



Perfil de segurança de lipossomas contendo extrato aquoso liofilizado de *Araucaria Angustifolia* em células de cólon humano Caco-2 Nanofito

Amanda Pereira, Carina Cassini, Cátia dos Santos Branco e Mirian Salvador



INTRODUÇÃO / OBJETIVO

A *Araucaria angustifolia* pertence à família Araucariaceae, rica em compostos fenólicos (Bert. O Kuntze). Em estudos prévios do nosso grupo, o extrato aquoso de brácteas de *A. angustifolia* (EAA) apresentou atividade preventiva e/ou terapêutica em sistemas biológicos (Branco et al., 2015). No entanto, apesar dos resultados promissores, os componentes de sua matriz química são instáveis nos fluidos do trato gastrointestinal e encapsula-los em nanocarreadores é uma forma de contornar essas limitações (Dai et al., 2015). Em vista disso, este estudo tem como objetivo preparar e caracterizar lipossomas contendo EAA quanto ao potencial zeta, índice de polidispersão, tamanho de partícula e pH assim como avaliar a viabilidade celular, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), genotoxicidade e níveis de óxido nítrico desses lipossomas contendo EAA em células de cólon humano (Caco-2).

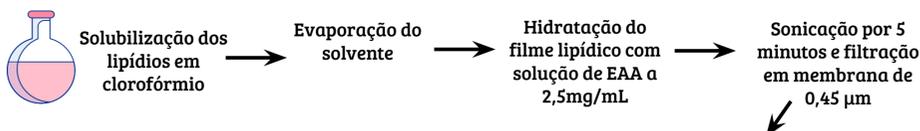
RESULTADOS

O potencial zeta das amostras preparadas foi de $-59,45 \pm 6,7$; $-60,85 \pm 2,2$ e $-61,6 \pm 3,3$ mV, para as formulações 1:3, 1:5 e 1:7, respectivamente (Tabela 1). O índice de polidispersão (PDI) variou de $0,393 \pm 0,18$ à $0,395 \pm 0,01$. O tamanho de partícula $279,3 \pm 145,4$; $232,55 \pm 75,3$ e $182,65 \pm 37,0$ nm para as concentrações 1:3, 1:5 e 1:7, respectivamente, o que corrobora com alguns relatos da literatura (Michelon et al., 2012; Aléman et al., 2021).

Nas células Caco-2, os testes foram conduzidos com os lipossomas preparados na proporção 1:3 e 1:5 (EAA:lipídeos). Não houve diminuição significativa na sobrevivência das células após o tratamento com lipossomas contendo EAA em nenhuma das concentrações testadas. Somente na concentração de $600 \mu\text{g/mL}$, a mais alta testada, que o tratamento com lipossomas contendo EAA levou ao aumento de NO em comparação com as demais concentrações testadas na proporção 1:3 (Figura 1). O tratamento com lipossomas contendo extrato não induziu genotoxicidade nem aumento de EROS em nenhuma das concentrações testadas.

MATERIAL E MÉTODOS

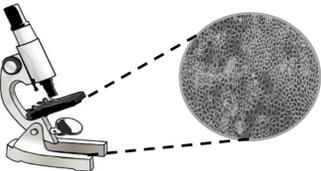
Preparação de lipossomas nas concentrações



- pH (potenciômetro Digimed)
- Diâmetro das partículas e índice de polidispersão (PDI) por meio de espalhamento de luz dinâmica (Zetasizer ZS, Malvern, UK)
- Potencial zeta pela técnica de mobilidade eletroforética (Zetasizer ZS)

Cultura celular

Linhagem Caco-2



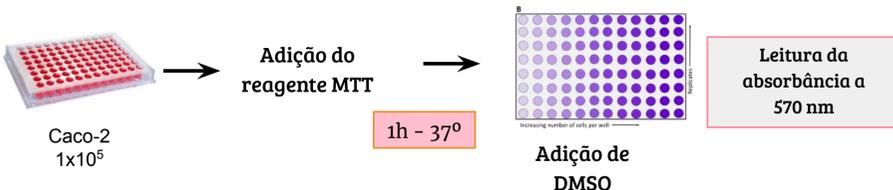
Mantidas em estufa a 37°C e atmosfera umidificada (5% CO₂).

Meio DMEM-LOW suplementado com

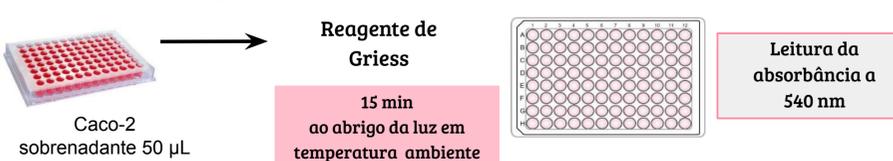
- ❖ 20% soro fetal bovino
- ❖ 1% antibiótico
- ❖ 1% aminoácidos essenciais
- ❖ 1% anfotericina



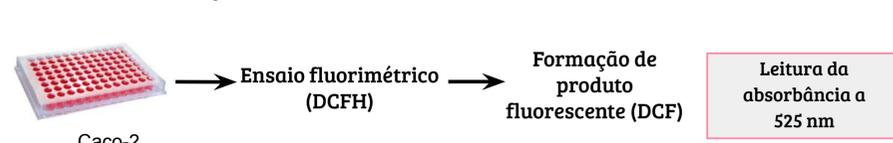
Determinação e viabilidade celular



Determinação de níveis de óxido nítrico (NO)



Determinação de espécies reativas de oxigênio (EROS)



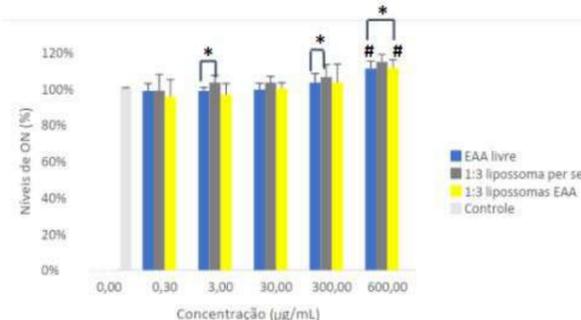
Determinação de genotoxicidade



Tabela 1. Potencial zeta, tamanho de partícula, PDI e pH das formulações de lipossomas per se e lipossomas contendo de extrato de *Araucaria angustifolia*

Extratos	Potencial zeta (mV) (média ± DP)	Tamanho de partícula (nm) (média ± DP)	PDI (média ± DP)	pH (média ± DP)
SEM EXTRATO				
Per se 1:3	$-39 \pm 1,8^a$	$135,6 \pm 6,1^a$	$0,358 \pm 0,02^a$	$4,94 \pm 0,04^{ab}$
Per se 1:5	$-52,7 \pm 0,8^b$	$145 \pm 3,3^a$	$0,280 \pm 0,01^{bc}$	$4,48 \pm 0,39^{ab}$
Per se 1:7	$-57,1 \pm 0,6^b$	$146,4 \pm 3,4^a$	$0,247 \pm 0,00^b$	$4,35 \pm 0,21^a$
COM EXTRATO				
EAA 1:3	$-59,45 \pm 6,7^c$	$279,3 \pm 145,4^b$	$0,393 \pm 0,18^d$	$5,50 \pm 0,49^{abc}$
EAA 1:5	$-60,85 \pm 2,2^c$	$232,55 \pm 75,3^b$	$0,397 \pm 0,07^d$	$5,57 \pm 0,18^{bc}$
EAA 1:7	$-61,6 \pm 3,3^c$	$182,65 \pm 37,0^b$	$0,395 \pm 0,01^d$	$5,72 \pm 0,01^c$

Figura 1. Níveis de óxido nítrico nas células Caco-2 após diferentes tratamentos.



*diferença significativa em comparação com os demais tratamentos na mesma concentração testada pelo pós-teste de Tukey (p 0,05). # diferença significativa entre as concentrações testadas, no mesmo tratamento pelo pós-teste de Tukey (p 0,05).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos até o momento mostram que o nanossistema lipossoma, selecionado para nano vetorizar o EAA é seguro. Na presença de EAA, os lipossomas não apresentam citotoxicidade para a linhagem de células testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMÁN, A.; Pérez-García, S.; Fernández de Palencia, P.; Montero, M.P.; Gómez-Guillén, M.d.C. Physicochemical, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Properties of Rapeseed Lecithin Liposomes Loading a Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed Extract. *Antioxidants* 2021,10, 693. <https://doi.org/10.3390/antiox10050693>

BRANCO CS, Lima ÉD, Rodrigues TS, Scheffel TB, Scola G, Laurino CC, et al. Mitochondria and redox homeostasis as chemotherapeutic targets of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze in human larynx HEp-2 cancer cells. *Chem Biol Interact* 2015;231:108-18

DAI P, Zhu L, Luo F et al. Triple recycling processes impact systemic and local bioavailability of orally administered flavonoids. *The AAPS Journal* 2015;17(3):723-36

MICHELON Fabiane, S. Branco Catia, Calloni Caroline, Giazon Ivana, Agostini Fabiana, K.W. Spada Patricia and Salvador Mirian, *Araucaria Angustifolia*: A Potential Nutraceutical with Antioxidant and Antimutagenic Activities, *Current Nutrition & Food Science* 2012; 8(3) <https://dx.doi.org/10.2174/157340112802651103>