma tendência, quanto maior a agitação do sistema, mais monodispersas são as partículas e menor é a população de particulado. Em ambos os casos a síntese de 9000 rpm para a síntese de 15000 rpm não tiveram diferença significativa no tamanho das partículas, porém em ambas as sínteses de 15000 rpm os dados foram mais próximos das três leituras e por isto serão utilizadas como melhor rota sintética.

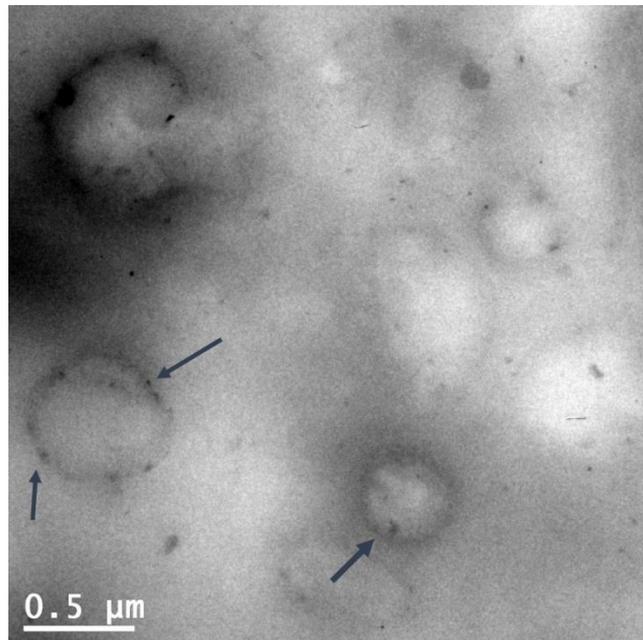
Quando comparamos a mesma taxa de agitação das sínteses sem extrato e com extrato, percebemos que as sínteses com extrato têm particulados maiores que suas contrapartes sem extrato, este é o primeiro indício encontrado que a formulação do lipossoma foi efetiva em encapsular o extrato dentro dos lipossomos.

5.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia de transmissão foi utilizada para conseguir parâmetros visuais do tamanho, forma e composição dos lipossomos. Para decidir qual método de contrastação é o mais apropriado, as imagens foram feitas da mesma rota sintética (6^o síntese). Percebe-se pelas imagens a seguir que é difícil a diferenciação do fundo da imagem com os lipossomos, por isto é necessário a contrastação das mesmas. Os contrastantes são moléculas com alta densidade e estarão presentes nas membranas das vesículas, como podemos observar na Figura 23. A concentração do contrastante é importante, pois o excesso acarreta em artefatos espalhados pelo grid como podemos ver nas imagens abaixo (Figura 23, 24, 25, 27 e 28).

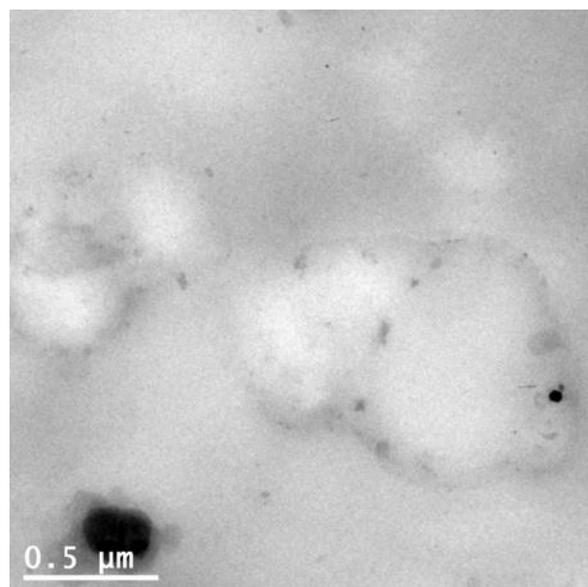
O método de microscopia de transmissão não é o método ideal para visualização de lipossomos, pois para o utilizarmos, a amostra necessariamente não pode conter água. Como o formato e tamanho dos lipossomos estão ligados com a camada de solvatação de água que está interagindo com a membrana, quando a amostra é seca, os lipossomos podem se aglomerar formando lipossomos maiores ou perder sua forma circular, como podemos ver na Figura 24.

Figura 23 - Contrastação com ácido fosfotúngstico, onde as setas destacam os particulados do contrastante.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento (Gatan).

Figura 24 - Contrastação com ácido fosfotúngstico, onde há a aglomeração de vesículas.

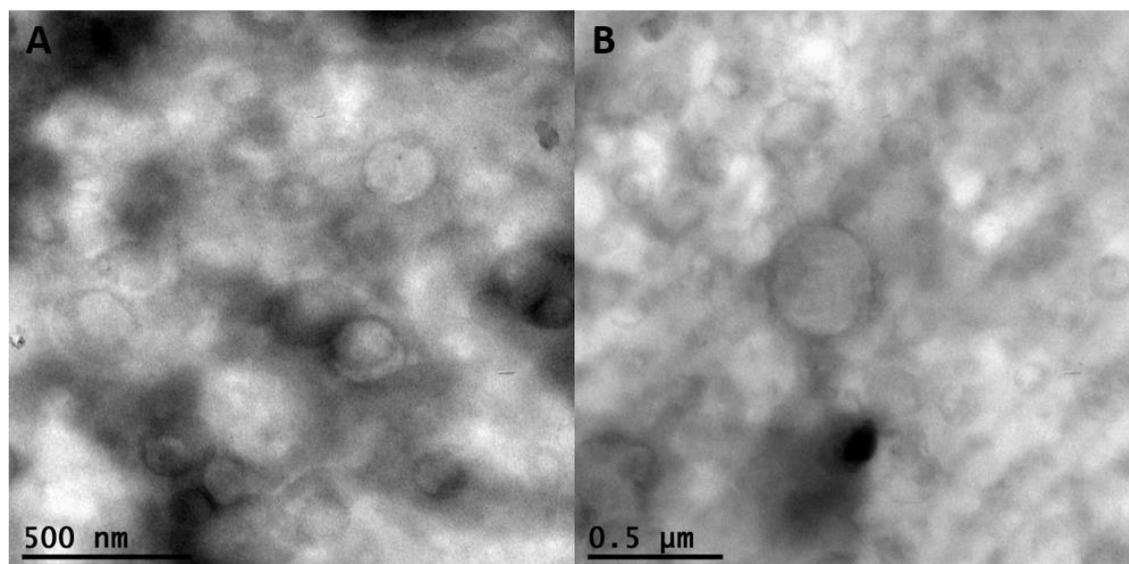


Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento (Gatan).

O método de contrastação com ácido fosfotúngstico é uma contrastação negativa, onde ocorre uma deposição envolvendo a amostra pela atração eletrostática de cargas (Muniz, Azeredo e Rosa, 2019). Por ser muito eletrodenso, ele irá se depositar na camada lipídica, onde a molécula de fosfocolina (Figura 7) possui uma amina quaternária altamente positiva e está exposta para o exterior da vesícula.

O método de contrastação com acetato de uranila ocorre através da ligação da molécula com o grupo fosfato da cabeça dos fosfolipídeos (Fujimoto *et al.*, 2013). A ligação acontecerá com o grupamento fosfato da fosfocolina exposta. Além disso, alguns trabalhos utilizam o acetato de uranila como fixante do lipossoma, pois ele ajuda a reter o colesterol das membranas (Fujimoto *et al.*, 2013).

Figura 25 - Contrastração com acetato de uranila, onde a imagem A e a imagem B são duas áreas diferentes da mesma amostra.

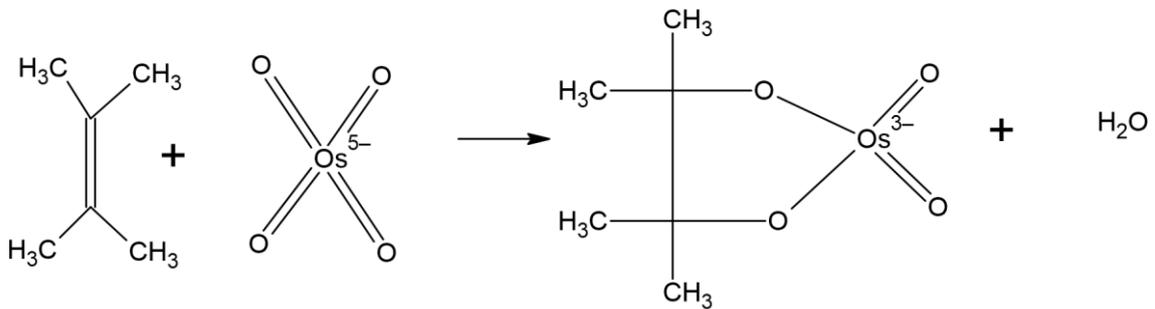


Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento (Gatan).

O método de contrastação por tetróxido de ósmio consiste na reação com a instauração dos lipídeos. O tetróxido de ósmio é muito reativo e possui quatro ligações duplas com oxigênios. Uma dupla de oxigênios ataca uma ligação

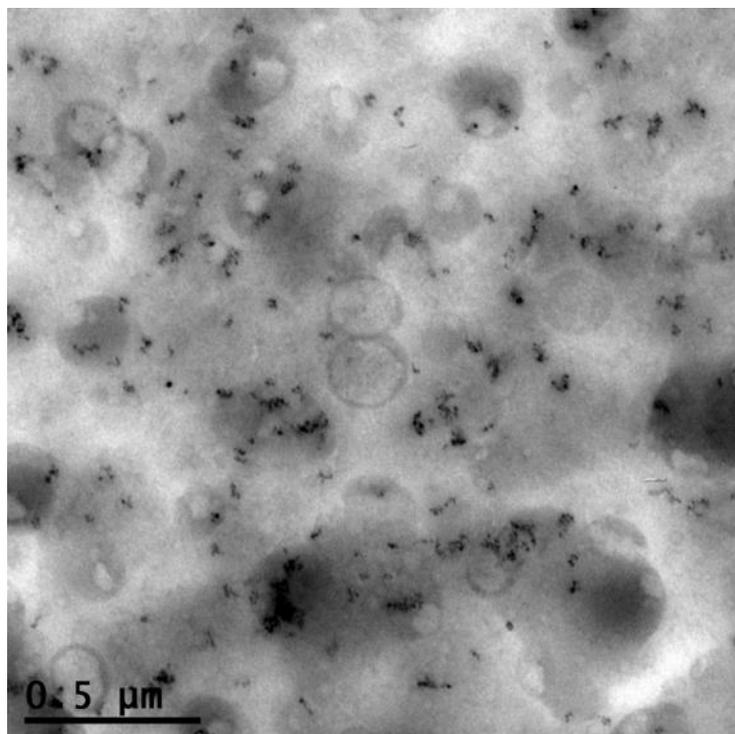
dupla de um ácido graxo insaturado da membrana lipídica, enquanto a outra dupla de oxigênios ataca uma outra ligação dupla (Bozzola, Jhon J.; Russel, Lonnie D., 1999). O tetróxido de ósmio constrói uma ponte entre os ácidos graxos, conferindo resistência a membrana, e por isso é utilizado como pós-fixador de membranas celulares.

Figura 26 - Reação de oxidação de alcenos por tetróxido de ósmio.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

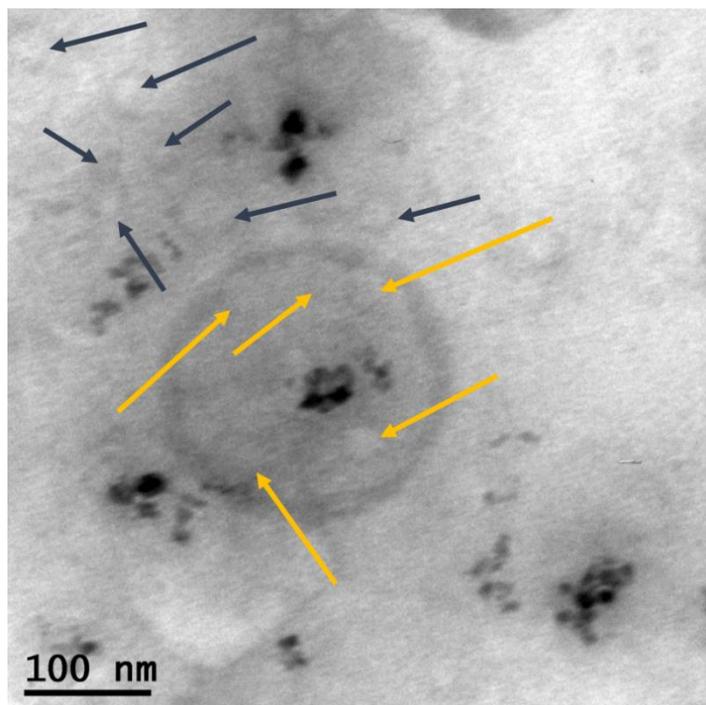
Figura 27 - Contrastação com tetróxido de ósmio.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento (Gatan).

Podemos observar na Figura 28, lipossomos onde aparentemente foram contrastados os cernes das vesículas. Possivelmente o contrastante penetrou nas vesículas e reagiu com as insaturações dos componentes que constituem o extrato.

Figura 28 – Contrastação com tetróxido de ósmio onde é possível observar lipossomo multilamelar.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento (Gatan).

Pelas imagens adquiridas dos três métodos, percebemos lipossomos de diferentes tamanhos, alguns maiores do que as medidas esperadas pelo DLS. Na Figura 28, percebemos nas setas azuis lipossomos menores, com tamanhos próximos ao esperado, enquanto nas setas amarelas podemos perceber vesículas contidas na vesícula maior, expondo um sistema multilamelar.

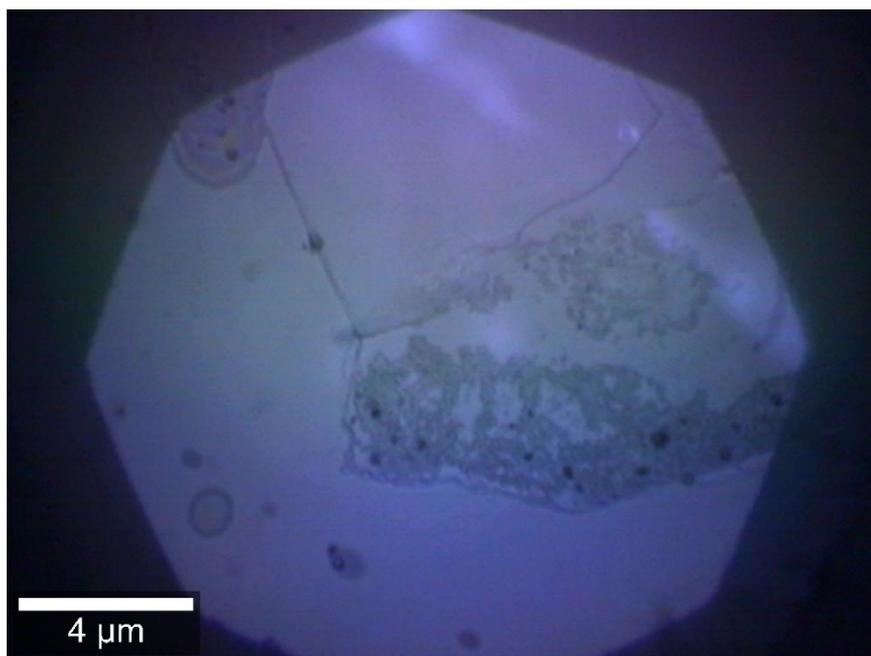
A polidispersão das amostras se deve em parte a secagem da amostra para MET, que força a anexação das partículas. Porém outra contribuição é a idade da solução sintetizada. Após um certo período de tempo, os lipossomos

tendem a se aglomerar naturalmente e a formar lipossomos maiores e multilamelares. Concluímos que a estabilização dos lipossomos é dependente do tempo.

5.4. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica foi realizada para estudar melhor a amostra, uma vez que a análise pôde ser realizada com a mesma em estado líquido. Continuando com a análise da 6^o síntese, uma gota foi pipetada sobre a superfície de uma mica recém-clivada e em seguida espalhada pela superfície de uma segunda mica.

Figura 29 – Microscopia ótica indicando a área a ser analisada pela AFM.



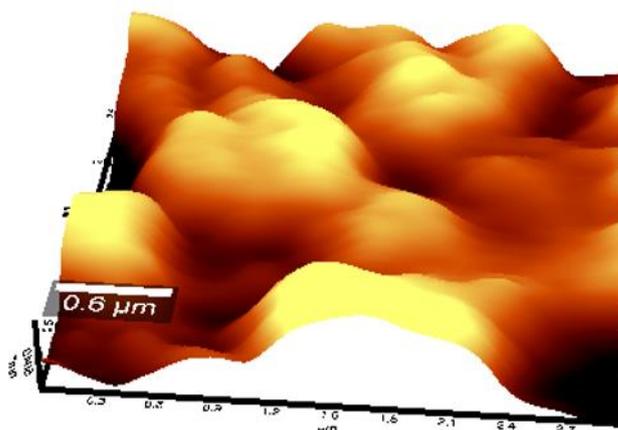
Fonte: Elaborada pelo próprio autor através da câmera do microscópio ótico.

Com os dados de imagens de microscopia de transmissão já havíamos percebido o crescimento das vesículas do lipossoma. Sebinelli (2016) diz que quando comparamos análises de DLS com a força atômica “A pequena diferença de tamanhos encontrada pode ser atribuída à etapa de fixação dos

lipossomos sobre a mica que pode ampliar o tamanho das vesículas e até mudar seu formato devido a sua deposição sobre uma superfície”. Este fato, somado ao envelhecimento das amostras nos faz esperar que os lipossomos fossem de tamanhos maiores do que esperado.

Na Figura 30 foi feita uma imagem de topográfica $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$, onde podemos ver pela topografia que as vesículas não são esferas regulares. O fato de não estarem muito redondas pode ser explicado pela deformação explicada acima. Além disso, supomos que há vesículas aglomeradas uma em cima das outras.

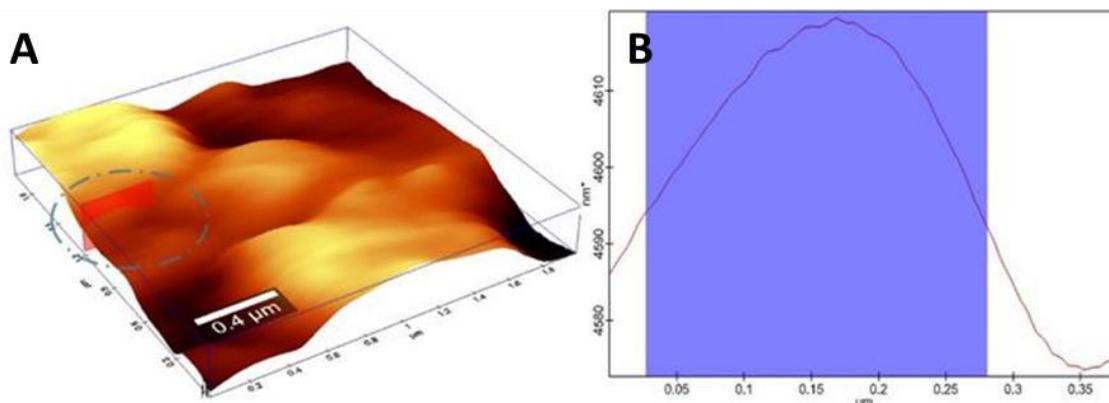
Figura 30 - Imagem de topografia por AFM da sexta síntese (15000 rpm, com extrato).



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento (WITEC).

Assim, foi feito um corte transversal de uma vesícula da amostra que pode ser observado na Figura 31. A topografia e o corte transversal feito do lipossomo na área delimitada pelo tracejado está representado no gráfico ao lado. Pela suavização da curva, que demonstra uma baixa tremulação, percebemos que se trata de uma vesícula única de 250 nm de diâmetro aproximadamente. A amostra é muito maior do que a média dada pelo DLS de 77,13 nm de diâmetro.

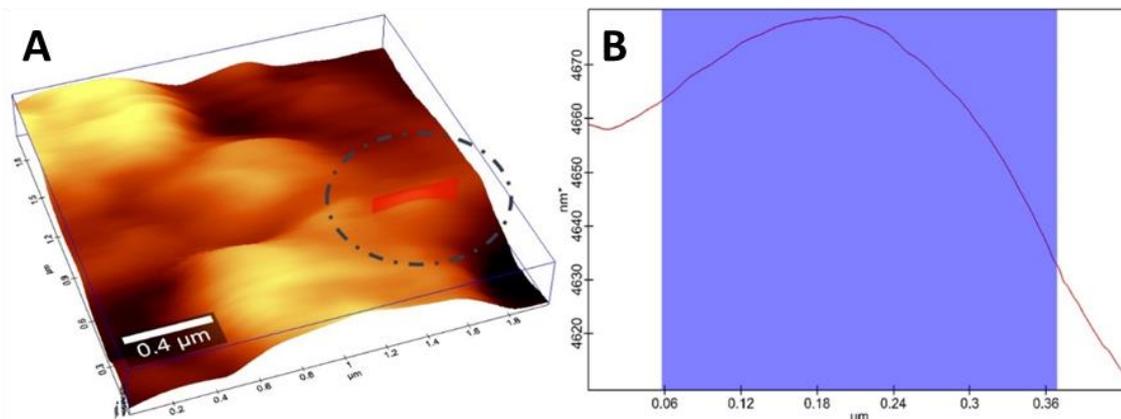
Figura 31 - Corte da seção transversal de uma vesícula da Figura 30 por AFM, onde A – Topografia da amostra, indicando a vesícula a ser tratado, B – Gráfico da seção transversal da vesícula indicado em A.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento (WITEC).

Fizemos então um corte transversal em outra vesícula da Figura 30, representado pela área tracejada da Figura 32, nos permite observar outro lipossomo. O gráfico ao lado demonstra outra curva muito suave, com baixa ondulação, o que comprova que provavelmente é apenas uma vesícula. O diâmetro estipulado pelo gráfico é de aproximadamente 300 nm. A literatura descreve que vesículas maiores que 100 nm provavelmente são vesículas multilamelares (Müller-Goymann, 2004), contribuindo para hipótese de agregação das mesmas.

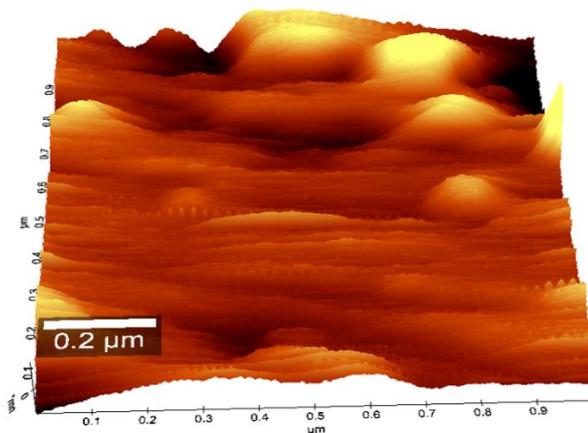
Figura 32 - Corte da seção transversal de outra vesícula da Figura 30 por AFM, onde A – Topografia da amostra, indicando a vesícula a ser tratada, B – Gráfico da seção transversal da vesícula indicada em A.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento (WITEC).

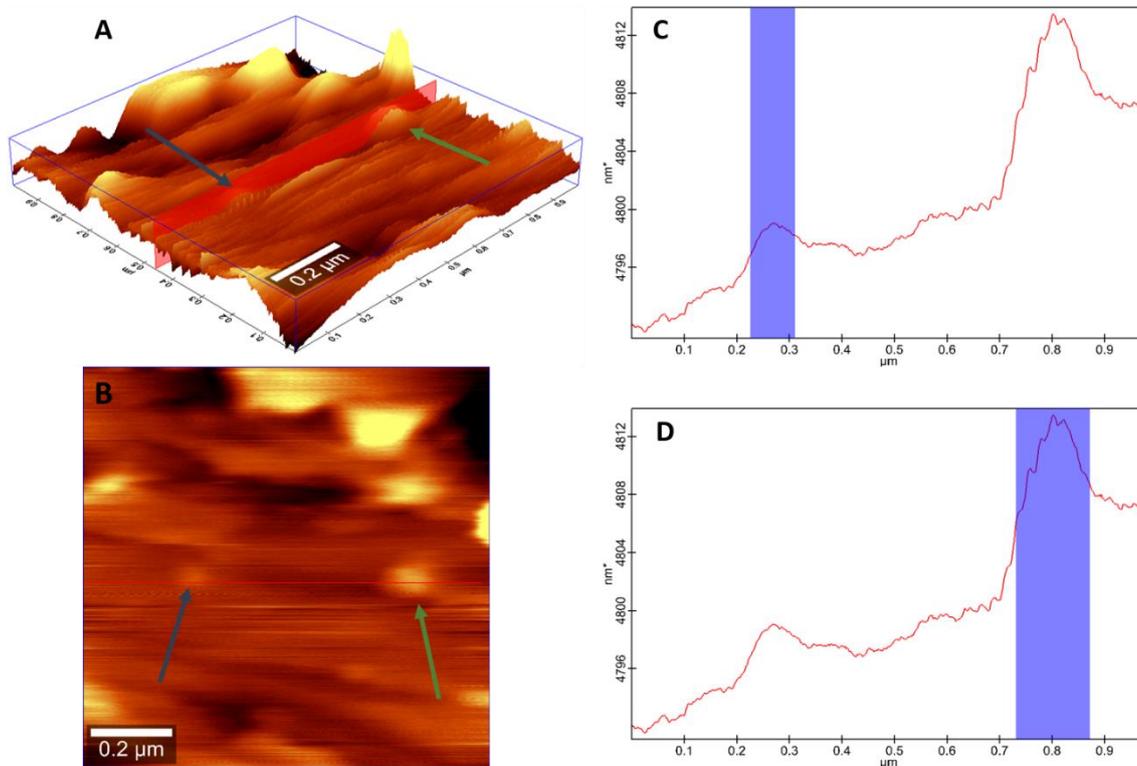
Também foi realizada a análise da 3ª síntese, que foi realizada com a mesma agitação, mas sem o extrato. Na Figura 33 temos a topografia de uma área $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$, nela observamos uma possível vesícula em condições boas para um corte transversal. Foi posteriormente feito um corte transversal atravessando duas vesículas dessa área, para termos os parâmetros de diâmetro da amostra (Figura 34).

Figura 33 – Aspecto geral da topografia por AFM da terceira síntese (15000 rpm, sem extrato).



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento (WITEC).

Figura 34 – Topografia de uma seção da Figura 33, onde A – Imagem da topografia, indicando a vesícula a ser tratado em C e D, B – 3D com setas indicando as vesículas a ser tratadas em C e D, C – Gráfico da seção transversal da vesícula indicada pela seta azul e D – Gráfico seção transversal da vesícula indicada pela seta verde.

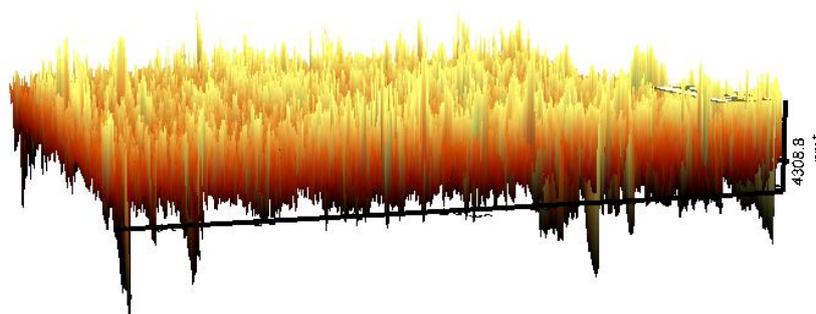


Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento (WITEC).

Na Figura 34, a seta azul corresponde a uma vesícula menor, e a seta verde a vesícula maior. Visualmente, a vesícula da seta azul é mais esférica que a da seta verde, devido a suavidade da curva. Através do gráfico da seção de corte C a vesícula tem cerca de 80 nm de diâmetro, enquanto o gráfico da seção de corte D tem cerca de 150 nm de diâmetro. Comparado com a média do DLS para esta síntese, que foi de 60,3 nm, a amostra sem extrato parece ter maior estabilidade que a amostra com extrato, pois a variação de tamanho foi menor.

Também foi realizado uma topografia da mica, para mostrar que a superfície não tem contribuição para a topografia da amostra. A variação de altura média (Figura 35) foi de 14 nm.

Figura 35 - Área de $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ da mica clivada.

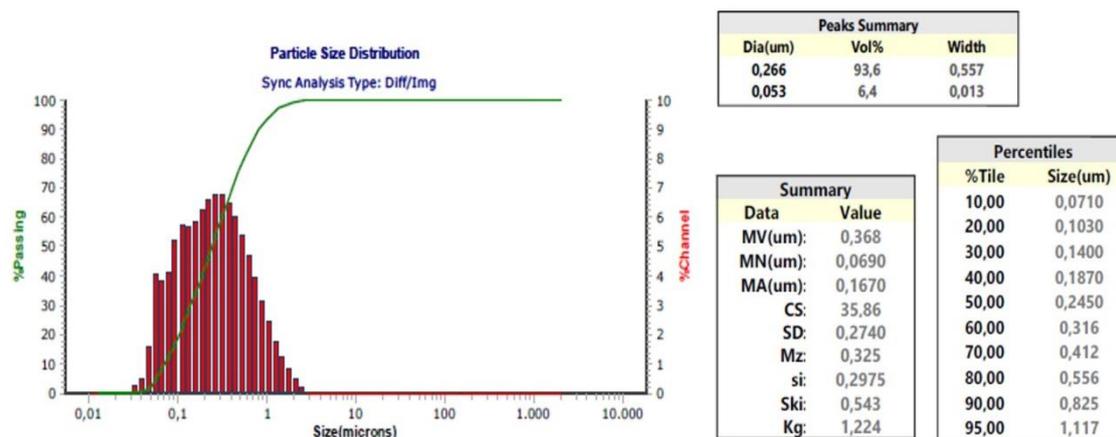


Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento (WITEC).

5.5. Espalhamento de luz com microimagem

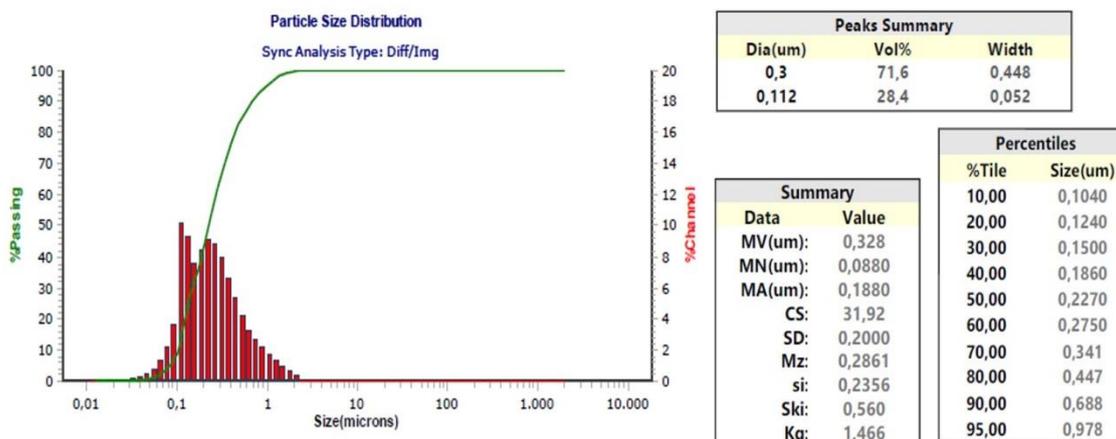
Para estudar os parâmetros de estabilidade dos lipossomos, foi feita uma nova análise de DLS quinze dias após a primeira, em um equipamento com sensibilidade para particulados na faixa de 2000μ até que $0,01\mu\text{m}$. O equipamento também é capaz de fazer imagem de particulados com tamanho maior que $3\mu\text{m}$.

Figura 36 - DLS da primeira síntese (3000 rpm, sem extrato).



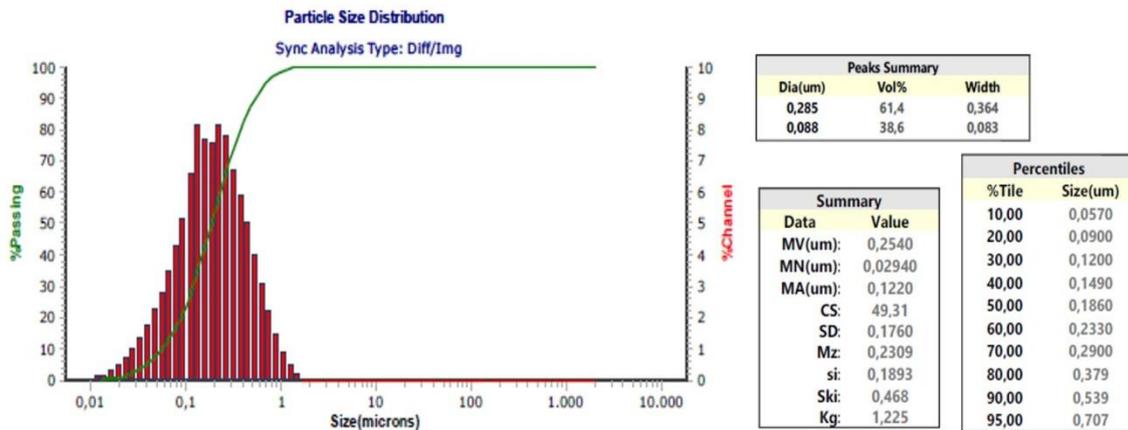
Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

Figura 37 - DLS da segunda síntese (9000 rpm, sem extrato).



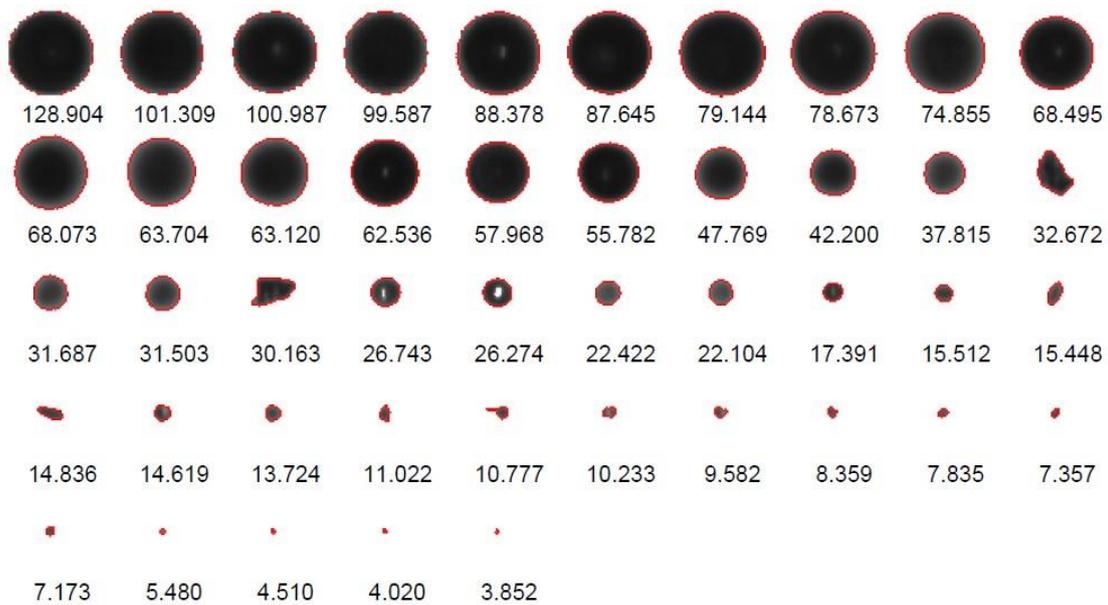
Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

Figura 38 - DLS da terceira síntese (15000 rpm, sem extrato).



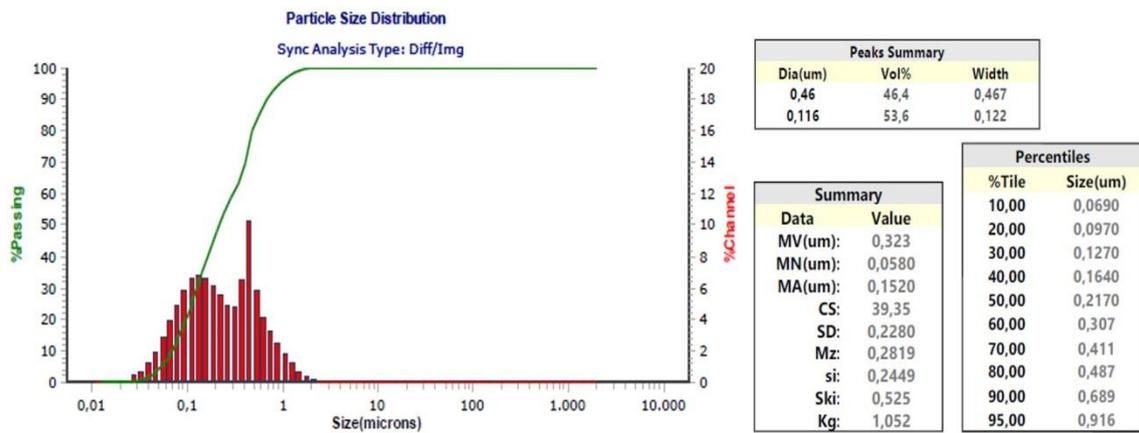
Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

Figura 39 - Imagem das partículas da terceira síntese (15000 rpm, sem extrato).



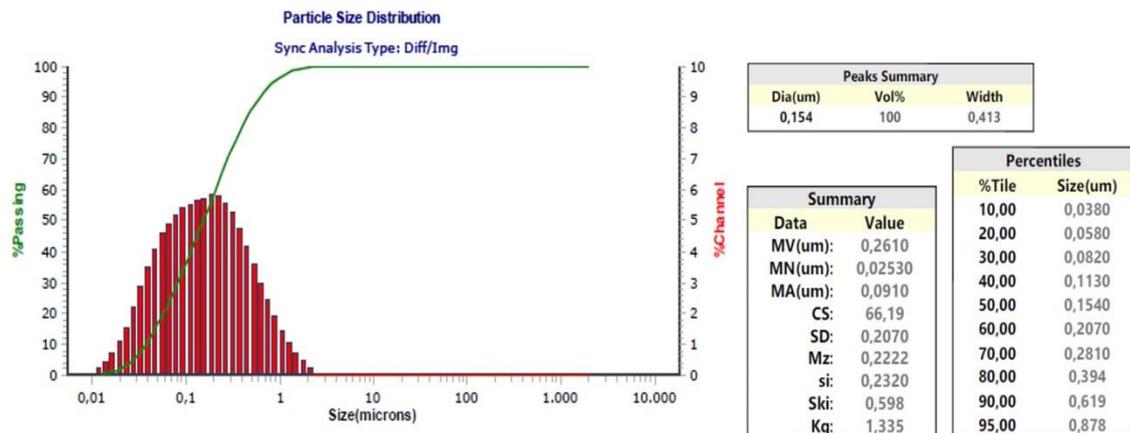
Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

Figura 40 - DLS da quarta síntese (3000 rpm, com extrato).



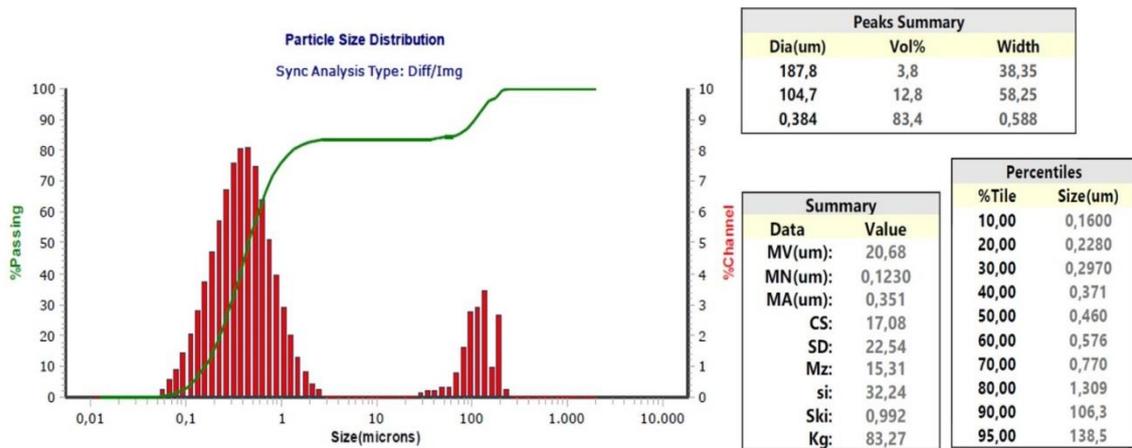
Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

Figura 41 - DLS da quinta síntese (9000 rpm, com extrato).



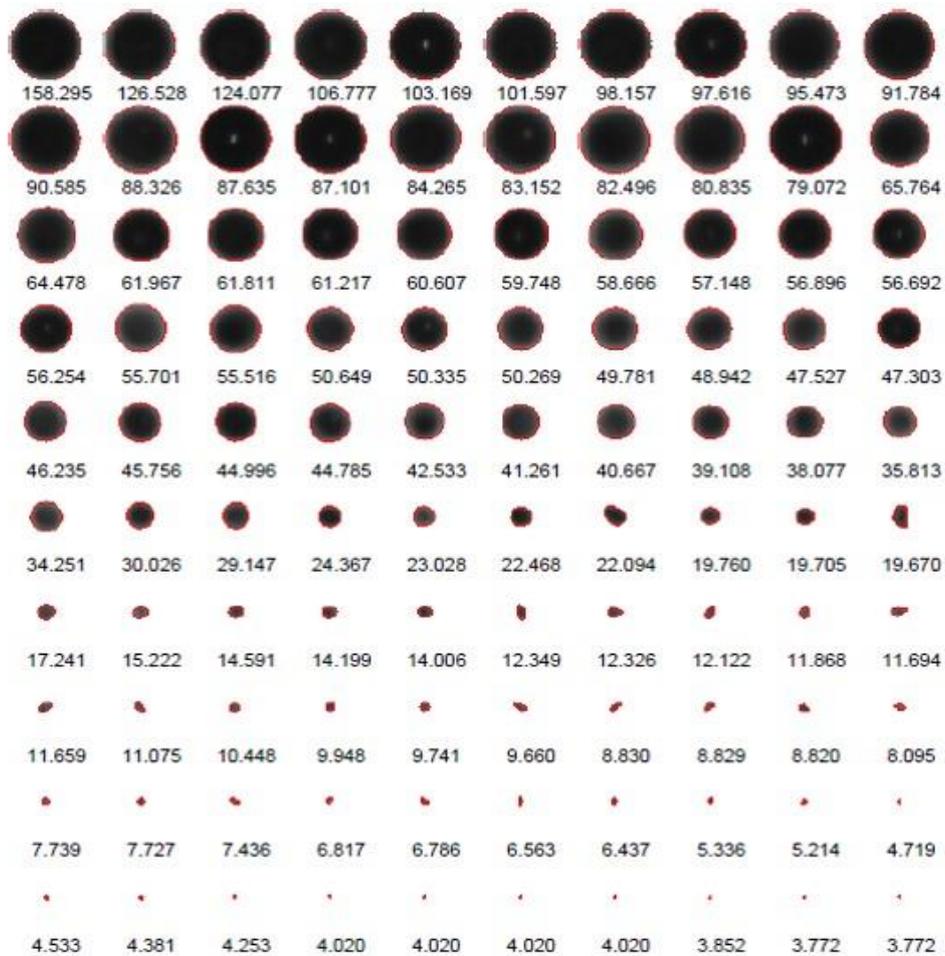
Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

Figura 42 - DLS da sexta síntese (15000 rpm, com extrato).



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

Figura 43 - Imagem das partículas da síntese 6 (15000 rpm, com extrato).



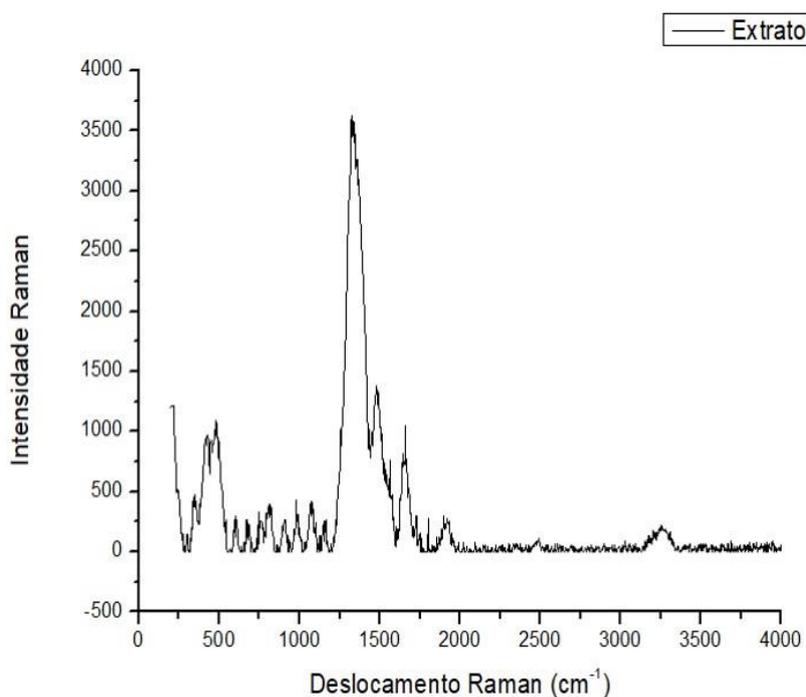
Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

Comparando todas as leituras feitas no décimo quinto dia com as leituras feitas no primeiro, percebeu-se que em todas a polidispersividade aumentou, os histogramas ficaram mais largos, com mais de um pico. O pico de todos os histogramas foi deslocado para a direita, sinalizando um aumento do tamanho das partículas. Um dado curioso é que as leituras parecem ter quantificado partículas pequenas que não apareciam na primeira leitura, o que fez algumas médias de diâmetro serem baixas. Uma possível explicação é que a sensibilidade do aparelho seja maior, captando populações menores que a primeira leitura no outro equipamento não havia captado. Outra hipótese é que como este aparelho dispersa a amostra em água e a bombeia, alguns lipossomos podem ter se fragmentado em vesículas menores. Independente da razão, percebemos uma falta de estabilidade ao longo do tempo, ocasionando em uma diferenciação maior nas partículas.

5.6. Espectroscopia de Raman

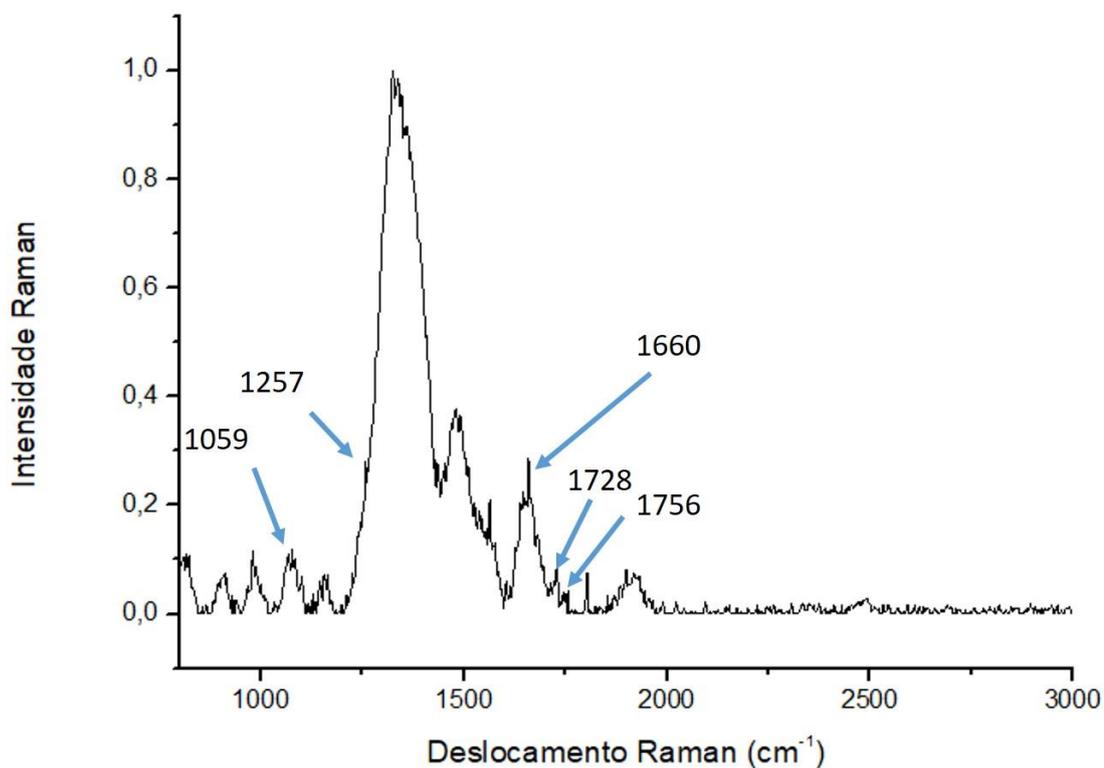
A amostra foi analisada em Raman para caracterizar o extrato e o lipossomo. O Raman do extrato, Figura 44 possui muitos picos, pois evidencia ligações intramoleculares de todos os compostos do extrato. Para poder comparar, iremos normalizar e suavizar os gráficos e evidenciar regiões de interesse.

Figura 44 - Raman: extrato de *Ilex guayusa*.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software OriginPro 8.5.

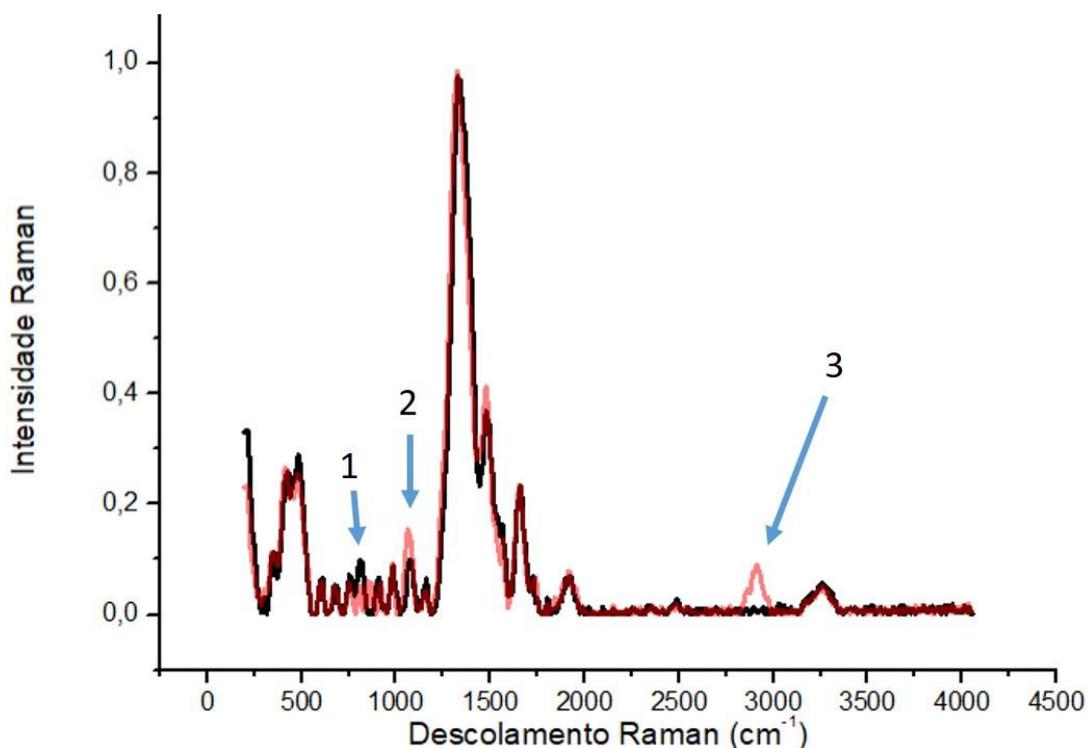
Figura 45 - Raman: Picos do extrato suavizados.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software OriginPro 8.5.

Pela Figura 45 podemos ver a presença de algumas ligações que indicam a presença dos compostos antioxidantes esperados. O pico em 1059 cm^{-1} indica a presença de álcool secundário cíclico, o pico em 1257 cm^{-1} indica a presença de fenol e o de 1756 cm^{-1} indica a presença de éster conjugado. A combinação dessas informações confirma a presença de ácido clorogênico (Figura 2). O pico de em 1660 cm^{-1} indica a presença de amida dissustituída e o pico em 1728 cm^{-1} à presença de imida cíclica, confirmando a presença de cafeína, teobromina e teofilina (Figura 3). Outros grupos de estruturas que englobam várias moléculas como flavonoides e taninos não podem ser identificados um a um, porém todos eles encaixam no grupo de polifenóis (Figura 2). O pico de 1257 cm^{-1} possui uma intensidade bem alta, indicando grande quantidade de ligações do tipo fenol (Paiva et al, 2015).

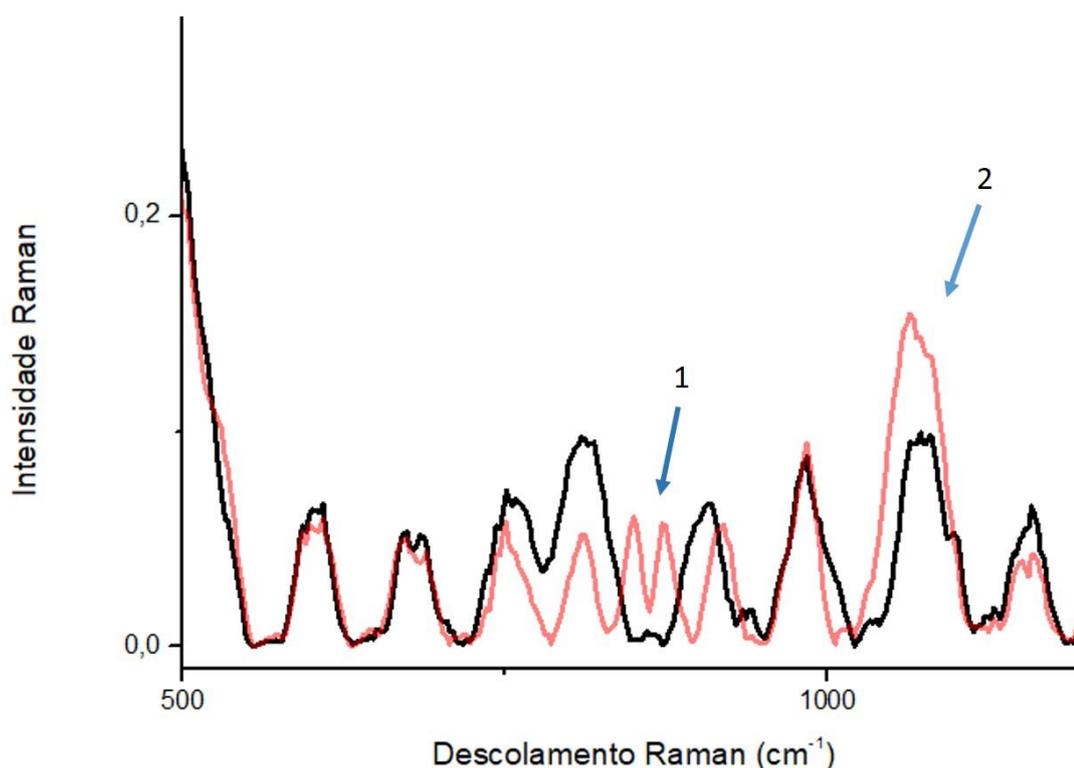
Figura 46 - Ramam: Comparação lipossomo com extrato (curvas suavizadas), onde a curva preta é referente ao extrato e a vermelha ao lipossomo.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software OriginPro 8.5.

Pela Figura 46 podemos ver três grandes diferenças no gráfico do lipossomo para o extrato. Na seta 3 vemos um pico existente apenas no lipossomo, na região de 2917 cm^{-1} , referente a ligações P-O-C₂H₅ que acreditasse ser referente a fosfocolina (Figura 7). Para analisar a seta 1 e 2 iremos ampliar o local, Figura 47. A seta 1 é referente a região com dois picos presentes apenas no lipossomo, um em 850 cm^{-1} que indica ligações P-O-CH₃ e 870 cm^{-1} que indica ligação P-O-C₂H₅, que confirmam a seta 3 (Paiva et al, 2015). A seta 2 é um pico em 1064 cm^{-1} , que indica álcool secundário cíclico. Este pico aparece para as duas curvas, mas é maior no lipossomo. O aumento deste pico implica em maior quantidade destas estruturas, devido ao colesterol (Figura 8) presente na membrana das vesículas.

Figura 47 - Aproximação da Figura 46.

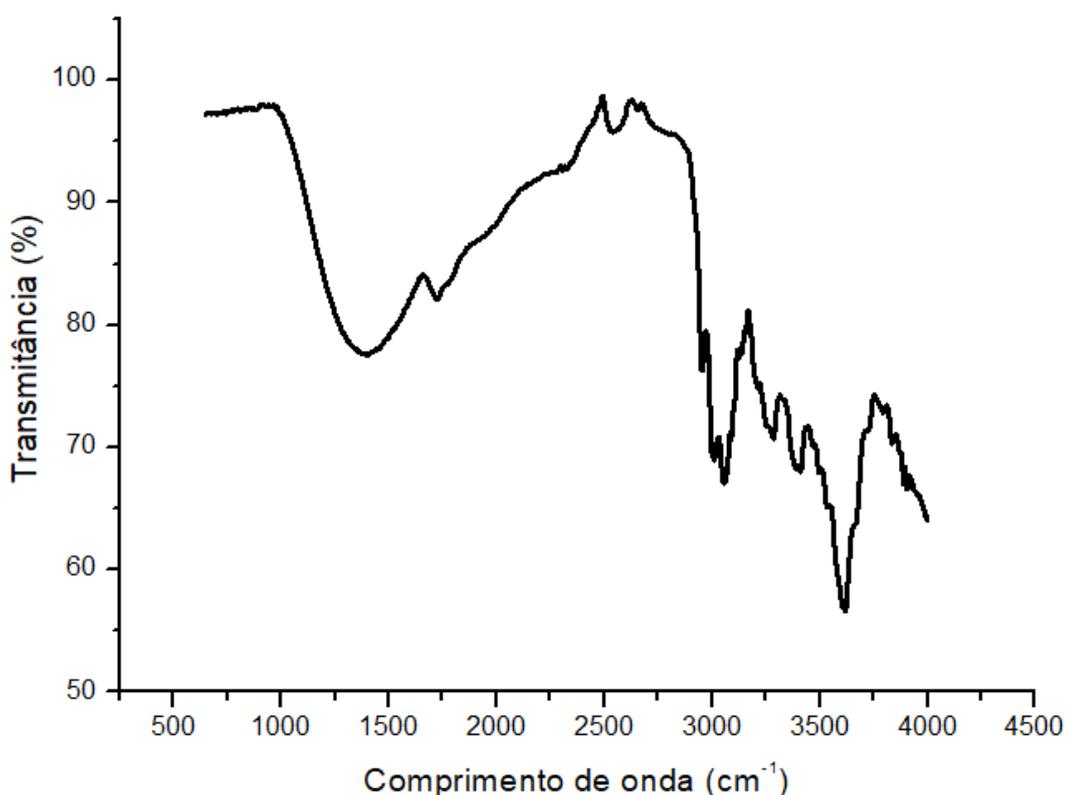


Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software OriginPro 8.5.

5.7. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IFTR)

Para refutar as informações obtidas através da caracterização por espectroscopia de Raman, foi feito o espectro de infravermelho com transformada de Fourier do extrato de guayusa. O espectro é plotado em transmitância versus comprimento de onda, onde quanto maior a energia de infravermelho absorvida por aquela ligação para realização de movimentos vibracionais, menor será a taxa de transmitância (Pavia *et al.*, 2015).

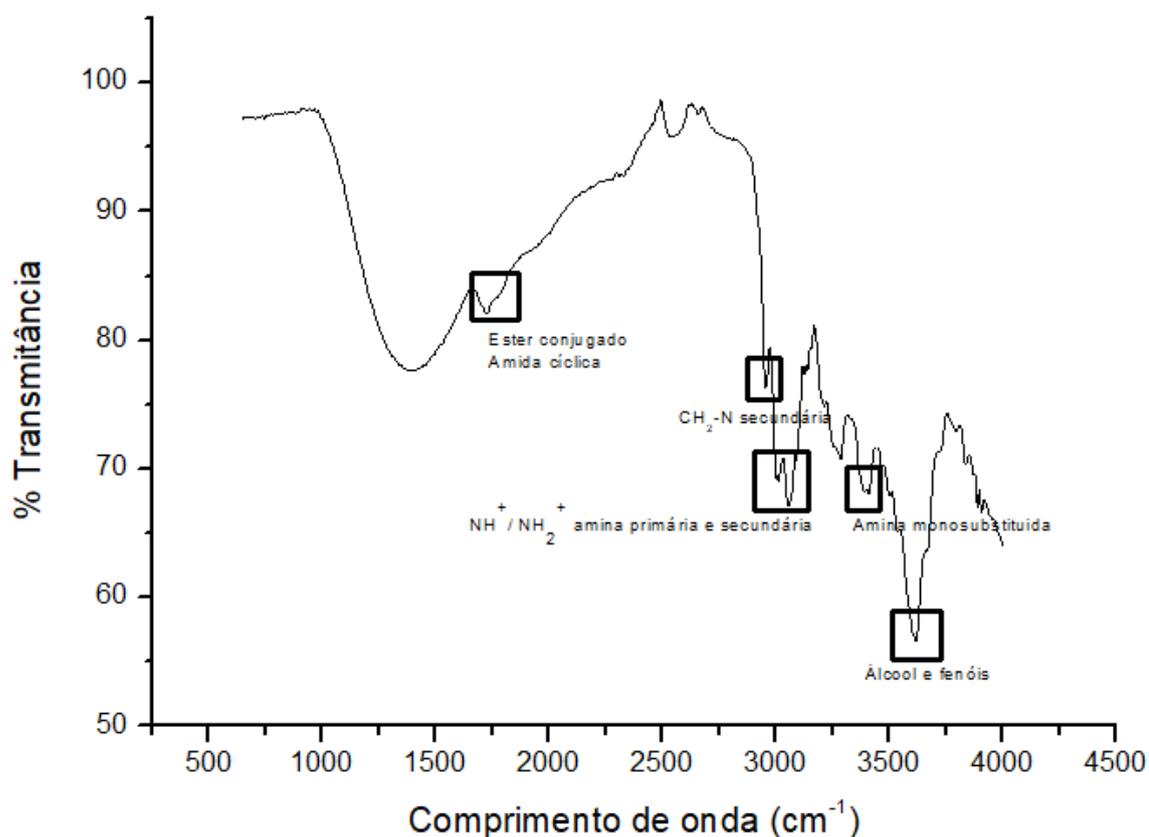
Figura 48 - Espectro de IFTR do extrato de *Ilex guayusa*.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software OriginPro 8.5.

Como o extrato orgânico de guayusa possui uma complexidade muito grande de moléculas e conseqüentemente um número muito grande de diferentes tipos de ligação, temos vários picos acontecendo ao mesmo tempo. Os picos com informações mais importantes iremos marcar no gráfico abaixo.

Figura 49 - Destaques para os picos de IFTR que representam ligações chave do extrato.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software OriginPro 8.5.

A primeira coisa que podemos perceber é que os picos importantes que trabalhamos no espectro de Raman, aqui estão todos aglomerados em uma única banda grande de 1000 a 1700 cm^{-1} aproximadamente. Mesmo que não seja possível distingui-los nesta banda, a menos que métodos de deconvolução sejam aplicados, podemos afirmar que estas interações estão presentes e refutam o que foi discutido no tópico anterior.

Além disso, iremos analisar outros picos que comprovam a presença das estruturas esperadas no extrato. O pico em 1726 cm^{-1} indica a presença de éster conjugado que é característico da estrutura de ácido clorogênico (Figura 2), além do pico em 3615 cm^{-1} característico de álcoois e fenóis; o pico 3036

cm^{-1} de estiramento de carbono secundário aromático (-CH=) e do pico em 2540 cm^{-1} característico de dímeros de ácido carboxílico.

A mesma banda que tem pico em 1726 cm^{-1} indica também a presença de amida e imida cíclicas, o que comprova a presença dos compostos cafeína, teobromina e teofilina (Figura 3). Outros picos importantes dessas estruturas são: 2956 cm^{-1} a presença de amina secundária; o pico 3036 cm^{-1} de estiramento de carbono secundário aromático (-CH=); 2540 cm^{-1} que são cátions de amina terciária (NH^+); e 3000 cm^{-1} que são cátions de amina secundária (NH_2^+).

A presença dos polifenóis característico dos flavonoides pode ser observado pela baixa transmitância da banda de álcoois e fenóis, sendo o grupo funcional mais presente no extrato.

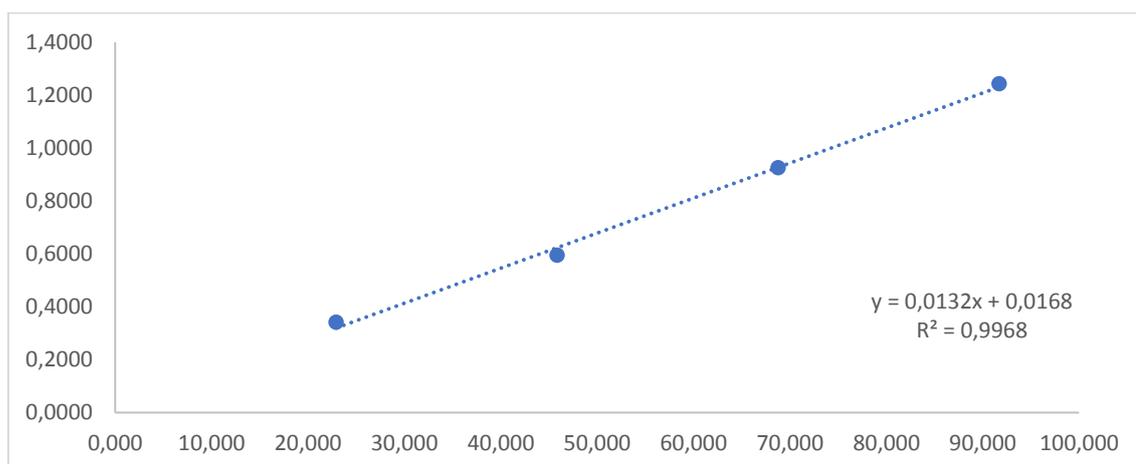
5.8. Determinação de polifenóis totais no extrato

Foi montada uma curva padrão de ácido gálico como referência de quantidade de fenóis e a mesma foi reagida com o reagente de Folin-Ciocalteu, a leitura desta interação se encontra na tabela abaixo.

Tabela 13. Curva padrão de ácido gálico.

Concentração de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância
22,93	0,341
45,86	0,594
68,80	0,925
91,73	1,243

Figura 50 - Gráfico da curva padrão de ácido gálico.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software Office 2016.

Da mesma forma, foram reagidas quantidades liofilizadas do extrato dissolvidos em metanol com o reagente de Folin-Ciocalteu e então lidos a UV-Vis.

Tabela 14. Curva analítica de extrato de guayusa.

Concentração de guayusa (mg/mL)	Absorbância	Concentração de ác. gálico (µg/mL)	Massa de ácido gálico/ 100g de extrato
0,9	0,678	47,41	4,78
1,5	1,000	71,75	5,27
3,0	2,287	169,31	5,64

Através da equação da reta da curva de ácido gálico, nós substituímos o valor de absorbância (Y) do extrato de guayusa e obtemos o equivalente da concentração de ácido gálico (X). Agora sabendo a quantidade de extrato em cada alíquota, calculamos o referente para 100 gramas de extrato.

Concluimos que a quantidade de componentes fenólicos no extrato é de 5,23 g GAE/100g de extrato.

5.9. Calorimetria (DSC)

A análise de calorimetria foi realizada para observar o comportamento do lipossomo durante um gradiente de temperatura, quando a bicamada de fosfolípidios passasse da fase gel para a fase líquida. O aumento da temperatura favoreceria uma mudança da configuração da cadeia, onde os ácidos graxos que estão em configuração trans, onde há maior compatibilidade da cadeia e menos fluidez transacionam para uma posição gauche desordenada que possibilita a maior mobilidade dos lipídios de membrana (Franzé *et al.*, 2018).

Alguns parâmetros como pH interferem na fluidez, e como o porta amostra é um capilar de vidro, tanto o lipossomo contendo o extrato como o lipossomo sem conter o extrato foram diluídos numa solução tampão de acetato de sódio e ácido acético 0,01 mol.L⁻¹. Foram feitas diluições seriadas pois existia a possibilidade de que em uma solução muito concentrada o pico de T_m extrapolasse o gráfico.

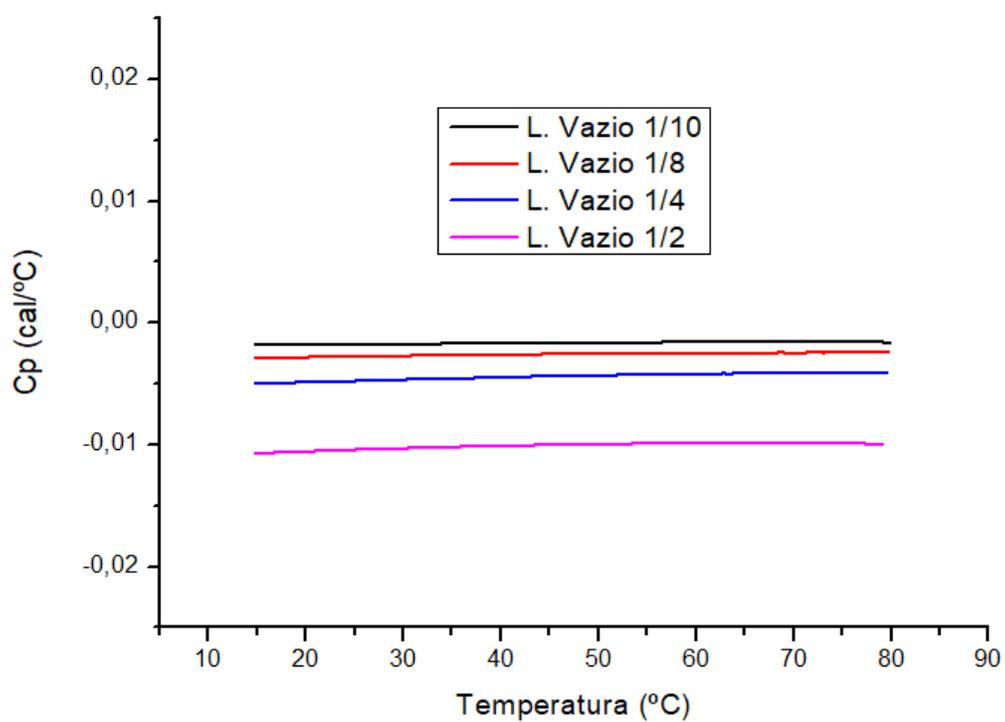
Para os dois tipos de lipossomos foram feitas diluições como na tabela abaixo:

Tabela 15. Tabela de diluição de lipossomos para DSC.

Volume do lipossomo (µL)	Volume de tampão Acetato (µL)	Volume Total (mL)	Ordem de diluição
100	900	1	$\frac{1}{10}$
125	875	1	$\frac{1}{8}$
250	750	1	$\frac{1}{4}$
500	500	1	$\frac{1}{2}$

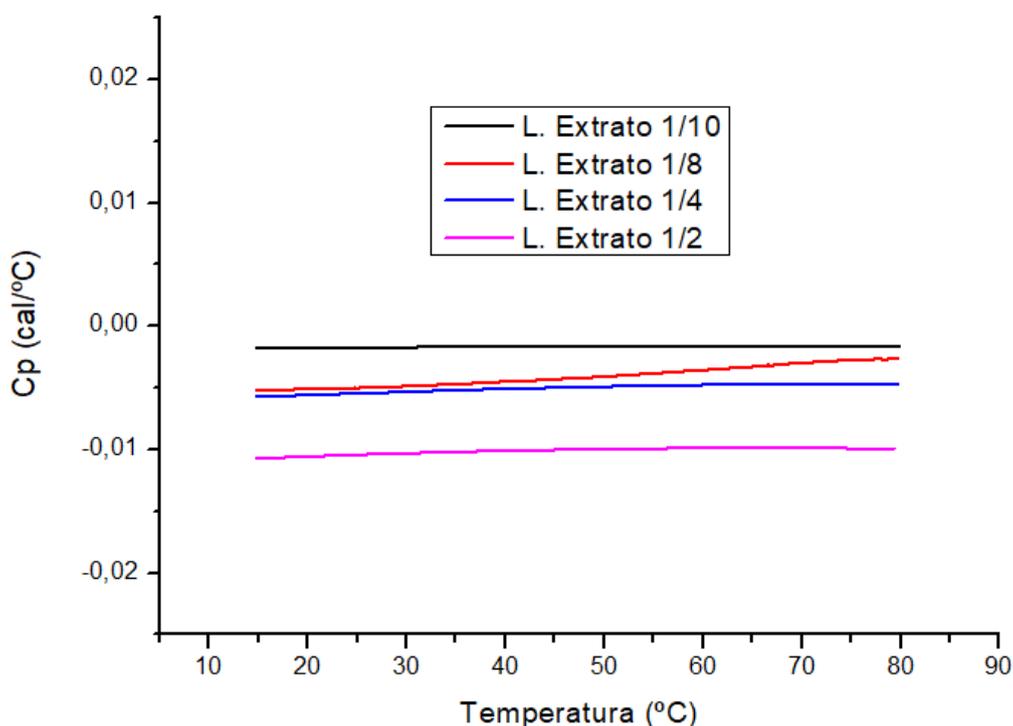
Os resultados foram observados nos gráficos abaixo:

Figura 51 - Gráfico de DSC dos lipossomos vazios.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software OriginPro 8.5.

Figura 52 - Gráfico de DSC para os lipossomos com extrato.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software OriginPro 8.5.

O objetivo era que conseguíssemos estudar como o conteúdo da vesícula iria influenciar na fluidez da membrana quando submetida à um mesmo de gradiente de temperatura de uma vesícula contendo apenas água. O livro Princípios de Bioquímica de Lehninger afirma que a fluidez da membrana não depende apenas da polaridade do meio que ela está inserida, mas também da polaridade de seu conteúdo (Nelson e Cox, 2014).

Infelizmente, em todas as diluições de ambas as amostras não foi possível visualizar o pico de T_m esperado. Era sabido que a presença de colesterol nas membranas das vesículas dos lipossomos diminui a temperatura T_m , uma vez que o colesterol diminui a fluidez da membrana através da organização que ele promove com a interação entre as caudas dos ácidos graxos (Nelson e Cox, 2014). Assim, a fase líquida atingida se torna uma fase líquida ordenada em contra partida da fase líquida desordenada esperada de uma vesícula sem a presença de colesterol (Franzé *et al.*, 2018). (Nakhaei *et al.*, 2021) afirma que enquanto a presença de colesterol é muito importante em seu papel de regular

a permeabilidade das membranas e diminuir a perda de fármacos em sistemas de entrega (drug delivery), quando a concentração dele nas mesmas é menor que uma certa concentração, não há alteração no DSC das membranas. Acima de uma certa concentração ele faz com que o pré pico de T_m desapareça, e numa concentração maior ainda pode fazer com que o pico de T_m desapareça completamente. Assim, seria necessário um estudo da formulação dos nossos lipossomos com diferentes concentrações de colesterol para obter gráficos de DSC e estudar o comportamento destas vesículas diante à um gradiente de temperatura.

5.10. Reidratação dos lipossomos

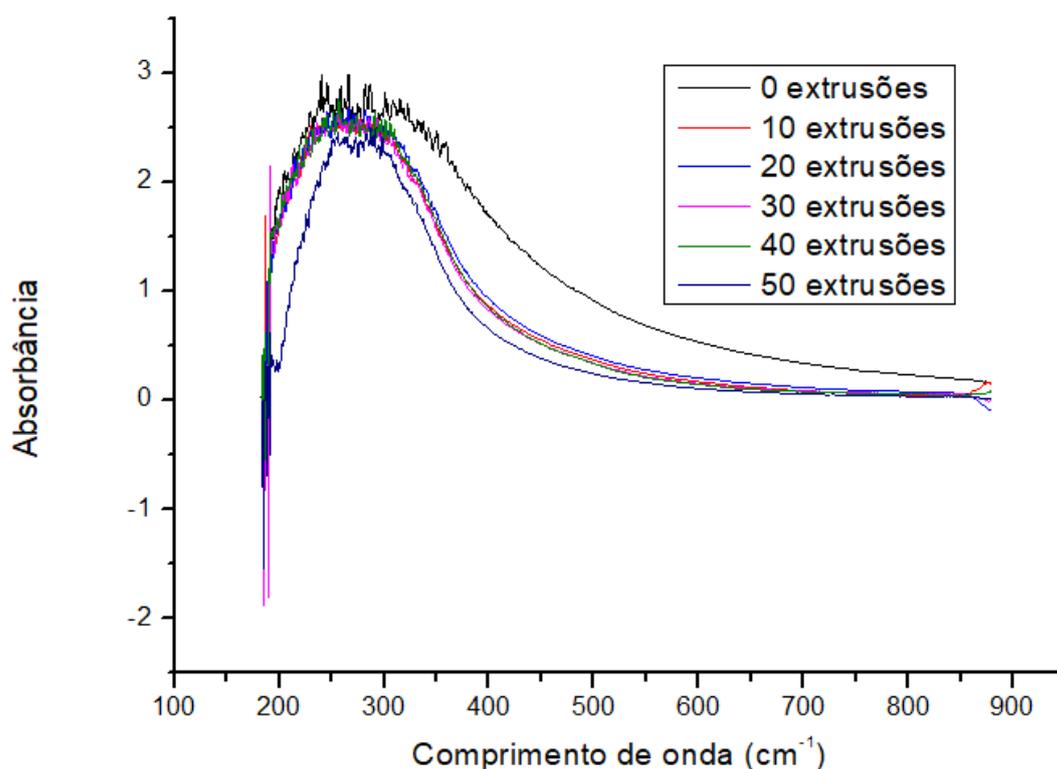
Através das análises de DLS dos lipossomos no item 5.2 comparados com o item 5.5, percebemos mesmo com a presença de (PEG) e uma alta concentração de colesterol nos lipossomos, eles se aglutinaram e formaram vesículas maiores com o passar do tempo. Assim, outra síntese foi feita na formulação otimizada e os mesmos foram liofilizados com a intenção de serem armazenados por um tempo maior. Depois, para o uso os mesmos foram reidratados, e levados a um ultrassom de ponta para que houvesse uma nova disrupção das membranas formando lipossomos menores. Após este preparo foi feita uma leitura de DLS e percebeu-se que embora tenhamos sido bem-sucedidos no preparo de vesículas em nanoescala, a população de partículas era muito dispersa em diferentes tamanhos.

Foi então sugerido que as membranas passem por um procedimento comum na homogeneização deste material. A passagem através de uma membrana de porosidade conhecida de 100 nm num aparelho de extrusão. Esta técnica consiste em um equipamento que possui uma membrana semipermeável de 100 nm de porosidade e uma membrana de apoio de cada lado com porosidade de 400 nm. Acoplado de cada lado está uma seringa de vidro, que irá aplicar uma pressão constante para que a solução lipossomal seja forçada a passar pela membrana. Uma vez que a solução com lipossomos maiores que a porosidade da membrana seja obrigado a passar pelos poros, os lipossomos

maiores seriam fragmentados a lipossomos menores, diminuindo o tamanho da população e sua dispersividade.

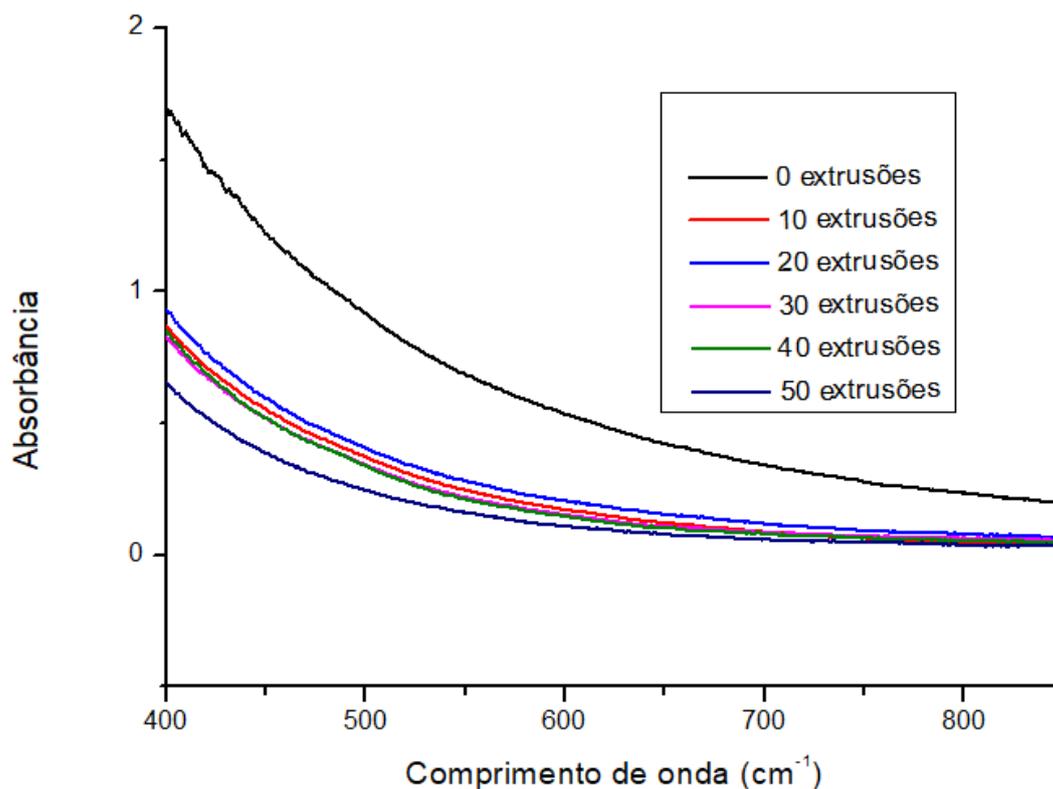
Para isso, fizemos leituras de UV-Vis para o lipossomo reidratado, e leituras para a solução depois que a mesma passou 10, 20, 30, 40 e 50 vezes através da membrana. A banda do pico nos dá uma noção da distribuição do particulado, enquanto a curva após o pico uma noção da dispersão de luz. Quanto maior a abertura da banda, mais disperso está a população de partículas em tamanhos maiores. Quanto maior a integração da área após a banda, maior o efeito de floculação, que é o espalhamento de luz ou turbidez que a solução causa. Quanto menor é a população, ou seja, em menor em nano escala, menor é a turbidez do coloide.

Figura 53 - Gráfico de UV-Vis dos lipossomos com extrato submetidos a extrusão.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software OriginPro 8.5.

Figura 54 – Leitura de 400 a 850 nm, após a banda da Figura 52.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software OriginPro 8.5.

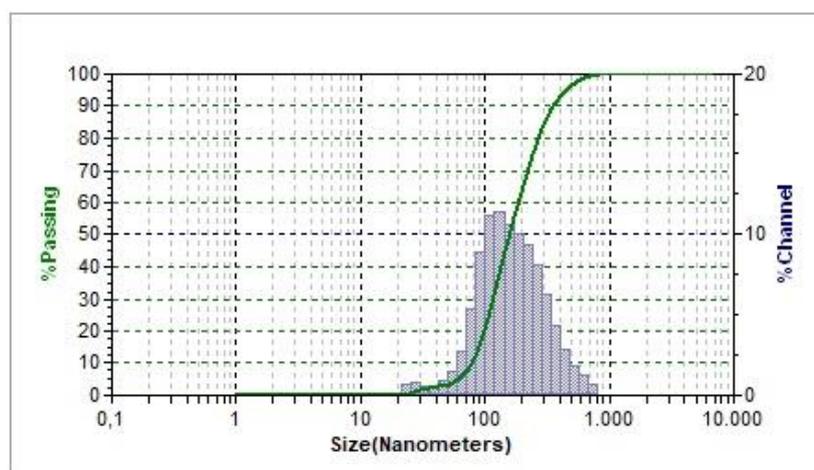
Através das leituras de UV-Vis, percebemos que com apenas dez passagens pela membrana já possuímos uma melhora significativa na dispersão e no tamanho dos lipossomos presentes no coloide. A integração da área abaixo da curva após a banda foi feita entre 400 e 850 cm^{-1} e está presente na tabela abaixo.

Tabela 16. Integração da área abaixo da curva das extrusões.

Número de passagens pela membrana	Integral da área
0	277,243
10	104,481
20	119,322
30	98,556
40	96,510
50	72,005

Percebemos pela tabela que realmente houve uma diminuição da turbidez do coloide tanto visível quanto medido. Assim, a pior e a melhor medida foram levadas ao DLS para comparação de tamanho de particulado e dispersividade.

Figura 55 - Histograma do lipossomo após reidratação.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

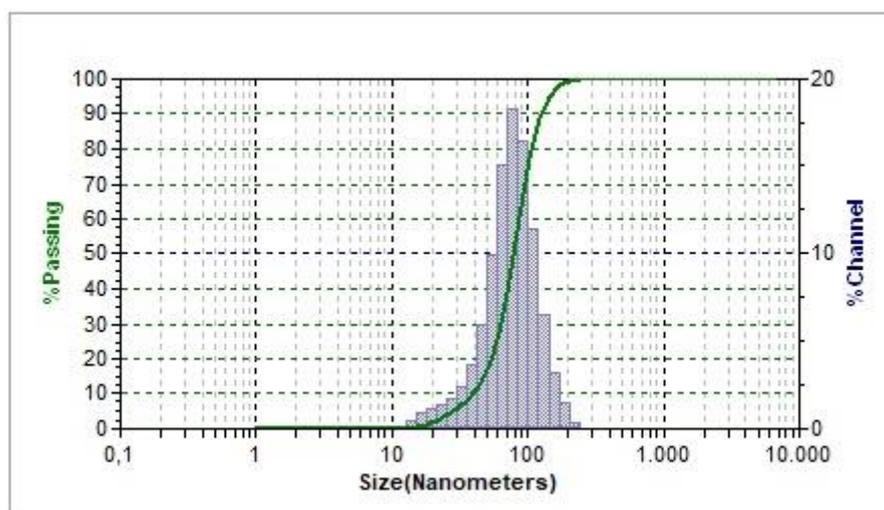
Pelo DLS do coloide reidratado que passou apenas pelo ultrassom de ponta, percebemos que grande parte da população é maior do que 100 nm, o que segundo a literatura significa vesículas grandes multilamelares. A média do tamanho de partículas desse coloide é de 193,5 nm, tendo seu pico em 160,30 nm (fração de tamanho que possui a maior quantidade de partículas). A largura

da banda em meia altura do pico foi de 206,50 nm mostrando o quão disperso estão as frações de tamanho que contribuem para esta população de lipossomos. As populações contribuintes se encontram na tabela abaixo.

Tabela 17. Distribuição de tamanho das partículas do lipossomo reidratado.

Fração de tamanho (nm)	% das partículas
818,0	0,71
687,0	1,25
578,0	1,86
486,0	2,86
409,0	4,36
344,0	6,26
289,0	8,10
243,0	9,35
204,4	10,01
171,9	10,63
144,5	11,43
121,5	11,15
102,2	8,88
85,90	5,41
72,30	2,74
60,80	1,43
51,10	0,94
43,00	0,44
36,10	0,62
30,40	0,83
25,55	0,74

Figura 56 - Histograma do lipossomo com extrato após reidratação e passar 50 vezes pela membrana extrusora.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento.

O DLS do coloide que passou pelo ultrassom de ponta e fez cinquenta passagens pela membrana de 100 nm apresentou um resultado muito mais satisfatório. A maior parte das partículas estavam abaixo de 100 nm, o que segundo a literatura significam vesículas unilamelares, nosso objetivo nesta formulação. A média de tamanho das partículas foi de 81,20 nm, tendo seu pico em 77,80 nm. Muito próximo das vesículas obtidas inicialmente à liofilização. Quando analisada a dispersão da população, tivemos uma largura da banda à meia altura do pico em 63,10, mostrando o quão monodisperso as vesículas estavam quando comparado ao mesmo coloide sem passar pelos processos de extrusão. As populações contribuintes se encontram na tabela abaixo.

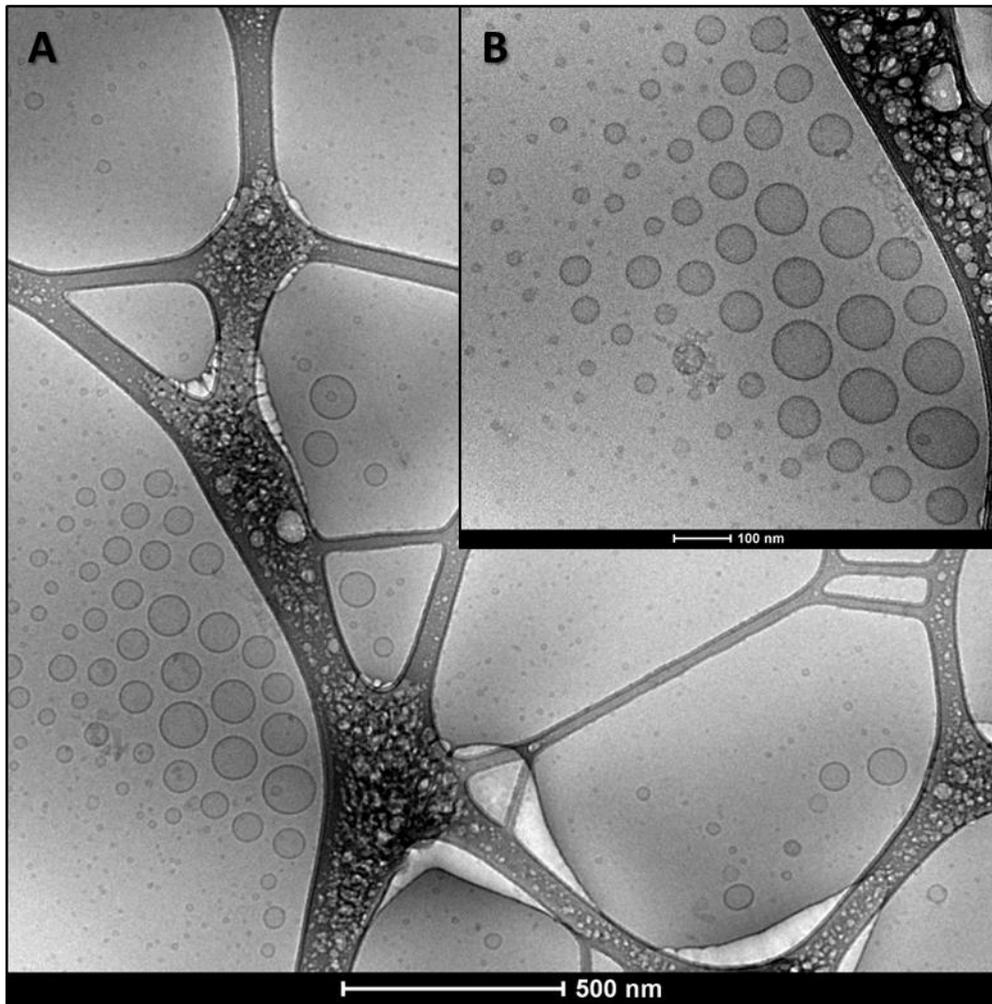
Tabela 18. Distribuição de tamanho das partículas do lipossomo com extrato reidratado que passou 50 vezes pela membrana extrusora.

Fração de tamanho (nm)	% das populações
243,0	0,31
204,4	1,47
171,9	3,22
144,5	6,47
121,5	11,40
102,2	16,46
85,90	18,24
72,30	15,03
60,80	9,92
51,10	5,93
43,00	3,62
36,10	2,41
30,40	1,75
25,55	1,35
21,48	1,09
18,06	0,91
15,19	0,42

5.11. Criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryoTEM)

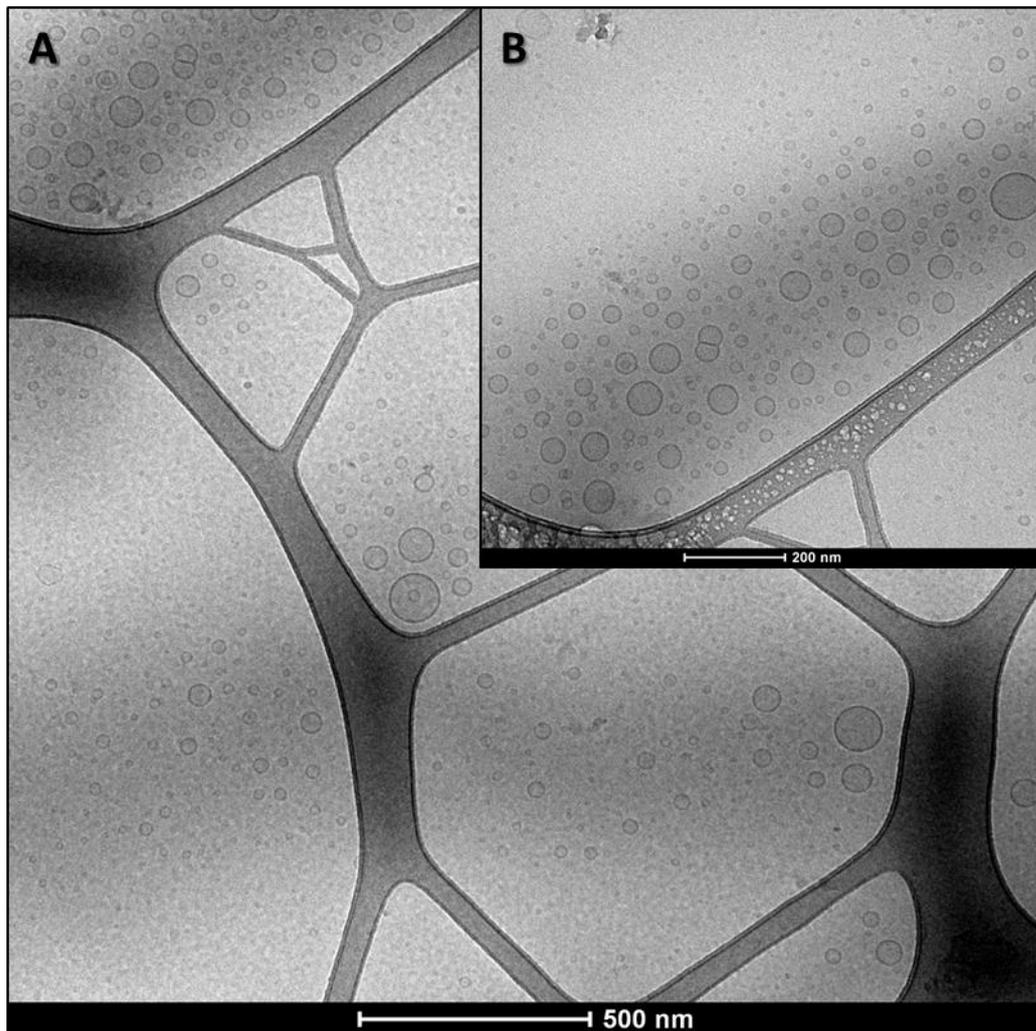
As imagens da amostra através de cryoTEM confirmaram que houve formação de vesículas, com a bicamada de fosfolípidios bem definida, onde as vesículas se encontram numa escala abaixo de 100 nm, com uma única lamela caracterizando conforme a literatura SUV, pequenas vesículas unilamelares (Figura 57). Uma quantidade insignificante de vesículas possui multilamelas ou estão aglutinadas, porém até elas possuem um diâmetro abaixo de 100 nm, provando a baixa dispersão do coloide (Figura 58).

Figura 57 - Imagem de criomicroscopia eletrônica de transmissão dos lipossomos, onde A - Imagem geral da amostra, B - Aproximação de uma região de A.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento

Figura 58 - Imagem de criomicroscopia eletrônica de transmissão do lipossomo, onde A - Imagem geral da amostra, B - Aproximação de uma região de A onde podemos ver efeito de aglutinação da vesícula e multilamelas.

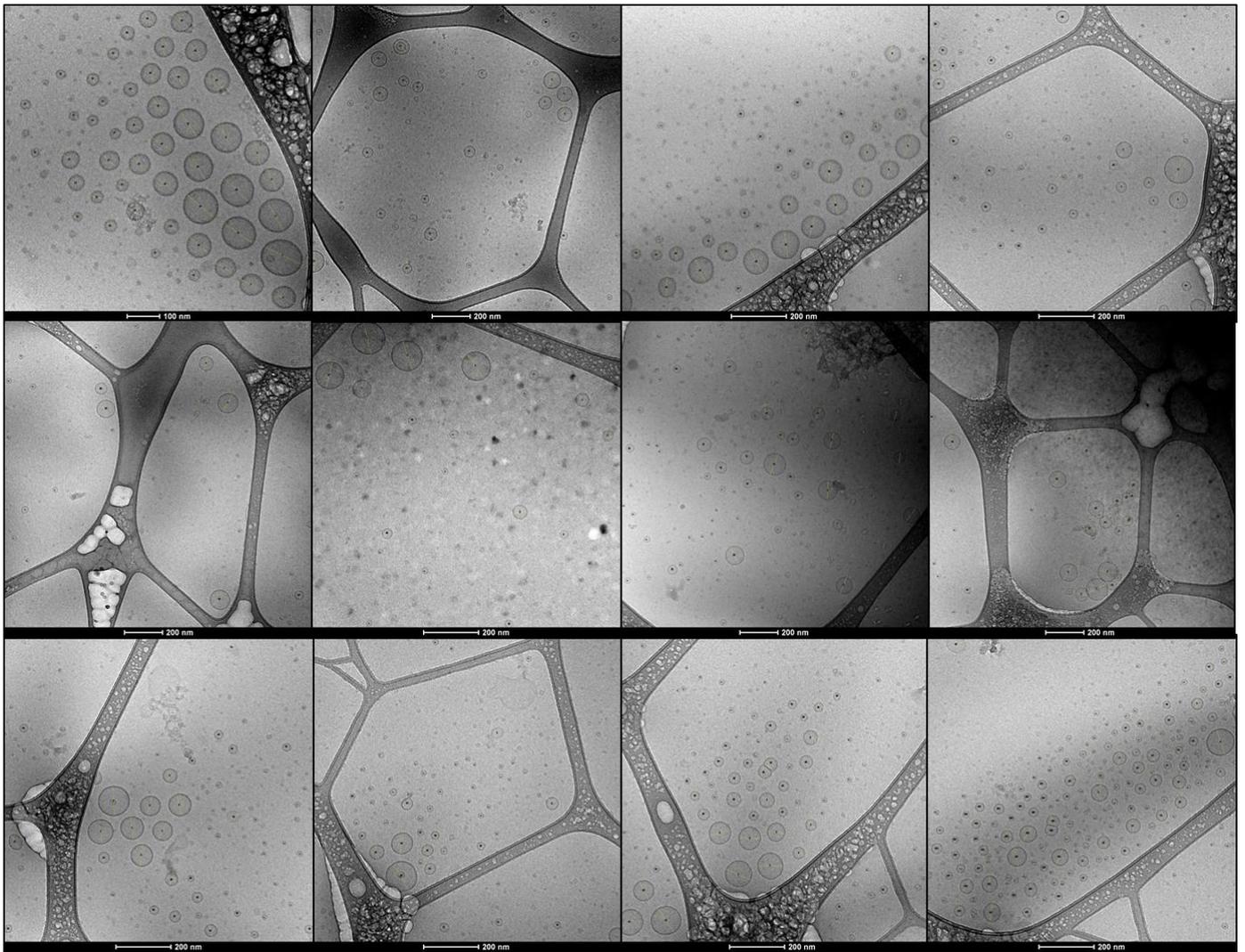


Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software do equipamento

Conseguimos ver que as amostras estavam com uma camada de gelo um pouco extensa, ou seja, uma camada menos vitrificada diminuindo a resolução e aumentando a incerteza pelo aparecimento de artefatos. Isto pode ser resolvido aumentando o *blot time* para formar uma camada vítrea mais uniforme. Além disso, neste trabalho foi utilizado um tempo de incubação longo quando comparado com cryoTEM para outras amostras pois o um período maior de incubação ajuda na distribuição mais uniforme das vesículas.

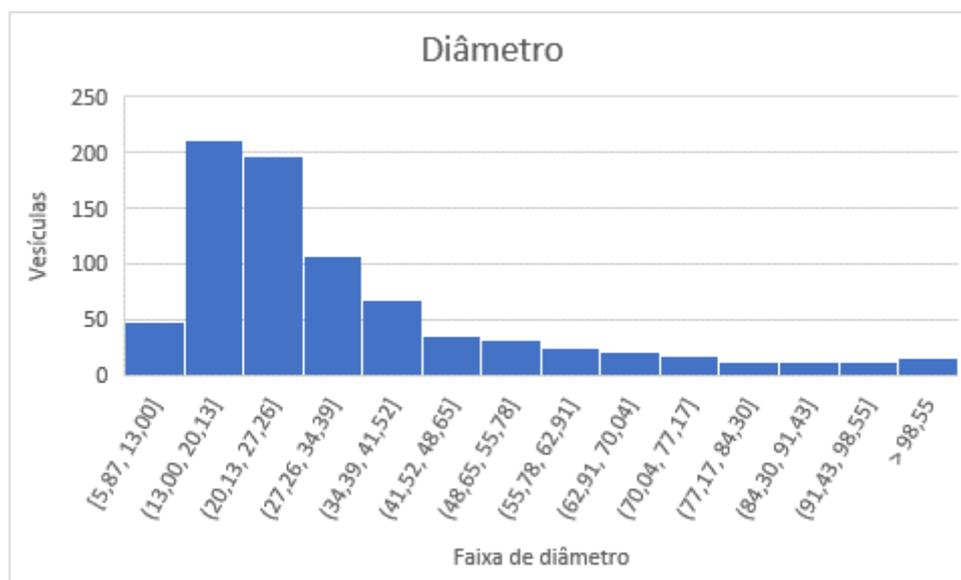
Através das imagens coletadas, foram medidos os diâmetros de aproximadamente 800 vesículas através do software ImageJ (FIJI), como demonstrado na figura abaixo.

Figura 59 - Imagens de criomicroscopia eletrônica de transmissão utilizadas para quantificação de dados através de ImageJ.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software ImageJ.

Figura 60 - Gráfico do histograma dos lipossomos por dados de ImageJ através da criomicroscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software Excel 2016.

Através da quantificação de 807 vesículas o dado de diâmetro médio obtido foi de 32,62 nm, um valor abaixo do obtido pelo DLS. Como podemos ver no gráfico, existe um baixo número de vesículas formadas baixo diâmetro. Estas podem ser facilmente artefatos sendo confundidos como vesículas, isto porque o filme vitrificado derrete sob o feixe de elétrons e se congela novamente formando cristais de gelo que podem ser confundidos com vesículas pequenas devido à sua forma de esfera redonda. Quando desconsiderado estruturas com diâmetro menor que 30 nm, a média se altera para um diâmetro médio de 53,54 nm, muito mais próximo dos resultados de DLS. Como já discutido, um maior *blot time* com a formação de um filme mais fino e homogêneo seria uma alternativa para diminuir a quantidade de artefatos e aumentar a eficiência da quantificação (Almgren, Edwards e Karlsson, 2000). Outra possível explicação é que o volume das vesículas é menor na fase congelada que na fase líquida, mesmo que o congelamento tenha sido rápido para diminuir o efeito do congelamento sobre as vesículas.

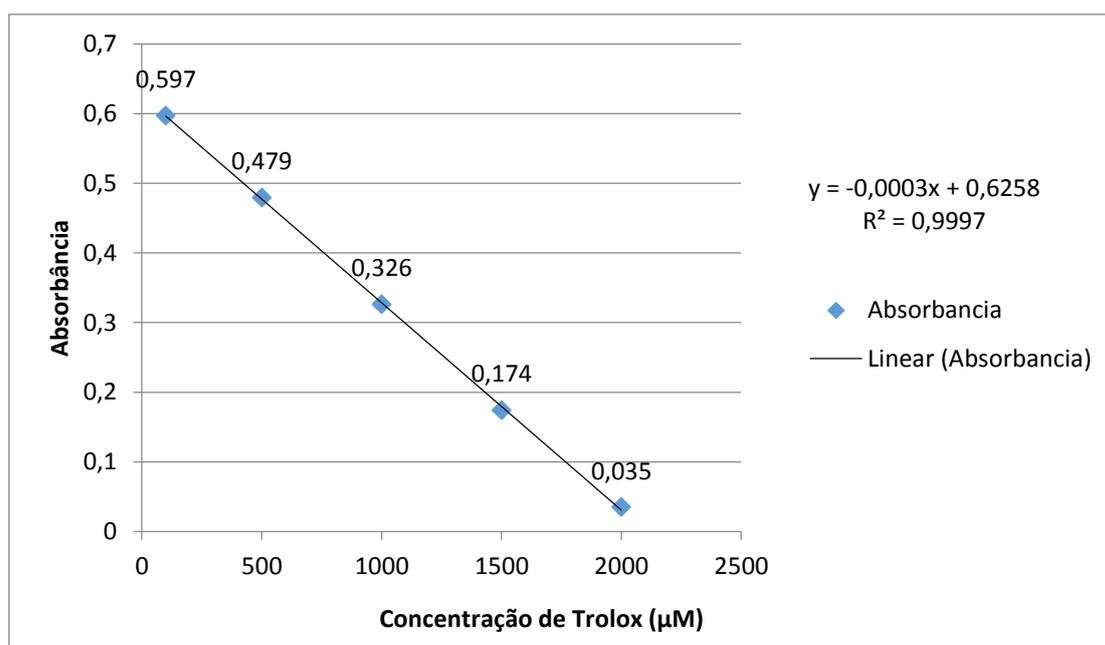
5.12. Determinação de antioxidantes totais através da atividade do radical livre ABTS+

Conforme Tabela 1, foram montadas as curvas de diluição para o padrão de antioxidantes trolox. As amostras foram lidas no espectrofotômetro de UV-VIS e os dados estão na Tabela 19. Assim, foi possível montar o gráfico e gerar a equação da reta (Figura 61). A partir da equação da reta obtida, calcula-se a absorbância calculada para 1000 µM de trolox.

Tabela 19. Tabela da curva padrão de trolox.

	Concentração de trolox (µM)	Absorbância
Ponto 1:	100	0,597
Ponto 2:	500	0,479
Ponto 3:	1000	0,326
Ponto 4:	1500	0,174
Ponto 5:	2000	0,035

Figura 61 - Gráfico da curva padrão de trolox.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software Office 2016.

$$y = -0,003 \times 1000 + 0,6258 = 0,3258 \text{ (Equação 3)}$$

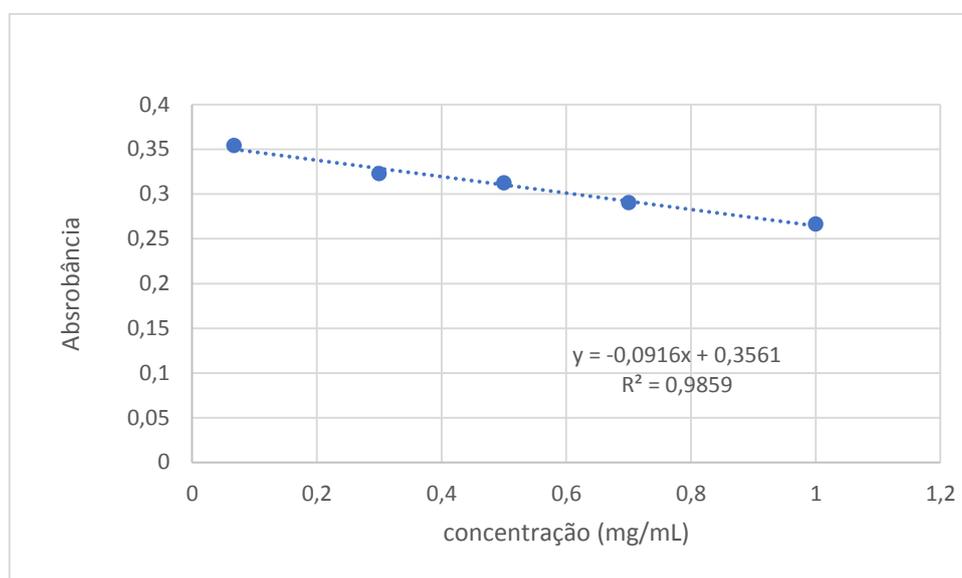
A partir da curva de amostra preparada na Tabela 2, as mesmas foram aliqotadas em placas de 96 poços e lidas no leitor de placas para determinar a absorção. Os dados se encontram na Tabela 20 abaixo.

Tabela 20. Tabela da determinação antioxidante do extrato de *Ilex guaysa* através do radical ABTS.

Concentração do extrato (mg/mL)	Absorbância
1	0,266
0,9	0,261
0,8	0,263
0,7	0,290
0,6	0,299
0,5	0,312
0,4	0,301
0,3	0,322
0,2	0,351
S0,1	0,352
0,067	0,354
0,033	0,343

Observando a Tabela 20, alguns pontos não seguiram a ordem esperada, isso se deve ao fato de que apenas dois microlitros de amostra são utilizados para reagir com o radical ABTS. Um volume tão baixo acaba ocasionando grandes erros de manuseamento. Para diminuir erros e melhorar a equação da reta, cinco pontos equidistantes da Tabela 20 foram escolhidos e apresentados no gráfico a seguir. Utilizando-se da absorbância calculada para 1000 μ M de trolox, substituímos na nova equação da reta a fim de descobrir o equivalente de amostra de extrato.

Figura 62 - Gráfico da determinação antioxidante do extrato de *Ilex guayusa* através do radical ABTS.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software Office 2016.

$$0,3258 = -0,0916 \times \text{Conc}(\text{amostra}) + 0,3561 \text{ (Equação 4)}$$

$$\text{Conc}(\text{amostra}) = \frac{(0,3258 - 0,3561)}{-0,0916} = 0,330786 \text{ mg/mL}$$

$$Z = \frac{1000}{0,330786} = 3023,1 \text{ (Equação 5)}$$

Através da equação 4 temos que o $IC_{(50\%)}$ é de 0,3308 (mg/mL), ou seja, essa é a quantidade necessária de extrato para neutralizar 50% do radical. Temos também através da equação 5, 3023,1 μM de trolox por mg de amostra, ou 3,02 mM de trolox por mg de amostra. Isso quer dizer que o poder antioxidante de 1 g de extrato é equivalente a 3,02 mol de padrão trolox, o que é um alto poder antioxidante.

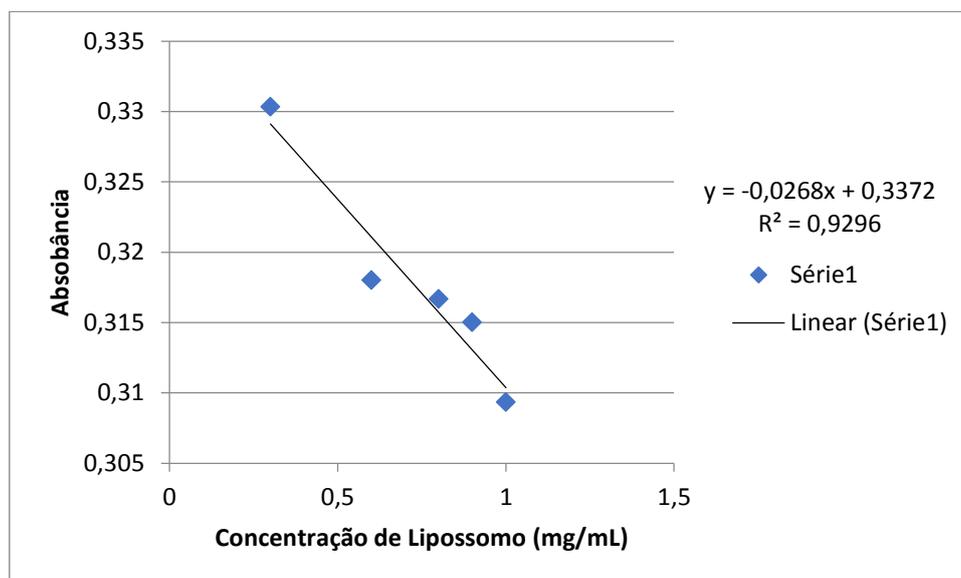
Da mesma forma, fizemos a determinação de atividade antioxidante do lipossomo (Tabela 3). As amostras foram alíquotadas na placa de 96 poços da mesma forma

Tabela 21. Tabela da determinação antioxidante do lipossomo através do radical ABTS.

Concentração do lipossomo (mg/mL)	Absorbância
1	0,309
0,9	0,315
0,8	0,316
0,7	0,311
0,6	0,318
0,5	0,318
0,4	0,321
0,3	0,330
0,2	0,317
0,1	0,320
0,067	0,316
0,033	0,318

Observando a tabela acima, assim como para o extrato, alguns pontos não seguiram a ordem esperada, isso se deve ao fato de que apenas dois microlitros de lipossomos são utilizados para reagir com o radical ABTS. Um volume tão baixo acaba ocasionando grandes erros de manuseamento. Para diminuir erros e melhorar a equação da reta, cinco pontos foram escolhidos e apresentados no gráfico a seguir. Utilizando-se da absorbância calculada para 1000 μ M de trolox, substituímos na nova equação da reta a fim de descobrir o equivalente de amostra de extrato.

Figura 63 - Gráfico de determinação antioxidante do lipossomo através do radical ABTS.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software Office 2016.

$$0,3258 = -0,0268 \times Conc(amostra) + 0,3372 \text{ Eq(5)}$$

$$Conc(amostra) = \frac{(0,3258 - 0,3372)}{-0,0268} = 0,425373 \text{ mg/mL}$$

$$W = \frac{1000}{0,425373} = 2350,88 \text{ (Eq 6)}$$

Através da equação 5 temos que o $IC_{(50\%)}$ é de 0,4253 (mg/mL), ou seja, essa é a quantidade necessária de lipossomo para neutralizar 50% do radical. Temos também através da equação 6, 2350,9 μM de trolox por mg de extrato, ou 2,35 mM de trolox por mg de extrato. Isso quer dizer que o poder antioxidante de 1 g de extrato é equivalente a 2,35 mol de padrão trolox, o que é um poder antioxidante comparável ao extrato.

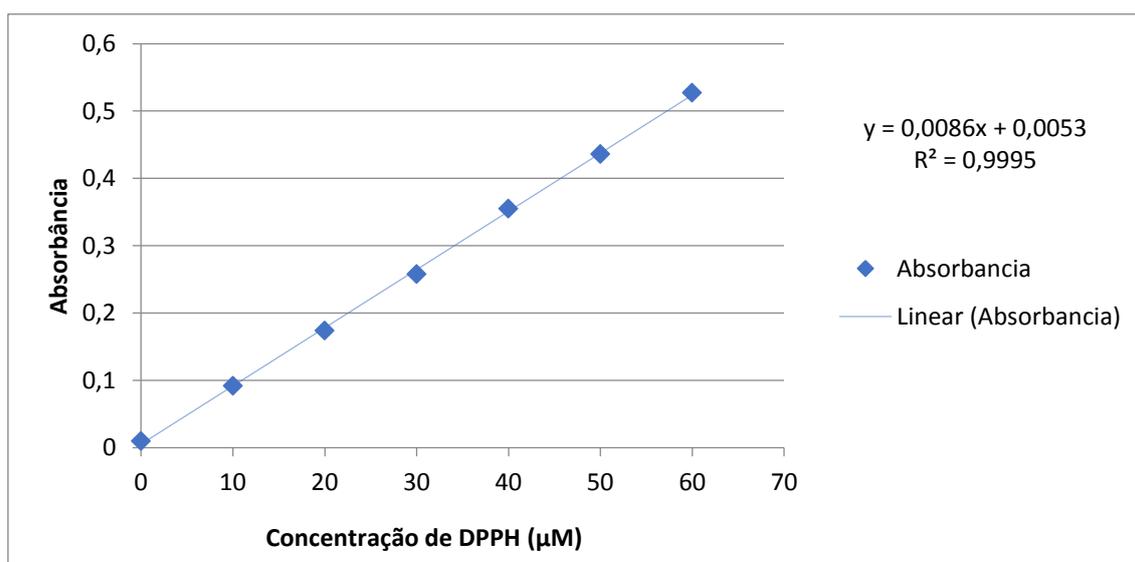
5.13. Determinação de antioxidantes totais através da atividade do radical DPPH

Foi preparada uma solução estoque de DPPH de 60 μM , e com ela feitas diluições seriadas para calcular uma curva padrão de leitura de absorvância do radical DPPH no UV-Vis. Então, através dessa leitura foi plotado a curva padrão:

Tabela 22. Curva padrão de DPPH.

Concentração de DPPH (μM)	Absorbância
0	0,010
10	0,092
20	0,174
30	0,258
40	0,355
50	0,436
60	0,527

Figura 64 - Gráfico da curva padrão de DPPH.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software Office 2016.

Através da equação da reta foi calculado a absorvância referente à metade da concentração total de DPPH (30 µM).

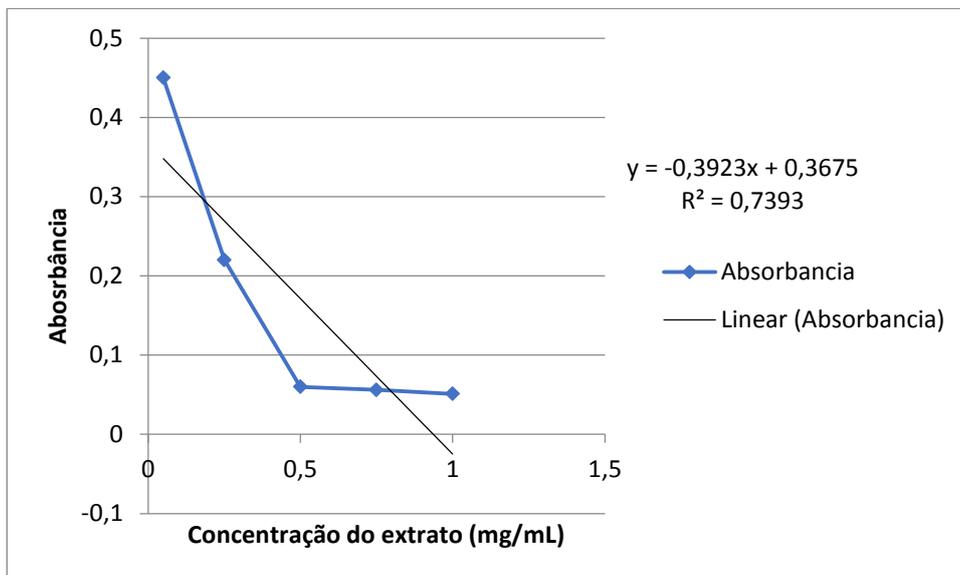
$$y = 0,0086 \times 30 + 0,0053 = 0,2633 \text{ (Eq. 7)}$$

Foi preparado então uma solução de 1 mg/mL de extrato de guayusa e feito diluições seriadas dela para montar uma curva de redução do radical. Para a leitura foram adicionados 0,1 mL de solução com 3,9 mL do radical DPPH e lidos então no espectrofotômetro de UV-Vis.

Tabela 23. Determinação da atividade antioxidante do extrato de guayusa através do radical DPPH.

Concentração do extrato (mg/mL)	Absorbância
0,05	0,450
0,25	0,220
0,5	0,060
0,75	0,056
1	0,051

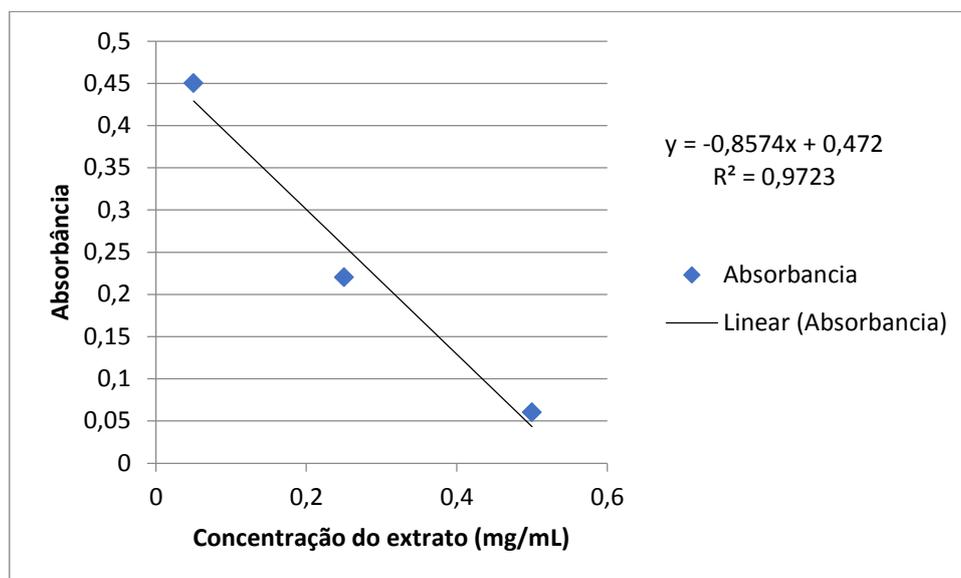
Figura 65 - Gráfico da determinação antioxidante do extrato de guayusa através do radical DPPH.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software Office 2016.

Percebemos então que depois de uma certa concentração do extrato, todo o radical era neutralizado. Então desconsideramos os pontos após a neutralização.

Figura 66 - Gráfico da determinação antioxidante do extrato de guayusa através do radical DPPH utilizando 3 pontos.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software Office 2016.

Utilizando a equação da reta, e calculando a concentração necessária para neutralizar 50% da concentração de DPPH.

$$0,2663 = -0,8574 \times \text{Conc}(\text{extrato}) + 0,472 \text{ (Eq. 8)}$$

$$\text{Conc}(\text{extrato}) = \frac{(0,2663 - 0,472)}{-0,8574} = 0,2399 \text{ mg/mL}$$

Pela equação 8 obtemos o IC_{50%} de DPPH, porém apenas 0,1 mL de extrato estavam presentes em 4 mL de solução na cubeta, assim:

$$\frac{0,2399 \times 0,1}{4} = \text{Concentração real} = 5,9975 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$$

Ou seja, esta é a concentração equivalente 30 µM de DPPH, o equivalente a 0,012 mg de DPPH. Calculamos então o equivalente a 1g:

$$m = \frac{5,9975 \times 10^{-3}}{0,012} = 0,5 \text{ g de extrato de guayusa}$$

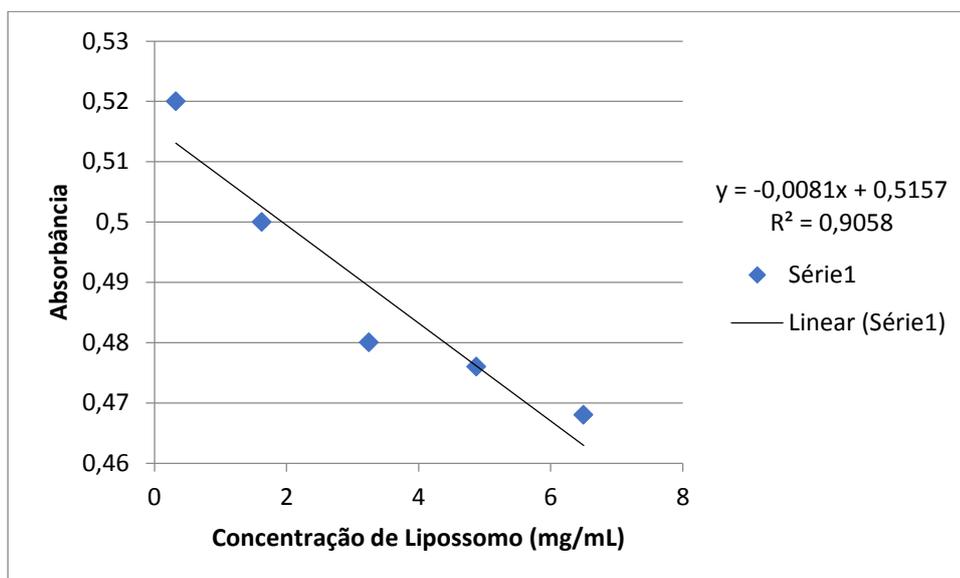
Assim, é necessária uma massa de 0,5 gramas de extrato para neutralizar cada grama de radical DPPH.

De mesma forma, para o lipossomo foi preparada uma solução de 6,5 mg/mL e feitas diluições seriadas para a leitura conforme a tabela abaixo.

Tabela 24. Determinação da atividade antioxidante do lipossomo através do radical DPPH.

Concentração do extrato (mg/mL)	Absorbância
0,325	0,520
1,625	0,500
3,25	0,480
4,875	0,476
6,5	0,468

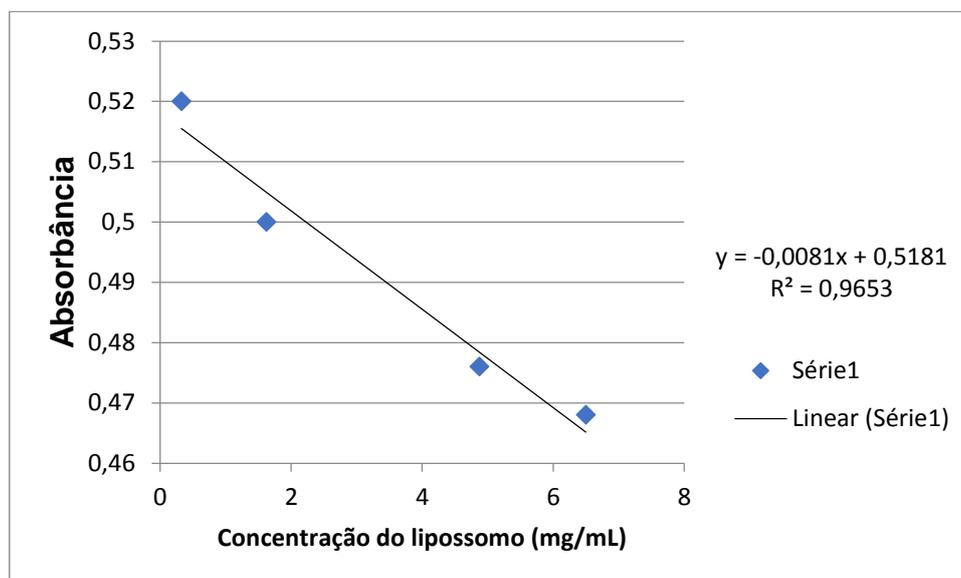
Figura 67 - Determinação da atividade antioxidante do lipossomo através do radical DPPH.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software Office 2016.

Percebemos que dois pontos tiveram uma leitura muito próxima, podendo significar um erro de leitura. Assim, o ponto do meio foi retirado para tentar melhorar a regressão da curva.

Figura 68 - Determinação da atividade antioxidante do lipossomo através do radical DPPH utilizando 4 pontos.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor através do software Office 2016.

Através da equação da reta agora calculamos o $Ic_{50\%}$ de DPPH.

$$Conc (lipossomo) = \frac{(0,2633 - 0,5181)}{(-0,0081)} = 31,4568 \text{ mg/mL (Eq. 9)}$$

Pela equação 9 obtemos o $IC_{50\%}$ de DPPH, porém apenas 0,1 mL de lipossomos estavam presentes em 4 mL de solução na cubeta, assim:

$$\frac{31,4568 \times 0,1}{4} = \text{Concentração real} = 0,78642 \text{ mg/mL}$$

Ou seja, esta é a concentração equivalente 30 μM de DPPH, o equivalente a 0,012 mg de DPPH. Calculamos então o equivalente a 1g:

$$m = \frac{0,78642}{0,012} = 65,535 \text{ g de lipossomo}$$

Assim, é necessária uma massa de 65,535 gramas de lipossomo para neutralizar cada grama de radical DPPH. Uma quantidade cento e trinta e uma vezes maior que a necessária de extrato. (Villacis-Chiriboga *et al.*, 2018) demonstrou que para o parâmetro de DPPH, a idade das folhas influenciava muito no resultado, devido ao mecanismo da reação. Ele provou que folhas mais jovens tem componentes polifenóis diferentes de folhas mais velha, talvez a utilização de folhas secas armazenadas comercialmente não tenha sido um substrato para esta análise, ou os componentes fenólicos não tenham sido encapsulados pelos lipossomos.

6. CONCLUSÃO

O trabalho foi bem-sucedido na rota proposta para sintetizar lipossomos. Os lipossomos sintetizados tiveram parâmetros de tamanho e dispersão dentro do aceitável mantendo características de nanopartículas. O extrato de *Ilex guayusa* demonstrou ter um alto poder antioxidante, condizente com o esperado via literatura em ambos os testes de neutralização de radicais livres que foram aplicados. Foi possível observar os lipossomos por técnicas de microscopia eletrônica, possibilitando provar a formação de lipossomos, unilamelares e monodispersos. O método de armazenamento e reidratação dos lipossomos proposto mostrou que é possível transpor a barreira do tempo para a aplicação deste sistema de entrega de fármacos, obtendo novamente um lipossomo com parâmetros tão bons quanto os sintetizados. O lipossomo carreando o extrato demonstrou um bom poder antioxidante frente ao radical livre ABTS⁺.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMGREN, M.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G. Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 174, p. 3–21, 2000.
- ALMUNDENA, G.-R. *et al.* Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 12, p. 3929–3936, 2017.
- ALVAREZ, L. A. C. **PROPOSIÇÃO DE UMA ROTA DE SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO REDUZIDAS COM RESINA DE *Virola oleifera* ATRAVÉS DO PLANEJAMENTO FATORIAL.** [s.l.] UFES, 2018.
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- ANNAMALAI, A. *et al.* Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of Au NPs using *Euphorbia hirta* L. leaf extract. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 108, p. 60–65, 2013.
- ARTEAGA-CRESPO, Y. *et al.* Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Ilex guayusa* Loes. leaves using response surface methodology. **Heliyon**, v. 6, n. 1, p. 0–7, 2020.
- BERG, J. L.; TYMOCKZO, J. L.; STRYDER, L. **Bioquímica.** sétima edi ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2014. v. 59
- BÖTTCHER, H.; SLOWIK, P.; SÜSS, W. Sol-Gel Carrier Systems for Controlled Drug Delivery. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 13, n. 1–3, p. 277–281, 1998.
- BRIUGLIA, M. L. *et al.* Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 5, n. 3, p. 231–242, 2015.
- CHETANACHAN, P. *et al.* Ultrastructural characterization of liposomes using transmission electron microscope. **Advanced Materials Research**, v. 55–57, p. 709–711, 2008.
- CIANCAGLINI, P. *et al.* Proteoliposomes in nanobiotechnology. **Biophysical Reviews**, v. 4, n. 1, p. 67–81, 2012.
- CONTERO, F. *et al.* Estrogenic activity of ethanolic extracts from leaves of *Ilex guayusa* Loes. and *Medicago sativa* in *Rattus norvegicus*. **Pharmacologyonline**, v. 2, n. September 2014, p. 95–99, 2015.
- DEMETZOS, C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): A tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. **Journal of Liposome Research**, v. 18, n. 3, p. 159–173, 2008.
- DOU, Q. P. Tea in health and disease. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 10–12, 2019.
- DUEÑAS, J. F. *et al.* Amazonian Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.): A Historical and Ethnobotanical Overview. **Economic Botany**, v. 70, n. 1, p. 85–91, 2016.

FAN, F. Y. *et al.* Catechins and their therapeutic benefits to inflammatory bowel disease. **Molecules**, v. 22, n. 3, 2017.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950–2962, 2009.

FRANZÉ, S. *et al.* Lyophilization of liposomal formulations: Still necessary, still challenging. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, 2018.

FUJIMOTO, T. *et al.* **Imaging Lipid Droplets by Electron Microscopy**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 116

HAO, D. *et al.* Research progress in the phytochemistry and biology of Ilex pharmaceutical resources. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3, n. 1, p. 8–19, 2013.

HARB, T. B. *et al.* Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, n. April 2018, p. 2–6, 2016.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 89–143, 2003.

KAMALY, N. *et al.* Folate receptor targeted bimodal liposomes for tumor magnetic resonance imaging. **Bioconjugate Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 648–655, 2009.

KAPP, R. W. *et al.* General and Genetic Toxicology of Guayusa Concentrate (Ilex guayusa). **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 2, p. 222–242, 2016.

KREPSKY, P. B. *et al.* Chemical composition and vasodilatation induced by Cuphea carthagenensis preparations. **Phytomedicine**, v. 19, n. 11, p. 953–957, 2012.

LEWIS, W. H. *et al.* Ritualistic use of the holly Ilex guayusa by Amazonian Jivaro Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, n. 1–2, p. 25–30, 1991.

LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 757–772, 2018.

MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 343–356, 2004.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161–177, 2000.

MUNIZ, C. R.; AZEREDO, H. M. C. DE; ROSA, M. DE F. Preparo de amostras para observação de nanoestruturas em microscópio eletrônico de varredura acoplado a detector STEM. **Comunicado técnico (Embrapa Agroindústria Tropical)**, v. 248, p. 1–6, 2019.

NAKHAEI, P. *et al.* Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability

Parameters With Emphasis on Cholesterol. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. September, p. 1–23, 2021.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6^o edição ed. [s.l.] ARTMED, 2014.

NGUYEN, T. A. *et al.* Micro and nano liposome vesicles containing curcumin for a drug delivery system. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, n. 3, 2016.

OHTAKE, S. *et al.* Phase behavior of freeze-dried phospholipid-cholesterol mixtures stabilized with trehalose. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1713, n. 1, p. 57–64, 2005.

PARDAU, M. D. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory properties of Ilex guayusa tea preparations: a comparison to Camellia sinensis teas. **Food and Function**, v. 8, n. 12, p. 4601–4610, 2017.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à Espectroscopia**. 5^o edição ed. [s.l.] Cengage Learning, 2015.

PIRES, J. S. *et al.* Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, n. April 2018, p. 1–5, 2017.

RADICE, M.; SCALVENZI, L.; SABLÓN COSSIO, N. *Ilex guayusa*: A systematic review of its Traditional Uses, Chemical Constituents, Biological Activities and Biotrade Opportunities. p. 3868, 2017.

RUOZI, B. *et al.* Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. **Talanta**, v. 73, n. 1, p. 12–22, 2007.

RUOZI, B. *et al.* AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 557–563, 2011.

SEBINELLI, H. G. “Estudo de proteolipossomos constituídos de Na,K-ATPase utilizando a técnica de microscopia de força atômica”. **Dissertação.**, 2016.

SEQUEDA-CASTAÑEDA, L. G. *et al.* *Ilex guayusa* loes (Aquifoliaceae): Amazon and andean native plant. **Pharmacologyonline**, v. 3, n. December, p. 193–202, 2016.

SESSA, G.; WEISSMANN, G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. **Journal of Lipid Research**, v. 9, n. 3, p. 310–318, 1968.

STELLA, V. J.; HIMMELSTEIN, K. J. Prodrugs and Site-Specific Drug Delivery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 12, p. 1275–1282, 1980.

TAVERA, C. F. C. *et al.* High polarity extracts obtained from *Ilex guayusa* Loes. leaves, exhibit antioxidant capacity. **Vitae**, v. 29, n. 1, 2022.

TIWARI, G. *et al.* Drug delivery systems: An updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, n. 1, p. 2, 2012.

UEKAMA, K. Cyclodextrins in drug delivery system. **Advanced Drug Delivery**

Reviews, v. 36, n. 1, p. 1–2, 1999.

VANGALA, A. *et al.* A comparative study of cationic liposome and niosome-based adjuvant systems for protein subunit vaccines: characterisation, environmental scanning electron microscopy and immunisation studies in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 6, p. 787–799, 2010.

VARDE, N. K.; PACK, D. W. Microspheres for controlled release drug delivery. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 4, n. 1, p. 35–51, 2004.

VILLACIS-CHIRIBOGA, J. *et al.* Changes in phytochemical composition, bioactivity and in vitro digestibility of Guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) in different ripening stages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 5, p. 1927–1934, 2018.

WEINER, N.; MARTIN, F.; RIAZ, M. LIPOSOMES AS A DRUG DELIVERY SYSTEM. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 15, n. 10, p. 1523–1554, 1989.

WISE, G.; NEGRIN, A. A critical review of the composition and history of safe use of guayusa: a stimulant and antioxidant novel food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 14, p. 2393–2404, 2020.

WOJDYŁO, A.; OSZMIAŃSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 940–949, 2007.