

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
CAMPUS FACULDADE CEILÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE –
PGCTS/UnB

Giovanna Oliveira de Brito

Microencapsulação e nanoencapsulação como estratégias para viabilizar a utilização
de bioativos extraídos da casca de *Spondias mombin* L.

Brasília
2023

Giovanna Oliveira de Brito

Microencapsulação e nanoencapsulação como estratégias para viabilizar a utilização de bioativos extraídos da casca de *Spondias mombin* L.

Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências e Tecnologia em Saúde.

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Eliana Fortes Gris

Brasília

2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48m Oliveira de Brito, Giovanna
Microencapsulação e nanoencapsulação como estratégias para
viabilizar a utilização de bioativos extraídos da casca de
Spondias mombin L. / Giovanna Oliveira de Brito; orientador
Eliana Fortes Gris. -- Brasília, 2023.
124 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias em Saúde)
- Universidade de Brasília, 2023.

1. Taperebá. 2. Cerrado. 3. Compostos fenólicos. 4.
Encapsulação. 5. Melanoma. I. Fortes Gris, Eliana , orient.
II. Título.

Giovanna Oliveira de Brito

Microencapsulação e nanoencapsulação como estratégias para viabilizar a utilização de bioativos extraídos da casca de *Spondias mombin* L.

Local Plataforma Virtual, 31 de janeiro de 2023.



Coordenação do Curso

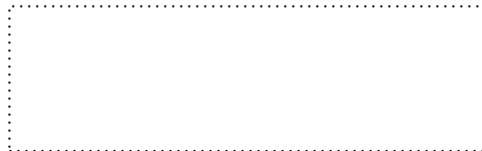
Banca examinadora



Prof.(a) Dr.(a) Eliana Fortes Gris
Orientador(a)



Prof.(a) Dr.(a) Claire Nain Lunardi Gomes
Instituição Universidade de Brasília



Prof.(a) Dr.(a) Leila Denise Falcão
Instituição Membro Externo

Brasília, 2023.

RESUMO

O taperebá é uma fruta do Cerrado, rica em compostos fenólicos com potencial terapêutico. Um desafio para a utilização desses compostos é sua instabilidade bem como a sua baixa biodisponibilidade, sendo a encapsulação uma ferramenta que pode minimizar essas questões. O presente estudo teve como objetivos encapsular compostos fenólicos extraídos da casca do taperebá, através do desenvolvimento de micropartículas (MPs) e de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs), avaliar características e estabilidade das MPs e dos CLNs, bem como a toxicidade *in vitro* dos CLNs em células de melanoma murino. A quantificação dos polifenóis totais (PT) do extrato foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu, e da atividade antioxidante, por DPPH e ABTS. As MPs foram obtidas pelo método de spray drying com quitosana e caracterizadas quanto à eficiência de encapsulação, morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e estabilidade do conteúdo fenólico armazenados em diferentes condições por 60 dias. Os CLNs foram elaborados pela técnica de temperatura de inversão de fase, com e sem análogos naturais de solventes eutéticos profundos (NADES). Os CLNs foram caracterizados quanto a eficiência de encapsulação, propriedades coloidais, morfologia pela microscopia eletrônica de transmissão (MET), análise térmica diferencial (DTA), análise termogravimétrica (TGA), estabilidade coloidal e do conteúdo fenólico em diferentes temperaturas ao longo do tempo. Foi avaliada a viabilidade de células de melanoma com o tratamento de CLNs a partir do método MTT. O extrato obteve a quantidade de PT de ~550 mg EAG/100 g de casca fresca e atividade antioxidante de ~50 μ MTEAC/g e ~100 μ MTEAC/g de casca, para DPPH e ABTS. A microencapsulação obteve eficiência de 55,4%, além de melhor estabilidade térmica, quando comparado ao extrato liofilizado. A nanoencapsulação obteve eficiência de ~85%. Os CLNs apresentaram valores de PDI, tamanho e potencial Zeta adequados para uma formulação mais estável, sendo que sem NADES mostraram morfologia mais organizada comparadas aos com NADES. O DTA demonstrou possível encapsulamento do extrato, enquanto o TGA evidenciou a maior estabilidade térmica dos CLNs com extrato, comparado ao extrato liofilizado. Os CLNs demonstraram uma boa estabilidade coloidal após 60 dias em temperatura ambiente e estressante. Os valores verificados de retenção de PT nos CLNs com NADES foram considerados altos, com melhor retenção nas temperaturas ambiente e refrigerada após 60 dias. Os CLNs sem NADES apresentaram menor estabilidade dos PT após congelamento e temperatura estressante. Os CLNs com extrato e sem o NADES apresentaram atividade citotóxica para B16-F10 e menor toxicidade em células não tumorais.

Palavras-chave: Taperepá; Cerrado; Compostos fenólicos; Nanoencapsulação; Microencapsulação; Melanoma.

ABSTRACT

Taperebá is a cerrado fruit, rich in phenolic compounds with therapeutic potential. A challenge for using these compounds is their instability as well as their low bioavailability, and encapsulation is a tool that can minimize these issues. The present study aimed to encapsulate phenolic compounds extracted from Taperebá peel, through the development of microparticles (MPs) and nanostructured lipid carriers (PLNs), evaluate characteristics and stability of MPs and CLNs, as well as the in vitro toxicity of the CLNs in Murino melanoma cells. The quantification of total polyphenols (PT) of the extract was performed by the Folin-Ciocalteu method, and antioxidant activity, by DPPH and ABTs. The MPs were obtained by the chitosan spray drying method and characterized on encapsulation efficiency, scanning electronic microscopy (SME) morphology, and phenolic content stability stored in different conditions for 60 days. The CLNs were elaborated by the phase reversal temperature technique, with and without natural analog deep eutentic solvents (NADES). CLNs were characterized regarding encapsulation efficiency, colloidal properties, morphology by electronic transmission microscopy (MET), differential thermal analysis (DTA), thermogravimetric analysis (TGA), colloidal stability and phenolic content at different temperatures over time. The feasibility of melanoma cells with the treatment of CLNs from the MTT method was evaluated. The extract obtained the amount of PT of ~ 550 mg EAG/100 g of fresh bark and antioxidant activity of ~ 50 $\mu\text{mteac/g}$ and ~ 100 $\mu\text{mteac/g}$ of bark, for DPPH and ABTs. Microencapsulation obtained efficiency of 55.4%, as well as better thermal stability compared to the lyophilized extract. Nanoencapsulation obtained ~ 85% efficiency. The CLNs presented PDI values, size, and zeta potential suitable for a more stable formulation, and without NADES showed more organized morphology compared to with NADES. DTA demonstrated possible extract encapsulation, while TGA showed the largest thermal stability of the CLNs with extract compared to the lyophilized extract. The CLNs demonstrated good colloidal stability after 60 days at room and stressful temperature. The verified values of PT retention in the CLNs with NADES were considered high, with better retention in ambient temperatures and refrigerated after 60 days. The CLNs without NADES showed lower PT stability after freezing and stressful temperature. CLNS with extract and without the Nades had cytotoxic activity for B16-F10 and less toxicity in non-tumor cells.

Keywords: Taperebá; Cerrado; Phenolic compounds; Nanoencapsulation; Microencapsulation; Melanoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens do fruto taperebá.	20
Figura 2 - Estrutura química básica (fenol) e estrutura química de alguns representantes dos ácidos fenólicos.	24
Figura 3 - Estrutura química dos taninos hidrolisáveis.	25
Figura 4 - Estrutura dos representantes de estilbenos: resveratrol nas configurações <i>cis</i> e <i>trans</i>	25
Figura 5 - Estrutura química dos flavonoides.	26
Figura 6 - Fluxograma das principais ramificações da biossíntese de polifenóis.	27
Figura 7 - Mecanismos de ação antioxidante dos compostos fenólicos: eliminação de radicais livres (reações 1-3).	28
Figura 8 - Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura em um aumento de 5.500 vezes para as MPs contendo extrato de casca de taperebá.	57
Figura 9 - Teor total de polifenóis das amostras submetidas a diferentes temperaturas ao longo de 60 dias.	58
Figura 10 - Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para o extrato de casca de taperebá encapsulado nos CLNs.	67
Figura 11 - Curvas da análise térmica diferencial (DTA).	69
Figura 12 - Curvas termogravimétricas obtidas para os diferentes materiais e formulações.	70
Figura 13 - Comparação entre a temperatura do evento endotérmico (pico 2 na figura 7) e o início da degradação demonstrado na análise termogravimétrica (TGA), para a manteiga de murumuru e as diferentes formulações.	75
Figura 14 - Índice de polidispersão (PDI) referente a cada formulação armazenada em condições de temperatura diferentes, ao longo de 30 dias.	76
Figura 15 - Tamanho do diâmetro hidrodinâmico (DH) da nanopartícula referente a cada formulação armazenada em condições de temperatura diferentes, ao longo de 30 dias.	79
Figura 16 - Representação da concentração dos polifenóis totais (%) nanoencapsulados e armazenados em condições de temperatura diferentes.	86
Figura 17 - Citotoxicidade dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) para células de melanoma B16-F10.	90

Figura 18 - Citotoxicidade dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) para células de fibroblastos L929.....	93
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resumo dos diferentes tipos de DES com fórmulas gerais e exemplos. 36

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Formulações escolhidas e formulações utilizadas para demais avaliações.	50
Esquema 2 - Formulações e materiais utilizados em cada análise.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das formulações para o preparo dos carreadores lipídicos nanoesturados (CLNs) pela técnica de temperatura de inversão de fase (PIT) em diferentes proporções de lipídios.....	47
Tabela 2 - Composição das formulações para o preparo dos carreadores lipídicos nanoesturados (CLNs) pela técnica de temperatura de inversão de fase (PIT) em diferentes proporções de surfactante.	48
Tabela 3 - Formulações contendo diferentes concentrações de extrato após concentração em rotaevaporador.....	48
Tabela 4 - Formulações com diferentes volumes de NADES contendo extrato após concentração em rotaevaporador.....	49
Tabela 5 - Características coloidais das formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) com diferentes proporções de lipídios, relacionadas ao índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico (DH).	61
Tabela 6 - Alterações macroscópicas identificadas nas formulações.	61
Tabela 7 - Características coloidais das formulações de CLN com diferentes proporções de surfactante, relacionadas ao índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico (nm).....	62
Tabela 8 - Características coloidais das formulações de CLN com diferentes proporções de extrato, relacionadas ao índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico (DH).	63
Tabela 9 - Características coloidais das formulações de CLN com diferentes quantidades de extrato e NADES, relacionadas ao índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico (DH).....	63
Tabela 10 - Índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico (nm) das formulações BRA, BCN, ESN e ECN elaboradas em diferentes temperaturas.....	64
Tabela 11 - Índice de polidispersão (PDI), diâmetro hidrodinâmico (DH), potencial zeta (PZ), polifenóis totais (PT), eficiência de encapsulamento (EE%) das formulações de CLNs.	65
Tabela 12 - Temperaturas de início e de fim dos picos térmicos identificados pela análise térmica diferencial (DTA) e entalpia gerada nos eventos térmicos da manteiga de murumuru e diferentes formulações.....	70

Tabela 13 - Faixa de temperatura das etapas observadas nos gráficos da análise termogravimétrica (TGA) e perda de massa (%) de cada material ou formulação....	71
Tabela 14 - Valores da carga de superfície (potencial zeta) e pH dos CLNs referente a cada formulação armazenada em condições de temperatura diferentes, ao longo de 30 dias.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Dia2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid) diammonium salt
ACTH	Adrenocorticotrofina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATCC	American Type Culture Collection
B16-F10	Células de melanoma murino
BCN	CLN com manteiga, surfactante, óleo de buriti e NADES
BRA	CLN com manteiga, surfactante e óleo de buriti
BSB	CLN com manteiga e surfactante
CLNs	Carreadores lipídicos nanoestruturados
Cox-2	Ciclooxigenase-2
CPAC	Embrapa Cerrados
CREB	Ligação de proteína
DES	Solventes eutéticos profundos
DH	Diametro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSC	Calorimetria de varredura diferencial
EAG	Equivalente de ácido gálico
ECN	CLN com extrato sem NADES
EE	Eficiência de nanoencapsulação
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESN	CLN com extrato dissolvido no NADES
FBS	Soro fetal bovino
FDA	Food and Drug Administration
HBA	Aceptores de ligação de hidrogênio
HBD	Doadores de ligações de hidrogênio
ILs	Líquidos iônicos
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível

L929	Fibroblasto murino
MC1R	Melanocortina-1 acoplado à proteína G
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
MITF	Mediada do fator de transcrição microftalmia
MM	Melanoma
MSHs	Hormônios estimuladores de melanócitos
MTT	Brometo de 3-(4,5dimetiltiazol2il)-2,5-difeniltetrazólio
NADES	Análogos naturais de solventes eutéticos
NF-kB	Fosforiladas do fator nuclear kappa B
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
NMM	Não melanoma
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX	NADPH Oxidase
NPs	Nanopartículas
PAL	Enzima fenilalanina amônia-liase
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDI	Índice de polidispersão
PEP	Fosfoenolpiruvato
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIT	Temperatura de inversão de fase
POMC	Pró-opiomelanocortina
PT	Polifenóis totais
PZ	Potencial zeta
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TGA	Análise termogravimétrica
UV	Raios ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
α -MSH	Alfa-melanócitos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	CERRADO.....	18
2.2	REVISÃO TAPEREBÁ (<i>SPONDIAS MOMBIN L.</i>).....	18
2.3	BIOATIVOS	21
2.4	BIOATIVOS PRESENTES EM SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA.....	22
2.5	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	23
2.5.1	Compostos fenólicos: ação sobre células cancerígenas	29
2.6	MICRO E NANOENCAPSULAMENTO COMO ESTRATÉGIAS PARA A UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	31
2.6.1	Encapsulação de bioativos extraídos de alimentos	31
2.7	MICROENCAPSULAÇÃO	32
2.8	NANOENCAPSULAÇÃO.....	33
2.9	ANÁLOGOS NATURAIS DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (NADES).....	36
2.10	MELANOMA	38
3	OBJETIVOS	42
3.1	OBJETIVO GERAL.....	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	MATERIAIS	43
4.2	AMOSTRAS	43
4.3	ELABORAÇÃO DO ANÁLOGO NATURAL DE SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO (NADES)	44
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE CASCA DE TAPEREBÁ.....	44
4.5	OBTENÇÃO DA MICROPARTÍCULA (MP) DE QUITOSANA CONTENDO EXTRATO DE TAPEREBÁ.....	45
4.5.1	Caracterização das micropartículas (MPs) contendo extrato de taperebá	45
4.5.1.1	<i>Eficiência de encapsulação das micropartículas (MPs)</i>	45
4.5.1.2	<i>Morfologia das Micropartículas (MPs)</i>	46

4.5.2	Estudo de estabilidade das micropartículas (MPs)	46
4.6	OBTENÇÃO DO CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO (CLN)	46
4.6.1	Formulações de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs) a partir de análise das variáveis em diferentes proporções	46
4.6.2	Caracterização dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs)	50
4.6.2.1	<i>Eficiência da encapsulação das nanopartículas (NPs)</i>	50
4.6.2.2	<i>Avaliação de propriedades coloidais</i>	51
4.6.2.3	<i>Morfologia das Nanopartículas (NPs)</i>	51
4.6.2.4	<i>Calorimetria de varredura diferencial (DSC) e Análise termogravimétrica (TGA)</i>	51
4.6.2.5	<i>Estudo da estabilidade coloidal das formulações</i>	52
4.6.3	Estudo da estabilidade dos polifenóis totais contidos nos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs)	52
4.6.4	Viabilidade de células de melanoma (B16-F10) e fibroblastos (L929) ...	53
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE CASCA DE TAPEREBÁ	55
5.2	MICROENCAPSULAÇÃO DO EXTRATO DA CASCA DE TAPEREBÁ	56
5.2.1	Caracterização de micropartículas (MPs) de quitosana contendo extrato de taperebá	56
5.2.2	Ensaio de estabilidade Polifenóis Totais nas Micropartículas (MPs)	57
5.3	FORMULAÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO (CLN) A PARTIR DE ANÁLISE DAS VARIÁVEIS EM DIFERENTES PROPORÇÕES	60
5.4	CARACTERIZAÇÃO DO CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO (CLN)	65
5.4.1	Características coloidais	65
5.4.2	Morfologia das Nanopartículas (NPs)	67
5.4.3	Análise térmica diferencial (DTA) e Análise termogravimétrica (TGA) ..	68
5.4.4	Estudo da estabilidade coloidal das formulações	75
5.4.5	Ensaio de estabilidade dos Polifenóis Totais nos careadores lipídicos nanoestruturados (CLNs)	85
5.5	VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MELANOMA (B16-F10)	89
6	CONCLUSÃO	97

REFERÊNCIAS	100
ANEXO A: ARTIGO PUBLICADO	121

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é um importante bioma brasileiro, onde se encontra uma grande variedade vegetal (1), que o torna um dos hotspots mundiais de biodiversidade (2). Essa variedade de espécies vegetais dá ao Cerrado maiores possibilidades de plantas de interesse medicinal. Além disso, por causa de suas características climáticas, como altas temperaturas, períodos de estiagem e alta radiação ultravioleta, como também as características atribuídas pela sua localização, como deficiência de nutrientes no solo e alta incidência de incêndios, muitas espécies desse bioma começaram a apresentar estratégias para a proteção ao decorrer do processo evolutivo, sendo uma delas a maior expressão de componentes bioativos, principalmente compostos fenólicos (3,4).

Dessa forma, muitos frutos provenientes do Cerrado podem apresentar expressão de metabólitos secundários com diversas estruturas e alta quantidade (4–6). Dentre elas, o taperebá (*Spondias mombin* L.), também chamado de cajá, cajá-mirim, entre outros (7), já é descrito na literatura como detentor de atividade biológica, como atividade de proteção gástrica em ratos (8) e atividade citotóxica em células de câncer de ovário (9).

Suas atividades biológicas estão relacionadas aos compostos fenólicos presentes tanto na polpa (10) quanto nas cascas desses frutos (5), que são uns dos mais comuns e principais bioativos produzidos pelas plantas (11). O fruto do taperebá pode ser consumido in natura ou utilizados em produtos processados, porém a polpa é a parte da fruta utilizada nesses processos (12), tornando a casca um subproduto do processamento, que acaba sendo um desperdício, já que esse material possui bioativos presentes em sua composição (5).

Os metabólitos secundários produzidos por esses vegetais podem ter ação contra patógenos, predadores e proteção contra raios ultravioleta (13,14). Tais compostos possuem propriedades antioxidantes, que estão relacionadas à prevenção de doenças desencadeadas pelo estresse oxidativo e, em razão disso, têm sido amplamente investigados para aplicações relacionadas a benefícios a saúde (14).

A ação biológica dos polifenóis totais depende da biodisponibilidade que essas substâncias conseguem atingir em sistemas biológicos, que pode ser um desafio, levando em consideração a instabilidade no suco gástrico, a má absorção no intestino e a instabilidade no período de armazenamento (15,16). Para viabilizar a

chegada desses bioativos ao local de ação, técnicas de encapsulamento podem ser utilizadas (17), tendo como função o aumento da permeabilidade (18) e a proteção contra fatores externos, como luz, umidade e temperatura (19).

Dentre essas tecnologias destacam-se a microencapsulação e a nanoencapsulação, que vão se diferenciar entre si principalmente pelo tamanho, em que as micropartículas (MPs) vão variar de tamanho de um micron até alguns milímetros (20), e as nanopartículas (NPs), que podem ter até 100 nm (21). Tanto as MPs quanto as NPs podem apresentar diferentes aplicações a depender do tamanho e das características de superfície (22).

As novas tecnologias associadas a encapsulação lançam mão de ferramentas cada vez mais ambientalmente corretas, que tenham alta compatibilidade biológica e que sejam biodegradáveis. Dessa forma, os materiais escolhidos para a encapsulação podem agregar na formulação de partículas menos tóxicas que não agridam o meio ambiente (23).

Nesse contexto, os análogos naturais de solventes eutéticos profundos (NADES) foram criados com a proposta de substituir solventes tóxicos (24). Por conta de suas propriedades crioprotetoras (25,26) e pela capacidade de dissolução de extratos naturais (26), esse solvente pode ser interessante na formulação de partículas para entrega de fármacos.

Dessa maneira, cria-se um ambiente favorável à encapsulação de compostos fenólicos extraídos de um subproduto industrial, com tecnologias inovadoras associadas, como a adição do NADES, para a construção de uma formulação com capacidade de crioproteção, dessa forma as NPs poderiam ser congeladas e após isso liofilizadas, aumentando a possibilidade de futuras aplicações. Além dessa característica, também pode ser explorada sua capacidade de dissolução de extratos naturais, para a facilitar a utilização desses extratos em possíveis aplicações na saúde, incluindo tratamentos de doenças como o câncer.

O câncer é considerado uma doença com alta incidência no Brasil, sendo o de pele o mais frequente (30%). Dentre os tipos de câncer de pele, o melanoma tem apenas 3% de incidência, porém, pode apresentar um prognóstico ruim, caso não seja descoberto no início, com chance de metástase (27). Sua fisiopatologia abrange muitos mecanismos, sendo a criação de espécies reativas de nitrogênio um deles (28). Portanto, o uso de compostos fenólicos encapsulados para o tratamento desse tipo de câncer poderia ser eficaz, visto que, os polifenóis possuem efeitos antioxidantes e

já demonstraram efeitos inibitórios sobre outros tipos de células de câncer *in vitro* (29–31).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CERRADO

O Cerrado é o segundo principal bioma brasileiro, que demonstra uma grande diversidade de plantas. Localizado no centro-oeste, abrangendo quase dois milhões de quilômetros quadrados, que cobrem aproximadamente 21% do território do país (1). A biodiversidade encontrada no Cerrado é considerada uma das 25 maiores do mundo, sendo a formação de savana com maior diversidade vegetal que abriga mais de 12 mil espécies, dentre elas, 44% consideradas endêmicas (3).

Essas características conferem ao Cerrado o título de ser um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade desde 2000. Esse termo é utilizado para caracterizar regiões que possuem muitas espécies endêmicas e perderam pelo menos 70% do seu habitat natural (2). Muitas de suas espécies de plantas são fonte de substâncias que podem ser utilizadas no aumento da funcionalidade de alimentos e para pesquisa de novos medicamentos (3).

Essas substâncias são chamadas de bioativos, que estão presentes na natureza e podem ser utilizados na promoção de saúde e bem-estar (32). A produção desses compostos ativos em plantas do Cerrado pode estar envolvida no processo adaptativo ao decorrer do tempo para proteção relacionada a diversos fatores como altas temperaturas, falta de água durante grandes períodos, ocorrência frequente de incêndios, alta incidência de radiação ultravioleta, falta de nutrientes no solo, ataques de insetos e micro-organismos patogênicos (3,4). Por esta razão, há uma maior expressão de bioativos, principalmente compostos fenólicos. Diversos estudos sobre frutos advindos desse bioma têm demonstrado interesse na atividade biológica desses metabólitos secundários (4,6).

2.2 REVISÃO TAPEREBÁ (*SPONDIAS MOMBIN* L.)

O taperebá (*Spondias mombin* L.) é pertencente ao gênero *Spondias* e à família *Anacardiaceae*. Essa família compreende 70 gêneros e 600 espécies em regiões pertencentes aos trópicos e subtropicais, se estendendo à zona temperada. O gênero *Spondias* abrange 18 espécies distintas (7).

O extrato aquoso de folhas de *Spondias mombin* L. demonstrou diminuição da ulceração causada por indometacina em ratos, mesmo não apresentando maior eficácia do que o tratamento padrão, sendo o efeito protetor gástrico e antioxidante determinados após a administração oral do extrato provavelmente relacionados à presença de compostos fenólicos (33). Além disso, outro estudo com ratos revelou o poder antioxidante e hepatoprotetor do taperebá (34). O extrato da casca da árvore de *Spondias dulcis* demonstrou um efeito preventivo a danos de DNA em camundongos (35). Também foi relatado controle metabólico associado ao estresse oxidativo em camundongos obesos a partir da administração do extrato da casca da árvore de *Spondias purpurea* L (36).

Na cultura popular, várias plantas desse gênero são utilizadas para tratamento de enfermidades. Em Bangladesh, a fruta *Spondias dulcis* é utilizada para tratamento de infecções oculares (37), já no nordeste brasileiro, as folhas e a casca da árvore de *Spondias tuberosa* é utilizada para tratamento de tosse, como cicatrizante e calmante (38). Na Nigéria, a decocção da casca de *Spondias mombin* é utilizada como antiemético, antidiarreico, para disenterias e hemorroidas, e o suco da fruta utilizado como diurético e antipirético (39).

O *Spondias mombin* L. tem diversos nomes populares no Brasil, a depender da Unidade da Federação, como cajá, taperebá, taperebá-de-anta, cajá-da-mata, acaiá, caiá, cajá-miúdo, taberibá, cajarana, cajá-mirim e cajá-pequeno. Internacionalmente os nomes são ubos, na Bolívia e Peru; ciruelo hobo, na Colômbia; hobo, no Equador; jobo, no México; ciruelo de hueso, na Venezuela. As infrutescências podem ter até 30 cm, apresentando drupas ovóides de três a seis cm, com o pericarpo glabro e liso externamente. As árvores podem chegar à 30 m com tronco de 120 cm de diâmetro à altura do peito (7). Os frutos de *Spondias mombin* L. estão representados na figura 1 e podem ser consumidos *in natura* e sua polpa pode ser utilizada em alimentos processados como sucos, sorvetes, entre outros (12).

Figura 1 - Imagens do fruto taperebá.



Fonte – Imagem autoral.

A quantificação de polifenóis totais da polpa seca de taperebá demonstrado por Bataglioni *et al.* (10), foi maior do que o encontrado na polpa seca do açai-do-Amazonas (*Euterpe precatória*) (40). Lucena *et al.* (34) identificaram no fruto (polpa e casca) diversos bioativos como compostos fenólicos, fibras, frutanos, carotenóides, ácido ascórbico e minerais, não sendo possível diferenciar o que seria pertencente à polpa e o que seria da casca. No mesmo estudo identificaram a ação do consumo do taperebá em ratos, que induziu um efeito redutor de glicose e colesterol séricos, reduziu o acúmulo de lipídios no fígado protegendo-o de danos oxidativos consequentes de uma dieta com alto teor de gordura. Em seu trabalho, Brito *et al.* (5) caracterizaram os compostos fenólicos presentes nas cascas do taperebá do Cerrado, sendo que o ácido elágico, ácido gálico, quercetina e o *cis*-Piceid foram os mais abundantes.

Já é descrito na literatura a relação entre os bioativos presentes no taperebá e sua atividade biológica. Um estudo verificou que suco deste fruto foi eficaz na aceleração do processo de epitelização da parede gástrica de ratos, demonstrando um enorme potencial como um alimento funcional (8).

Outro trabalho demonstrou o potencial anti-inflamatório do extrato da folha de *Spondias mombin* em modelo de peritonite induzida por carragenina, demonstrando

que o ácido clorogênico e o ácido elágico, que são compostos fenólicos identificados no extrato, contribuíram para a ação farmacológica (41).

O extrato da polpa de taperebá e de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.)) provenientes da Amazônia foram capazes de produzir efeitos citotóxicos em células cancerígenas do ovário em um estudo realizado *in vitro*, no qual a atividade dos extratos contendo os bioativos nas linhagens de célula de câncer levou à parada do ciclo celular e apoptose (9).

2.3 BIOATIVOS

Por definição, um composto bioativo ocorre na natureza fazendo parte da cadeia alimentar, sendo essencial (vitaminas) ou não essencial (compostos fenólicos, por exemplo)(42). Segundo a RDC nº 243, de 2018, podem possuir ação metabólica ou fisiológica no organismo humano (43). Os compostos bioativos podem ser adquiridos essencialmente através da ingestão de alimentos ricos nesse tipo de substância.

Suas diferentes estruturas químicas estão distribuídas em diversas fontes naturais e faixas de concentração, podendo exercer diferentes atividades biológicas (11,14,32,44,45). Um dos grupos também chamados de bioativos dos compostos fenólicos, podem ser considerados um dos mais comuns grupos de bioativos presentes nas plantas, possuindo algumas propriedades biológicas (11,14), que serão discutidas mais a fundo na seção “2.5.”.

A ação desses biocompostos depende da sua biodisponibilidade, que é a característica relacionada à capacidade de atingir a circulação sistêmica, alcançando órgãos e tecidos, para a manifestação da atividade biológica. Dessa forma, é necessário levar em consideração que apesar da presença de bioativos em alimentos em alta concentração, muitos deles possuem uma baixa biodisponibilidade quando ingeridos, fazendo com que sua atividade seja diminuída. Compostos como polifenóis, fitoesteróis e algumas vitaminas podem apresentar biodisponibilidade abaixo de 10% pela via oral (46).

A baixa biodisponibilidade está relacionada à baixa estabilidade no fluido gastrointestinal e má absorção intestinal, demonstrando a necessidade da incorporação de bioativos em sistemas de entrega de fármacos como nanoemulsões,

microemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), entre outros (46). Além disso, alguns estudos têm abordado diferentes vias de administração para estes compostos encapsulados, que não a via oral. Por exemplo, o trabalho de Trapani et al. (47) desenvolveu a encapsulação de compostos fenólicos do extrato da semente de uva (*Vitis* sp.) juntamente ao neurotransmissor dopamina em NLS como uma proposta para tratamento da doença de Parkinson pela via intranasal, porém essa fase de testes foi feita apenas *in vitro*.

Outro estudo abordou a farmacocinética de compostos fenólicos extraídos *Erigeron breviscapus* em voluntários chineses saudáveis, demonstrando tolerabilidade na administração intravenosa. Esse extrato já é utilizado para tratamento de doenças cardiovasculares, portanto o resultado do estudo apresenta uma via alternativa para administração desses polifenóis (48).

Já relacionado ao efeito terapêutico, as características físico-químicas, como peso molecular, lipofilicidade e interação com receptores e transportadores, são muito relevantes. A elevada interação com receptores e transportadores, como ligações de hidrogênio, determinam um alto efeito terapêutico para uma biomolécula (46,49).

Alimentos que apresentam compostos bioativos e contém efeito benéfico à saúde são classificados como alimentos bioeficientes, fornecendo suporte básico às funções do corpo (potencialmente nutricional) e contribuindo para a manutenção da saúde humana (potencial biológico)(46). A aplicabilidade desses bioativos pode ser relacionada a melhora da qualidade de alimentos convencionais, a produção de alimentos funcionais e nutracêuticos, entre outros (11).

2.4 BIOATIVOS PRESENTES EM SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA

Compostos bioativos têm sido identificados em resíduos agrícolas, como bagaço de cana, casca de milho, casca de amendoim, casca de cereja e farelo de arroz, e subprodutos da indústria agroalimentar, como frutas e legumes degomados, borra de café, soro de leite, borra de lã, suco, açúcares, entre outros (32).

Esses resíduos, ou subprodutos, despertaram o interesse de cientistas e da indústria, no sentido de buscar novas tecnologias para o reaproveitamento desses materiais, de forma a diminuir o desperdício e acrescentar valor funcional a outros produtos (11,32,50). Desse modo, muitos estudos já relatam a utilização de

compostos bioativos extraídos de resíduos industriais e agrícolas para diversas aplicações (11), como: enriquecimento de iogurtes com casca de camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh) e extrato do epicarpo da romã (*Punica granatum* L.) como um corante natural para confeitaria com propriedades antioxidantes (51).

Como bioativos provenientes de plantas podem ter diversas propriedades biológicas, é grande o interesse em pesquisas relacionadas à utilização de resíduos agroindustriais ou subprodutos dessas indústrias para fins terapêuticos, pois contribui para a utilização sustentável dos recursos naturais (11).

2.5 COMPOSTOS FENÓLICOS

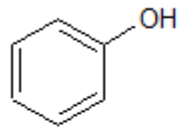
Os compostos fenólicos são um dos principais e mais comuns grupos de bioativos produzidos pelas plantas, de grande interesse devido às suas propriedades biológicas (11,14). Essas substâncias têm como característica estrutural o acoplamento de um ou mais anéis aromáticos a um ou mais grupos hidroxila, podendo variar de fenólicos simples como os ácidos fenólicos, aos compostos mais complexos como os taninos. Para as plantas, essas estruturas participam da defesa contra patógenos e outros predadores, e protegem contra raios ultravioletas (UV) (13,14). Além disso, dão apoio a funções biológicas fundamentais como fotossíntese, suporte estrutural, transporte e adesão ao oxigênio (52).

Em razão de suas propriedades antioxidantes, e do seu papel relacionado à prevenção de condições desencadeadas pelo estresse oxidativo, os polifenóis têm sido investigados para diversas aplicações. Além da atividade antioxidante, essas moléculas podem influenciar o funcionamento de diversas enzimas e de receptores celulares, sendo outro tipo de mecanismo de ação estudado (14).

Geralmente, os compostos fenólicos são encontrados na forma de ésteres ou de heterosídeos, não na forma livre. Sua forma conjugada é usualmente ligada à açúcares, sendo a glicose o mais comum. As ligações são formadas a partir de grupos -OH (O-glicosídeos) e ligações carbono-carbono (C-glicosídeos), o que altera a solubilidade desses compostos (53).

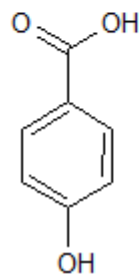
Figura 2 - Estrutura química básica (fenol) e estrutura química de alguns representantes dos ácidos fenólicos.

1. Estrutura básica

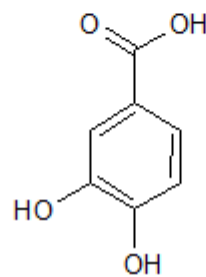


Fenol

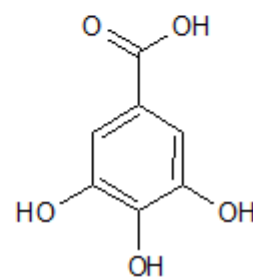
2. Ácidos fenólicos



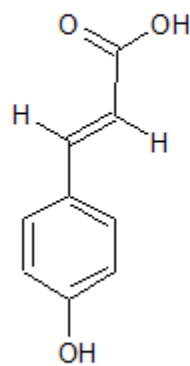
Ácido 4-hidroxibenzóico



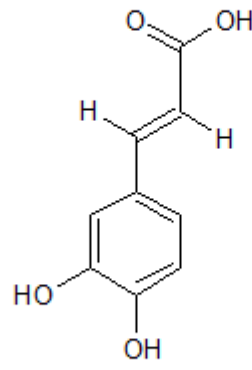
Ácido protocatecuico



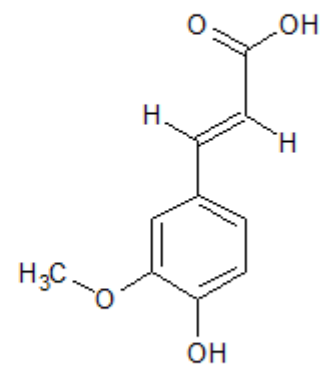
Ácido gálico



Ácido p-cumárico



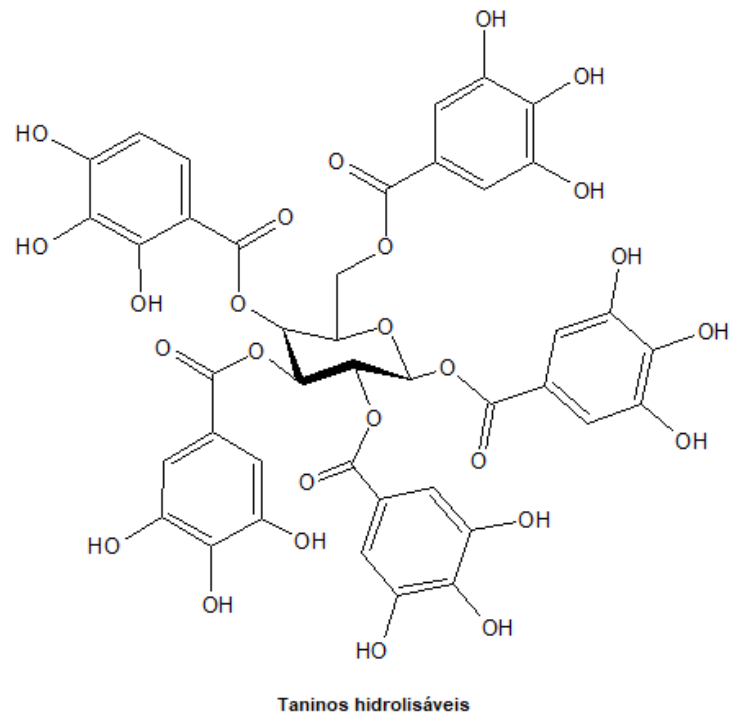
Ácido cafeico



Ácido ferúlico

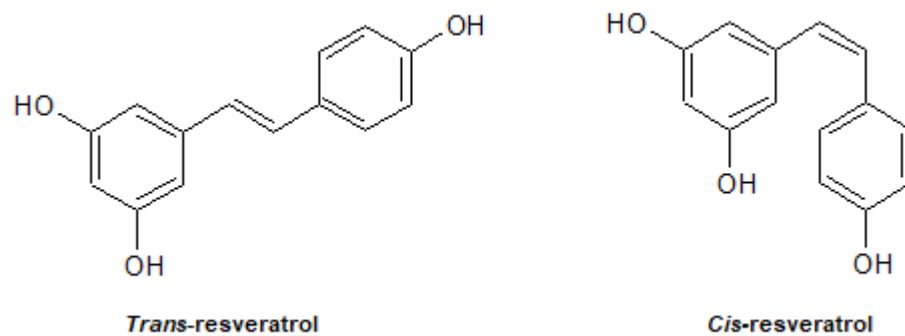
Fonte – Adaptado de Magalhães e Santos (54).

Figura 3 - Estrutura química dos taninos hidrolisáveis.



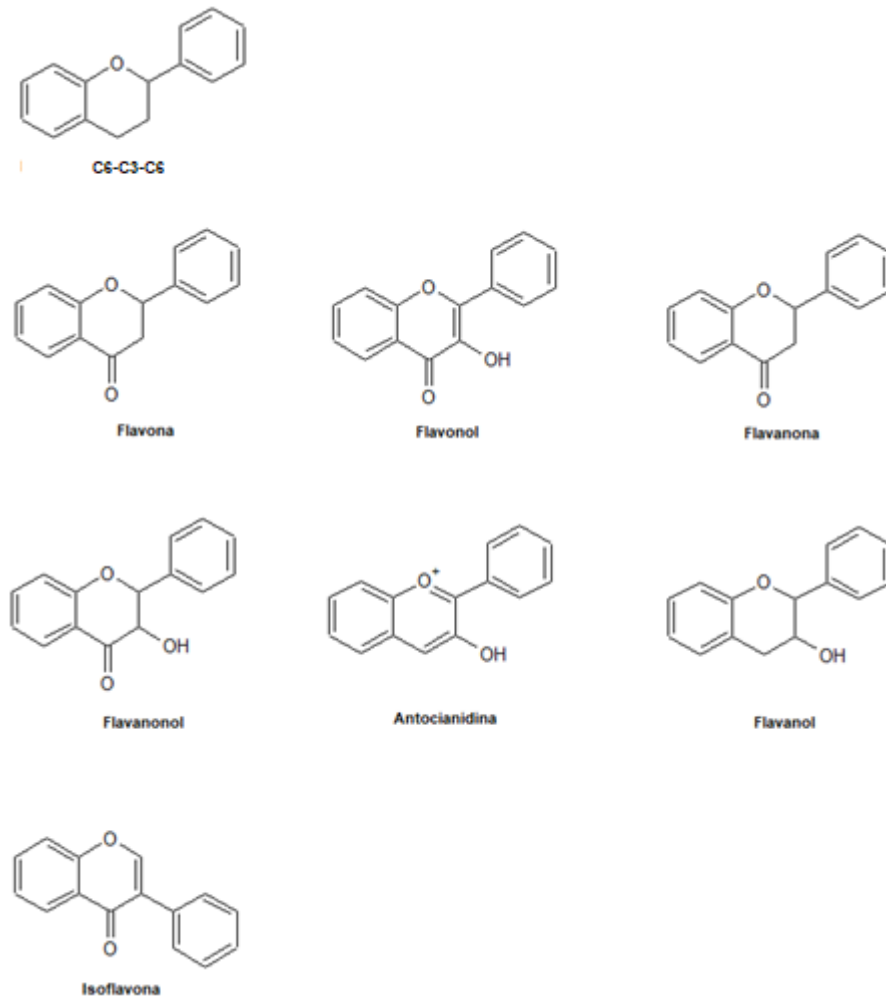
Fonte – Adaptado de Pereira e Angelis-Pereira (55).

Figura 4 - Estrutura dos representantes de estilbenos: resveratrol nas configurações *cis* e *trans*.



Fonte – Adaptado de Pereira e Angelis-Pereira (55).

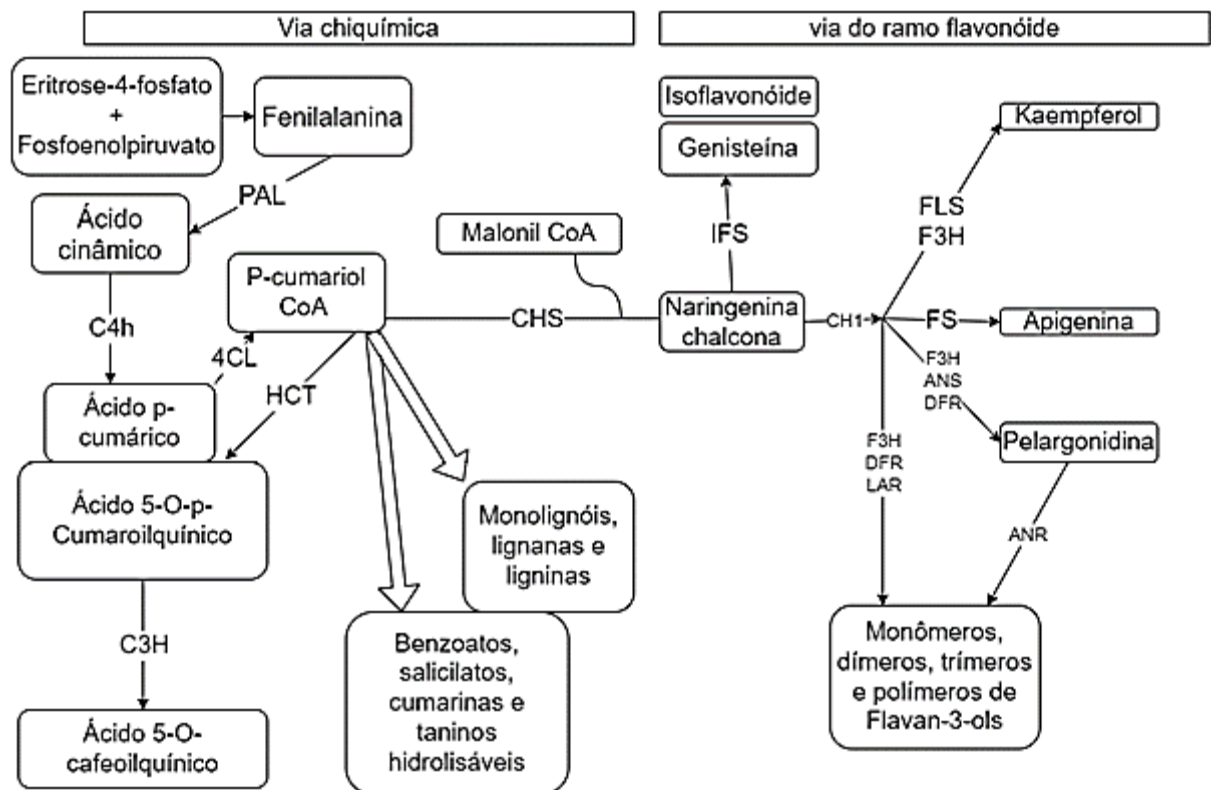
Figura 5 - Estrutura química dos flavonoides.



Fonte – Adaptado de Magalhães e Santos (54).

A parte da molécula que corresponde ao composto fenólico é chamada de aglicona, sendo dividida entre flavonoides e não flavonoides. Os não flavonoides são formados por um ou dois anéis aromáticos, classificados como ácidos fenólicos e (figura 2), taninos hidrolisáveis (figura 3) e estilbenos (figura 4) (13). Já os flavonoides são formados por 15 carbonos e subdivididos em vários grupos: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanas, flavanonóis e antocianidinas (figura 5)(54).

Figura 6 - Fluxograma das principais ramificações da biossíntese de polifenóis.



Legenda - PAL, fenilalanina amônia-liase; C4H, cinamato-4-hidroxilase; 4CL, 4-cumaroil:CoA-ligase; HCT, hidroxicinamoil transferase; C3H, p-cumarato-3-hidroxilase; CHS, chalcona sintase; CHI, chalcona isomerase; ANS, antocianidina sintase; DFR, dihidroflavonol redutase; FS, flavona sintase; FLS, flavonol sintase; F3H, flavanona 3-hidroxilase; IFS, isoflavona sintase; ANR, antocianidina redutase; LAR, leucoantocianidina redutase.

Fonte - adaptado de Cheynier *et al.* (56).

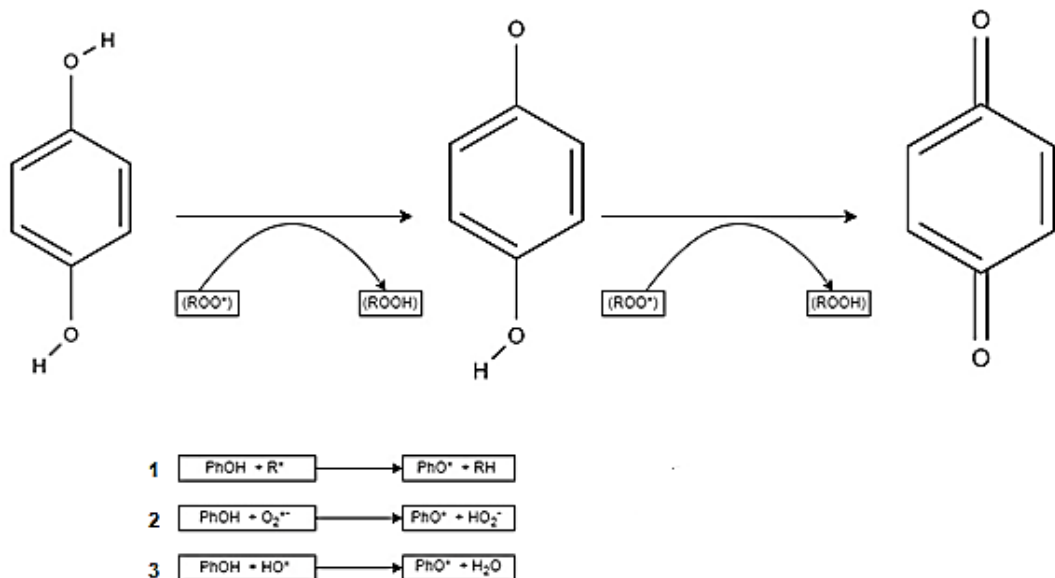
A figura 6 representa, de forma resumida, a biossíntese dos compostos fenólicos. A síntese de compostos fenólicos provenientes de plantas acontece de forma biogenética, através da via de chiquimato/fenilpropanóide, já a via de mevalonato gera terpenóides. Na via do chiquimato/fenilpropanóide, a eritrose 4-fosfato é combinada com fosfoenolpiruvato (PEP) para formar a fenilalanina. Em seguida, a enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) faz a conversão de fenilalanina em ácido cinâmico a partir de uma catálise. A partir dessa via, diversos compostos fenólicos são formados (56).

A estabilidade dos compostos fenólicos pode variar a depender de sua estrutura e distribuição nas plantas. Enquanto alguns polifenóis são considerados

estáveis, outros são mais suscetíveis à oxidação, alterações relacionadas à temperatura e variação da volatilidade (14).

A estrutura primária desse composto é um anel fenólico contendo um grupo hidroxila. A parte fenólica tem caráter hidrofóbico, e o grupo hidroxila tem caráter hidrofílico, com capacidade de doar ou de aceitar ligações de hidrogênio, podendo também quelar metais quando existem grupos hidroxila adjacentes em um anel fenólico. A absorção de raios ultravioleta de alguns dos polifenóis, em torno de 270 a 320 nm, confere a esses característica de proteção contra raios solares (57). Tais propriedades atribuem a muitos polifenóis uma alta instabilidade, podendo comprometer suas atividades biológicas (58), porém as mesmas propriedades podem ser responsáveis pelo poder antioxidante.

Figura 7 - Mecanismos de ação antioxidante dos compostos fenólicos: eliminação de radicais livres (reações 1-3).



Fonte - Tatipamula e Kukavica (2021) com adaptações(59).

As propriedades antioxidantes da natureza química dos compostos fenólicos estão esquematizadas na figura 7. A eliminação de radicais livres acontece pela transferência do átomo de hidrogênio de seus grupos hidroxila, de forma a neutralizar esses radicais (figura 7, reação 2). Após a perda do hidrogênio, o radical fenoxila se mantém estável, utilizando o deslocamento do elétron e várias formas ressonantes.

Os compostos fenólicos também podem sequestrar radicais peróxido (figura 7), radicais hidróxi (figura 7, reação 3) e radicais ânion superóxido (figura 7, reação 2) (59).

2.5.1 Compostos fenólicos: ação sobre células cancerígenas

O câncer é uma doença que pode ser gerada por fatores internos ou fatores ambientais. Tais fatores modulam diversos componentes celulares relevantes, incluindo genes, por meio de intermediários celulares (60). Os intermediários celulares, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), influenciam as vias de sinalização celular. Em baixas concentrações, esses intermediadores têm funções fisiológicas nas células, porém, também possuem um papel importante na fisiopatologia de diversas doenças (61).

Para manter o equilíbrio entre a atividade antioxidante e pró-oxidante dentro das células, os sistemas de defesa utilizam de componentes antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase e glutathione. A desestabilização desse sistema de defesa pode levar ao estresse oxidativo, que tem potencial de dar início à carcinogênese (62,63).

As EROs são moléculas que derivam do oxigênio, como superóxido, hidroxila, peroxila e alcoxila, e não radicais que são facilmente convertidos em radicais ou que provocam oxidação, como ácido hipocloroso, ozônio, oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio. Quando endógenas, as EROs são subprodutos de organelas subcelulares, e, quando exógenas, são derivadas de poluentes, tabaco, fumaça, entre outros. Dentre os produtores de EROs intracelulares, a NADPH oxidase é uma das principais fontes desse mediador (64).

A literatura descreve o papel das EROs na transformação de células não cancerosas em células cancerosas. As células de câncer costumam apresentar um aumento no nível de EROs, permitindo a ativação de diferentes vias para o desenvolvimento da tumorigênese. O estresse oxidativo gerado por essas EROs está envolvido em todas as etapas do desenvolvimento do câncer. Primeiro, as EROs geradas neutralizam os mecanismos de defesa celular, como a atividade antioxidante endógena, alterando o equilíbrio antioxidante/pró-oxidante, que induz danos ao DNA.

O acúmulo dos danos gerados no DNA, em razão do reparo incorreto ou incompleto pode levar à mutagênese, combinado à uma via apoptótica deficiente (64–67).

As EROs também podem ser geradas a partir da modulação de fatores de transcrição. O estudo de Crowder et al. (68) relatou o acúmulo desses intermediários após uma hipóxia e tratamento com metal cancerígeno em células-tronco mesenquimais humanas, gerando um fenótipo semelhante ao de uma célula tumoral. O processo inverso também ocorre. Eblin *et al.* (69), após estudo em células uroteliais não tumorais expostas ao ácido monometilarsônico relataram a transformação dessa célula em tumoral, ocorrendo o aumento de EROs, que foram capazes de modular o fator de transcrição MAPK, que está associado ao desenvolvimento de câncer.

Além disso, as EROs apresentam um papel importante na sobrevivência de células tumorais a partir de efeitos antiapoptóticos e proliferativos (64). A resistência a quimioterápicos também é influenciada pelo alto nível de EROs dentro de células de câncer, que pode ser relacionado à adaptação a esses tratamentos (70).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos foi relatada como tendo efeitos inibitórios sobre células tumorais, com indução da apoptose, inibição da proliferação, angiogênese e metástase, e modulação do sistema imunológico nessas células (17,71,72). Os estudos descrevem diferentes mecanismos de ação dos compostos fenólicos. Os polifenóis podem prevenir o desenvolvimento do câncer a partir da modulação de vias de transdução de sinal relacionadas a esse processo, como a modulação de citocinas pró-inflamatórias e a modulação de várias proteínas apoptóticas (73,74).

Roy *et al.* (29) realizaram um estudo no qual foi examinado o efeito inibitório de polifenóis provenientes de *Camellia sinensis* (chá verde e preto) no desenvolvimento de tumores mamários em ratos, concluindo a atividade antioxidante a partir da inibição da ciclooxigenase-2 (Cox-2) e inativação das formas fosforiladas do fator nuclear kappa B (NF-kB) e Akt. Por outro lado, sua atuação como agente pró-oxidante, causando a morte celular a partir do aumento da concentração de EROs, também já foi descrita (31). Outro mecanismo já relatado para atividade anticâncer dos polifenóis, foi a inibição do fator de crescimento semelhante à insulina. Esse fator está relacionado ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, como de mama, pulmão e colorretal (30).

2.6 MICRO E NANOENCAPSULAMENTO COMO ESTRATÉGIAS PARA A UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A incorporação de compostos fenólicos para aumento da funcionalidade dos alimentos também é uma questão amplamente estudada. Em sua pesquisa, Lomeu (75) adicionou a farinha de banana verde (*Musa sp.*) a uma bebida láctea, acrescentando a essa bebida funcional fibras provenientes da banana, bem como aumento da quantidade de compostos fenólicos. Já Rotta *et al.* (76) fez a adição de casca de abacate (*Persea Americana*) em formulações de chá, para obter o aumento do valor agregado ao produto, fazendo com que houvesse o aumento da quantidade de compostos fenólicos quando comparado a chás já comercializados.

Entretanto, quando os polifenóis precisam passar pelo trato gastrointestinal, acabam sendo transformados por enzimas no fígado, intestino delgado e no cólon, então quando são absorvidos sofrem conjugação, e quando não são absorvidos são transformados pela microbiota do intestino (17). Além dos obstáculos já mencionados, ação desses compostos é diminuída ou insuficiente para produzir resposta biológica por causa da instabilidade no suco gástrico, da baixa permeabilidade, instabilidade da estrutura química durante o processamento e estocagem e a susceptibilidade a fatores externos, como a exposição ao oxigênio (15,16).

Para resolver esses problemas e viabilizar a chegada dos compostos fenólicos no local de ação, novas técnicas de bioengenharia ou encapsulamento em sistemas de entrega de fármacos na escala nano ou micro estão sendo investigadas, na intenção de melhorar a biodisponibilidade (17). As técnicas de encapsulamento, especificamente, podem melhorar a permeabilidade em sistemas biológicos, além de proteger suas propriedades contra condições ambientais adversas (77,78).

2.6.1 Encapsulação de bioativos extraídos de alimentos

A encapsulação de bioativos vem sendo utilizada para diversos fins, podendo formar partículas de tamanho nanométrico a milimétrico. Uma das funções do encapsulamento desses ativos é a diminuição da degradação induzida por fatores do ambiente externo, como calor, luz, umidade e oxigênio, durante o processamento e o armazenamento (19).

As vantagens dessa tecnologia são a prevenção de interações com outros componentes, características de liberação controlada, bem como aumento da biodisponibilidade do material revestido (18), que se torna importante quando se trata de bioativos, já que a biodisponibilidade desses compostos costuma ser baixa. Essa característica está relacionada à baixa estabilidade durante a digestão e a má absorção intestinal (46,79). Além disso, essas tecnologias podem auxiliar e viabilizar a entrega desses compostos ao alvo terapêutico de forma adequada (80,81).

Há diversos métodos para a encapsulação dessas substâncias, como os físicos (secagem por spray dryer, liofilização, precipitação de fluido supercrítico e evaporação de solvente), os físico-químicos (coacervação, lipossomas e gelificação) e os químicos (polimerização interfacial e complexação de inclusão molecular). A escolha da técnica irá depender da solubilidade, da sensibilidade térmica desses ativos, bem como de sua possível aplicação (82,83).

2.7 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação de um bioativo tem como principal objetivo a proteção desse composto, mas também pode ser utilizado para conversão de líquidos em sólidos, alterar propriedades coloidais e de superfície e controlar a liberação do material revestido (84).

As microcápsulas terão a variação de tamanho de um micron até alguns milímetros, e poderão variar sua estrutura em: modelo reservatório, que o núcleo é revestido com material da parede; ou sistemas de matriz, que o material encapsulado é embutido na matriz, sem uma parede externa limitante. Além disso, as cápsulas podem ser mononucleares, conter diversos núcleos, ou ter multicamadas. Essa técnica de microencapsulação é utilizada pela indústria para entrega de vacinas e medicamentos e para aumentar o valor funcional de alimentos (20). Dentro dos métodos para a produção de MPs, o spray drying é utilizado na indústria para melhorar a estabilidade de medicamentos, aumentar a biodisponibilidade ou controlar a taxa de liberação (85).

A indústria pode utilizar diferentes materiais de revestimento para as técnicas de microencapsulação, como biopolímeros, lipídios e minerais. Os biopolímeros utilizados podem ser derivados de plantas ou animais, e polissacarídeos, que acabam

sendo muito utilizados pelo baixo custo, biocompatibilidade e pela baixa toxicidade (86).

A quitosana é um polímero que possui características importantes para a indústria, como biocompatibilidade, bioatividade e alta resistência mecânica, mas sua baixa solubilidade pode limitar sua aplicação, apesar de ser mais solúvel do que seu precursor (quitina)(87). Esse biopolímero tem aprovação pela FDA para uso clínico, em parte devido ao fato de ser biocompatível e biodegradável (85).

Um estudo propôs o desenvolvimento de MPs de quitosana contendo antibacterianos, pulverizado a partir de *spray drying*, para tratamento de infecções pulmonares. As MPs demonstraram alta eficiência direcionada a células pulmonares e baixa toxicidade (88).

As MPs de quitosana processadas em *spray dryer*, mostraram efetividade na conservação de compostos fenólicos em diferentes temperaturas, aumentando sua estabilidade. Isso demonstra que a tecnologia de microencapsulação poderia ser eficiente na preservação desses compostos durante o armazenamento (6). Portanto as micropartículas de quitosana tem como vantagens a menor toxicidade (85,87) o aumento da estabilidade de compostos bioativos (6) e o aumento da resistência de compostos fenólicos no trato gastrointestinal quando encapsulados por quitosana (89).

2.8 NANOENCAPSULAÇÃO

Essas NPs têm sido utilizadas amplamente na indústria farmacêutica como carreadores de drogas, tendo aplicações tanto em diagnóstico quanto em terapias. As NPs possuem diferentes aplicabilidades clínicas a depender dos parâmetros, como suas propriedades. A nanotecnologia tem sido alvo de muitas pesquisas nas últimas décadas, demonstrando um aumento na aplicação de produtos com nanopartículas (NPs), principalmente na indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica (90). Segundo as recomendações europeias (21) a dimensão das NPs pode variar entre 1 e 100 nm para estar dentro da nanoescala, sendo que 50% das partículas têm que estar abaixo de 100 nm. Além disso, podem apresentar diferentes propriedades, a depender de seu tamanho e características de superfície (22,91).

A *International Organization for Standardization Technical Committee* reitera que o tamanho de nanomateriais entre 1 e 100 nm tem que estar dentro desse parâmetro nas três dimensões para ser considerado nanopartícula. Outras instituições avaliam a nanotecnologia de maneira mais abrangente, considerando que a manipulação a nível atômico pode acontecer abaixo de 1 nm e acima de 100 nm, em torno de 200 a 300 nm para partículas poliméricas, por exemplo (92). No Brasil, ainda não existe regulamentação sobre a nanotecnologia, que contenha definições e caracterizações, mas segundo a Anvisa um comitê para tratar desses assuntos foi criado justamente com este fim (93).

O crescimento no interesse desse tipo de tecnologia foi intensificado após a possibilidade de visualização dos nanomateriais, com a utilização de técnicas de resolução atômica, como microscopia de tunelamento de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura (94).

Essas NPs têm sido utilizadas amplamente na indústria farmacêutica como carreadores de drogas, tendo aplicações tanto em diagnóstico quanto em terapias (95–99). As NPs possuem diferentes aplicabilidades clínicas a depender dos parâmetros, como suas propriedades físicas e químicas, eficiência de carga do medicamento, liberação do medicamento e, o mais importante, baixa ou nenhuma toxicidade do próprio transportador. Elas podem ser de diferentes tipos de formulações como poliméricas, nanoemulsões, lipossomas e NPs sólidas (100).

As NPs podem ser desenvolvidas a partir de diversos tipos de materiais, como, por exemplo, à base de polímero. As NPs poliméricas são muito utilizadas para carregamento de medicamentos, com a finalidade de promover uma liberação controlada e sustentada. O conteúdo a ser encapsulado pode estar anexado à superfície de uma nanoesfera ou nanocápsula, ou incorporado na matriz (95).

As NPs sólidas baseadas em metal, podem conter óxido de ferro, ouro, prata, entre outros. As NPs a base de ferro tem atraído atenção na última década por causa da sua característica superparamagnética (96), podendo ser utilizadas como biossensores (com apoio da ressonância magnética), sistema de entrega de fármaco direcionado e várias técnicas de diagnóstico e imagem (97). As NPs de ouro têm sido utilizadas para diagnóstico de câncer, tratamento e radioterapia, sendo consideradas as menos tóxicas entre as NPs sólidas (101). Já as de prata são utilizadas como biossensores ou em dispositivos (como curativos, revestimentos antibacterianos, entre outros) (102).

NPs à base de carbono tem como representante importante os nanotubos de carbono, que são fortes candidatos à diversas aplicações na área da saúde (como entrega de fármacos), exibindo estabilidade e maior capacidade de carregamento de drogas. Porém, os nanotubos de carbono apresentaram toxicidade em exposição crônica, devendo ser mais bem avaliados (98).

A nanoemulsão é um sistema em que se mistura dois líquidos imiscíveis (103) utilizando, geralmente, surfactantes para aumentar a estabilidade. A maior limitação desse tipo de formulação é a instabilidade termodinâmica (se seu tamanho ultrapassar 500 nm). Essas NPs são formadas por nanogotas de água dispersas em óleo ou nanogotas de óleo dispersa em água, e existem as formulações óleo-em-água-em-óleo (o/a/o) ou água-em-óleo-em-água (a/o/a)(104). Esses sistemas têm obtido sucesso na liberação controlada e aumento da biodisponibilidade de compostos fenólicos (103).

As NPs a base de lipídios vesiculares são chamadas de lipossomas e consistem em uma bicamada fosfolipídica e de colesterol, aprisionando um núcleo aquoso (104). Essas NPs são as mais comumente usadas, com alta eficiência de encapsulamento. Tais propriedades permitem a acumulação desses carreadores em locais específicos, podendo ser uma vantagem para tratamento de câncer (105).

As NLS e os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs) também são NPs à base de lipídios e são semelhantes à preparação de emulsões O/A, porém possuem um núcleo lipídico solidificado (99). A estabilidade das NPs lipídicas pode ser afetada pela quantidade e tipo de lipídios, pela natureza do surfactante, pelo tamanho e concentração iniciais das partículas e das condições de resfriamento (103). As NLS apresentam como vantagens uma menor toxicidade e uma permeabilidade que, em teoria, seria maior por se tratar de partículas lipídicas, mas apresentam como limitação a baixa capacidade de carga e o escape do conteúdo encapsulado durante o armazenamento (106).

Os CLNs são como uma segunda geração das NLS e foram desenvolvidos para superar essas desvantagens (107). A formulação desse tipo de carreador leva em sua composição lipídios sólidos (gordurosos) e líquidos (óleo) à temperatura ambiente. Essa alteração na composição melhorou a estabilidade, diminuiu a expulsão do conteúdo durante o armazenamento e melhorou a capacidade da carga. Os efeitos observados foram consequência da mudança na matriz, que, na NLS era

uma estrutura de rede cristalina, e no CLN a matriz adquiriu uma estrutura menos cristalizada (108).

2.9 ANÁLOGOS NATURAIS DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (NADES)

Os solventes eutéticos profundos (DES) ou análogos naturais de solventes eutéticos profundos (NADES) são formados a partir da mistura de aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) e doadores de ligações de hidrogênio (HBD). Essa conformação é comumente encontrada na natureza, como açúcares, ácidos orgânicos, poliálcoois e outros (109–112). Esses solventes podem ser classificados em quatro grupos: sal de amônio quaternário e cloreto de metal (tipo I); sal de amônio quaternário e hidrato de cloreto de metal (tipo II); sal de amônio quaternário e doador de ligação de hidrogênio (tipo III) e hidrato de cloreto de metal e doador de ligação de hidrogênio (tipo IV) e estão descritos no quadro 1. O DES que tem como constituinte o cloreto de colina (HBA), que é um sal de amônio quaternário, se classifica no tipo III e é o mais comumente usado com HBDs como ureia, poliálcoois, açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos. Podem ser chamados de NADES quando possuem componentes celulares abundantes (açúcares e ácidos orgânicos) (110,113).

Quadro 1 - Resumo dos diferentes tipos de DES com fórmulas gerais e exemplos.

Tipo	Fórmula geral	Termos
Tipo II	$Cat^+X \cdot zMCl_x$	M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In
Tipo II	$Cat^+X \cdot zMCl_x \cdot yH_2O$	M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe
Tipo III	$Cat^+X \cdot Zrz$	Z = CONH ₂ , COOH, OH
Tipo IV	$MCl_x + RZ = MCl_{x-1}^+ \cdot RZ + MCl_{x-1}^-$	M = Al, Zn et Z = CONH ₂ , OH

Legenda - X = base de Lewis; Cat⁺ = catião (amônio, fosfônio ou sulfônio); M = metal; RZ = molécula orgânica com função Z (exemplos: CONH₂, COOH ou OH).

Fonte – Adaptado de Depoorter (113).

O termo “eutético” se refere à uma mistura de componentes que, nas proporções específicas, demonstram menor ponto de fusão, se mantendo em estado líquido em temperatura ambiente. O NADES foi desenvolvido com algumas propriedades semelhantes aos Solventes Eutéticos Profundos (DES) e aos Líquidos Iônicos (ILs), sendo que os três apresentam a vantagem de poder alterar sua

composição a depender do objetivo da aplicação, e o NADES apresenta maior biocompatibilidade, sendo mais sustentável. O conceito de solvente natural, que dá característica ao NADES, é sua capacidade de solubilizar compostos naturais, como flavonoides, bem como a influência de misturas eutéticas que ocorrem de forma natural (26).

A utilização desse tipo de solvente surgiu como uma estratégia para a substituição de solventes orgânicos tóxicos, não biodegradáveis e inflamáveis (metanol, acetona e ácido fórmico, por exemplo) para a extração de metabólitos vegetais. Além de mais sustentável, quando foi comparado a solventes considerados mais seguros, o NADES demonstrou uma extração mais eficiente em relação à extração com solventes orgânicos (24). Porém, apresenta como desvantagem a alta viscosidade, que acaba levando a baixa difusão do metabólito alvo para o meio de extração. Tal problema pode ser resolvido ao adicionar água à formulação, reduzindo a viscosidade e a tensão superficial, aumentando a eficiência de extração (114).

Além disso, o NADES também tem sido alvo de pesquisas relacionadas à sua capacidade de crioproteção e resistência à alta pressão osmótica. Essas características são provenientes da mistura de metabólitos como a colina, e ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, formando uma fase líquida (25,26).

Estudos já demonstram uma ação de crioproteção de culturas de células Jurkat ocasionado pelo NADES, em que há tanto a supressão da formação de gelo quanto a desidratação, melhorando a sobrevivência e a proliferação das células após o descongelamento (115,116).

Dentre as aplicações investigadas para o NADES, está o direcionamento da entrega de fármacos, diminuindo assim os efeitos citotóxicos em células não tumorais. Em seu trabalho Sun *et al.* (117), encapsularam paclitaxel e 7-hidroxycumarina em carreadores sólidos líquidos poliméricos, e o sistema foi capaz de direcionar a entrega de fármacos por conta das ligações amida éster presentes no NADES, uma vez que a célula tumoral continha enzimas com a função de degradar as ligações éster e amida, se caracterizando como um sistema promissor. Isso demonstra as diversas aplicabilidades dos NADES e a possibilidade de novas técnicas de melhorias em sistemas de nanocarreadores com esse solvente.

2.10 MELANOMA

O câncer é um assunto pertinente à saúde pública no Brasil por ser uma das enfermidades mais incidentes, tendo estimativa de 704 mil novos casos por ano para o triênio de 2023-2025. Dos vários tipos de câncer, o de pele é o mais frequente no Brasil, correspondendo a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país, sendo apenas 3% enquadrados como melanoma. O melanoma apresenta um prognóstico bom se detectado em sua fase inicial, evitando a principal complicação que seria a metástase (27).

O câncer de pele pode ser dividido em melanoma (MM) e não melanoma (NMM). Esses se diferem principalmente pelo tipo de célula nos quais são desenvolvidos. O MM se desenvolve a partir dos melanócitos, enquanto o NMM se origina dos queratinócitos da epiderme. Sabe-se que um dos principais fatores que influenciam a formação dos dois tipos de câncer de pele é a exposição à radiação ultravioleta (UV), principalmente UVA, que é capaz de penetrar através da epiderme até a derme, e UVB, que é absorvido pela epiderme (118).

A principal diferença da radiação UVA e UVB são as consequências geradas a partir da exposição. A radiação UVA gera espécies reativas de oxigênio (EROs), que interagem com diversos constituintes das células, como lipídios, proteínas e DNA. Essa interação é chamada de estresse oxidativo, que tem como consequência alterações celulares importantes, sendo um dos fatores relacionados à carcinogênese. Por esta razão, o direcionamento das terapias ao estresse oxidativo induzido por ROS, pode representar uma abordagem promissora no tratamento de câncer de pele (118,119). Enquanto isso, a exposição à radiação UVB acaba danificando diretamente o DNA (120).

Os melanócitos são derivados de uma população celular originada durante a neurulação, que ficam localizados principalmente na camada basal da epiderme da pele humana, podendo ser encontrados também na úvea (camada intermediária da estrutura ocular), folículo piloso, epitélio da mucosa e meninges. Essa célula tem como principal função a síntese da melanina dentro de organelas que são chamadas de melanosomos. Essas organelas são transferidas por células dendríticas para os queratinócitos vizinhos e, uma vez dentro desses queratinócitos, elas se realocam em áreas perinucleares (capeamento nuclear), protegendo o DNA de danos causados pelos raios UV (121).

No processo de melanogênese e pigmentação da pele, há regulação via constitutiva e adaptativa, sendo a constitutiva o nível básico de pigmentação da pele, que varia entre diferentes grupos étnicos em razão de diversos polimorfismos genéticos na sinalização de melanócitos-chave e genes de síntese de pigmento (122). Já a pigmentação adaptativa tem como principal exemplo a pigmentação induzida por radiação UV (bronzamento), mas também pode ser ativada por diversos distúrbios de hiperpigmentação da pele (121).

Os melanócitos são responsáveis pela produção de duas formas de pigmento melanina: eumelanina preta/marrom e feomelanina vermelha/loira, que são derivadas da tirosina precursora. O equilíbrio entre a quantidade de feomelanina e eumelanina é regulado através da sinalização do receptor melanocortina-1 acoplado à proteína G (MC1R)(121).

A síntese de melanina pela indução por UV a partir da via de regulação dependente de MC1R leva a danos no DNA dos queratinócitos, com uma subsequente estabilização do gene supressor tumoral (p53), que codifica uma fosfoproteína nuclear, desempenhando um papel importante no controle do ciclo celular, no reparo do DNA e na indução da apoptose. Além disso, há ativação transcricional direta de pró-opiomelanocortina (POMC), que é um precursor dos hormônios estimuladores de melanócitos (MSHs) e da adrenocorticotrofina (ACTH), também conhecidos como melanocortinas. O POMC é sintetizado principalmente na pele, hipófise e cérebro, passando em seguida para os corpos de Golgi, direcionado para os grânulos secretores, e, finalmente, processado em vários peptídeos, incluindo hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α -MSH) (122,123). A α -MSH se liga, ativando o MC1R na superfície de melanócitos, que leva a uma cascata de ativação do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e depois ativação do elemento de resposta do AMPc com ligação de proteína (CREB). Todas essas etapas desencadeiam na ativação transcricional mediada do fator de transcrição microftalmia (MITF) (121).

O MITF é o principal regulador da via de síntese de melanina através da regulação transcricional direta de enzimas melanogênicas (PMEL, tirosinase, TRP1 e DCT). Outros genes, que acabam se tornando cruciais para a sobrevivência tanto dos melanócitos quanto do melanoma, também são regulados pelo MITF, como as proteínas antiapoptóticas BCL2 e BCL2A1, e o regulador do ciclo celular CDK2 (124,125).

Na célula melanoma, o MITF se torna hiperativo, impulsionando a diferenciação, pigmentação e sobrevivência dessa célula (121). Portanto, esse regulador, funciona como um marcador imuno-histoquímico sensível e específico no melanoma (126,127).

O termo EROs refere-se a moléculas quimicamente reativas, como ânions superóxidos, peróxidos e radicais hidroxila, que tem a capacidade modificar proteínas e moléculas de DNA, bem como alterar seu comportamento celular permanentemente ou temporariamente. O estresse oxidativo é causado por excesso de EROs gerado pelas células, que é bem difundido como um evento adverso para promover a tumorigênese (128). Porém, existem evidências que indicam que EROs em níveis adequados, em particular superóxido e peróxido de hidrogênio, também servem como moléculas sinalizadoras para proliferação celular, função vascular e cicatrização de feridas (129–131). Já níveis extremamente baixos de EROs podem permitir que as células sofram uma parada do ciclo celular (132,133).

Células de câncer, incluindo células de melanoma, demonstram altos níveis de EROs, porém, a fonte desse tipo de molécula nessas células ainda não foi completamente elucidada na literatura. A principal fonte de EROs em células cancerosas geralmente é atribuída ao desacoplamento e disfunção mitocondria (134). No melanoma, a mitocôndria também pode gerar EROs via cadeia transportadora de elétrons (135). Estudos apontam que a mutação do DNA mitocondrial é não acontece com frequência em células cancerosas, portanto, é improvável que seja uma das principais causas de desenvolvimento de câncer e geração desse estresse oxidativo (136). Entende-se que o principal papel das mitocôndrias no câncer está ligado à regulação metabólica defeituosa, conseqüentemente, teoriza-se que as EROs geradas pelas mitocôndrias também possam participar diretamente desses processos (137).

Evidências indicam que, além dessa alteração metabólica da mitocôndria, outros compartimentos celulares e enzimas também contribuem significativamente para a geração de EROs, incluindo a família NADPH Oxidase (NOX), o desacoplamento de óxido nítrico sintase (NOS), os peroxissomos e os melanossomos em células de melanoma (28). Os melanócitos e células de melanoma exibem uma regulação redox única, portanto, os melanossomos e a melanina podem ter um papel importante na oxirredução cíclica de EROs (138).

As NADPH oxidases são enzimas com várias subunidades. Nox1, Nox2, Nox3 e Nox4 compartilham a subunidade comum de membrana CYBA (p22phox, citocromo b-245, cadeia leve do citocromo b neutrófilo) como parte de sua holoenzima, mas cada uma tem afinidade por subunidades citoplasmáticas diferentes. Evidências emergentes indicam que Nox1, Nox4, Nox5 e NCF1 podem afetar a progressão e a gênese do melanoma (139,140).

Espécies reativas de nitrogênio são uma série de moléculas ativas geradas a partir de óxido nítrico e superóxido e participam de todos os aspectos do desenvolvimento do câncer. O óxido nítrico é sintetizado pela síntese do óxido nítrico (NOS) que consiste em três isoformas: NOS neuronal (nNOS, NOS1), NOS induzível (iNOS, NOS2) e NOS endotelial (eNOS, NOS3) (28). O iNOS foi bem caracterizado no melanoma: sua expressão promove a proliferação celular; está associado à baixa sobrevida; e aumenta a resistência à cisplatina (141–143). O nNOS desempenha um papel na invasão e proliferação do melanoma (144–146). Já desacoplamento da eNOS também é uma fonte importante de superóxido no melanoma que promove a formação desse tipo de câncer (147).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Encapsular o extrato de cascas de taperebá (*Spondias mombim* L.) do Cerrado a partir de formulações de micropartículas e nanopartículas, caracterizar e avaliar a estabilidade dessas formulações; verificar a viabilidade de células de melanoma murino (B16-F10) após o tratamento com o extrato nanoencapsulado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar extrato de cascas de taperebá do Cerrado do Distrito Federal e caracterizar quanto aos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante/
- Desenvolver micropartículas contendo o extrato;
- Avaliar as características físico-químicas das micropartículas;
- Avaliar a estabilidade dos polifenóis totais nas micropartículas armazenadas em diferentes temperaturas durante 60 dias;
- Desenvolver nanopartículas capazes de carrear os compostos fenólicos extraídos da casca de taperebá;
- Avaliar as características físico-químicas das nanopartículas;
- Avaliar a estabilidade coloidal das nanopartículas armazenadas em temperaturas diferentes durante 30 dias;
- Avaliar a estabilidade das nanopartículas, quanto ao conteúdo de polifenóis totais, armazenadas em temperaturas diferentes durante 60 dias;
- Avaliar a toxicidade *in vitro* das nanopartículas em células de melanoma murino (B16-F10) e fibroblasto murino (L929).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Carbonato de sódio anidro padrão analítico foi obtido de Dinâmica, Brasil. A manteiga de murumuru (*Astrocaryum murumuru*) e o óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) foram obtidas de Amazon Oil, Brasil. Folin Ciocalteau, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), meios Roswell Park Memorial Institute (RPMI) e Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) Diammonium Salt (ABTS), glicerol padrão analítico e Brij® O10 foram obtidos da Sigma, EUA. Cloreto de colina padrão analítico e ácido cítrico anidro padrão analítico foram obtidos de Êxodo Científica, Brasil. Soro fetal bovino (FBS), penicilina, estreptomicina e tripsina foram obtidos da Gibco, EUA. O brometo de 3-(4,5dimetiltiazol2il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi adquirido da Invitrogen, EUA. A solução salina tamponada com fosfato (PBS) foi fornecida pela Laborclin, Brasil.

4.2 AMOSTRAS

Os frutos de taperebá (*Spondias mombin* L.) foram coletados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Cerrados (CPAC)), localizada em Planaltina, Distrito Federal – DF (15°54'16.50" Sul e 47°22'37.49" Oeste, a 855 m de altitude). As características da área enquadram-se no bioma Cerrado, com solo caracterizado como Latossolo Vermelho-Escuro, textura muito argilosa, em relevo praticamente plano, sob Cerrado Ralo. O presente projeto está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SIGGEN) sob os números AAC830E e A002D4B.

A coleta dos frutos foi feita quando estavam maduros. Os frutos foram descascados em um processo manual, e as cascas secaram naturalmente em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 24 horas.

As células de melanoma murino (B16-F10), foram cultivadas em DMEM, e os fibroblastos (L929), cultivados em RPMI, suplementados com FBS a 10% (v:v) e

solução de antibiótico a 1% (v:v). As células foram mantidas em incubadora sob atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C.

4.3 ELABORAÇÃO DO ANÁLOGO NATURAL DE SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO (NADES)

O análogo natural de solvente eutético profundo (NADES) foi elaborado com cloreto de colina, glicerol e ácido cítrico (1:4:1), com 25% de água. A mistura foi aquecida a 80°C até total dissolução dos reagentes (148). Após a concentração do extrato etanólico em rotaevaporador, foi realizada a dissolução do extrato concentrado utilizando-se o NADES preparado.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE CASCA DE TAPEREBÁ

O extrato das cascas de taperebá (*Spondias mombin* L.) foi elaborado conforme a metodologia descrita por Cabral *et al.* (6) com adaptações. O etanol foi adicionado às cascas de taperebá, na proporção de 1:2 (peso casca fresca/solvente), e colocados para maceração durante sete dias sob refrigeração e ao abrigo da luz. Após isso o extrato foi filtrado e armazenado em frasco âmbar, sob refrigeração. Esse extrato foi utilizado para todas as análises posteriores.

Para a formulação das NPs o extrato etanólico de cascas de taperebá foi preparado previamente, para a eliminação do solvente, em rotaevaporador (Rotavapor RII, Buchi®) à 40 °C, 25 mbar por 30 minutos. O produto desse processamento foi utilizado puro e, também, diluído em NADES para a confecção das NPs.

A quantificação dos compostos fenólicos do extrato foi realizada através de análise espectrofotométrica, sendo avaliada a partir do método de Folin-Ciocalteu. Os cálculos foram feitos segundo a curva padrão de ácido gálico e os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG) por 100g da casca do taperebá (149).

Foi realizada a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato através da avaliação de captura de radicais livres DPPH (150) e ABTS (151). Os resultados

foram expressos como equivalentes Trolox (mM TEAC/g de casca) e calculados a partir de uma curva padrão.

4.5 OBTENÇÃO DA MICROPARTÍCULA (MP) DE QUITOSANA CONTENDO EXTRATO DE TAPEREBÁ

A microencapsulação do extrato de taperebá com quitosana foi realizada por meio de *spray drying* (Labmaq, modelo MSD 1.0) de acordo com o método de Cabral *et al.* (6). O extrato foi incorporado na proporção de 4:1 (quitosana:extrato seco) e a mistura final (16 g da quitosana foi dissolvida em 800 mL da solução aquosa a 1% de ácido acético e 4,7 g de extrato seco) foi submetida ao spray dryer com as seguintes configurações: vazão de 7 ml/minuto, bico atomizador pressurizado de 1,0 mm de diâmetro, ar de atomização a 30 L/minuto, fluxo de ar quente de secagem de 4,5 m³, temperatura de entrada do ar de 140 °C e de saída do ar de 99 °C. As micropartículas (MPs) foram então caracterizadas e submetidas ao estudo de estabilidade de polifenóis totais durante o armazenamento.

4.5.1 Caracterização das micropartículas (MPs) contendo extrato de taperebá

4.5.1.1 Eficiência de encapsulação das micropartículas (MPs)

A quantidade de polifenóis totais encapsulados nas MPs de quitosana foram avaliadas a partir do método de Folin-Ciocalteu (149) adaptado por Cabral *et al.* (6) com as seguintes alterações: as MPs foram deixadas 24 horas sob agitação em uma solução de ácido acético a 1%. Antes da leitura espectrofotométrica (760 nm), as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 4000 rpm (Hettich Zentrifugen, modelo EBA 20). O cálculo foi feito segundo a equação 1:

$$EE\% = (Q_{obtida} / Q_{teórica}) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

EE% é a eficiência de encapsulação de compostos fenólicos na MP, Q_{obtida} é a concentração de polifenóis totais presente dentro das MPs após o processamento e

Qteórica é a concentração de polifenóis totais que foi adicionado para o processamento.

4.5.1.2 Morfologia das Micropartículas (MPs)

Fotomicrografias foram obtidas para a análise morfológica e a visualização do tamanho das MPs, utilizando o microscópio eletrônico de varredura (MEV Jeol JSM-7000F), utilizando o detector de espectroscopia de raios X dispersiva de comprimento de onda Oxford a uma voltagem de 15 kV, com aproximadamente 10 mg da amostra previamente metalizada com ouro. A amostra foi analisada em aumentos de 1000 a 5000 vezes (152).

4.5.2 Estudo de estabilidade das micropartículas (MPs)

As MPs foram avaliadas nos dias 1, 7, 14, 30 e 60 dias após a elaboração quanto ao teor de polifenóis totais em diferentes condições de estocagem: ambiente (25 ± 3 °C), refrigerada (4 ± 2 °C) e temperatura estressante na câmara climática (40 °C, 70% de umidade), e sob o abrigo da luz. Para a análise utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu (149) com as adaptações descritas anteriormente (6).

4.6 OBTENÇÃO DO CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO (CLN)

4.6.1 Formulações de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs) a partir de análise das variáveis em diferentes proporções

As proporções testadas inicialmente para a formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) foram baseadas no trabalho de Ganassin *et al.* (153). O método inicial utilizava a proporção de 1:1 de manteiga de murumuru e com Compritol ATO 888 (7,5:2,5 p/p) para uma mistura de surfactantes, Span20 e Tween80 (2:8 p/p). Após a fusão da fase orgânica (~75 °C), o princípio ativo foi adicionado, e em seguida foram acrescentados 40 ml de água à 65 °C, elevando-se a

temperatura acima do ponto de turvação para 91 °C, mantido sob agitação por 30 minutos, deixando resfriar em temperatura ambiente. Silva (154) adaptou a metodologia de Ganassin *et al.* (153) após o teste de diversas proporções, com diferentes manteigas, utilizando outro surfactante (Brij® O10), chegando à seguinte formulação: o lipídio natural e o surfactante foram misturados a 60 °C, numa proporção de 2:1, sob agitação magnética (350 RPM) por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentada água a essa mistura (1:10, p:v), e então aquecida a 81 °C. Após chegar à temperatura de 81 °C, a emulsão foi rapidamente resfriada em banho de gelo (0 °C) para solidificar a matriz lipídica e formar o CLN com o princípio ativo.

Com objetivo de se obter uma formulação otimizada capaz de nanoencapsular os compostos fenólicos obtidos da casca de taperebá foram testadas diferentes proporções de surfactante e lipídios, em diferentes temperaturas, a partir da metodologia de Silva (154). Inicialmente foram preparadas formulações para padronização de cada componente (fase oleosa e aquosa), variando as proporções de manteiga de murumuru (fase lipídica), óleo de buriti (fase lipídica) e surfactante (tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Composição das formulações para o preparo dos carreadores lipídicos nanoesturados (CLNs) pela técnica de temperatura de inversão de fase (PIT) em diferentes proporções de lipídios.

Formulações	Murumuru (%)	Óleo de buriti (%)	Surfactate	Fase sólida (%)	Fase aquosa (%)
F1	3,8	0	2,1	5,9	94,1
F2	3,6	0,2	2,1	5,9	94,1
F3	3,3	0,5	2,1	5,9	94,1
F4	3,1	0,7	2,1	5,9	94,1
F5	2,9	0,9	2,1	5,9	94,1

Fonte - Elaborado pelo autor

Tabela 2 - Composição das formulações para o preparo dos carreadores lipídicos nanoesturados (CLNs) pela técnica de temperatura de inversão de fase (PIT) em diferentes proporções de surfactante.

Formulações	Murumuru (%)	Óleo de buriti (%)	Surfactante	Fase sólida (%)	Fase aquosa (%)
F6	3,6	0,2	1,2	5	95,0
F7	3,6	0,2	1,8	5,5	94,5
*F2	3,6	0,2	2,1	5,9	94,1
F8	3,6	0,2	2,6	6,4	93,6
F9	3,6	0,2	3,1	6,9	93,1

Nota: *F2 corresponde à mesma formulação designada como "F2" descrita na tabela 1.

Fonte - Elaborado pelo autor.

Para a adição do extrato à formulação sem NADES, não foi possível a dissolução em água, sendo necessária adição direto na fase orgânica (lipídios e surfactante). Para a formulação com NADES, o extrato foi diluído no NADES em uma proporção de 1:6 (p:v), e adicionado à fase orgânica (após fusão da manteiga).

Após escolha da formulação mais adequada, considerando índice de polidispersão (PDI) >0,25 (155), e avaliação do tamanho (91), foram testadas diferentes proporções do extrato rotaevaporado (tabela 3) e com diferentes volumes após diluição em NADES (tabela 4). A F2 foi a formulação utilizada para os testes de análise da quantidade de extrato e volume de extrato dissolvido em NADES a serem utilizados.

Tabela 3 - Formulações contendo diferentes concentrações de extrato após concentração em rotaevaporador.

Formulações	Extrato (mg/g CLN)
F2.1	12
F2.2	30
F2.3	48
F2.4	60
F2.5	76

Nota - F2 corresponde à mesma formulação designada como "F2" descrita na tabela 1.

Fonte - Elaborado pelo autor.

Tabela 4 - Formulações com diferentes volumes de NADES contendo extrato após concentração em rotaevaporador.

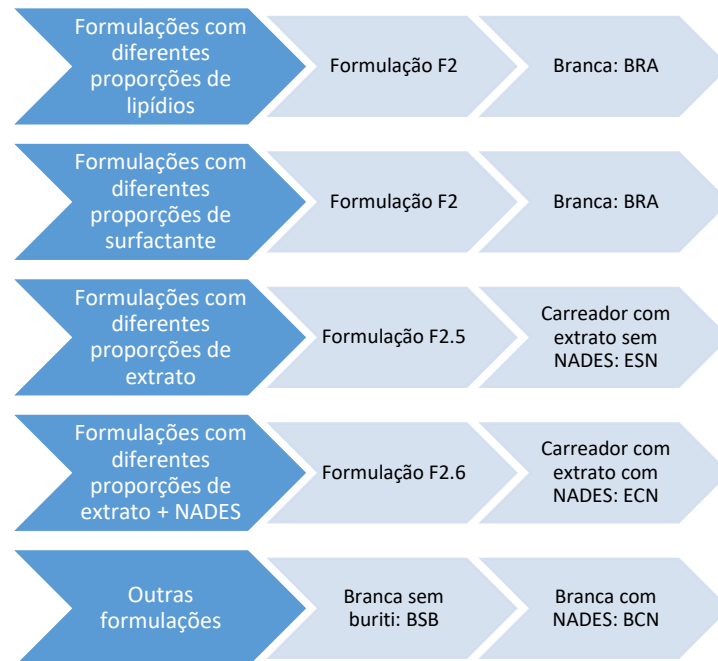
Formulações	NADES (mL)	Extrato (mg/g CLN)
F2.6	1,5	6,0
F2.7	5,0	19,8
F2.8	8,5	33,8

Nota - F2 corresponde à mesma formulação designada como "F2" descrita na tabela 1.

Fonte - Elaborado pelo autor.

Todas as formulações, foram avaliadas em relação separação de fase após observação macroscópica da emulsão. Após escolha das formulações mais adequadas em relação à quantidade de extrato e NADES, considerando índice de polidispersão (PDI) abaixo de 0,25 (155), e avaliação do tamanho (91) dos CLNs, a partir do espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer, Malvern Panalytical), após formulação em diferentes temperaturas (70, 75 e 80 °C), para otimização do processo. As formulações que apresentam os melhores resultados nesses critérios de avaliação foram avaliadas conforme eficiência de encapsulação (EE%), avaliação das propriedades coloidais, análise térmica diferencial, análise termogravimétrica, estudo de estabilidade coloidal e estudo de estabilidade dos polifenóis. As formulações escolhidas para os demais testes estão representadas no esquema 1.

Esquema 1 - Formulações escolhidas e formulações utilizadas para demais avaliações.



Fonte – Elaborado pelo autor.

4.6.2 Caracterização dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs)

4.6.2.1 Eficiência da encapsulação das nanopartículas (NPs)

Após a padronização dos CLNs, estes foram submetidas a quantificação fenólica e a eficácia do processo foi calculado como porcentagem (6), segundo a equação 1:

$$EE\% = (Q_{obtida} / Q_{teórica}) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde EE% é a eficiência de encapsulação de compostos fenólicos na nanopartícula, Q_{obtida} é a quantidade de polifenóis totais presente após o nanoencapsulação e $Q_{teórica}$ é a quantidade de polifenóis totais que foi adicionado.

4.6.2.2 Avaliação de propriedades coloidais

A técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (Dynamic Light Scattering, ou DLS), foi empregada para determinar a média dos diâmetros das partículas e a dispersão das formulações de CLNS escolhidos, utilizando a proporção de 1:10 (v/v) em água destilada, e os resultados expressos como uma média de triplicatas utilizando o ZetaSizer (Nano ZS®, Malvern Instruments, Malvern, UK) a 25 °C.

Os valores do potencial Zeta (mV) das CLNs selecionados foram determinados utilizando o equipamento ZetaSizer (Nano ZS®, Malvern Instruments, Malvern, UK) a 25 °C. As formulações foram adicionadas em água destilada na proporção de 1:10 (v/v).

4.6.2.3 Morfologia das Nanopartículas (NPs)

A morfologia das CLNs foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando o equipamento JEOL® 1011 (Tóquio, Japão), o qual foi operado com tensão de aceleração de 100 kV. As suspensões foram diluídas 1:10 (v:v) com água Milli-Q® e depositadas diretamente em grades revestidas com carbono usadas para observação das amostras usando um contraste Osmiun. O microscópio foi operado no modo campo claro com ampliação acima de 10.000 vezes (156).

4.6.2.4 Calorimetria de varredura diferencial (DSC) e Análise termogravimétrica (TGA)

A avaliação de propriedades físico-químicas e a estabilidade termodinâmica dos CLNs foram feitas a partir da calorimetria de varredura diferencial (DSC) e Análise termogravimétrica (TGA). Os CLNs que apresentaram os melhores resultados de PDI e tamanho foram avaliados. Para a avaliação das contribuições da manteiga de murumuru, esse material foi avaliado sozinho. Para avaliação da influência do óleo de buriti na formulação, foi avaliado o CLN com manteiga e surfactante (BSB), e outro CLN com manteiga, surfactante e óleo de buriti (BRA). Para a avaliação das contribuições do NADES sem o extrato, um CLN com manteiga de murumuru,

surfactante, óleo de buriti e NADES foi analisada (BCN). Além do CLN com extrato dissolvido no NADES (ECN) e CLN com extrato sem NADES (ESN), foi avaliado também o extrato liofilizado puro. O fluxo de gás nitrogênio utilizado foi de 50 ml/min, com temperatura de início de 30 °C e final de 600 °C. As amostras foram previamente liofilizadas (Liofilizador L101 Liotop, LABIOM) e analisadas em painéis de alumínio herméticas, utilizando aproximadamente 10 mg de material (DTG-60, Shimadzu).

4.6.2.5 Estudo da estabilidade coloidal das formulações

As formulações de CLNs sem NADES e sem extrato (BRA), com NADES e sem extrato (BCN), com NADES e com extrato (ECN), sem NADES e com extrato (ESN) foram submetidas ao estudo da estabilidade coloidal das formulações, com avaliação do potencial hidrogeniônico (pH) a 25 °C (pHmetro DM-22, Digimed), além do diâmetro das partículas, a polidispersão e o potencial zeta a 25 °C (Nano ZS®, Malvern Instruments, Malvern, UK), ao longo do tempo. Tais parâmetros foram avaliados no dia da formulação, após 24 horas, e posteriormente, após 7, 15 e 30 dias em diferentes condições de temperatura: temperatura ambiente (25 °C), alta temperatura (37 °C), refrigerado (-4 °C) e congelado (-20 °C).

4.6.3 Estudo da estabilidade dos polifenóis totais contidos nos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLNs)

As formulações de CLN com extrato dissolvido no NADES e não dissolvido no NADES foram submetidas ao estudo da estabilidade de concentração de polifenóis totais a partir da análise espectrofotométrica, sendo avaliada a partir do método de Folin-Ciocalteu (6) com adaptações. As nanoestruturas foram adicionadas à água destilada (100 uL em 3900mL). Após a adição dos reagentes (Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio 20%), foi possível observar a precipitação dos lipídios. Após 45 minutos, foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos, sendo retirado 1 mL do sobrenadante e centrifugado novamente por 5 minutos. O sobrenadante foi avaliado no espectrofotômetro (U-3900H, Hitachi) a 750 nm.

A estabilidade dos compostos fenólicos foi realizada no dia da formulação (dia 0), e posteriormente após 7, 15 e 30 dias (dias 7, 15 e 30). As amostras foram armazenadas em diferentes temperaturas de armazenamento: ambiente (25 °C), alta (37 °C), refrigerada (-4 °C) e congelada (-20 °C).

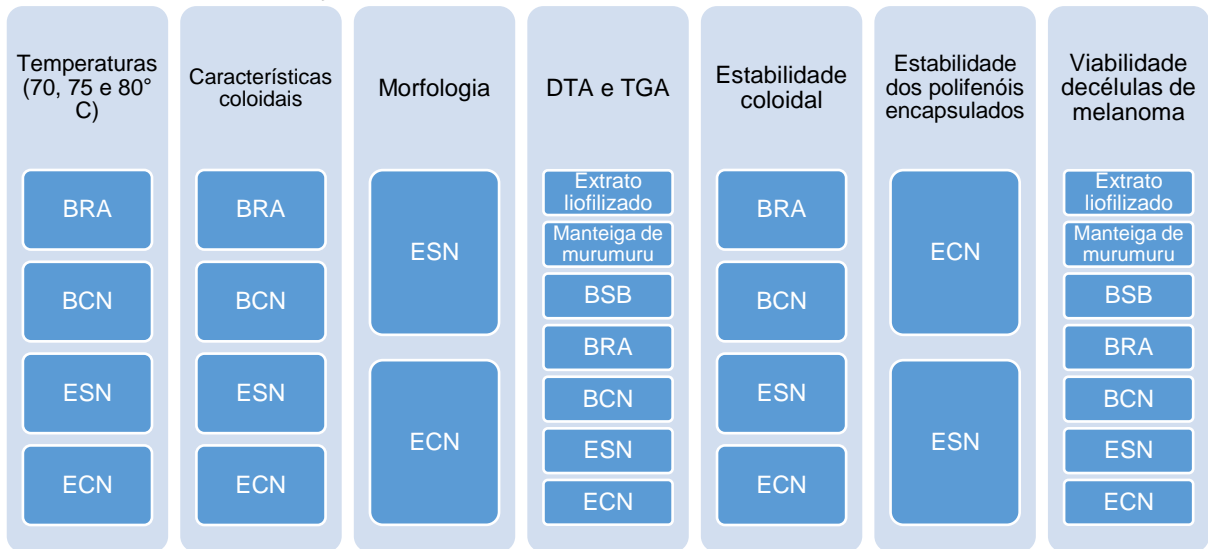
4.6.4 Viabilidade de células de melanoma (B16-F10) e fibroblastos (L929)

As linhagens celulares escolhidas foram fibroblasto murino (L929), como modelo não tumoral, juntamente com a B16-F10, como modelo de célula tumoral. As células foram cultivadas em incubadora úmida à 37 °C com 5% de CO₂, de acordo com a recomendação da American Type Culture Collection (ATCC).

Foi feito o ensaio do brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (157), para analisar a viabilidade celular no grupo controle e nos grupos experimentais a seguir: (1) Grupo com os CLNs sem extrato; (2) Grupo com os CLNs sem extrato com NADES; (3) Grupo com os CLNs com extrato; (4) Grupo com os CLNs com extrato dissolvido em NADES; (5) Grupo com os nanopartículas sem extrato e sem buriti; (6) Grupo com extrato dissolvido que vc observou ao favelado em NADES; (7) Grupo com NADES. As concentrações utilizadas foram: 0,002 mg/mL; 0,008 mg/mL; 0,040 mg/mL; 0,200 mg/mL; 1,000 mg/mL 5,002 mg/mL e 25,008 mg/mL (mg de CLN/mL).

As linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 96 poços e o tratamento foi de 24h. Em todos os grupos, após os tempos, o tratamento foi retirado e foi acrescentado 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura) e incubado por 4 horas a 37°C. Após incubação, esta solução foi retirada e foram adicionados 200 µL de DMSO para a dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA), utilizando comprimento de onda de 595 nm, com o auxílio do programa SoftMax Pro (Molecular Devices).

Esquema 2 - Formulações e materiais utilizados em cada análise.



Fonte – Elaborado pelo autor.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A quantificação de fenólicos totais, da atividade antioxidante e a eficiência de encapsulação das micropartículas do extrato de casca de taperebá foram calculados a partir de uma curva padrão e os resultados foram expressos como uma média de triplicatas e desvio padrão. A estabilidade dos polifenóis encapsulados em micropartículas de quitosana foram realizadas em triplicata. ANOVA, Análise de Correlação e Teste Tukey HSD foram realizados no programa STATISTICA 10.0. admitindo nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Os resultados da formulação e estabilidade dos CLNs foram expressos como uma média de triplicatas e desvio padrão. O ensaio de MTT foi realizado em quadruplicata e em três independentes experimentos. Os resultados obtidos foram analisados em programa Graphpad Prism 5.0 submetidos a testes específicos com confiança estatística de 95%. Foi utilizado o teste de Anova Two Way. As formulações escolhidas para os cada teste estão representadas no esquema 1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE CASCA DE TAPEREBÁ

Os compostos bioativos estão presentes naturalmente em diversas partes de produtos vegetais, tais como sementes, polpas, cascas, dentre outros, e podem compreender compostos com diversas características químicas, distribuição na natureza e quantidade existente (32). Esses compostos são responsáveis pela bioatividade dos produtos, que pode ser definida como a capacidade de exibir um efeito biológico, gerando benefício à saúde. Dentre essas substâncias destacam-se os compostos fenólicos (46), que são utilizados pelas plantas como parte do mecanismo de defesa, principalmente por conta de sua atividade antioxidante (158).

Alguns trabalhos têm demonstrado um alto teor desses bioativos em frutas tropicais (6,10). Como um representante desse grupo de interesse está o taperebá. Nosso trabalho encontrou valores de polifenóis totais no extrato etanólico das cascas do taperebá de ~550 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de casca fresca, os quais foram utilizados tanto para o desenvolvimento das microcápsulas e das nanoestruturas lipídicas.

Embora sejam valores considerados significativos, poucos estudos foram encontrados sobre a casca desse fruto. Para além da casca, essa fruta possui polifenóis em sua polpa (712,72 ± 8,71 µg/g da polpa seca) (10). Aniceto *et al.* (40) constatou que o taperebá apresentou altos valores de PT na polpa congelada (~1300 mg EAG/100 g).

A avaliação da atividade antioxidante do extrato de taperebá foi medida a partir do método de DPPH e ABTS, em que foi revelado uma capacidade antioxidante de 51,62 ± 1,27 µMTEAC/g de casca para DPPH e 98,57 ± 2,49 µMTEAC/g de casca para ABTS. Da Silva *et al.* (159) revelaram a capacidade antioxidante para *Spondias mombin* L., que, quando comparado ao potencial antioxidante do ácido elágico e da quercetina isolados (compostos fenólicos presentes nessas espécies), a atividade antioxidante foi maior, demonstrando o poder de sequestro de radicais livre dos polifenóis do extrato.

A atividade antioxidante das polpas de murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) e taperebá foi de ~52,94% e ~74,14%, respectivamente para o DPPH e ~79 µMTEAC/g e ~188 µMTEAC/g para o ABTS, demonstrando alto poder antioxidante do

taperebá (40). Os resultados obtidos para a polpa do taperebá (40) foram maiores do que o obtido no presente estudo para a casca.

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos pode ser relevante para tratamento de doenças que envolvem os danos que radicais livres podem causar no organismo, que, em altas concentrações, podem danificar vários tipos de biomoléculas (160). Essa atividade dos compostos fenólicos é resultado da estabilização e deslocamento de elétrons desemparelhados que o anel fenólico promove, conferindo capacidade antioxidante, porém não é seu único mecanismo de proteção (161).

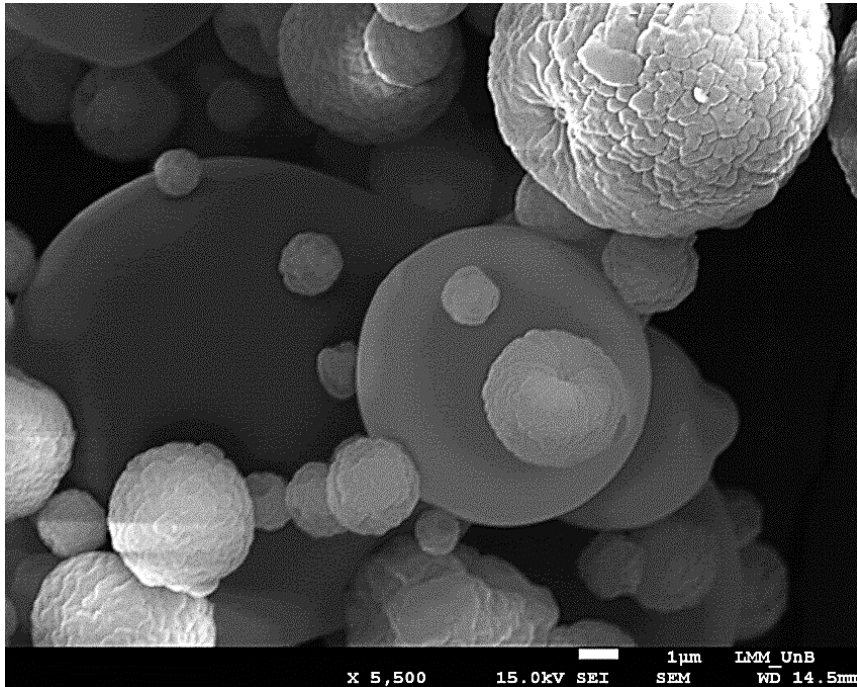
5.2 MICROENCAPSULAÇÃO DO EXTRATO DA CASCA DE TAPEREBÁ

5.2.1 Caracterização de micropartículas (MPs) de quitosana contendo extrato de taperebá

A eficiência de encapsulação do extrato etanólico da casca de taperebá com a quitosana foi de 55,4%, sendo o teor de polifenóis igual a $149,59 \pm 4,3$ mg EAG/g de micropartícula. É considerado um resultado interessante, uma vez que os compostos fenólicos apresentam sensibilidade térmica (58), e o método de *spray drying* utiliza de altas temperaturas na pulverização de materiais. Esse resultado demonstrou que as micropartículas foram capazes de encapsular o extrato.

Em relação à eficiência de encapsulação, Cabral *et al.* (6) obtiveram um resultado de ~90% na microencapsulação do extrato de jabuticaba, a partir de pulverização. Essa diferença observada entre a eficiência de encapsulação pode ser relacionada a composição e quantidade de polifenóis distinta dos extratos.

Figura 8 - Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura em um aumento de 5.500 vezes para as MPs contendo extrato de casca de taperebá.



Fonte - imagem autoral.

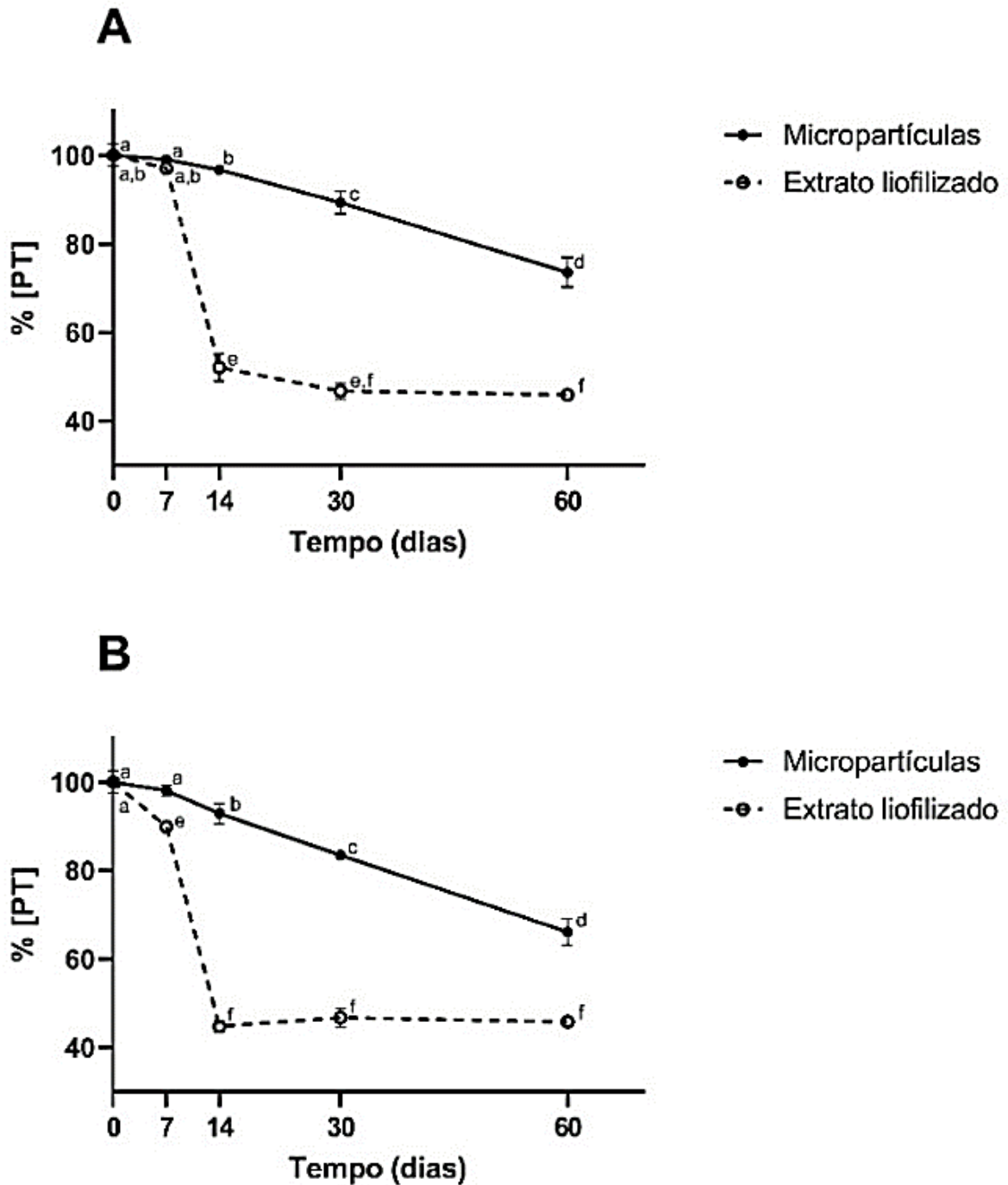
A formação e morfologia das micropartículas, avaliada a partir do MEV (figura 8), demonstrou o formato de esferas de tamanhos variados com superfície enrugada ou lisa. Na microencapsulação do extrato de jabuticaba, Cabral *et al.* (6) encontraram uma morfologia semelhante das microcápsulas de quitosana, que demonstraram uma superfície lisa, de diferentes tamanhos. Esse estudo também descreveu a morfologia da microcápsula sem extrato, que demonstrou um aspecto enrugado, indicando a interação entre o polímero e o extrato quando encapsulado. Desai *et al.* (162) identificaram o mesmo padrão de morfologia para a microencapsulação por pulverização de extrato fenólico de pétalas de açafão (*Crocus Sativus L.*), com maltodextrina como polímero.

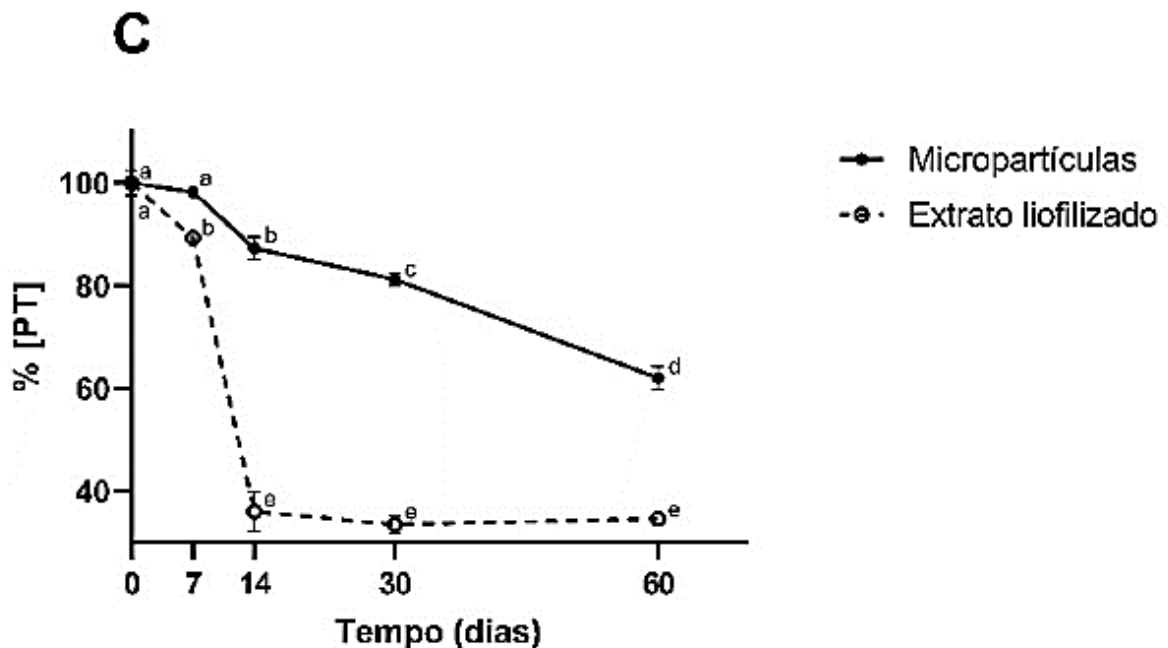
5.2.2 Ensaio de estabilidade Polifenóis Totais nas Micropartículas (MPs)

Os resultados obtidos com a estabilidade dos polifenóis totais microencapsulados e extrato liofilizado podem ser observados na figura 9. O

microencapsulamento foi capaz de proteger o conteúdo com compostos fenólicos em todas as temperaturas de armazenamento, durante 60 dias de estudo.

Figura 9 - Teor total de polifenóis das amostras submetidas a diferentes temperaturas ao longo de 60 dias.





Legenda - (A) Temperatura refrigerada ~2–6 °C; (B) Temperatura ambiente ~25 °C; (C) Temperatura de estresse térmico ~40 °C. Letras diferentes em cada gráfico representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) de acordo com o Tukey.

Fonte - imagens autorais.

O armazenamento por 60 dias em temperatura ambiente resultou na retenção de polifenóis nas micropartículas de ~65%, enquanto em temperatura estressante a retenção foi de ~60%. Após 60 dias de armazenamento em temperatura refrigerada, as micropartículas obtiveram retenção de ~75%, enquanto o extrato liofilizado teve a perda de ~55% da concentração de polifenóis totais. Isso demonstra o efeito da temperatura na degradação dos compostos fenólicos.

A retenção de polifenóis totais da casca da jabuticaba (*Plinia cauliflora*) em micropartículas de quitosana também foi maior do que quando comparada ao extrato liofilizado. Esse estudo também evidenciou a influência da temperatura na estocagem de polifenóis, demonstrando retenção de 75% na temperatura estressante após 30 dias, e de 100% na temperatura refrigerada após 60 dias (6).

A estabilidade térmica de micropartículas de maltodextrina contendo o extrato de *Antidesma punctatum* Mig. também demonstrou maior retenção quando refrigerada após 30 dias, com ~90% de retenção a 4 °C e ~50% a 45 °C ($p \leq 0,05$) (163). Mais estudos são necessários para a melhor compreensão de como outras

variáveis podem influenciar na estabilidade desse tipo de composto durante o período de armazenamento.

Portanto, o método de aprisionamento de compostos fenólicos extraídos de fontes naturais pode ser uma tecnologia útil ao levar em conta a susceptibilidade a fatores externos, por serem substâncias instáveis (56), aumentando a estabilidade e por consequência a possibilidade de novas aplicações (6,164).

5.3 FORMULAÇÃO DE CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO (CLN) A PARTIR DE ANÁLISE DAS VARIÁVEIS EM DIFERENTES PROPORÇÕES

Previamente aos testes de formulação dos CLNs, foi realizada a dissolução do extrato concentrado em rotaevaporador, no solvente NADES, com a intenção de tornar o processo de encapsulação mais prático, pois o extrato forma um material de difícil dissolução/solubilização após concentração em rotaevaporador. Como já descrito em literatura, os NADES podem ser capazes de solubilizar compostos fenólicos provenientes de extratos naturais (26).

Silva et al. (148) testaram diferentes misturas na intenção de constituir um NADES capaz de extrair antocianinas de blueberry, sem a necessidade de solventes tóxicos. Dessa forma, chegaram a uma formulação ternária de cloreto de colina (HBA), glicerol (HBD) e ácido cítrico (HBD), chegando a uma extração mais eficiente do que quando utilizado um solvente tóxico. Essa mistura se enquadra na classificação de DES tipo III e pode ser chamado de NADES por conta da grande quantidade de glicerol (113). Apesar do sucesso de dissolução do extrato com NADES, mais estudos são necessários para determinar a formação desse solvente e a forma com que ele interage com o extrato.

Além disso, as formulações foram avaliadas tanto com extrato dissolvido no NADES quanto sem a dissolução, em razão da falta de trabalhos que utilizam esse solvente com compostos fenólicos encapsulados, para entender melhor a influência dessa mistura à formulação.

As diferentes formulações de CLNs foram avaliadas conforme análise macroscópica e as características coloidais (apresentadas nas tabelas 5 a 7), conforme os diferentes fatores que foram alterados (quantidade de lipídeos, surfactante, extrato e NADES com extrato). As características coloidais avaliadas

foram o índice de polidispersão (PDI) e tamanho (nm). O PDI se refere à homogeneidade em que estão distribuídos os tamanhos das nanopartículas, podendo variar de 0 a 1 (quanto mais próximo a zero, mais homogêneo é a distribuição de tamanho). Já o tamanho dos CLNs é a medida do diâmetro hidrodinâmico, tendo como unidade de medida o nanômetro (165).

Tabela 5 - Características coloidais das formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) com diferentes proporções de lipídios, relacionadas ao índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico (DH).

Formulações	Murumuru (%)	Óleo de buriti (%)	PDI	Tamanho (nm)
F1	3,8	0	0,13 ± 0,02	44,81 ± 0,28
F2	3,6	0,2	0,14 ± 0,02	48,80 ± 0,38
F3	3,3	0,5	0,14 ± 0,02	49,04 ± 0,43
F4	3,1	0,7	0,15 ± 0,01	51,41 ± 0,07
F5	2,9	0,9	0,19 ± 0,01	53,51 ± 0,38

Resultados expressos como uma média de triplicatas e desvio padrão.

Fonte - Elaborado pelos autores.

Após avaliação das características coloidais dos CLNs com diferentes proporções de lipídios (tabela 5), foi observado um valor de PDI dentro do esperado, sem muita variação de tamanho, para todas as formulações. Porém, na avaliação macroscópica, apenas as formulações F1 e F2 não demonstraram separação de fases (tabela 6). Assim, a F2 foi a formulação selecionada para a continuidade do trabalho (CLN com lipídios em fase sólida e líquida). Os CLNs que são constituídos por lipídios nas fases sólida e líquida podem ter um poder de aprisionamento e liberação de ativos mais controlados do que as nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs), devido ao maior grau de imperfeição cristalina (23).

Tabela 6 - Alterações macroscópicas identificadas nas formulações.

Formulação	Alteração macroscópica
F1	Emulsão homogênea
F2	Emulsão homogênea
F3	Emulsão heterogênea (separação de fases)
F4	Emulsão heterogênea (separação de fases)
F5	Emulsão heterogênea (separação de fases)

Fonte - Elaborado pelos autores.

Após a otimização da proporção de lipídios, foram realizados testes para a verificação da quantidade de surfactante mais adequada a ser utilizada na formulação, com a intenção de se adicionar a menor quantidade possível, visando a não toxicidade (155) e um valor de PDI dentro $<0,25$ (166). Tanto a composição como os resultados das formulações podem ser verificados na tabela 7, onde observa-se que a formulação F2 foi a mais adequada. Verificou-se que quanto menor a quantidade de surfactante, maior o tamanho de partícula e maior a heterogeneidade do tamanho de partícula.

Tabela 7 - Características coloidais das formulações de CLN com diferentes proporções de surfactante, relacionadas ao índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico (nm).

Formulações	Surfactante (%)	Lipídios (%)	PDI	Tamanho (nm)
F6	1,2	3,8	$0,38 \pm 0,96$	$269,27 \pm 0,96$
F7	1,7	3,8	$0,36 \pm 0,01$	$76,07 \pm 0,22$
*F2	2,1	3,6	$0,14 \pm 0,02$	$49,04 \pm 0,43$
F8	2,6	3,1	$0,11 \pm 0,05$	$37,05 \pm 0,48$
F9	3,1	2,9	$0,08 \pm 0,01$	$32,4 \pm 0,30$

Nota – F2 corresponde à mesma formulação designada como “F2” descrita na tabela 1; Resultados expressos como uma média de triplicatas e desvio padrão.

Fonte - Elaborado pelo autor.

A escolha do surfactante utilizado para o presente estudo foi realizada utilizando-se o método descrito por Silva (154), com as alterações necessárias para a encapsulação do extrato de taperebá e otimização para formação de CLNs (adição do óleo de buriti). O Brij® O10 foi o escolhido por ser um surfactante com característica de carga neutra (não iônico), geralmente utilizado na administração transdérmica de fármacos, com baixo potencial de irritação, que, levando-se em consideração o tipo de câncer estudado no presente estudo (melanoma), são características interessantes (155).

Tabela 8 - Características coloidais das formulações de CLN com diferentes proporções de extrato, relacionadas ao índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico (DH).

Formulações	Extrato (mg/g CLN)	PDI	Tamanho
F2.1	13,81	0,25 ± 0,01	89,85 ± 0,41
F2.2	29,13	0,38 ± 0,01	98,79 ± 0,45
F2.3	45,80	0,18 ± 0,02	142,93 ± 2,46
F2.4	56,60	0,24 ± 0,02	199,83 ± 0,80
F2.5	70,63	0,23 ± 0,01	167,30 ± 2,87

Nota – F2 corresponde à mesma formulação designada como “F2” descrita na tabela 1; Resultados expressos como uma média de triplicatas e desvio padrão.

Fonte - Elaborado pelo autor.

De acordo com os valores apresentados na tabela 8, verificou-se um aumento do PDI e do tamanho, mas não foi possível encontrar um padrão de quantidade de extrato. Portanto, para os demais testes, foi escolhida a formulação com PDI em valor abaixo de 0,25 contendo a maior quantidade possível de extrato (F2.5).

Tendo em vista que estudos já descreveram seu poder de crioproteção em culturas de células, e sua natureza menos tóxica do que outros solventes (25,26), essa formulação poderia ser útil para a crioproteção de nanopartículas e do conteúdo encapsulado, caso houvesse a necessidade de liofilização para aplicações futuras.

Tabela 9 - Características coloidais das formulações de CLN com diferentes quantidades de extrato e NADES, relacionadas ao índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico (DH).

Formulações	Nades (mL)	Extrato (mg/g CLN)	PDI	Tamanho
F2.6	1,5	92,59	0,21 ± 0,03	242,63 ± 3,69
F2.7	5,0	308,64	0,28 ± 0,01	124,00 ± 1,10
F2.8	8,5	493,83	0,27 ± 0,02	150,00 ± 0,17

Nota – F2 corresponde à mesma formulação designada como “F2” descrita na tabela 1; Resultados expressos como uma média de triplicatas e desvio padrão.

Fonte - Elaborado pelo autor.

Com o objetivo de adicionar NADES à formulação, foi utilizada uma formulação base, que foi testada quanto ao PDI e tamanho anteriormente (F2), alterando apenas o volume de NADES com extrato, para obtenção da formulação de CLN otimizado (tabela 9).

A partir do PDI e tamanho da nanopartícula, foi selecionada a formulação com a quantidade de 1,5 mL (F2.6), que foi a formulação com menor heterogeneidade, porém, um tamanho maior (tabela 9). A dissolução do extrato concentrado é dificultada em razão das características dos compostos fenólicos, que, nesse estado físico, se dissolvem em solventes tóxicos, como o etanol (24).

Portanto, a partir das formulações com melhores resultados de PDI ($>0,25$) e avaliação do tamanho (155) nos testes de proporção de lipídios, surfactante, quantidade de extrato sem NADES e quantidade de NADES com extrato, foram realizados testes com diferentes temperaturas (tabela 10), a fim de otimizar o processo de encapsulamento de polifenóis. As formulações avaliadas foram: F2 (BRA), F2.5 (ESN), F2.6 (ECN) e a formulação F2.6 com mesmo volume de NADES, mas sem extrato (BCN).

Tabela 10 - Índice de polidispersão (PDI) e diâmetro hidrodinâmico (nm) das formulações BRA, BCN, ESN e ECN elaboradas em diferentes temperaturas.

Formulação	Temp (°C)	PDI	Tamanho
BRA	70	0,25 \pm 0,02	214,60 \pm 25,65
	75	0,26 \pm 0,02	255,23 \pm 4,21
	80	0,14 \pm 0,02	46,71 \pm 0,20
BCN	70	0,26 \pm 0,02	196,73 \pm 2,37
	75	0,88 \pm 0,20	173,47 \pm 11,81
	80	0,33 \pm 0,01	111,90 \pm 4,42
ESN	70	0,23 \pm 0,01	199,13 \pm 0,91
	75	0,64 \pm 0,04	198,67 \pm 10,22
	80	0,30 \pm 0,01	126,37 \pm 1,46
ECN	70	0,21 \pm 0,03	159,00 \pm 0,66
	75	0,57 \pm 0,06	151,80 \pm 5,40
	80	0,56 \pm 0,02	130,63 \pm 2,77

Nota – F2 corresponde à mesma formulação designada como “F2” descrita na fig 1; Resultados expressos como uma média de triplicatas e desvio padrão; BRA: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10 e óleo de buriti; BCN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES; ESN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e extrato; ECN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES + extrato.

Fonte – Elaborado pelo autor.

Após a adição do extrato e do NADES foi possível perceber aumento no PDI, sendo necessário ajustar mais um parâmetro da formulação: a temperatura. Assim, todas as formulações selecionadas foram testadas à 70 °C, 75 °C e 80 °C. A formulação BRA apresentou melhores resultados à 80 °C, enquanto as demais

apresentaram melhores resultados à 70 °C. Tais resultados podem ser consequência da sensibilidade térmica do extrato (6,56) ou, provavelmente, a degradação de componentes do NADES, que podem estar desestabilizando o sistema da nanoestrutura, de forma a causar heterogeneidade do tamanho (aumento do PDI).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO CARREADOR LIPÍDICO NANOESTRUTURADO (CLN)

5.4.1 Características coloidais

As formulações selecionadas nos testes anteriores, conforme a proporção de lipídios, proporção de surfactante, proporção de extrato, proporção de NADES com extrato e temperatura, foram a F2, que é o CLN com manteiga de murumuru, surfactante e óleo de buriti (BRA); a F2.6 (sem extrato), que é o CLN com manteiga de murumuru, surfactante, óleo de buriti e NADES (BCN); a F2.5, que é o CLN com manteiga de murumuru, surfactante, óleo de buriti e extrato (ESN); e a F2.6, que é o CLN com manteiga de murumuru, surfactante, óleo de buriti e NADES com extrato (ECN). Essas formulações foram submetidas a caracterização a partir de da avaliação de PDI, tamanho de nanopartícula e análise macroscópica, onde é avaliada de forma visual a fluidez e homogeneidade.

As formulações selecionadas apresentaram características macroscópicas adequadas (homogeneidade). A tabela 11 mostra os valores de PDI, tamanho, potencial zeta e eficiência de encapsulamento (EE%) das formulações de CLNs.

Tabela 11 - Índice de polidispersão (PDI), diâmetro hidrodinâmico (DH), potencial zeta (PZ), polifenóis totais (PT), eficiência de encapsulamento (EE%) das formulações de CLNs.

Formulação	Temp (°C)	PDI	DH (nm)	PZ (mV)	PT (mg GAE/mL CLN)	EE%
BRA	80	0,14 ± 0,02	46,71 ± 0,20	-19,39 ± 0,76	-	-
BCN	70	0,26 ± 0,02	196,73 ± 2,37	-2,83 ± 0,27	-	-
ESN	70	0,23 ± 0,01	199,13 ± 0,91	-4,31 ± 0,16	27,05 ± 0,97	83,95
ECN	70	0,21 ± 0,03	159,00 ± 0,66	-2,35 ± 0,35	20,64 ± 0,58	85,81

Nota – F2 corresponde à mesma formulação designada como “F2” descrita na fig 1; Resultados expressos como uma média de triplicatas e desvio padrão; BRA: formulação com manteiga de

murumuru, Brij® O10 e óleo de buriti; BCN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES; ESN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e extrato; ECN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES + extrato.

Fonte – Elaborado pelo autor.

Em relação ao tamanho das nanopartículas, apenas a BRA manteve as dimensões dentro da nanoescala (21), enquanto as demais demonstraram um aumento de mais de 4 vezes nos valores de DH dos CLNs quando adicionados o extrato e/ou NADES, porém, suas dimensões ainda permaneceram na medida nanométrica. Também houve um aumento no PDI, porém, este se manteve em um valor menor do que 0,25 (155) para quase todos, com exceção do BCN, que se manteve próximo. O potencial zeta da BRA, que não continha extrato e nem NADES, foi mais negativamente carregado do que as demais. Tal característica pode proporcionar uma melhor estabilidade para BRA, por diminuir as chances de coalescência (165).

A diferença entre as formulações pode ser explicada pela diferença de temperatura utilizada em cada formulação, já que para a BRA foi utilizado 80 °C, obtendo um potencial zeta de aproximadamente -20 mV, enquanto as demais foram formuladas à 70 °C e obtiveram um potencial zeta próximo a zero. Silva (154) cita que um aumento da temperatura na formulação promove o desenvolvimento de CLNs com cargas negativas menores. A hipótese gerada é que o aumento da carga pode ser explicado pela presença de ácidos graxos livres da manteiga, portanto o aumento da temperatura pode promover melhor distribuição dos ácidos graxos na superfície dos CLNs.

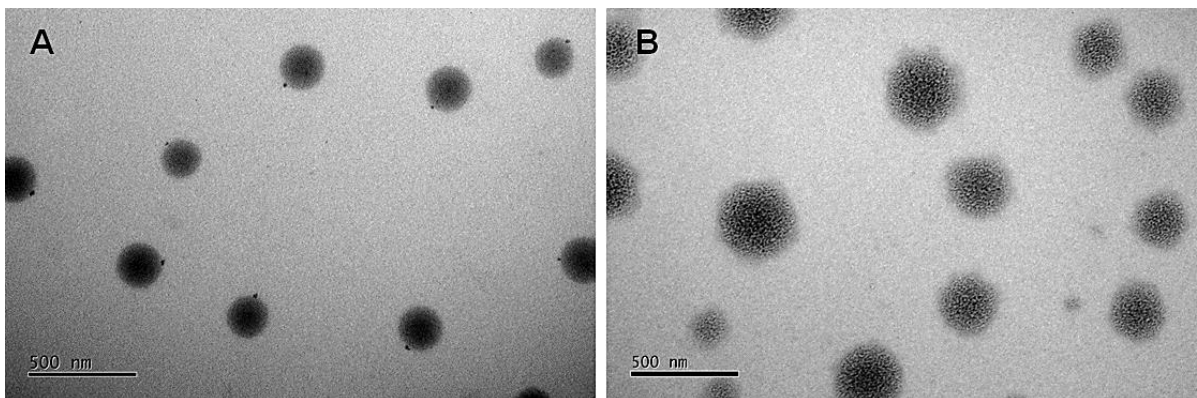
A eficiência de encapsulamento (EE%) obtida para ESN foi de 83,95%, com $27,05 \pm 0,97$ mg GAE/mL NP, e para ECN foi de 85,81%, com $20,64 \pm 0,58$ mg GAE/mL NP, não demonstrando diferença para a formulação com e sem o NADES. A eficiência de encapsulamento (EE%) de fármacos em sistemas de nanoestruturas lipídicas, em geral, depende da solubilidade do princípio ativo no material da matriz lipídica. Um trabalho que encapsulou a quercetina, que é um composto fenólico, em um sistema de CLN, evidenciou uma EE de ~95% (167). O sucesso da encapsulação desse composto pode ser explicado pela sua natureza hidrofóbica. Brito *et al.* (5) identificaram a quercetina como um dos compostos mais abundantes no extrato de taperebá. Isso pode explicar a alta EE% obtida em CLNs formuladas no presente estudo (~85%).

Outro estudo avaliou o potencial de NLS para a o encapsulamento de resveratrol, e obteve ~90% de EE (168), demonstrando que esse sistema de entrega de fármacos expressou alta capacidade de aprisionamento de compostos fenólicos.

5.4.2 Morfologia das Nanopartículas (NPs)

As microscopias na figura 10 indicam a morfologia dos CLNs sem NADES e com NADES. Os dois CLNs apresentaram formato esférico, porém, ao observar a figura 10A nota-se uma morfologia mais organizada do que quando comparado com a figura 10B, que está mais difusa na presença de NADES. A hipótese é que o NADES dificulte a formação de cristais lipídicos.

Figura 10 - Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para o extrato de casca de taperebá encapsulado nos CLNs.



Legenda - A) CLN sem NADES (ESN); e B) CLN com NADES (ECN).

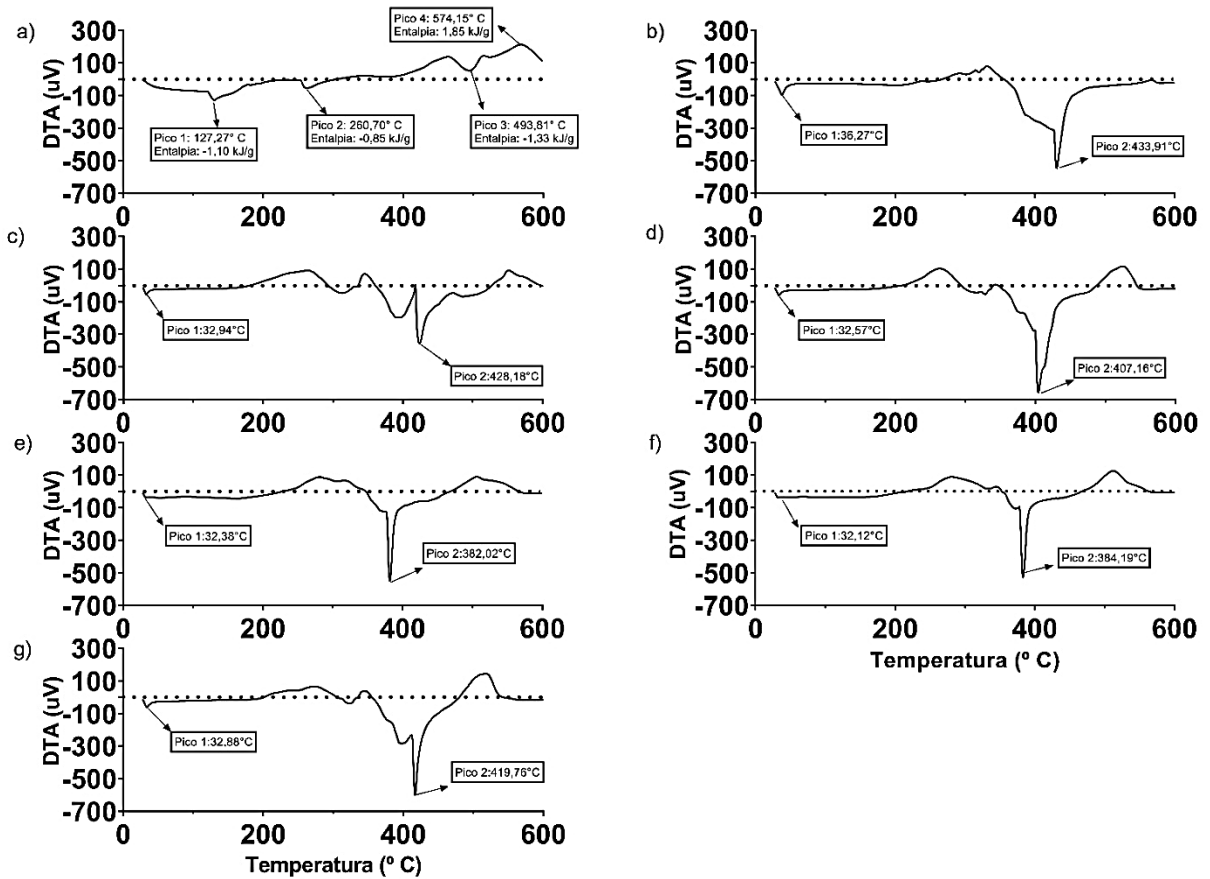
Fonte – Imagens autorais.

Além disso, o comportamento físico desses lipídios está relacionado às características da cadeia hidrocarbônica, a presença de insaturações, e configurações cis ou trans (169,170). Os NADES, podem atuar dificultando a cristalização e assim, o sistema terá uma estrutura mais desorganizada, porém mais testes precisam ser realizados para tal afirmação.

5.4.3 Análise térmica diferencial (DTA) e Análise termogravimétrica (TGA)

A figura 11 apresenta os valores da análise térmica diferencial (DTA), que é uma técnica em que se medem mudanças físicas ou químicas de uma determinada substância em relação a uma variação de temperatura. A tabela 11 se refere às temperaturas de início e de fim dos picos térmicos e entalpia gerada nos eventos térmicos dos diferentes materiais e formulações. Essa análise identifica de forma qualitativa, a partir do cálculo da área sob a curva, a energia envolvida no evento térmico, a entalpia. A reação é caracterizada como exotérmica quando gera uma curva no sentido ascendente e apresenta entalpia positiva, já quando gera uma curva no sentido descendente é uma reação endotérmica e apresenta entalpia negativa (171).

Figura 11 - Curvas da análise térmica diferencial (DTA).



Legenda - a) Extrato liofilizado b) Manteiga de murumuru; c) CLN com manteiga de murumuru e Brij® O10; d) CLN com manteiga de murumuru, Brij® O10 e óleo de buriti; e) CLN com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES; f) CLN com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti, NADES e extrato da casca do taperebá; g) CLN com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e extrato da casca do taperebá.

Fonte – Elaborado pelo autor.

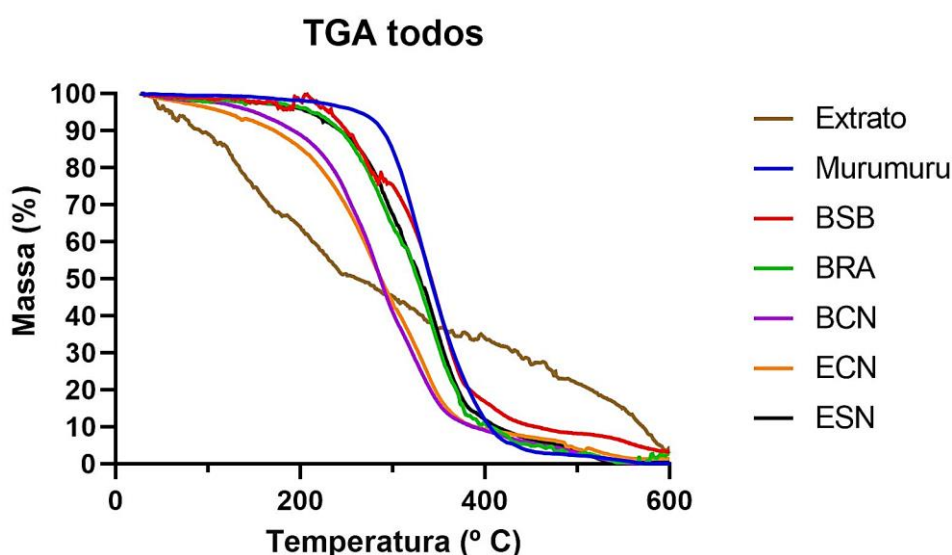
Tabela 12 - Temperaturas de início e de fim dos picos térmicos identificados pela análise térmica diferencial (DTA) e entalpia gerada nos eventos térmicos da manteiga de murumuru e diferentes formulações.

Formulação	Evento*	Temperatura de início (°C)	Temperatura de fim (°C)	Temperatura do pico (°C)	Entalpia (kJ/g)
Murumuru	1	28,39	45,72	36,27	-0,56
	2	429,72	448,95	433,91	-0,50
BSB	1	28,96	54,03	32,94	-0,17
	2	428,18	433,32	428,18	-1,47
BRA	1	28,36	48,3	32,57	-0,16
	2	402,96	421,86	407,16	-3,52
BCN	1	26,68	32,38	32,38	-0,04
	2	376,64	388,65	382,02	-1,88
ECN	1	28,90	39,28	32,12	-0,05
	2	378,33	390,61	384,19	-2,06
ESN	1	28,35	55,06	32,88	-0,20
	2	414,67	426,32	419,76	-1,79

Nota - Numeração referente aos eventos térmicos marcados nos gráficos apresentados na figura 11. BSB: formulação com manteiga de murumuru e Brij® O10; BRA: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10 e óleo de buriti; BCN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES; ECN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES + extrato; ESN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e extrato.

Fonte – Elaborado pelo autor.

Figura 12 - Curvas termogravimétricas obtidas para os diferentes materiais e formulações.



Legenda - BSB: formulação com manteiga de murumuru e Brij® O10; BRA: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10 e óleo de buriti; BCN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES; ECN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES + extrato; ESN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e extrato.

Fonte – Imagens autorais.

Tabela 13 - Faixa de temperatura das etapas observadas nos gráficos da análise termogravimétrica (TGA) e perda de massa (%) de cada material ou formulação.

Formulação	Etapas	Faixa de Temperatura (C°)	Perda de massa (%)
Extrato	1	67,6 - 114,9	6,4
	2	114,9 - 182,5	19,9
	3	182,5 - 246,2	15,8
	4	246,2 - 395,4	16,2
	5	395,4 - 487,7	12,2
	6	487,7 - 596,0	19,3
Murumuru	1	257,6 - 429,4	90,3
	2	429,7 - 542,0	4,2
BSB	1	212,4 - 285,8	21,1
	2	285,9 - 378,1	56,0
	3	378,1 - 600,0	18,3
BRA	1	204,2 - 311,8	37,4
	2	311,8 - 377,5	52,6
	3	377,5 - 534,3	4,8
BCN	1	106,2 - 354,8	83,0
	2	354,9 - 531,8	13,6
ECN	1	88,2 - 136,3	3,9
	2	136,6 - 301,5	50,6
	3	301,7 - 559,2	40,7
ESN	1	208,3 - 332,5	47,6
	2	332,7 - 387,8	33,4
	3	387,5 - 525,3	13,0

Nota - BSB: formulação com manteiga de murumuru e Brij® O10; BRA: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10 e óleo de buriti; BCN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES; ECN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES + extrato; ESN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e extrato.

Fonte – Elaborado pelo autor.

A figura 12 representa as curvas termogravimétricas obtidas a partir do TGA, que diz respeito à perda de massa conforme há o aumento de temperatura, representando a estabilidade térmica do extrato. A tabela 13 mostra os dados representativos do gráfico de TGA para a manteiga de extrato de casca de taperebá murumuru e as diferentes formulações.

As contribuições das curvas de DTA do extrato liofilizado são apresentadas na figura 11a, onde é possível identificar quatro contribuições: 3 eventos endotérmicos (127,27 °C; 260,70 °C e 493,81 °C) e um evento exotérmico em 574,15 °C. Esses eventos são, provavelmente, de alguns componentes do extrato já quantificados por esse grupo de pesquisa (5). De acordo com esses resultados de quantificação, o

extrato de cascas de taperebá possui diversos compostos fenólicos, destacando-se o ácido elágico, a quercetina, o ácido gálico e o *cis*-Piceid.

Valores muito semelhantes aos dois picos endotérmicos observados para o extrato (figura 11a): em 127,27 °C e 260,70 °C, também foram observados por Sakurai *et al.* (172). Nesse trabalho os autores apresentam a curva de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para o ácido elágico puro, com dois eventos endotérmicos: o primeiro em 128 °C e o segundo em 293 °C.

Já Aydogdu *et al.* (173) identificaram um pico endotérmico a 275 °C na curva (DSC) do ácido gálico puro, que é referente ao ponto de fusão da forma cristalina desse composto. Tal pico não foi evidenciado no presente estudo, podendo ser consequência da perda da sua estrutura cristalina original.

Ravichandran, Rajendran e Devapiriam (174), demonstraram em seu trabalho que a quercetina apresentou um pico endotérmico em torno de 500 °C, evento semelhante ao observado no extrato (493,81 °C), com duas etapas de degradação na curva de TGA, a primeira em torno de 300 °C e a segunda de 400 °C a 500 °C. Os pontos de degradação da quercetina são similares aos resultados apresentados na curva de TGA expressos na figura 12, onde a quarta etapa de perda de massa ficou entre 246,2 °C a 395,4 °C e quinta entre 395,4 °C a 487,7 °C (tabela 13). De forma geral, pode-se inferir que os eventos observados no extrato, bem como as etapas de degradação apresentados, podem corresponder aos compostos ácido elágico e quercetina. Além disso, o quarto pico (574,15 °C) observado no extrato pode ser relacionado a degradação dos compostos residuais.

Cabe ressaltar que os eventos observados no extrato não foram observados nos gráficos condizentes às formulações de nanopartículas que continham extrato (figura 11e e 11f). Tal observação pode significar interação entre os componentes (173,174).

Os eventos térmicos que aparecem na figura 11b são referentes à manteiga de murumuru (36,27°C e 433,91°C) e se repetem para todas as formulações que contém esse componente. O TGA (figura 12), demonstra o início de degradação da manteiga em 257,6 °C, com perda de massa de 90,3% na primeira etapa (tabela 13). Almeida *et al.* também identificaram o primeiro pico localizado à 32,8 °C, que é um evento próximo ao ponto de fusão do ácido láurico (175), composto majoritário (40 - 50%) dentre os ácidos graxos presentes nessa manteiga (176).

Para o segundo pico da manteiga (figura 11b), os resultados obtidos foram diferentes dos observados na literatura, que traz um pico endotérmico em 323,1 °C, com estabilidade térmica no TGA até 111,6 °C (177). Além disso, em nosso trabalho observamos duas etapas de degradação da manteiga, diferentemente de Lima (177), que observou três etapas de degradação.

Na figura 11c é possível observar as contribuições do DTA da interação entre a manteiga e o surfactante, que são os eventos entre 200 °C e 400 °C e em torno de 550 °C, bem como alteração da entalpia do segundo pico de -0,50 kJ/g para -1,47 kJ/g (tabela 12). Segundo a ficha técnica do produto Brij® O10, o seu ponto de ebulição é de 255 °C, o ponto de inflamação é acima de 240°C e a temperatura de decomposição é de 281 °C, portanto estes eventos podem ser referentes à interação entre a manteiga e o surfactante (178).

Quando o óleo de buriti é adicionado (BRA), observa-se diferença na temperatura do segundo evento térmico (figura 11d) em relação à formulação BSB (figura 11c), no qual o pico se desloca de 428,18 °C para 407,16 °C. Na figura 11d também é possível observar a variação da entalpia de -1,47 kJ/g para -3,52 kJ/g (tabela 12), provavelmente, a consequência da interação do óleo de buriti com os demais componentes da formulação. Além disso, o gráfico de TGA (figura 12; tabela 13), identificou três etapas de perda de massa: em 204,2 °C, 311,8 °C e 377,5 °C.

Segundo Lima (177) o DSC do óleo de buriti puro registrou três picos: em 348,5 °C, em 416,5 °C e em 506,1 °C, que foram relacionados à evaporação e/ou pirólise dos triacilgliceróis. O mesmo estudo identificou três etapas de degradação na curva de TGA, nas temperaturas de 162,0 °C; 393,6 °C e 479,1 °C. Em nosso trabalho não foram observadas as mesmas contribuições na curva de DTA após a inclusão do óleo de buriti à formulação (figura 11d), e esses achados das etapas de degradação são semelhantes quando relacionados ao número de etapas (figura 12; tabela 12), mas não em relação à temperatura em que ocorrem. Tais achados, juntamente ao deslocamento do pico de DTA para menor temperatura, podem ser resultado da interação dos componentes da formulação com o óleo.

A adição do NADES às formulações BCN e ECN acarretou mudanças nas curvas de DTA (figura 11e; figura 11f), onde é possível observar a atenuação do primeiro pico e a antecipação do segundo pico (~380 °C) quando comparados às outras formulações (figura 11c; figura 11d; figura 11g). Essas alterações são sugestivas de interações entre o NADES e os CLNs.

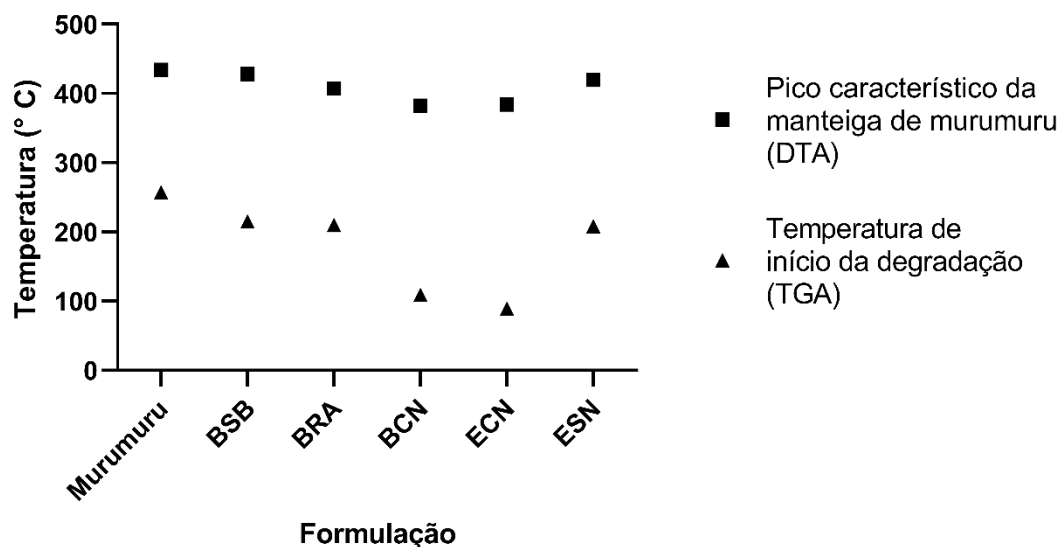
Silva *et al.* (148) caracterizaram diferentes composições de NADES em seu trabalho, apresentando a formulação: cloreto de colina:glicerol:ácido cítrico na proporção molar de 0,5:2:0,5 como o NADES capaz de substituir solventes orgânicos em algumas aplicações, que foi a mesma formulação utilizada neste estudo. No mesmo estudo, a calorimetria exploratória diferencial (DSC) apresentou um pico endotérmico em torno de 160 °C. Esse evento não foi observado no DTA apresentado pelas figuras 11e e 11f.

Em relação aos resultados do DTA, as formulações ECN e ESN (figuras 11f e 11g) não demonstraram os eventos térmicos observados na curva de DTA do extrato liofilizado (figura 11a). Tal observação pode estar relacionada à degradação de compostos fenólicos no processo de formulação (148) dos CLNs, como também, à interação entre os componentes do extrato e os componentes da formulação, e evidência da nanoencapsulação desses compostos fenólicos (173,179).

Em seu trabalho, Gumireddy *et al.* (180) fizeram a análise de DSC após a formulação de NLS com curcumina e resveratrol, em que não foi possível identificar o pico de fusão da curcumina nas amostras nanoencapsuladas. Segundo os autores isso pode ser explicado pela baixa concentração do composto no estado não cristalino ou pela sua baixa concentração.

O início da degradação do extrato liofilizado (figura 12; tabela 13) em menores temperaturas (~65 °C) pode ser um fator que influencia o início mais precoce da degradação da ECN (~88,2 °C), o CLN que contém extrato juntamente ao NADES, quando comparada às outras formulações. Porém, não se observou influência na formulação com extrato e sem NADES (ESN), quando comparada à BRA, que iniciaram sua degradação em ~208 °C e ~204 °C, respectivamente. De todo modo, as duas demonstraram proteção térmica em relação ao extrato liofilizado. Outros estudos também demonstram a proteção térmica de compostos fenólicos quando encapsulados em relação à análise termogravimétrica (181–183).

Figura 13 - Comparação entre a temperatura do evento endotérmico (pico 2 na figura 11) e o início da degradação demonstrado na análise termogravimétrica (TGA), para a manteiga de murumuru e as diferentes formulações.



Legenda - BSB: formulação com manteiga de murumuru e Brij® O10; BRA: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10 e óleo de buriti; BCN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES; ECN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES + extrato; ESN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e extrato.

Fonte – Imagem autoral.

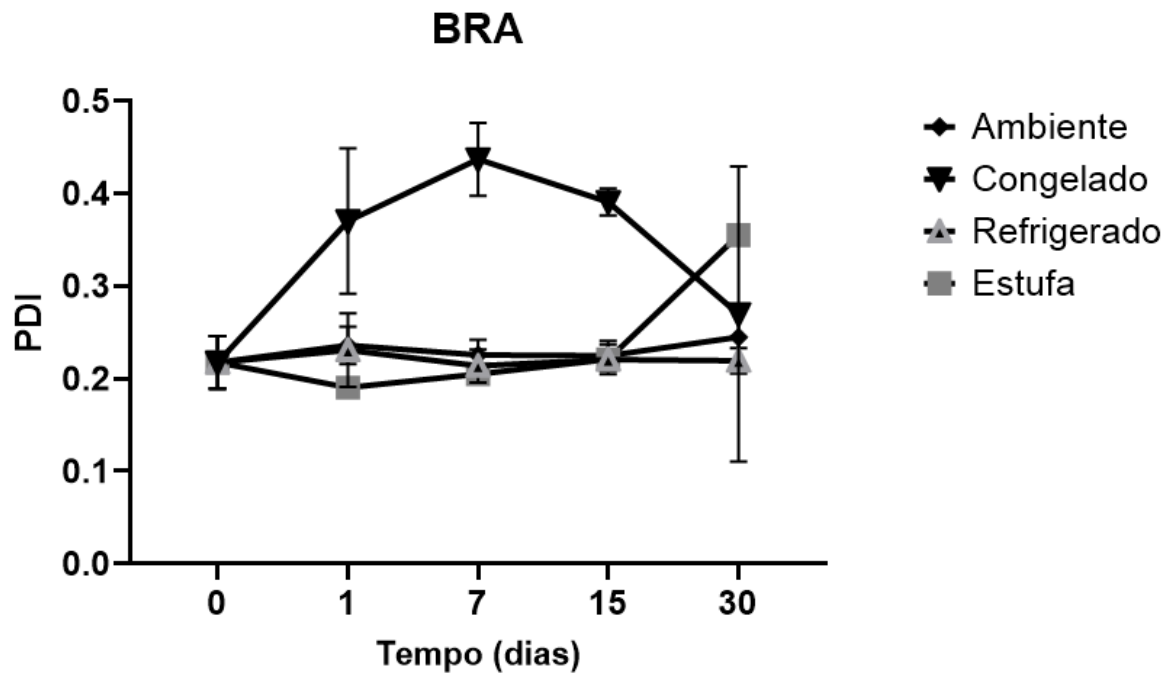
A figura 13 apresenta o deslocamento da eventos térmicos (DTA) de todas as formulações para temperaturas mais baixas em relação à manteiga de murumuru, assim como houve um deslocamento na curva termogravimétrica (TGA). É possível identificar que, quando adicionado o NADES, há o deslocamento da curva de DTA e TGA para menores temperaturas, indicando menor efeito de estabilidade térmica. Porém esse deslocamento também pode ser relacionado à interação do solvente eutético com os componentes das formulações (184).

5.4.4 Estudo da estabilidade coloidal das formulações

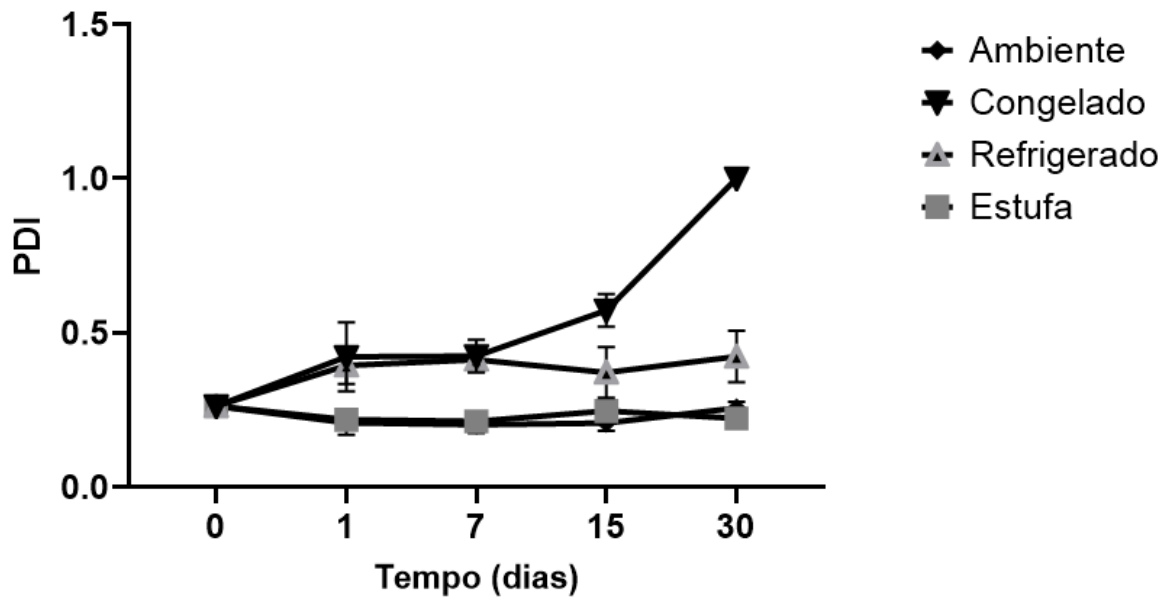
A estabilidade de formulações é definida como a capacidade de manter suas características físico-químicas ao longo do tempo em condições de armazenamento controladas (185). Assim, para essa avaliação, as formulações BRA, BCN, ECN e ESN foram submetidas a diferentes condições de temperatura: ambiente (25 ± 2 °C) congelado (-20 ± 2 °C), refrigerado (-4 ± 2 °C) e estufa (37 ± 2 °C); e avaliadas

conforme o índice de polidispersão (PDI), o tamanho do diâmetro hidrodinâmico (nm), e valores da carga de superfície (potencial zeta), e os resultados são apresentados na figura 14 e 15, e tabela 14, respectivamente. As análises foram realizadas no dia 0, após um dia, após 7 dias, após 15 dias e após 30 dias.

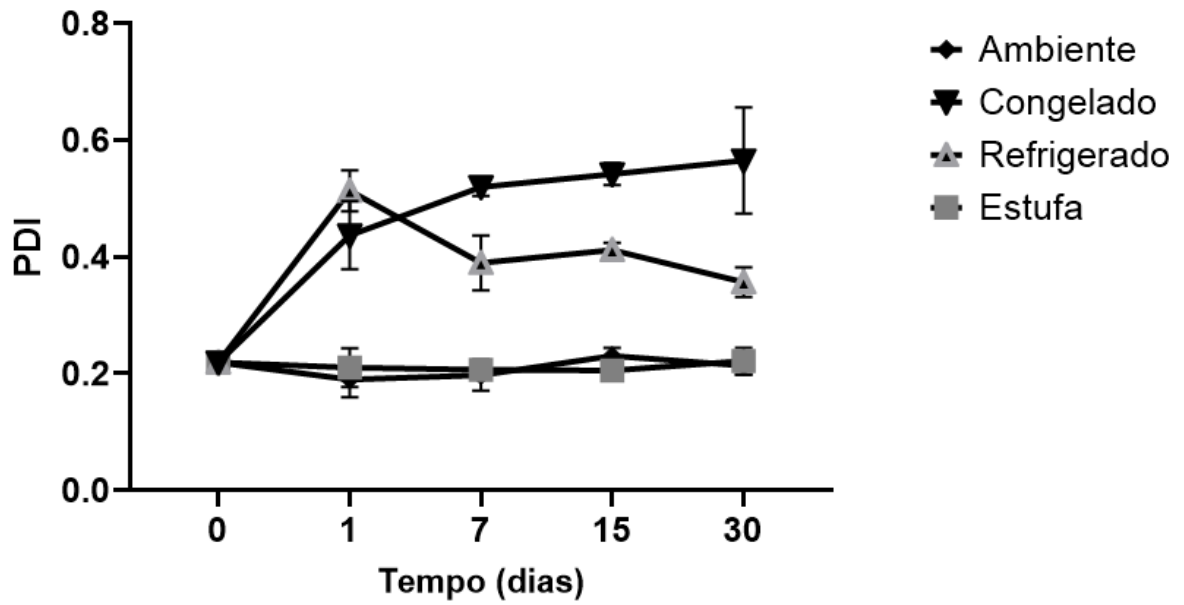
Figura 14 - Índice de polidispersão (PDI) referente a cada formulação armazenada em condições de temperatura diferentes, ao longo de 30 dias.

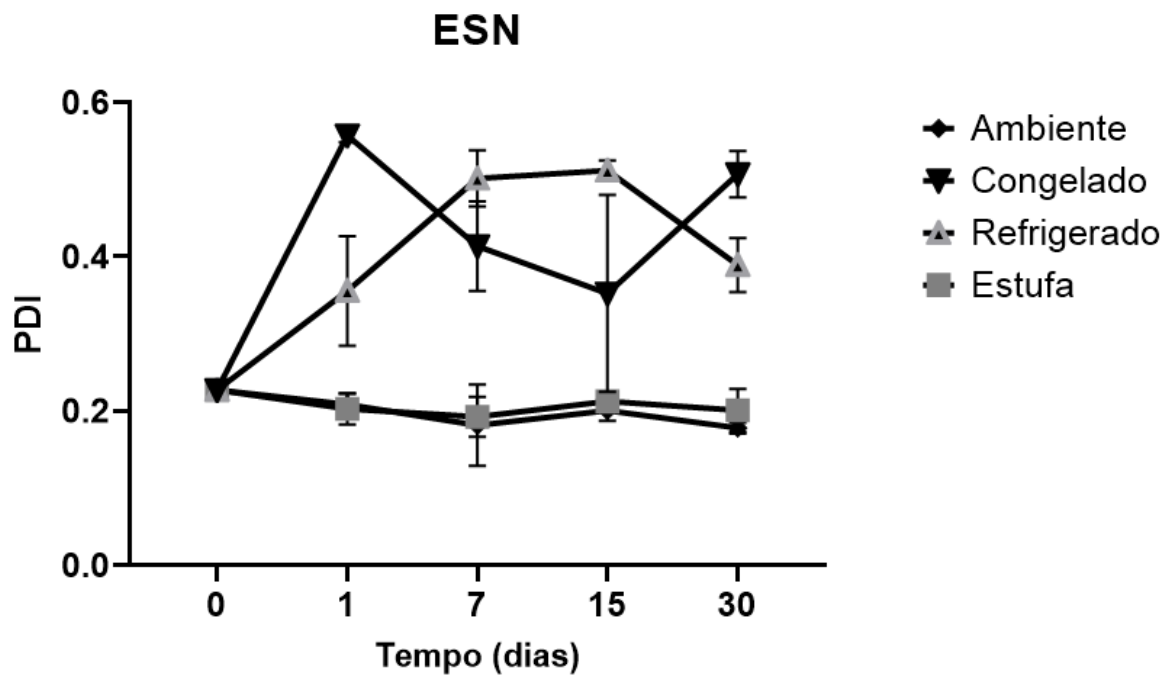


BCN



ECN

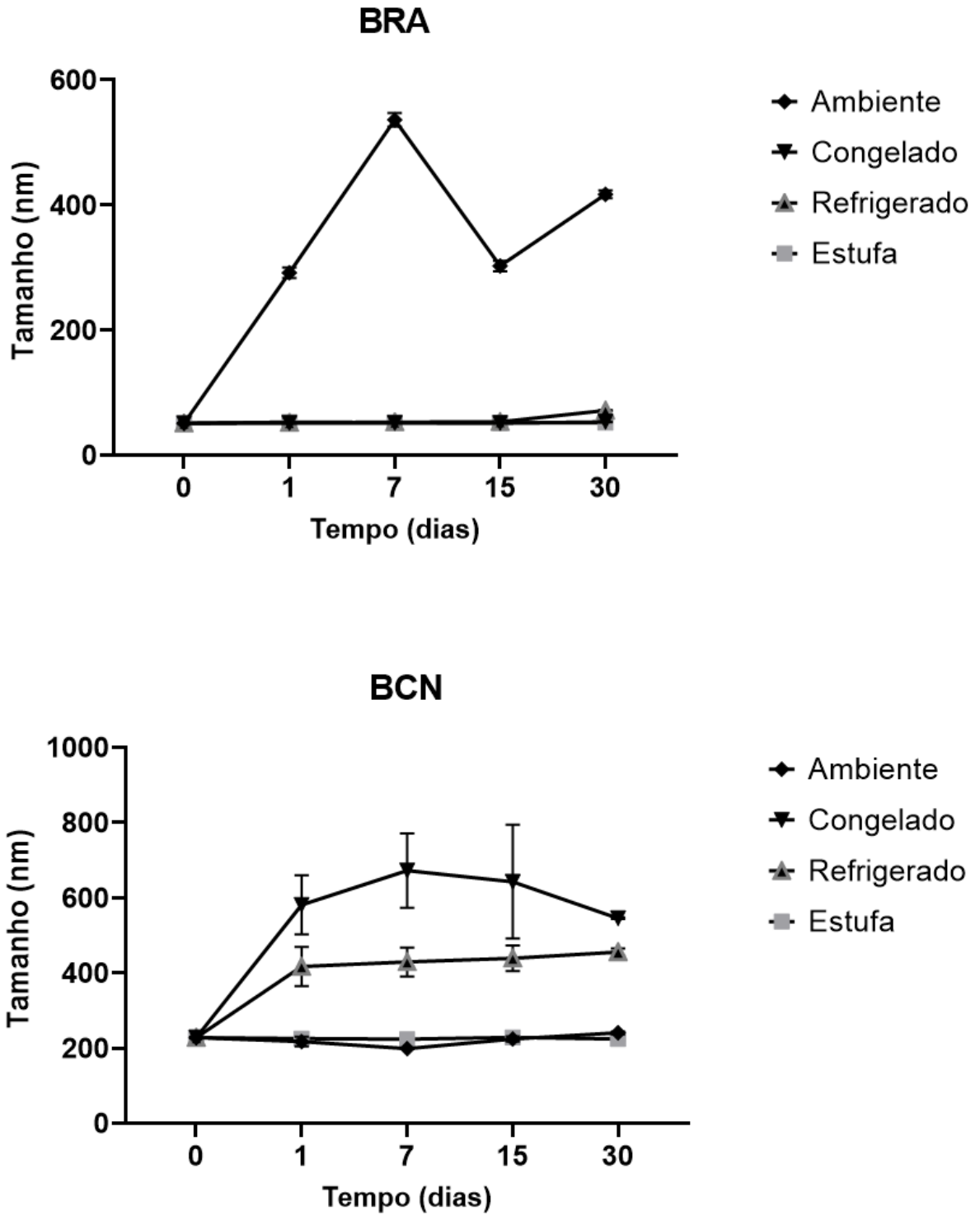


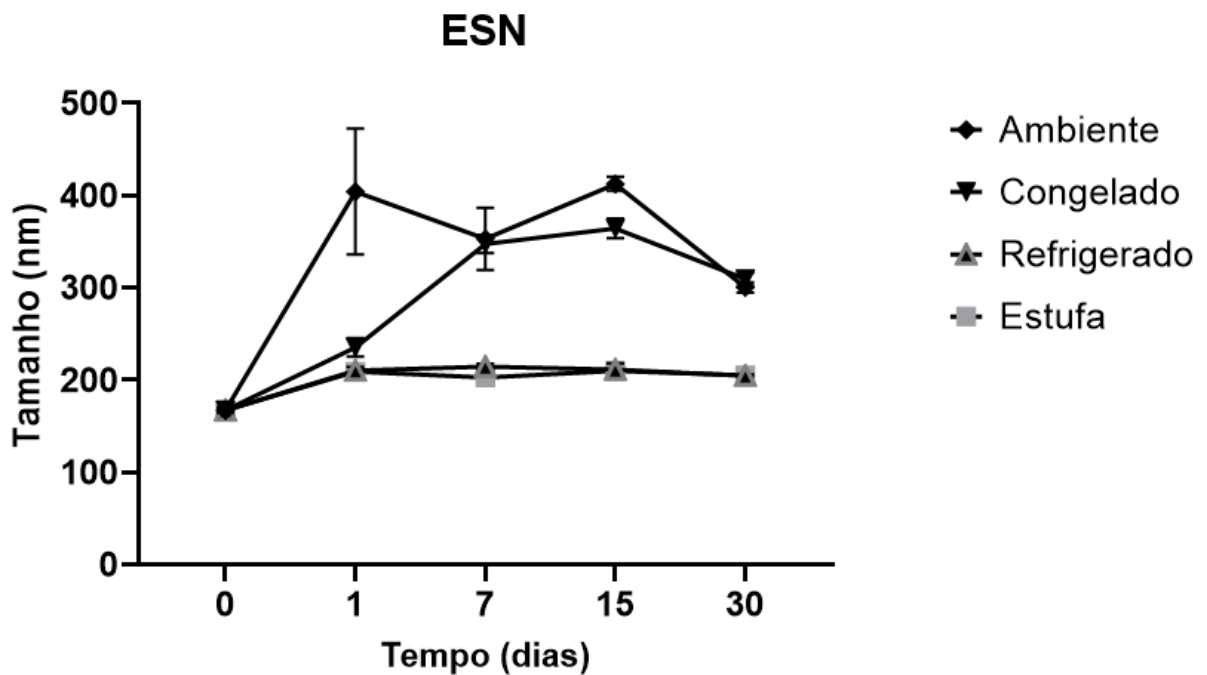
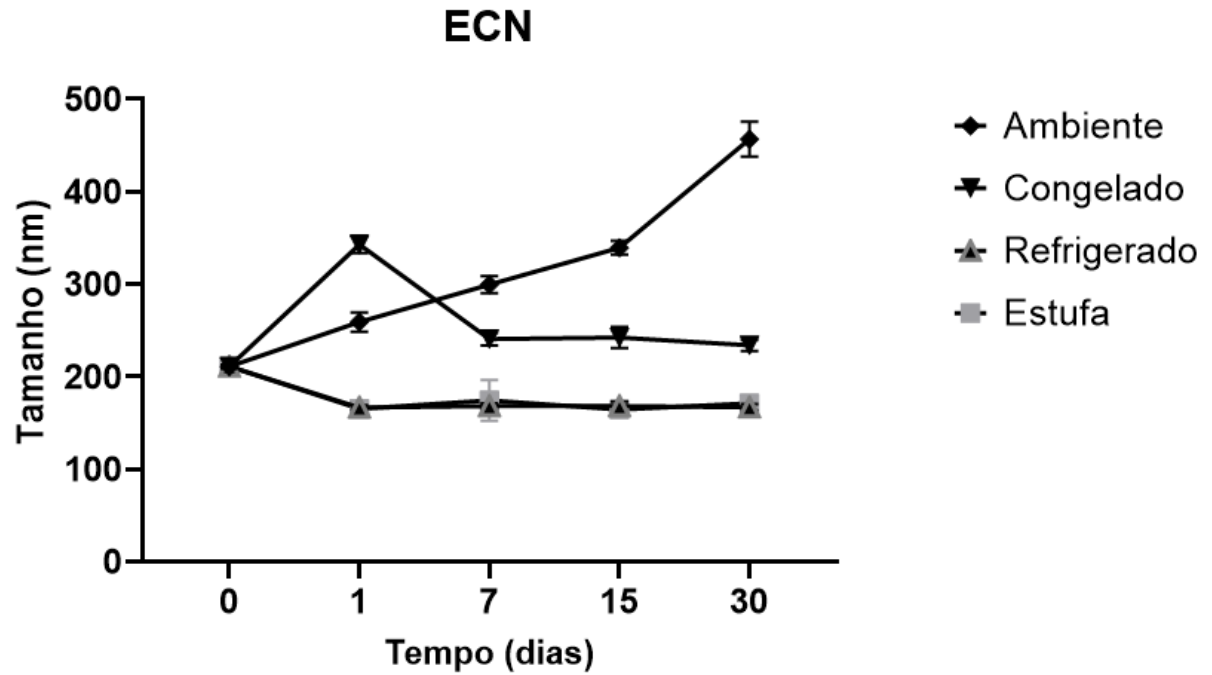


Legenda - Índice de polidispersão referente a cada formulação armazenada em condições de temperatura diferentes, ao longo de 30 dias: BRA (formulação sem NADES e sem extrato); BCN (formulação com NADES e sem extrato); ECN (formulação com NADES e com extrato); e ESN (formulação com NADES e com extrato). Resultados expressos em médias de triplicatas.

Fonte – Imagem autoral.

Figura 15 - Tamanho do diâmetro hidrodinâmico (DH) da nanopartícula referente a cada formulação armazenada em condições de temperatura diferentes, ao longo de 30 dias.





Legenda - tamanho do diâmetro hidrodinâmico da nanopartícula referente a cada formulação armazenada em condições de temperatura diferentes, ao longo de 30 dias: BRA (formulação sem NADES e sem extrato); BCN (formulação com NADES e sem extrato); ECN (formulação com NADES e com extrato); e ESN (formulação com NADES e com extrato). Resultados expressos em médias de triplicatas.

Fonte – Imagem autoral.

O valor de PDI se refere à homogeneidade em que estão distribuídos os tamanhos de nanopartículas. Os valores variam no intervalo de 0 a 1, sendo os valores próximos ou iguais a 1 a indicação de nanopartículas em tamanhos muito diferentes entre si. Já o tamanho (nm) se refere à medida do diâmetro da nanopartícula, levando em consideração a camada de solvatação da água em torno dela, sendo chamado, portanto, de diâmetro hidrodinâmico (165).

De maneira geral, todas os CLNs demonstraram estabilidade do PDI (figura 14) e tamanho (figura 15) em 30 dias para as temperaturas ambiente e estressante. Esse achado significa que não houve grandes variações na homogeneidade do tamanho dessas nanopartículas nessas condições, indicando uma maior resistência à temperaturas mais altas nesse intervalo de tempo, com a exceção do PDI da formulação BRA (figura 14) após 30 dias, variando de $0,22 \pm 0,03$ para $0,35 \pm 0,01$, sem a variação do tamanho.

O congelamento das BRA proporcionou alteração do PDI desde o primeiro dia da estabilidade, com a variação do PDI de $0,22 \pm 0,02$ para $0,37 \pm 0,06$, mantendo alteração até o D30 ($0,27 \pm 0,16$). O tamanho também sofreu alteração desde o primeiro dia, variando de ~50 nm para ~290 nm, chegando a ~535 nm no sétimo dia, e ~420 nm no trigésimo dia. A refrigeração dessa formulação não alterou os valores de PDI ou tamanho. De maneira geral, essa formulação se manteve estável em praticamente todas as temperaturas, porém, em relação ao congelamento, foi a que mais sofreu alteração de tamanho, que pode ser explicado pelo alto valor de PDI após 30 dias, que demonstrou um alto desvio padrão.

A formulação com o NADES (BCN) revelou alteração quando refrigerada ($0,39 \pm 0,06$) e congelada ($0,42 \pm 0,11$) desde o primeiro dia, sendo que o D0 registrou um valor de $0,26 \pm 0,02$ para essas duas temperaturas. A formulação que permaneceu refrigerada se manteve estável até o D30, já a formulação congelada obteve aumento dos valores no D15 ($0,57 \pm 0,05$), chegando a 1 no D30. O tamanho inicial da BCN foi de ~230 nm, havendo aumento do tamanho desde o primeiro dia para a temperatura refrigerada (~420 nm) e congelada (~580 nm). Sob refrigeração, o tamanho permaneceu estável após o primeiro aumento, já a formulação congelada chegou ao tamanho máximo de ~670 nm no D7. A BCN, teve o acréscimo no solvente eutético (NADES) à formulação, que desencadeou aumento no tamanho de partícula (~50 nm para 230 nm) e no PDI ($0,22 \pm 0,01$ para $0,26 \pm 0,02$) em relação à BRA. Essa

formulação, quando congelada, obteve a maior alteração de PDI dentre todas as formulações, podendo ser a explicação para a grande variação do tamanho.

Na ECN, mantida sob refrigeração, foi verificado uma variação de $0,22 \pm 0,1$ para $0,36 \pm 0,09$ após 30 dias, sendo que essa variação pode ser observada desde o primeiro dia, pois seu tamanho inicial era de ~ 210 nm, variando nesse primeiro dia para ~ 340 nm, porém após 30 dias registrou tamanho próximo ao inicial (~ 235 nm). Já a formulação congelada teve tamanho inicial de ~ 210 nm, sofreu alteração desde o primeiro dia no PDI (de $0,22 \pm 0,01$ para $0,44 \pm 0,06$), mantendo estabilidade até o final, com variação até $0,56 \pm 0,09$ após 30 dias, obtendo aumento crescente no tamanho, até ~ 455 nm.

O PDI do CLN com extrato (ESN) refrigerada se diferenciou do D0 ($0,23 \pm 0,01$) em todos os dias de avaliação, apresentando $0,39 \pm 0,04$ após 30 dias, com aumento de tamanho desde o dia 15 da estabilidade (de ~ 170 nm para ~ 350 nm), chegando ao final dos 30 dias com ~ 310 nm. A formulação que ficou em condições de congelamento apresentou mudanças no tamanho da nanopartícula desde o primeiro dia (~ 405 nm), com aumento do PDI para $0,56 \pm 0,01$. O tamanho foi de ~ 300 nm ao fim dos 30 dias, como PDI de $0,51 \pm 0,03$.

O aumento do PDI está relacionado à menor estabilidade das nanopartículas, pois esse parâmetro afeta a taxa de amadurecimento de Ostwald, que significa o aumento de partículas em detrimento da diminuição de outras partículas no mesmo sistema. Além disso, o PDI mais alto representa uma diferença maior no potencial químico entre as gotículas, podendo gerar maiores interações entre elas (91).

O resfriamento das formulações a ~ 4 °C por 30 dias demonstraram um valor de PDI $< 0,25$ sem aumento do tamanho de partícula apenas para a BRA, demonstrando aumento desses fatores para as demais formulações. Já em temperatura ambiente e estressante, todas as formulações apresentaram estabilidade até o final do ensaio.

Chaiittianan e Sripanidkulchai (186) avaliaram a estabilidade de nanoemulsões contendo compostos fenólicos do extrato de *Phyllanthus emblica* L., não evidenciando aumento de tamanho de partícula após 28 dias à 30 °C, porém, após 40 dias, verificaram um aumento das partículas nas formulações com maior quantidade de extrato, e após 60 dias um aumento de todas as nanopartículas com extrato, enquanto a nanopartícula sem extrato não apresentou aumento. Sob refrigeração, não foi observado aumento do tamanho de nenhuma formulação (186).

Tais resultados, divergem dos resultados encontrados no presente estudo. Isso provavelmente ocorreu devido a diferença entre as nanoestruturas utilizadas, já que esses autores desenvolveram nanoemulsões para o aprisionamento de compostos fenólicos, que é um tipo de formulação que possui maior instabilidade termodinâmica do que os CLNs desenvolvidos nesse estudo (23).

Um trabalho avaliou a estabilidade de armazenamento de NLS e etossomas (bicamadas lipídicas contendo duas regiões) contendo ácido cafeico. Após seis meses de estocagem a 22 °C as formulações não apresentaram alterações macroscópicas, sem separação de fases nem sedimentação. O tamanho de quase nenhuma das nanopartículas sofreu mudanças, apenas as etossomas tiveram aumento de 10% após três meses (187). Esses resultados corroboram com os observados no presente estudo, já que as nanopartículas com extrato taperebá se mostraram estáveis em relação ao tamanho em temperatura ambiente durante 30 dias.

Os valores de PDI registrados para todos os CLNs, mantidos sob temperatura de congelamento não são considerados adequados para uma formulação estável ($<0,25$)(166). Resultados que, provavelmente, são consequência do efeito destrutivo que o congelamento exerce sobre as nanopartículas, aumentando a concentração das partículas na fase crioconcentrada, aumentando possibilidade de fusão entre elas, bem como o efeito mecânico do gelo na degradação (188). O solvente NADES, já caracterizado na literatura como detentor de um poder crioprotetor (26), não foi capaz de manter as características físicas das nanopartículas, não evitando os efeitos de degradação que o congelamento de um sistema de nanoestruturas pode sofrer.

Um estudo, que avaliou o efeito da adição de glicose como crioprotetor à formulação de nanopartículas lipídicas carreadoras contendo quercetina, registrou o aumento do tamanho (~150 nm para ~250 nm) de e do PDI ($0,24 \pm 0.02$ para $0,31 \pm 0.02$) após a liofilização das nanopartículas, porém, um melhor efeito do que esses fatores quando as nanopartículas foram liofilizadas sem o crioprotetor, que tiveram um tamanho de ~630 nm e um PDI de 0.61 ± 0.01 (167).

Tabela 14 - Valores da carga de superfície (potencial zeta) e pH dos CLNs referente a cada formulação armazenada em condições de temperatura diferentes, ao longo de 30 dias.

Dias	Temperatura	BRA		BCN		ESN		ECN	
		Potencial Zeta	pH	Potencial Zeta	pH	Potencial Zeta	pH	Potencial Zeta	pH
0	Inicial	-19,39 ±0,76	5,49	-2,83 ±0,27	2,93	-2,35 ±0,35	2,61	-4,31 ±0,16	2,42
1	Ambiente	-16,1 ± 0,68	ND	-0,22 ±0,15	ND	-4 ±0,30	ND	-0,13 ±0,15	ND
	Estufa	-17,89 ±0,23	ND	0,08 ±0,32	ND	-4,55 ±0,35	ND	-0,41 ±0,47	ND
	Refrigerado	-12,93 ±0,23	ND	0,28 ±0,33	ND	-0,01 ±0,35	ND	-2,82 ±0,15	ND
	Congelado	-20,09 ±1,07	ND	0,01 ±0,07	ND	-7,42 ±0,31	ND	0,12 ±0,26	ND
7	Ambiente	-18,49 ±0,42	5,01	-2,31 ±0,05	2,55	-7,15 ±0,03	3,05	-2,74 ±0,34	2,44
	Estufa	-19,95 ±0,33	5,10	-2,76 ±0,25	2,53	-7,92 ±0,78	3,02	-2,56 ±0,19	2,51
	Refrigerado	-14,29 ±0,63	4,44	-1,76 ±0,56	2,51	-5,41 ±0,28	3,14	-1,46 ±0,28	2,66
	Congelado	-20,56 ±1,24	4,81	-1,98 ±0,17	2,56	-9,91 ±0,75	3,12	-1,73 ±0,05	2,51
15	Ambiente	-21,93 ±1,1	5,84	-3,94 ±0,22	2,63	-9,61 ±0,04	3,09	-3,55 ±0,34	2,30
	Estufa	-23,1 ±0,52	4,54	-3,64 ±0,38	2,30	-9,43 ±0,12	2,83	-3,62 ±0,23	2,39
	Refrigerado	-15,55 ±0,39	4,47	-2,68 ±0,31	2,52	-5,8 ±0,52	2,97	-2,26 ±0,5	2,26
	Congelado	-20,32 ±0,61	4,46	-2,49 ±0,29	2,51	-11,74 ±1,18	3,07	-3,02 ±0,22	2,35
30	Ambiente	-18,11 ±0,73	5,10	-1,49 ±0,30	2,44	-5,89 ±0,48	2,90	-1,47 ±0,51	2,40
	Estufa	-14,74 ±1,16	3,35	-0,83 ±0,28	2,39	-5,33 ±0,4	2,99	-1,09 ±0,03	2,44
	Refrigerado	-21,98 ±1,79	6,05	-0,59 ±0,18	2,55	-4,27 ±0,21	2,92	-1,18 ±0,01	2,38
	Congelado	-5,56 ±2,09	3,46	-1,4 ±0,32	2,41	-0,83 ±2,81	2,58	-1,45 ±0,11	2,45

Nota - Formulações: BRA (formulação sem NADES e sem extrato); BCN (formulação com NADES e sem extrato); ECN (formulação com NADES e com extrato); e ESN (formulação com NADES e com extrato). *ND - não determinado.

Fonte - Elaborado pelo autor.

O potencial zeta é uma das características físicas apresentadas por qualquer partícula em suspensão, sendo um fator que influencia diretamente a estabilidade, com valor mínimo de -30 mV para ser considerado fortemente aniônico, sendo valores próximos a ± 10 mV considerados neutros (189). O pH é uma medida que afeta diretamente o potencial zeta. Quando há mudanças no pH ao longo do tempo, pode ser sinal de instabilidade (165).

De modo geral, os resultados demonstram estabilidade das BRA nas temperaturas ambiente e refrigerada, até 30 dias, e estressante até 15 dias. A formulação BRA mantida em temperatura ambiente e refrigerada apresentou a carga inicial de $-19,39 \pm 0,76$ mV, com pH de 5,49, não sendo observadas grandes variações até o trigésimo dia. Já as demais condições de armazenamento causaram alterações de valores do potencial zeta e de pH, destacando-se os valores da carga de superfície da formulação mantida sob congelamento ($-5,56 \pm 2,09$), com diminuição do pH (3,46). A temperatura estressante causou aumento da carga a partir da avaliação do potencial zeta ($-14,74 \pm 1,16$) e do pH (3,35).

As demais formulações demonstraram valores de potencial zeta próximos a zero e diminuição do pH com a adição do NADES (BCN), extrato (ESN) e NADES+extrato (ECN). Valores de potencial zeta próximos a zero podem aumentar a probabilidade de interação eletrostática, aumentando a possibilidade de coalescência (165), e, portanto, aumentar a instabilidade dos CLNs

As formulações com NADES (BCN e ECN) apresentaram valores de potencial zeta mais próximos a zero do que a formulação sem NADES com extrato (ESN), com valores de pH menores após o trigésimo dia. De todo modo, a carga de superfície não foi uma característica que influenciou a estabilidade da homogeneidade, não havendo alterações do PDI e do tamanho dessas formulações armazenadas em temperatura ambiente e estressante após o fim do ensaio, sendo necessário, portanto, mais estudos sobre a estabilidade dessas nanoestruturas.

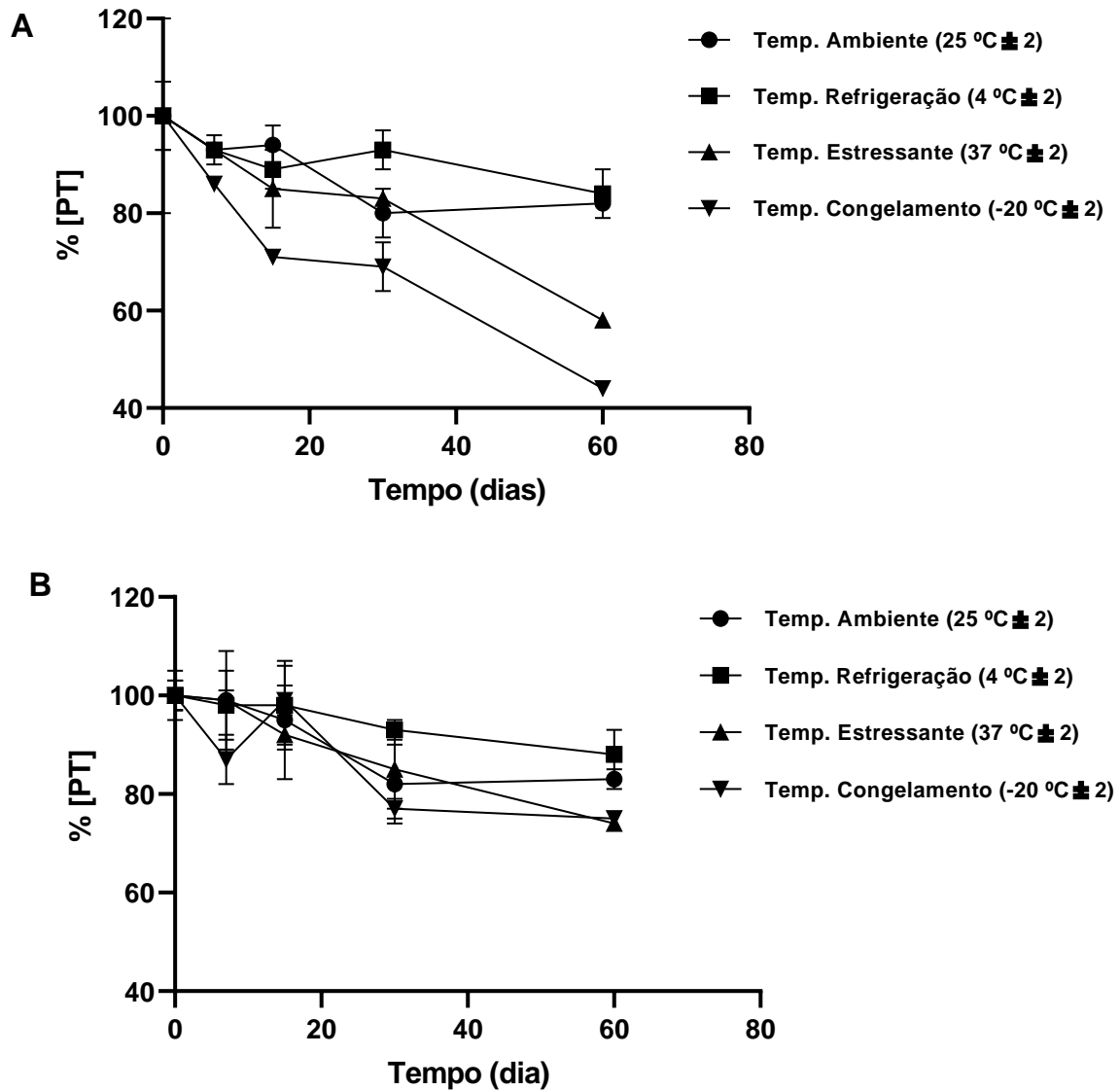
A literatura destaca que nanoestruturas podem apresentar a carga de superfície neutra e ainda permanecer estáveis, se a coalescência entre as partículas for minimizada por moléculas presentes na superfície (165). Porém, outras análises são necessárias para determinar o real papel da carga de superfície na estabilidade dessas nanopartículas.

Silva (154) em uma formulação com manteiga de murumuru e Brij® O10 na proporção de 2:1 obteve um potencial zeta de $-5,61 \pm 0,92$, que não obteve grandes variações nem em temperatura ambiente e nem sob refrigeração, demonstrando estabilidade do tamanho e PDI, mesmo com a carga próxima a zero.

5.4.5 Ensaio de estabilidade dos Polifenóis Totais nos careadores lipídicos nanoestruturados (CLNs)

A figura 16 apresenta os resultados da percentagem de retenção de polifenóis totais das nanopartículas formuladas com o extrato da casca do taperebá, ESN, sem a adição do NADES (figura 16A) e ECN, com a adição do NADES (figura 16B).

Figura 16 - Representação da concentração dos polifenóis totais (%) nanoencapsulados e armazenados em condições de temperatura diferentes.



Legenda - ECN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES + extrato; ESN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e extrato.

Fonte – Imagem autoral.

Verificou-se que, entre o início do ensaio até o dia 15, não houve diferença entre as temperaturas estudadas, tanto para as ESN (figura 16A), quanto para as ECN (figura 16B) ($p \geq 0,05$). Em relação às ESN, observou-se que os valores de retenção de PT dessas amostras, à temperatura de congelamento, a partir do dia 15, diminuiriam significativamente em relação às outras temperaturas estudadas, sendo

assim, a temperatura que menos reteve os PT do extrato incorporado nas nanopartículas ($p \geq 0,05$), chegando ao final com valor de retenção de ~ 50%.

Após 30 dias de armazenamento, verificou-se que a temperatura de refrigeração obteve a maior retenção dos PT nas ESN (~ 95%), seguido das temperaturas ambiente e estressante (~ 80%)($p \geq 0,05$). As temperaturas ambiente (~80%) e de refrigeração (~85%) foram as que obtiveram os maiores valores de retenção dos PT nas nanopartículas ao final dos 60 dias de ensaio ($p \geq 0,05$).

Os CLNs sem a adição do NADES (ESN) que foram mantidos à temperatura de congelamento não foram capazes de proteger o conteúdo fenólico como nas condições de armazenamento em temperatura ambiente e refrigerada. Isso pode ser consequência da perda da estabilidade coloidal das nanopartículas, pois, há separação de fases entre gelo e solução crioconcentrada durante o processo de congelamento. Essa separação acarreta uma alta concentração de partículas, podendo gerar agregação e fusão irreversível do material particulado, além da cristalização do gelo exercendo um estresse mecânico sobre o sistema (188).

Após 60 dias de estocagem em temperatura estressante, o CLN sem NADES (ESN) apresentou uma diminuição importante na retenção de PT (~50%). Em teoria, esse tipo de aprisionamento do princípio ativo em nanoestruturas, que são constituídas por lipídios na fase sólida e na fase líquida (CLNs), têm uma temperatura de ponto de fusão menor do que as nanoestruturas constituídas apenas por lipídios na fase sólida (NLS). Essa característica as torna instáveis em temperatura estressante, porém, adequadas para armazenamento em temperatura ambiente (23). Assim é possível sugerir que houve instabilidade da ESN quando armazenada à ~40 °C, o que promoveu uma maior degradação de PT, já que os compostos fenólicos são conhecidos por serem termolábeis (6,56).

Sessa *et al.* (190) analisaram a estabilidade do resveratrol encapsulado em nanoemulsões de óleo de amendoim em água, produzidas por homogeneização de alta pressão, durante 30 dias, sob três temperaturas diferentes: 4 °C, 30 °C e 55 °C. Sua formulação mais estável foi capaz de proteger o princípio ativo nas temperaturas de 4 °C e 30 °C, obtendo degradação do composto quando a nanopartícula foi armazenada em temperatura estressante, restando ~40% após 30 dias.

Os resultados do ensaio de estabilidade de PT na formulação com NADES (ECN) demonstraram que, até o dia 15 de experimento, não foi observada diferença entre as temperaturas de estocagem estudadas ($p \geq 0,05$). Após 30 dias, verificou-se

que as ECN estocadas à temperatura de refrigeração obtiveram os maiores valores de retenção de PT (~95%), resultado que diferiu somente da temperatura de congelamento (~75%). Ao fim do ensaio, no dia 60, verificou-se que as temperaturas que obtiveram os maiores valores de retenção de PT nas nanopartículas foram as ambiente (~85%) e refrigeração (~90%). Cabe ressaltar que, de forma geral, ao final, os valores verificados de retenção de PT nos CLNs com NADES podem ser considerados altos (~75%).

Ao comparar a estabilidade do extrato da casca de taperebá microencapsulado com o biopolímero quitosana, a partir da técnica de *spray drying*, em três diferentes condições de armazenamento (~4 °C, ~25 °C e ~40 °C) durante 60 dias que foi observada no atual estudo foi possível identificar uma maior retenção de PT que foram as estocadas sob refrigeração (~75%) e temperatura ambiente (~65%). Esses achados se assemelham aos resultados já descritos para o ESN, em relação à melhor estabilidade em condição de refrigeração e temperatura ambiente terem maior retenção de PT do que em temperatura estressante, porém a semelhança não se repete quando adicionado o NADES (ECN), pois há uma retenção maior de PT em temperatura estressante, que é um resultado importante tendo em vista a sensibilidade térmica dos compostos fenólicos.

Como já mencionado, o congelamento promoveu maior degradação dos PT do que as outras temperaturas, tanto na ESN quanto na ECN. Entretanto, a perda visualizada em ECN é bem menos expressiva. Na indústria farmacêutica, estratégias já são utilizadas para proteger produtos quando existe a necessidade de congelamento (para liofilização, por exemplo). São adicionados adjuvantes chamados de crioprotetores. Um componente muito utilizado como crioprotetor é o glicerol, que está presente em grande volume na formulação do NADES utilizado neste estudo. Suas contribuições dentro de uma formulação podem ser de proteção do produto durante o congelamento e de ajuste de tonicidade (188).

A literatura traz algumas aplicações do NADES, tais como a substituição de solventes orgânicos tóxicos, não biodegradáveis e inflamáveis, como metanol, acetona e ácido fórmico (191), para a extração de metabólitos vegetais (192) e na síntese de nanopartículas de metal sem o uso de produtos químicos auxiliares, tendo como foco uma formulação ambientalmente correta (193). Porém, ainda não há menção à capacidade protetiva desse solvente quanto aos compostos fenólicos. De qualquer forma, essa proteção térmica demonstrada para o congelamento e

temperaturas mais altas (em menor escala), merece mais estudos para se entender esse mecanismo.

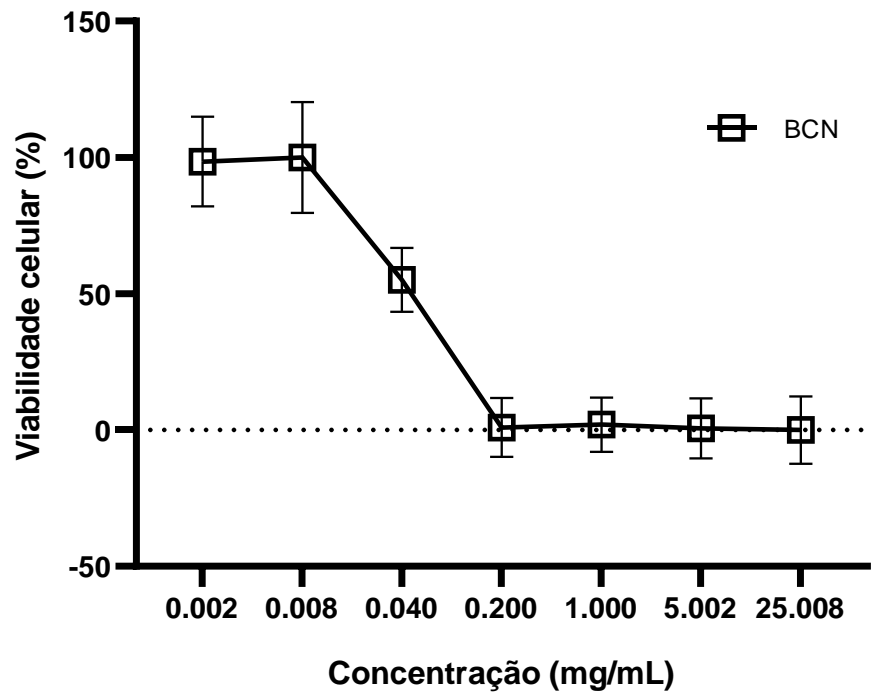
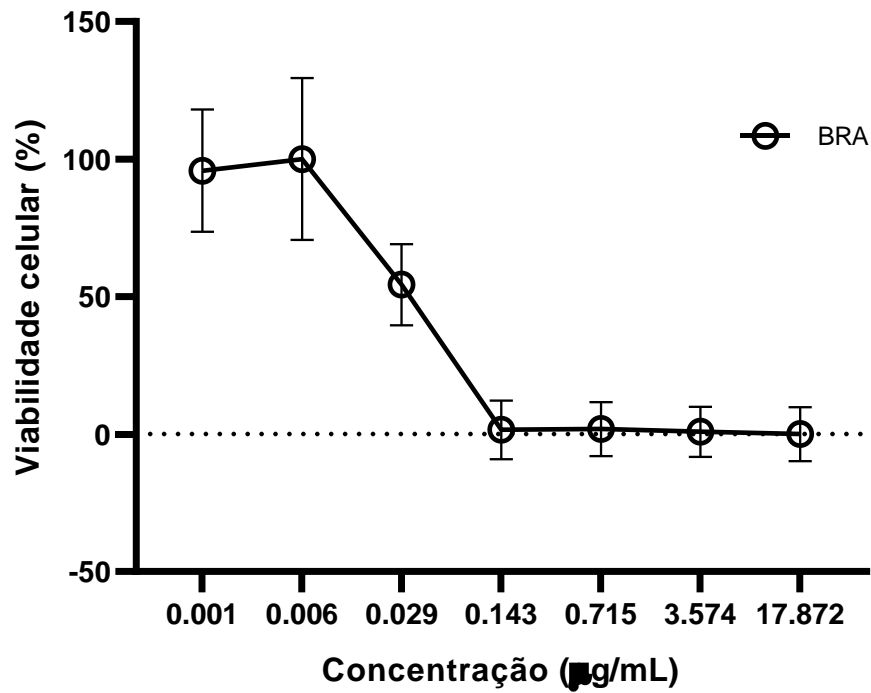
De forma geral verificou-se que os CLNs elaborados com o solvente NADES obtiveram valores de retenção de PT maiores que os elaborados sem esse solvente. Essa tendência variou, tanto ao longo do tempo, como também entre as temperaturas estudadas. Nas amostras estocadas à temperatura ambiente, de forma geral, essa tendência não foi observada (exceto no dia 7)($p \geq 0,05$). Já nos CLNs estocados sob refrigeração essa tendência de maiores valores de retenção de PT foi observada até o dia 15, enquanto os estocados à temperatura estressante essa tendência foi observada ao longo de todo o experimento, a partir do 7 dia ($p \geq 0,05$). Como observado nos CLNs sem NADES a temperatura de congelamento foi a que apresentou os menores valores de retenção de PT, sendo que ao final do experimento, os CLNs com NADES obtiveram valores maiores de retenção de PT (~ 75%).

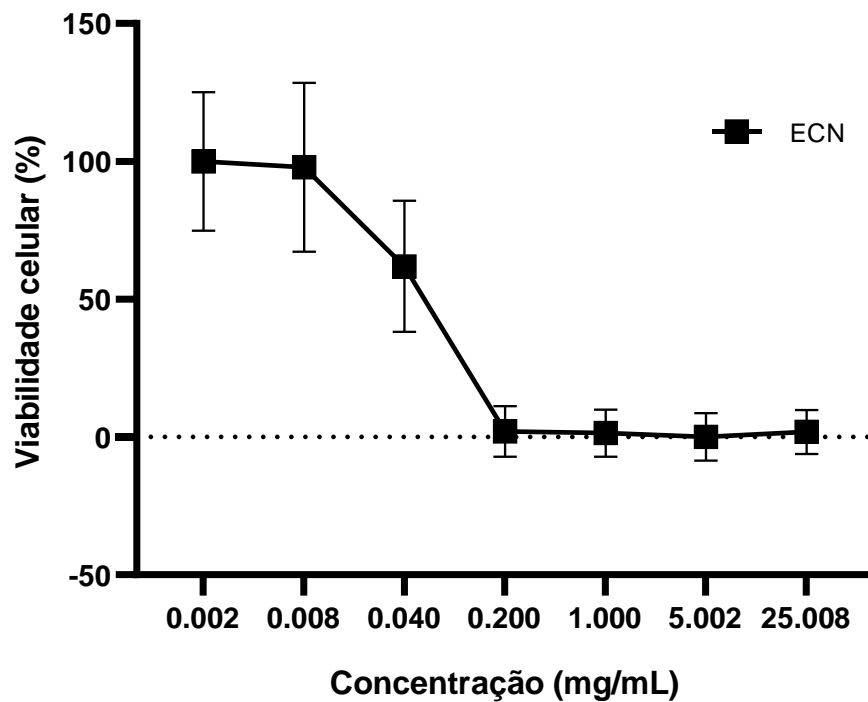
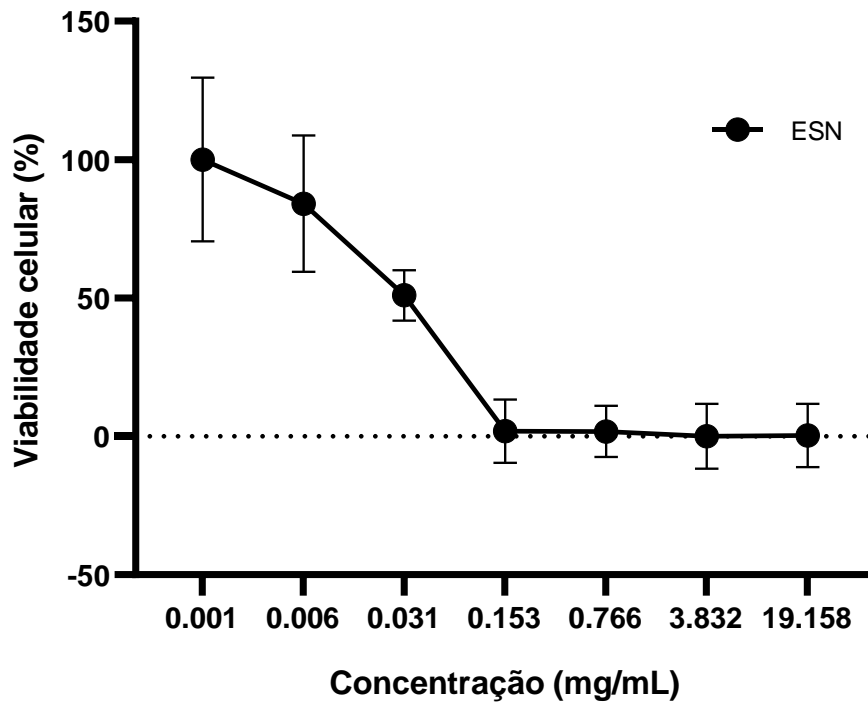
Ao relacionar os achados obtidos para as micropartículas com os resultados obtidos para os CLNs, é possível fazer uma comparação entre a estabilidade de PT fornecida pelas duas técnicas, pois o extrato trabalhado é o mesmo. Quando os valores são confrontados pode-se inferir que os CLNs com e sem o NADES (ECN e ESN) foram mais eficazes em manter a estabilidade dos PT quando comparados à microencapsulação a partir do *spray drying*.

5.5 VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MELANOMA (B16-F10)

O câncer de pele melanoma, é derivado dos melanócitos, que são responsáveis pela formação de melanina. O tumor gerado pela desordem na formação da melanina costuma ser agressivo, com proliferação rápida, levando o paciente a apresentar um prognóstico ruim em razão do risco de metástase (194). Por essa razão se torna importante o estudo de novas tecnologias e tratamentos para este tipo de câncer. No presente estudo, a citotoxicidade dos CLNs desenvolvidos foram testados para células de melanoma B16-F10, como apresentado na figura 17.

Figura 17 - Citotoxicidade dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) para células de melanoma B16-F10.



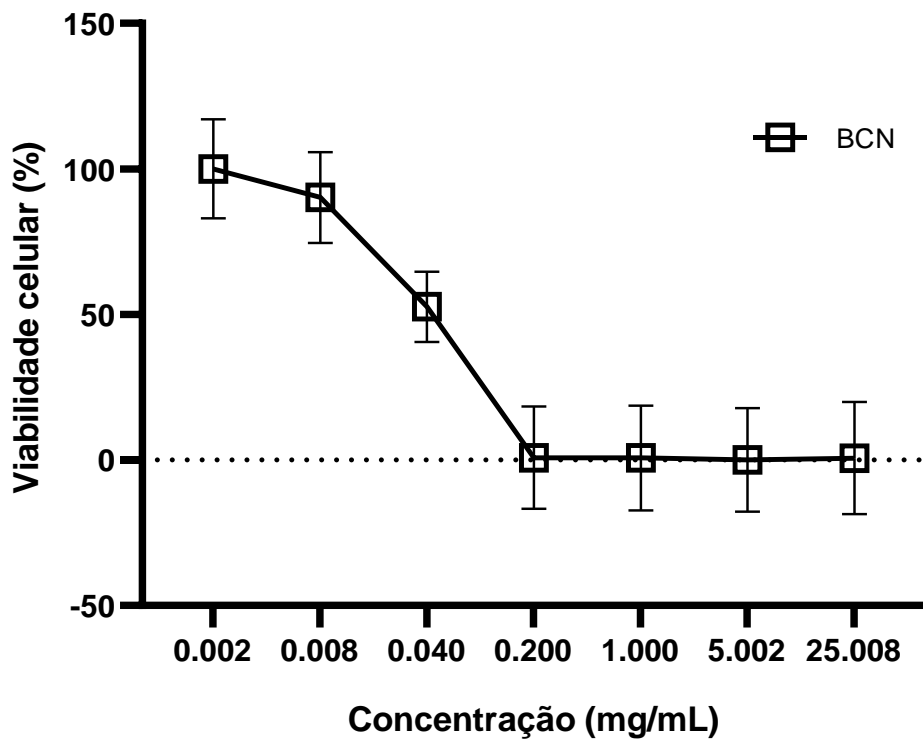
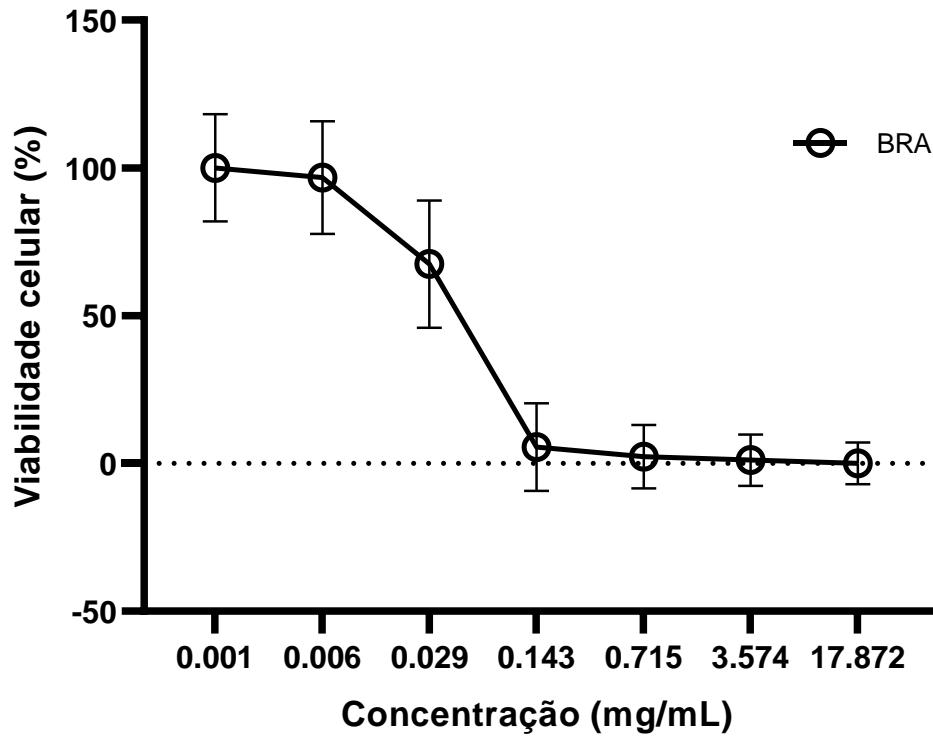


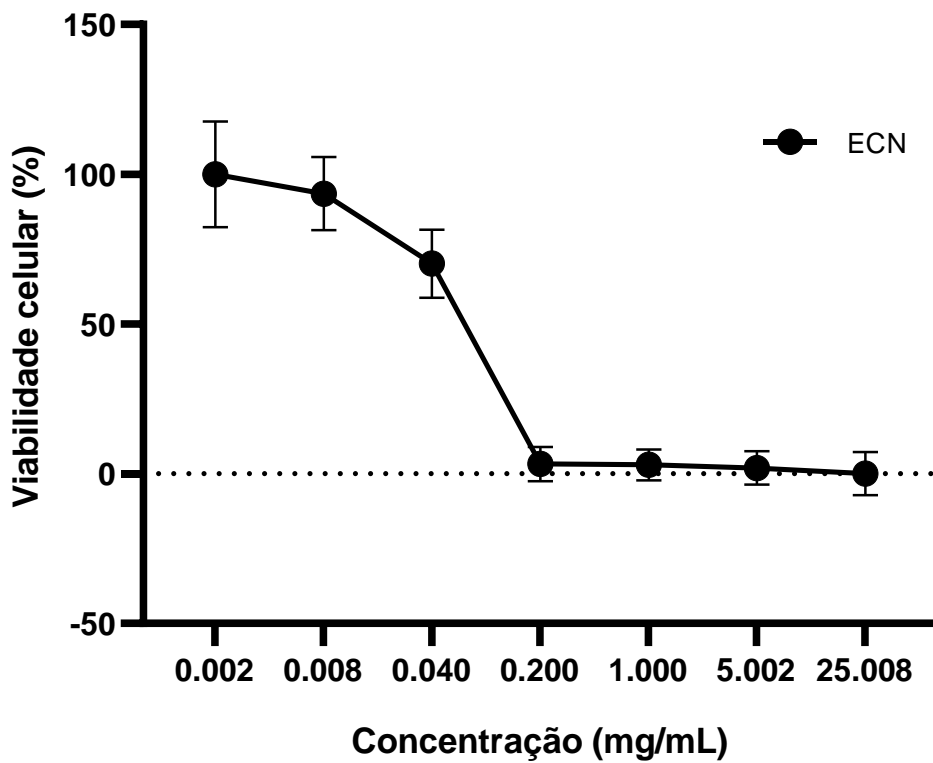
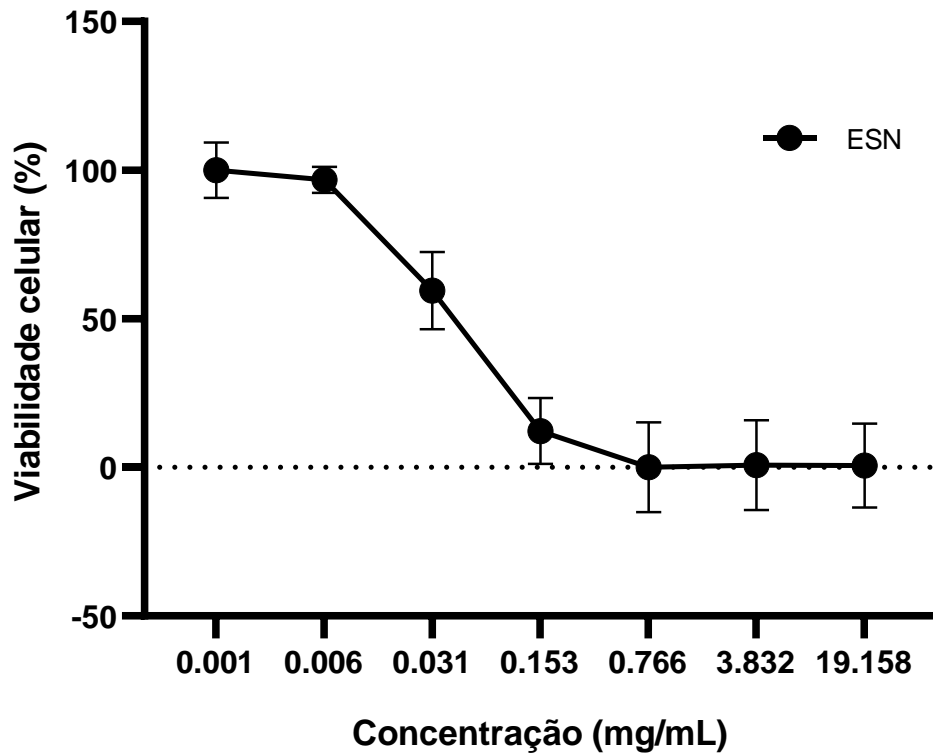
Legenda - BRA: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10 e óleo de buriti; BCN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES; ESN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e extrato; ECN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES + extrato. Os resultados de citotoxicidade foram expressos em percentagem de viabilidade pela concentração (mg/L) (média \pm DP (n = 3)).

Fonte – Imagens autorais.

Verificou-se que os CLNs foram capazes de inibir a proliferação das células B16-F10 de melanoma, tanto as elaboradas com extrato de taperebá, como também os sem o extrato, de forma dose-dependente, sendo o melhor resultado foi obtido pela formulação com extrato sem NADES (IC 50 = 28,14 µg/mL), demonstrando o efeito citotóxico, com diferença estatística ($p < 0,05$), desse extrato contra essas células tumorais, nas condições testadas, sendo que os demais não demonstraram diferença estatística ($p > 0,05$). Além disso, foi possível verificar que os resultados obtidos mostram uma curva dose-dependente, apesar de não apresentar diferença estatística ($p > 0,05$), mesmo assim é um resultado interessante e esperado em formulações com efeito antitumoral.

Figura 18 - Citotoxicidade dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) para células de fibroblastos L929.





Legenda - BRA: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10 e óleo de buriti; BCN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e NADES; ESN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10, óleo de buriti e extrato; ECN: formulação com manteiga de murumuru, Brij® O10,

óleo de buriti e NADES + extrato; Os resultados de citotoxicidade foram expressos em porcentagem de viabilidade pela concentração (mg/L) (média \pm DP (n = 3).

Fonte – Imagens autorais.

A citotoxicidade dos CLNs também foi testada em células não tumorais (fibroblastos L9290), e está representado na figura 18. Observou-se que os CLNs demonstraram uma menor toxicidade com maiores valores de IC50, o que significa que a toxicidade para a linhagem não tumoral foi dependente de uma dose mais alta, fortalecendo a hipótese de que as formulações foram capazes de produzir um efeito citotóxico nas células tumorais, principalmente a BRA e ESN. Os valores de IC50 obtidos foram de 39,95 μ g/mL para BRA; 40,75 μ g/mL para BCN; 40,10 μ g/mL para ESN; e 56,48 μ g/mL para ECN, sendo que o último foi o único que apresentou diferença estatística ($p < 0,05$).

Como mencionado anteriormente, os resultados demonstram que as formulações com manteiga de murumuru, óleo de buriti, com e sem NADES, também apresentaram efeito antitumoral contra as células testadas. Essa manteiga foi utilizada por ter características físico-químicas adequadas para formação de CLNs e trabalhos relatam a sua capacidade de carrear fármacos para uso tópico (195), como também para carreamento de fármacos para o tratamento do melanoma, onde demonstrou apenas função de carreadora juntamente ao surfactante (156). Já o óleo de buriti foi uma ferramenta utilizada para otimizar o sistema de carreamento de fármaco, objetivando aumentar a estabilidade desses CLNs. Sampaio (196), após elaboração de nanoemulsão à base de óleo de buriti, identificou citotoxicidade em células de câncer de mama (MCF-7) na dose de 360 μ g/mL (198). Já o trabalho de Silva (197), não identificou atividade significativa tanto para o óleo livre, quanto em sua forma nanoestruturada (199). Dessa forma acreditamos que o efeito citotóxico observado pode ser pela presença do óleo de buriti, ou até por uma possível sinergia entre esses componentes.

Melo *et al.* (198) testaram o extrato hidroalcolico do visco europeu (*Viscum album* L.) em diversas linhagens celulares tumorais, apresentando efeito citotóxico para o modelo de leucemia mieloide humano (K562) e de melanoma murino (B16F10). O extrato hidroalcolico deixa as lectinas instáveis, porém, contém compostos fenólicos, tendo o efeito antitumoral atribuído à essas substâncias. Dos compostos

fenólicos caracterizados nesse estudo o ácido clorogênico e o ácido cafeico também são encontrados no extrato de taperebá (5).

Um trabalho que avaliou a atividade antitumoral da quercetina em células B16-BL6 (modelo de melanoma de rato) evidenciou que esse composto induz a apoptose, bem como a inibição da atividade de diversas quinases, de forma dose-dependente (199). Essa substância foi encontrada entre um dos compostos do extrato de taperebá em quantidades relevantes (5). O extrato da cúrcuma, que tem alto teor de compostos fenólicos, apresentou um efeito antiproliferativo e apoptótico sobre a linhagem celular de melanoma murino (B164A5), que foi relacionado ao potencial antioxidante e concentração de polifenóis extraídos dessa planta (200). Isso demonstra que polifenóis extraídos de fontes naturais têm um papel importante na pesquisa de novos tratamentos para o câncer.

Resultados sobre efeito antitumoral de outras frutas do Cerrado são relatados na literatura. A guariroba (*Campomanesia adamantium*), que assim como o taperebá, é uma fruta do Cerrado, também apresentou atividade antiproliferativa sobre o melanoma (201). Outros frutos do Cerrado brasileiro também apresentaram ação de bioativos sobre linhagens de células de câncer cervical humano, destacando-se extratos brutos da fruta araticum (*Annona crassiflora*) e da pixirica-do-brejo (*Miconia chamissois*)(202).

A formulação contendo NADES (ECN) obteve um valor de IC50 maior, oferecendo efeito citotóxico em concentrações mais altas. Mais estudos devem ser realizados para a melhor compreensão dos NADES em células e em sistemas biológicos mais complexos.

Já o extrato de taperebá e o solvente NADES, quando testados de forma isolada, não promoveram nenhum efeito sobre as células testadas (viabilidade celular variou entre 100 e 90%). Estudos *in vivo* sobre compostos bioativos com capacidade antioxidante relatam a dificuldade dessas substâncias de atravessar as membranas celulares e baixa estabilidade, enfatizando o estudo de novas tecnologias para resolver essas questões, como a nanoencapsulação (203). Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, verificamos que a nanoencapsulação foi capaz de melhorar a ação dos bioativos presentes no extrato de taperebá, uma vez que, quando incorporado à CLN, foram verificados resultados de diminuição significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular, nas condições testadas.

Mais investigações devem ser realizadas em relação ao tratamento proposto, a fim de entender o mecanismo de ação relacionado e comparar os efeitos encontrados com os efeitos de medicamentos já utilizados no tratamento do melanoma. O sucesso da encapsulação dos compostos fenólicos do extrato, com aumento da estabilidade e facilitação da entrada desses bioativos em células precisa ser investigado em outras linhagens de células de câncer, levando em consideração a alta resistência da linhagem testada.

6 CONCLUSÃO

Os valores de polifenóis totais no extrato etanólico das cascas do taperabá de ~500mg EAG/100 g de casca, com uma alta capacidade antioxidante ($51,62 \pm 1,27$ μ MTEAC/g de casca para DPPH e $98,57 \pm 2,49$ μ MTEAC/g de casca para ABTS). A microencapsulação do extrato das cascas do taperabá com o polímero quitosana (MPs) pela técnica de spray dryer foi considerada adequada, com valor de eficiência de encapsulação de ~55%. A morfologia demonstrou formato de esferas de tamanhos variados com superfície enrugada ou lisa. Além disso, as MPs obtiveram melhor retenção de polifenóis totais em relação ao extrato liofilizado em todas as condições de armazenamento, ao longo de 60 dias, sendo que a MP sob refrigeração obteve a melhor capacidade de retenção (~75%). Tal resultado demonstra a proteção do conteúdo fenólico contra a alta temperatura quando microencapsulados, aumentando sua estabilidade.

Foi possível nanoencapsular o extrato das cascas de taperabá em CLNs. A formulação base utilizada, com valores adequados de PDI e tamanho, foi a que teve 3,6% de manteiga de mururu, 0,2% de óleo de buriti, 2,1% de surfactante (Brij® O10). A EE% da CLN de extrato sem NADES foi de 83,95%, e da nanopartícula de extrato com NADES foi de 85,81%, não demonstrando diferença entre as duas formulações.

Quanto a morfologia, ao observar o CLN sem NADES nota-se uma morfologia mais organizada do que quando comparado com o CLN com nades, que se apresentou mais difuso. O DTA identificou interação entre os componentes da formulação e uma indicação de que o extrato foi encapsulado. Os resultados da análise de TGA demonstraram que, quando encapsulado, o extrato apresentou maior estabilidade térmica, obtendo maior estabilidade no CLN sem NADES (ESN), com

início da degradação em ~210 °C. Além disso, demonstrou que o NADES no CLN não proporcionou aumento da estabilidade em temperaturas acima de ~90 °C.

Nas análises realizadas para a verificação da estabilidade coloidal, verificou-se que, com exceção do CLN sem NADES e sem extrato (BRA), todos os demais apresentaram estabilidade do PDI e do tamanho em temperatura ambiente e estressante em 30 dias. Tanto em temperatura de refrigeração quanto de congelamento, os CLNs apresentaram variação do PDI e do tamanho.

Em relação ao conteúdo fenólico, os CLNs sem NADES tiveram a maior perda após congelado, com diminuição da concentração de polifenóis, chegando ao final do ensaio com retenção de ~50%. As melhores temperaturas para retenção de compostos fenólicos nos CLNs sem NADES foram ambiente (~80%) e refrigerada (~85%). Para os CLNs com nades, a condição mais favorável à retenção de compostos fenólicos foi sob refrigeração (~95%). Nenhum dos CLNs foram capazes de manter a concentração de compostos fenólicos após congelamento, não havendo diferença com a adição do NADES. Isso demonstra que ele não foi capaz de promover crioproteção. Porém, é possível perceber que o NADES promoveu a proteção térmica dos compostos fenólicos, pois houve aumento da retenção em comparação aos CLNs sem NADES. Isso significa que esse solvente pode ser uma nova tecnologia para melhorar a estabilidade de compostos fenólicos quando associado a nanotecnologia. Considerando-se todos os resultados, verificou-se que a temperatura ambiente é a melhor temperatura de armazenamento para os CLNs, dentro das condições analisadas.

Evidenciou-se que os CLNs, no geral, tiveram um efeito citotóxico, em uma curva dose-dependente nas células de melanoma (B16-F10), sendo a melhor formulação a de extrato sem NADES (IC 50 = 28, 14 µg/mL), que obteve um IC 50 de 40,10 µg/mL ($p < 0,05$) para as células não tumorais (L929). A mesma formulação, porém, com a adição do NADES demonstrou um maior valor de IC50 na L929 ($p > 0,05$), que significa uma menor toxicidade para essas células.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível verificar que as cascas do taperebá podem ser considerados um exemplo de subproduto industrial, com a presença de compostos bioativos e que tecnologias de encapsulamento desses compostos podem ser uma alternativa interessante para viabilizar a sua possível aplicação, destacando-se a área de tecnologias em saúde. Além disso, essa prática

pode reduzir o desperdício e converter esses subprodutos em resultados econômicos e benéficos para a sociedade e meio ambiente.

Acredita-se que presente estudo abra precedentes para mais trabalhos incluindo a nanoencapsulação de compostos fenólicos com o NADES, para melhora da estabilidade, que faz com que possa ser analisado em outras aplicações. Mais pesquisas são necessárias para a avaliação do mecanismo de ação desses compostos, bem como seus efeitos em outras linhagens celulares. Os próximos passos devem incluir testes de liberação em meios com diferentes pHs e a avaliação da toxicidade deste extrato e das nanopartículas.

REFERÊNCIAS

1. de Carvalho JTG, Baldivia DS, Leite DF, de Araújo LCA, Espindola PP, Toledo, et al. Medicinal Plants from Brazilian Cerrado: Antioxidant and Anticancer Potential and Protection against Chemotherapy Toxicity. *Oxid Med Cell Longev*. 25 de agosto de 2019;2019:1–16.
2. Sawyer D, Beto Mesquita, Bruno Coutinho, Fábio Vaz Almeida, Isabel Figueiredo, Ivana Lamas, et al. Equipe responsável pela elaboração do Perfil do Ecossistema. *Critical Ecosystem Partnership Fund*; 2017. 506 p.
3. Arruda HS, Araújo MVL, Junior MRM. Underexploited Brazilian Cerrado fruits as sources of phenolic compounds for diseases management: A review. *Food Chemistry: Molecular Sciences*. 30 de dezembro de 2022;5.
4. Bailão E, Devilla I, da Conceição E, Borges L. Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits. *Int J Mol Sci*. 9 de outubro de 2015;16(10):23760–83.
5. Brito GO de, Reis BC, Ferreira EA, Vilela Junqueira NT, Sá-Barreto LCL, Mattivi F, et al. Phenolic Compound Profile by UPLC-MS/MS and Encapsulation with Chitosan of *Spondias mombin* L. Fruit Peel Extract from Cerrado Hotspot—Brazil. *Molecules*. 7 de abril de 2022;27(8):2382.
6. Cabral BRP, de Oliveira PM, Gelfuso GM, Quintão T de SC, Chaker JA, Karnikowski MG de O, et al. Improving stability of antioxidant compounds from *Plinia cauliflora* (jabuticaba) fruit peel extract by encapsulation in chitosan microparticles. *J Food Eng*. 1º de dezembro de 2018;238:195–201.
7. Carvalho PER. Cajá-da-mata: *Spondias mombin*. Em: CARVALHO PER, organizador. *Coleção espécies arbóreas brasileiras*. Embrapa; 2022. p. 125–32.
8. Brito SA, Barbosa IS, de Almeida CLF, de Medeiros JW, Silva Neto JC, Rolim LA, et al. Evaluation of gastroprotective and ulcer healing activities of yellow mombin juice from *spondias mombin* l. *PLoS One*. 1º de novembro de 2018;13(11).
9. de Souza VR, Brum MCM, Guimarães IDS, dos Santos PDF, do Amaral TO, Abreu JP, et al. Amazon fruits inhibit growth and promote pro-apoptotic effects on human ovarian carcinoma cell lines. *Biomolecules*. 1º de novembro de 2019;9(11).

10. Bataglion GA, da Silva FMA, Eberlin MN, Koolen HHF. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC–MS/MS. *Food Chem.* 1º de agosto de 2015;180:280–7.
11. Lemes AC, Egea MB, Filho JG de O, Gautério GV, Ribeiro BD, Coelho MAZ. Biological Approaches for Extraction of Bioactive Compounds From Agro-industrial By-products: A Review. *Front Bioeng Biotechnol.* 27 de janeiro de 2022;9.
12. Moura CL alves de, Pinto GAS, Figueiredo RW de. *Processamento e utilização de polpa de cajá (Spondias mombin L.)*. Curitiba; 2011.
13. Eseberri I, Trepiana J, Léniz A, Gómez-García I, Carr-Ugarte H, González M, et al. Variability in the Beneficial Effects of Phenolic Compounds: A Review. *Nutrients.* 4 de maio de 2022;14(9):1925.
14. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci.* 2021;4:200–14.
15. Liu C, Ge S, Yang J, Xu Y, Zhao M, Xiong L, et al. Adsorption mechanism of polyphenols onto starch nanoparticles and enhanced antioxidant activity under adverse conditions. *J Funct Foods.* outubro de 2016;26:632–44.
16. Lagoa R, Silva J, Rodrigues JR, Bishayee A. *Advances in phytochemical delivery systems for improved anticancer activity*. Vol. 38, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2020.
17. Gado F, Digiacomo M, Salsano JE, Macchia M, Manera C. Phenolic Compounds in Prevention and Treatment of Skin Cancers: A Review. *Curr Med Chem.* 25 de outubro de 2021;28(33):6730–52.
18. Yan C, Kim SR, Ruiz DR, Farmer JR. Microencapsulation for Food Applications: A Review. *ACS Appl Bio Mater.* 19 de dezembro de 2022;5(12):5497–512.
19. Ezhilarasi PN, Muthukumar SP, Anandharamakrishnan C. Solid lipid nanoparticle enhances bioavailability of hydroxycitric acid compared to a microparticle delivery system. *RSC Adv.* 2016;6(59):53784–93.
20. Dhakal SP, He J. Microencapsulation of vitamins in food applications to prevent losses in processing and storage: A review. *Food Research International.* 2020;137:109326.
21. Sinkevicius V. *Revisão da Recomendação 2011/696/UE da Comissão sobre a definição de nanomaterial*. Bruxelas; 2022 jun.

22. Gwinn MR, Vallyathan V. Nanoparticles: health effects--pros and cons. *Environ Health Perspect.* dezembro de 2006;114(12):1818–25.
23. Silva LP, Carvalho BS, Bonatto CC, Pupe JM, Pereira TM, Araujo TF. Síntese verde de nanomateriais. Em: Moraes MC de, Artemis FG, Soares BR, organizadores. *Nanotecnologia: considerações em materiais, saúde e meio ambiente.* 1º ed Brasília: Editora Universidade de Brasília; 2022. p. 110–73.
24. Benvenuti L, Sanchez-Camargo A del P, Zielinski AAF, Ferreira SRS. NADES as potential solvents for anthocyanin and pectin extraction from *Myrciaria cauliflora* fruit by-product: In silico and experimental approaches for solvent selection. *J Mol Liq.* outubro de 2020;315:113761.
25. Mustafa NR, de Winter W, van Iren F, Verpoorte R. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nat Protoc.* maio de 2011;6(6):715–42.
26. Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IWCE, et al. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *Plant Physiol.* 5 de agosto de 2011;156(4):1701–5.
27. INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025 [Internet]. Ministério da Saúde (BR). 2022 [citado 17 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>
28. Liu-Smith F, Dellinger R, Meyskens FL. Updates of reactive oxygen species in melanoma etiology and progression. *Arch Biochem Biophys.* dezembro de 2014;563:51–5.
29. Roy P, George J, Srivastava S, Tyagi S, Shukla Y. Inhibitory effects of tea polyphenols by targeting cyclooxygenase-2 through regulation of nuclear factor kappa B, Akt and p53 in rat mammary tumors. *Invest New Drugs.* 2011;29(2):225–31.
30. Kasprzak A, Kwasniewski W, Adamek A, Gozdicka-Jozefiak A. Insulin-like growth factor (IGF) axis in cancerogenesis. Vol. 772, *Mutation Research - Reviews in Mutation Research.* Elsevier B.V.; 2017. p. 78–104.
31. Kaur V, Kumar M, Kumar A, Kaur K, Dhillon VS, Kaur S. Pharmacotherapeutic potential of phytochemicals: Implications in cancer chemoprevention and future

- perspectives. Vol. 97, Biomedicine and Pharmacotherapy. Elsevier Masson SAS; 2018. p. 564–86.
32. Madureira J, Verde SC, Ferreira ICFR, Barros L, Margaça FMA, Santos-Buelga C. Ionizing radiation technologies to increase the extraction of bioactive compounds from agro-industrial residues: A review. *J Agric Food Chem*. 7 de outubro de 2020;68(40):11054–67.
 33. Sabiu S, Garuba T, Sunmonu T, Ajani E, Sulyman A, Nurain I, et al. Indomethacin-induced gastric ulceration in rats: Protective roles of *Spondias mombin* and *Ficus exasperata*. *Toxicol Rep*. 2015;2:261–7.
 34. Lucena TLC, Batista KS, Pinheiro RO, Cavalcante HC, Gomes JA de S, Silva LA da, et al. Nutritional Characterization, Antioxidant, and Lipid-Lowering Effects of Yellow Mombin (*Spondias mombin*) Supplemented to Rats Fed a High-Fat Diet. *Foods*. 2 de outubro de 2022;11(19):3064.
 35. Araujo C de S, Brito LD, Tarifa MO, Silva NJF da, Rodrigues KS, Cavalcante DGSM, et al. Protective effects of bark ethanolic extract from *Spondias dulcis* Forst F. against DNA damage induced by benzo[a]pyrene and cyclophosphamide. *Genet Mol Biol*. setembro de 2019;42(3):643–54.
 36. Antunes KA, Monteiro-Alfredo T, Cunha JSM, Espindola PPT, Oliveira AS, Ramalho de Oliveira CF, et al. *Spondias purpurea* L. Bark Extract Protects against Oxidative Stress and Reduces Hypercholesterolemia in Mice Fed High-Fat Diet. *Oxid Med Cell Longev*. 31 de março de 2022;2022:1–13.
 37. Rahmatullah M, Ferdousi D, Mollik MDAH, Azam MdNK, Taufiq-Ur-Rahman M, Jahan R. Ethnomedicinal survey of Bheramara area in Kushtia district, Bangladesh. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* [Internet]. 2009;534+. Disponível em: <https://link.gale.com/apps/doc/A235407059/AONE?u=anon~e045bdac&sid=googleScholar&xid=de326548>
 38. Paodjuenas R, Costa GM, Nunes EN, Paulino FO, Lucena RFP. CONHECIMENTO TRADICIONAL E USOS DO UMBUZEIRO (*Spondias tuberosa* Arruda) POR COMUNIDADES RURAIS DO SEMIÁRIDO, PARAÍBA, NORDESTE, BRASIL. *Ethnoscintia - Brazilian Journal of Ethnobiology and Ethnoecology*. 31 de dezembro de 2019;4(1).

39. Ayoka A, Akomolafe RO, Stephen A, Ukponmwan OE. Medicinal and economic value of *Spondias mombin*. African Journal Biomedical Research. 8 de fevereiro de 2010;11:129–36.
40. Aniceto A, Montenegro J, Cadena R da S, Teodoro AJ. Physicochemical characterization, antioxidant capacity, and sensory properties of murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) and taperebá (*Spondias mombin* L.) beverages. Molecules. 2 de janeiro de 2021;26(2).
41. Cabral B, Siqueira EMS, Bitencourt MAO, Lima MCJS, Lima AK, Ortmann CF, et al. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. Revista Brasileira de Farmacognosia. maio de 2016;26(3):304–11.
42. Biesalski HK, Dragsted LO, Elmadfa I, Grossklaus R, Müller M, Schrenk D, et al. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. Nutrition. novembro de 2009;25(11–12):1202–5.
43. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Diário Oficial da União, RDC N° 243 Brasil; jul 26, 2018.
44. Cioccoloni G, Soteriou C, Websdale A, Wallis L, Zulyniak MA, Thorne JL. Phytosterols and phytostanols and the hallmarks of cancer in model organisms: A systematic review and meta-analysis. Crit Rev Food Sci Nutr. 10 de fevereiro de 2022;62(5):1145–65.
45. Gosangari SaujanyaL, Watkin KL. Effect of preparation techniques on the properties of curcumin liposomes: Characterization of size, release and cytotoxicity on a squamous oral carcinoma cell line. Pharm Dev Technol. 24 de fevereiro de 2012;17(1):103–9.
46. Dima C, Assadpour E, Dima S, Jafari SM. Bioavailability and bioaccessibility of food bioactive compounds; overview and assessment by in vitro methods. Compr Rev Food Sci Food Saf. 1° de novembro de 2020;19(6):2862–84.
47. Trapani A, Guerra L, Corbo F, Castellani S, Sanna E, Capobianco L, et al. Cyto/Biocompatibility of Dopamine Combined with the Antioxidant Grape Seed-Derived Polyphenol Compounds in Solid Lipid Nanoparticles. Molecules. 9 de fevereiro de 2021;26(4):916.
48. Ju WZ, Zhao Y, Liu F, Wu T, Zhang J, Liu SJ, et al. Clinical tolerability and pharmacokinetics of *Erigerontis* hydroxybenzene injection: Results of a

- randomized phase I study in healthy Chinese volunteers. *Phytomedicine*. fevereiro de 2015;22(2):319–25.
49. Gomes A, Sobral PJDA. Plant protein-based delivery systems: An emerging approach for increasing the efficacy of lipophilic bioactive compounds. Vol. 27, *Molecules*. MDPI; 2022.
 50. Martínez-Ballesta Mc, Gil-Izquierdo Á, García-Viguera C, Domínguez-Perles R. Nanoparticles and Controlled Delivery for Bioactive Compounds: Outlining Challenges for New “Smart-Foods” for Health. *Foods*. 7 de maio de 2018;7(5):72.
 51. Veloso F da S, Caleja C, Calhelha RC, Pires TCS, Alves MJ, Barros L, et al. Characterization and application of pomegranate epicarp extracts as functional ingredients in a typical Brazilian pastry product. *Molecules*. 2020;25(7).
 52. Liang H, Zhou B, Wu D, Li J, Li B. Supramolecular design and applications of polyphenol-based architecture: A review. Vol. 272, *Advances in Colloid and Interface Science*. Elsevier B.V.; 2019.
 53. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Vol. 56. *Nutrition Reviews*; 1998. p. 317–33.
 54. Magalhães BEA de, Santos WNL dos. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E CONTEÚDO FENÓLICO DE INFUSÕES E DECOCÇÕES DE ERVAS MEDICINAIS. Em: Almeida Júnior S, Cardoso R, Quintela JB, Oliveira RJ de, Ramos Júnior E, Freire EB, et al., organizadores. *Produtos Naturais e Suas Aplicações: da comunidade para o laboratório*. Guarujá: Editora Científica Digital; 2021. p. 234–347.
 55. Pereira RC, Angelis-Pereira MC de. Compostos fenólicos na saúde humana: Do alimento ao organismo [Internet]. Editora UFLA. Lavras: Editora UFLA; 2020 [citado 11 de fevereiro de 2023]. p. 90. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/41377>
 56. Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*. novembro de 2013;72:1–20.
 57. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységú L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. Vol. 50, *Angewandte Chemie - International Edition*. 2011. p. 586–621.

58. Volf I, Ignat I, Neamtu M, Popa VI. Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. *Chemical Papers*. janeiro de 2014;68(1):121–9.
59. Tatipamula VB, Kukavica B. Phenolic compounds as antidiabetic, anti-inflammatory, and anticancer agents and improvement of their bioavailability by liposomes. *Cell Biochem Funct*. 9 de dezembro de 2021;39(8):926–44.
60. Sadikovic B, Al-Romaih K, Squire J, Zielenska M. Cause and Consequences of Genetic and Epigenetic Alterations in Human Cancer. *Curr Genomics*. 1º de setembro de 2008;9(6):394–408.
61. Acharya A, Das I, Chandhok D, Saha T. Redox regulation in cancer: A double-edged sword with therapeutic potential. *Oxid Med Cell Longev*. janeiro de 2010;3(1):23–34.
62. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*. agosto de 2018;80:50–64.
63. Paulsen CE, Carroll KS. Cysteine-Mediated Redox Signaling: Chemistry, Biology, and Tools for Discovery. *Chem Rev*. 10 de julho de 2013;113(7):4633–79.
64. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett*. fevereiro de 2017;387:95–105.
65. Renaudin X. Reactive oxygen species and DNA damage response in cancer. *Em: International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc.; 2021. p. 139–61.
66. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol*. julho de 2019;25:101084.
67. Ismail T, Kim Y, Lee H, Lee DS, Lee HS. Interplay Between Mitochondrial Peroxiredoxins and ROS in Cancer Development and Progression. *Int J Mol Sci*. 7 de setembro de 2019;20(18):4407.
68. Crowder SW, Horton LW, Lee SH, McClain CM, Hawkins OE, Palmer AM, et al. Passage-dependent cancerous transformation of human mesenchymal stem cells under carcinogenic hypoxia. *The FASEB Journal*. 8 de julho de 2013;27(7):2788–98.
69. Eblin KE, Jensen TJ, Wnek SM, Buffington SE, Futscher BW, Gandolfi AJ. Reactive oxygen species regulate properties of transformation in UROtsa cells

- exposed to monomethylarsonous acid by modulating MAPK signaling. *Toxicology*. janeiro de 2009;255(1–2):107–14.
70. Cui Q, Wang JQ, Assaraf YG, Ren L, Gupta P, Wei L, et al. Modulating ROS to overcome multidrug resistance in cancer. *Drug Resistance Updates*. novembro de 2018;41:1–25.
71. Abbaszadeh H, Keikhaei B, Mottaghi S. A review of molecular mechanisms involved in anticancer and antiangiogenic effects of natural polyphenolic compounds. *Phytotherapy Research*. 10 de agosto de 2019;33(8):2002–14.
72. Mutha RE, Tatiya AU, Surana SJ. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Futur J Pharm Sci*. 20 de janeiro de 2021;7(1):25.
73. Zare M, Roshan ZN, Assadpour E, Jafari SM. Improving the cancer prevention/treatment role of carotenoids through various nano-delivery systems. Vol. 61, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Bellwether Publishing, Ltd.; 2021. p. 522–34.
74. Bonferoni MC, Rossi S, Sandri G, Ferrari F. Nanoparticle formulations to enhance tumor targeting of poorly soluble polyphenols with potential anticancer properties. Vol. 46, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2017. p. 205–14.
75. LOMEU FLR de O. Bebida láctea funcional tipo “shake” a base de farinha de banana (*Musa spp.*) verde: desenvolvimento, aceitabilidade e efeito no estado nutricional antropométrico, metabólico e dietético de mulheres com excesso de peso e adiposidade abdominal. [Internet]. [Alfenas]: Universidade Federal de Alfenas; 2015 [citado 18 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://btdt.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/709>
76. Rotta EM, de Moraes DR, Biondo PBF, dos Santos VJ, Matsushita M, Visentainer JV. **Use of avocado peel (*Persea americana*) in tea formulation: a functional product containing phenolic compounds with antioxidant activity.** *Acta Scientiarum Technology* [Internet]. 1º de janeiro de 2015 [citado 18 de janeiro de 2023];38(1):23–9. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/27397>
77. Assadpour E, Jafari SM. A systematic review on nanoencapsulation of food bioactive ingredients and nutraceuticals by various nanocarriers. Vol. 59, *Critical*

- Reviews in Food Science and Nutrition. Taylor and Francis Inc.; 2019. p. 3129–51.
78. Esfanjani AF, Jafari SM. Nanoencapsulation of Phenolic Compounds and Antioxidants. *Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients: Principles and Applications*. Elsevier; 2017. p. 63–101.
 79. Shan W, Zhu X, Liu M, Li L, Zhong J, Sun W, et al. Overcoming the Diffusion Barrier of Mucus and Absorption Barrier of Epithelium by Self-Assembled Nanoparticles for Oral Delivery of Insulin. *ACS Nano*. 24 de março de 2015;9(3):2345–56.
 80. Heng PWS. Controlled release drug delivery systems. Vol. 23, *Pharmaceutical Development and Technology*. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 833.
 81. Park K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *Journal of Controlled Release*. setembro de 2014;190:3–8.
 82. Ozkan G, Franco P, de Marco I, Xiao J, Capanoglu E. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chem*. 30 de janeiro de 2019;272:494–506.
 83. Azeredo HMC de. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alim Nutr*. março de 2005;16(1):89–97.
 84. Bansode SS, Banarjee SK, Gaikwad DD, Jadhav SL, Thorat RM. MICROENCAPSULATION: A REVIEW. Vol. 1, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2010. p. 38–43.
 85. Strojewski D, Krupa A. Spray drying and nano spray drying as manufacturing methods of drug-loaded polymeric particles. *Polymers in Medicine*. 12 de agosto de 2022;52(2):101–11.
 86. Joye IJ, McClements DJ. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. Vol. 19, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2014. p. 417–27.
 87. Bedian L, Villalba-Rodríguez AM, Hernández-Vargas G, Parra-Saldivar R, Iqbal HMN. Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – A review. Vol. 98, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V.; 2017. p. 837–46.
 88. Mishra B, Mishra M, Yadav SK. Antibacterial Loaded Spray Dried Chitosan Polyelectrolyte Complexes as Dry Powder Aerosol for the Treatment of Lung

- Infections. Vol. 16, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2017.
89. Liang J, Yan H, Puligundla P, Gao X, Zhou Y, Wan X. Applications of chitosan nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of tea polyphenols: A review. *Food Hydrocoll.* agosto de 2017;69:286–92.
 90. Kumar V, Kumari A, Guleria P, Yadav SK. Evaluating the toxicity of selected types of nanochemicals. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2012;215:39–121.
 91. Gupta A, Eral HB, Hatton TA, Doyle PS. Nanoemulsions: Formation, properties and applications. *Soft Matter.* 2016;12(11):2826–41.
 92. Hupffer HM, Lazzaretti LL. Nanotecnologia e sua regulamentação no Brasil. *Revista Gestão e Desenvolvimento.* 9 de setembro de 2019;16(3):153.
 93. Instituído Comitê Interno de Nanotecnologia da Anvisa [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. 2022 [citado 13 de fevereiro de 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/anos-anteriores/instituido-comite-interno-de-nanotecnologia-da-anvisa>
 94. Sharma S, Jaiswal S, Duffy B, Jaiswal A. Nanostructured Materials for Food Applications: Spectroscopy, Microscopy and Physical Properties. *Bioengineering.* 19 de março de 2019;6(1):26.
 95. Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharm Res.* 21 de julho de 2006;23(7):1417–50.
 96. Wu W, Wu Z, Yu T, Jiang C, Kim WS. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci Technol Adv Mater.* 28 de abril de 2015;16(2):023501.
 97. Wu W, Jiang CZ, Roy VAL. Designed synthesis and surface engineering strategies of magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Nanoscale.* 21 de dezembro de 2016;8(47):19421–74.
 98. Alshehri R, Ilyas AM, Hasan A, Arnaout A, Ahmed F, Memic A. Carbon Nanotubes in Biomedical Applications: Factors, Mechanisms, and Remedies of Toxicity. *J Med Chem.* 22 de setembro de 2016;59(18):8149–67.
 99. McClements DJ, Li Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Adv Colloid Interface Sci.* setembro de 2010;159(2):213–28.

100. Puri A, Loomis K, Smith B, Lee JH, Yavlovich A, Heldman E, et al. Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2009;26(6):523–80.
101. Brown SD, Nativo P, Smith JA, Stirling D, Edwards PR, Venugopal B, et al. Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin. *J Am Chem Soc.* 7 de abril de 2010;132(13):4678–84.
102. Deshmukh SP, Patil SM, Mullani SB, Delekar SD. Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. *Materials Science and Engineering: C.* abril de 2019;97:954–65.
103. McClements DJ, Decker EA, Weiss J. Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components. *J Food Sci.* outubro de 2007;72(8):R109–24.
104. Najahi-Missaoui W, Arnold RD, Cummings BS. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? *Int J Mol Sci.* 31 de dezembro de 2020;22(1):385.
105. Fenske DB, Chonn A, Cullis PR. Liposomal Nanomedicines: An Emerging Field. *Toxicol Pathol.* 1º de janeiro de 2008;36(1):21–9.
106. Aditya NP, Macedo AS, Doktorovova S, Souto EB, Kim S, Chang PS, et al. Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). *LWT - Food Science and Technology.* novembro de 2014;59(1):115–21.
107. Fathi M, Mozafari MR, Mohebbi M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends Food Sci Technol.* janeiro de 2012;23(1):13–27.
108. da Silva JR, Oliveira J v, Araújo VHS. Recursos biológicos utilizados na síntese de nanomatérias. Em: Joanitti GA, Moraes PC de, Azevedo RB de, organizadores. *Nanotecnologia: considerações em materiais, saúde e meio ambiente.* 1º ed Brasília: Editora Universidade de Brasília; 2022. p. 110–6.
109. Płotka-Wasyłka J, Mohamed HM, Kurowska-Susdorf A, Dewani R, Fares MY, Andruch V. Green analytical chemistry as an integral part of sustainable education development. *Curr Opin Green Sustain Chem.* outubro de 2021;31:100508.
110. Ivanović M, Razboršek M, Kolar M. Innovative Extraction Techniques Using Deep Eutectic Solvents and Analytical Methods for the Isolation and

- Characterization of Natural Bioactive Compounds from Plant Material. *Plants*. 24 de outubro de 2020;9(11):1428.
111. Ivanović M, Krajnc P, Mlinarič A, Razboršek MI. Natural Deep Eutectic Solvent-Based Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) Extraction for Determination of Bioactive Compounds from Sandy Everlasting (*Helichrysum arenarium* L.): A Case of Stability Study. *Plants*. 11 de dezembro de 2022;11(24):3468.
 112. Gutiérrez A, Alcalde R, Atilhan M, Aparicio S. Insights on Betaine + Lactic Acid Deep Eutectic Solvent. *Ind Eng Chem Res*. 24 de junho de 2020;59(25):11880–92.
 113. Depoorter J. Use of deep eutectic solvents and ionic liquid derivatives for the design of new materials [Internet]. [Lyon]: L'UNIVERSITE DE LYON; 2021 [citado 13 de fevereiro de 2023]. Disponível em: <https://theses.hal.science/tel-03358909>
 114. Zainal-Abidin MH, Hayyan M, Hayyan A, Jayakumar NS. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Anal Chim Acta*. agosto de 2017;979:1–23.
 115. Castro VIB, Craveiro R, Silva JM, Reis RL, Paiva A, Duarte ARC. Natural deep eutectic systems as alternative nontoxic cryoprotective agents. *Cryobiology*. agosto de 2018;83:15–26.
 116. Hornberger K, Li R, Duarte ARC, Hubel A. Natural deep eutectic systems for <sc>nature-inspired</sc> cryopreservation of cells. *AIChE Journal*. 19 de fevereiro de 2021;67(2).
 117. Sun X, Pradeepkumar P, Rajendran NK, Shakila H, Houreld NN, al Farraj DA, et al. Natural deep eutectic solvent supported targeted solid–liquid polymer carrier for breast cancer therapy. *RSC Adv*. 2020;10(61):36989–7004.
 118. de Oca MKM, Pearlman RL, McClees SF, Strickland R, Afaq F. Phytochemicals for the Prevention of Photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol*. julho de 2017;93(4):956–74.
 119. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett*. fevereiro de 2017;387:95–105.
 120. Vats K, Kruglov O, Mizes A, Samovich SN, Amoscato AA, Tyurin VA, et al. Keratinocyte death by ferroptosis initiates skin inflammation after UVB exposure. *Redox Biol*. novembro de 2021;47:102143.

121. Ostrowski SM, Fisher DE. Biology of Melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* fevereiro de 2021;35(1):29–56.
122. Sturm RA. Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum Mol Genet.* 15 de abril de 2009;18(R1):R9–17.
123. Millington GWM. Proopiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors. *Clin Exp Dermatol.* maio de 2006;31(3):407–12.
124. Miller AJ, Du J, Rowan S, Hershey CL, Widlund HR, Fisher DE. Transcriptional Regulation of the Melanoma Prognostic Marker Melastatin (TRPM1) by MITF in Melanocytes and Melanoma. *Cancer Res.* 15 de janeiro de 2004;64(2):509–16.
125. Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 Are Transcriptionally Regulated by MITF in Melanocytes and Melanoma. *Am J Pathol.* julho de 2003;163(1):333–43.
126. Du J, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Ross K, Huber WE, et al. Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. Vol. 6, *Cancer Cell.* 2004. p. 565–76.
127. McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, et al. Bcl2 Regulation by the Melanocyte Master Regulator Mitf Modulates Lineage Survival and Melanoma Cell Viability. *Cell.* junho de 2002;109(6):707–18.
128. Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI. Reactive Oxygen Species (ROS)–Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* junho de 2011;711(1–2):167–73.
129. Groeger G, Quiney C, Cotter TG. Hydrogen Peroxide as a Cell-Survival Signaling Molecule. *Antioxid Redox Signal.* novembro de 2009;11(11):2655–71.
130. Zhang Y, Du Y, Le W, Wang K, Kieffer N, Zhang J. Redox Control of the Survival of Healthy and Diseased Cells. *Antioxid Redox Signal.* dezembro de 2011;15(11):2867–908.
131. Chan EC, Jiang F, Peshavariya HM, Dusting GJ. Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signaling: Potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering. *Pharmacol Ther.* maio de 2009;122(2):97–108.

132. Meyskens FL, McNulty SE, Buckmeier JA, Tohidian NB, Spillane TJ, Kahlon RS, et al. Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes. *Free Radic Biol Med.* setembro de 2001;31(6):799–808.
133. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive Oxygen Species as Intracellular Messengers During Cell Growth and Differentiation. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2001;11(4):173–86.
134. Wallace DC. Mitochondria and cancer. Vol. 12, *Nature Reviews Cancer.* 2012. p. 685–98.
135. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol.* agosto de 2010;45(7–8):466–72.
136. MAYBURY BD. Are Mitochondrial Genomes Damaged in Cancer? Cardiff; 2013 jul.
137. Filipp F v., Ratnikov B, de Ingeniis J, Smith JW, Osterman AL, Scott DA. Glutamine-fueled mitochondrial metabolism is decoupled from glycolysis in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* novembro de 2012;25(6):732–9.
138. Farmer PJ, Gidanian S, Shahandeh B, di Bilio AJ, Tohidian N, L. Meyskens F. Melanin as a Target for Melanoma Chemotherapy: Pro-oxidant Effect of Oxygen and Metals on Melanoma Viability. *Pigment Cell Res.* junho de 2003;16(3):273–9.
139. Ueyama T, Geiszt M, Leto TL. Involvement of Rac1 in Activation of Multicomponent Nox1- and Nox3-Based NADPH Oxidases. *Mol Cell Biol.* 15 de março de 2006;26(6):2160–74.
140. Opitz N, Drummond GR, Selemidis S, Meurer S, Schmidt HHHW. The ‘A’s and ‘O’s of NADPH oxidase regulation: A commentary on “Subcellular localization and function of alternatively spliced Noxo1 isoforms”. *Free Radic Biol Med.* janeiro de 2007;42(2):175–9.
141. Sikora AG, Gelbard A, Davies MA, Sano D, Ekmekcioglu S, Kwon J, et al. Targeted inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits growth of human melanoma in vivo and synergizes with chemotherapy. *Clinical Cancer Research.* 15 de março de 2010;16(6):1834–44.
142. Tanese K, Grimm EA, Ekmekcioglu S. The role of melanoma tumor-derived nitric oxide in the tumor inflammatory microenvironment: Its impact on the chemokine expression profile, including suppression of CXCL10. *Int J Cancer.* 15 de agosto de 2012;131(4):891–901.

143. Lopez-Rivera E, Jayaraman P, Parikh F, Davies MA, Ekmekcioglu S, Izadmehr S, et al. Inducible Nitric Oxide Synthase Drives mTOR Pathway Activation and Proliferation of Human Melanoma by Reversible Nitrosylation of TSC2. *Cancer Res.* 15 de fevereiro de 2014;74(4):1067–78.
144. Yang Z, Misner B, Ji H, Poulos TL, Silverman RB, Meyskens FL, et al. Targeting nitric oxide signaling with nNOS inhibitors as a novel strategy for the therapy and prevention of human melanoma. *Antioxid Redox Signal.* 10 de agosto de 2013;19(5):433–47.
145. Huang H, Li H, Yang S, Chreifi G, Martásek P, Roman LJ, et al. Potent and selective double-headed thiophene-2-carboximidamide inhibitors of neuronal nitric oxide synthase for the treatment of melanoma. *J Med Chem.* 13 de fevereiro de 2014;57(3):686–700.
146. Ahmed, van den Oord. Expression of the neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) and its inhibitor, protein inhibitor of nNOS, in pigment cell lesions of the skin. *British Journal of Dermatology.* julho de 1999;141(1):12–9.
147. Melo FHM, Molognoni F, Morais AS, Toricelli M, Mouro MG, Higa EMS, et al. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling as a key mediator of melanocyte malignant transformation associated with sustained stress conditions. *Free Radic Biol Med.* maio de 2011;50(10):1263–73.
148. da Silva DT, Pauletto R, Cavalheiro SS, Bochi VC, Rodrigues E, Weber J, et al. Natural deep eutectic solvents as a biocompatible tool for the extraction of blueberry anthocyanins. *Journal of Food Composition and Analysis [Internet].* 2020;89:103470. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157519312207>
149. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic [Internet].* 1º de janeiro de 1965;16(3):144. Disponível em: <http://www.ajevonline.org/content/16/3/144.abstract>
150. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology.* 1995;28(1):25–30.
151. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* maio de 1999;26(9–10):1231–7.

152. Tao H, Xiao Y, Wu F, Xu X. Optimization of additives and their combination to improve the quality of refrigerated dough. *LWT*. 1º de março de 2018;89:482–8.
153. Ganassin R, da Silva VCM, Araujo VHS, Tavares GR, da Silva PB, Cáceres-Vélez PR, et al. Solid lipid nanoparticles loaded with curcumin: development and in vitro toxicity against CT26 cells. *Nanomedicine*. fevereiro de 2022;17(3):167–79.
154. Silva VCM da. Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo alumínio-ftalocianina para terapia fotodinâmica contra melanoma: desenvolvimento, caracterização e teste de eficácia in vitro [Internet]. [Brasília]: Ubiversidade de Brasília; 2022 [citado 17 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/44245>
155. Patnaik S, Gorain B, Padhi S, Choudhury H, Gabr GA, Md S, et al. Recent update of toxicity aspects of nanoparticulate systems for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. abril de 2021;161:100–19.
156. Silva VCM, Araújo VHS, de Paiva KLR, Simões MM, Marques DC, da Silva Costa NR, et al. Development of New Natural Lipid-Based Nanoparticles Loaded with Aluminum-Phthalocyanine for Photodynamic Therapy against Melanoma. *Nanomaterials*. 11 de outubro de 2022;12(20):3547.
157. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. Vol. 65, *Journal of Immunological Methods*. 1983.
158. Swallah MS, Sun H, Affoh R, Fu H, Yu H. Antioxidant Potential Overviews of Secondary Metabolites (Polyphenols) in Fruits. *Int J Food Sci*. 7 de maio de 2020;2020:1–8.
159. da Silva ARA, de Moraes SM, Marques MMM, de Oliveira DF, Barros CC, de Almeida RR, et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. *Pharm Biol*. 10 de junho de 2012;50(6):740–6.
160. Meitha K, Pramesti Y, Suhandono S. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Postharvest Vegetables and Fruits. *Int J Food Sci*. 11 de dezembro de 2020;2020:1–11.
161. Schulz M, Seraglio SKT, Brugnerotto P, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. Composition and potential health effects of dark-colored underutilized Brazilian fruits – A review. *Food Research International*. novembro de 2020;137:109744.

162. Desai NM, Haware DJ, Basavaraj K, Murthy PS. Microencapsulation of antioxidant phenolic compounds from green coffee. *Prep Biochem Biotechnol.* 21 de abril de 2019;49(4):400–6.
163. Yingngam B, Tantiraksaroj K, Taweetao T, Rungseevijitprapa W, Supaka N, Brantner AH. Modeling and stability study of the anthocyanin-rich maoberry fruit extract in the fast-dissolving spray-dried microparticles. *Powder Technol.* fevereiro de 2018;325:261–70.
164. Alvim ID, Stein MA, Koury IP, Dantas FBH, Cruz CL de CV. Comparison between the spray drying and spray chilling microparticles contain ascorbic acid in a baked product application. *LWT - Food Science and Technology.* janeiro de 2016;65:689–94.
165. Silva LC, Silva LOB, Joanitti GA. Nanoemulsões: Preparação, Características e Estabilidade. Em: Marília Carolina de Moraes Florindo, Gabriela Artemis, Bruno Ribeiro Soares, organizadores. *Nanotecnologia : considerações em materiais, saúde e meio ambiente.* 1º ed Brasília: Universidade de Brasília; 2022. p. 45–76.
166. Romes NB, Abdul Wahab R, Abdul Hamid M, Oyewusi HA, Huda N, Kobun R. Thermodynamic stability, in-vitro permeability, and in-silico molecular modeling of the optimal *Elaeis guineensis* leaves extract water-in-oil nanoemulsion. *Sci Rep.* 1º de dezembro de 2021;11(1).
167. Ni S, Sun R, Zhao G, Xia Q. Quercetin Loaded Nanostructured Lipid Carrier for Food Fortification: Preparation, Characterization and *in vitro* Study. *J Food Process Eng.* fevereiro de 2015;38(1):93–106.
168. Pandita D, Kumar S, Poonia N, Lather V. Solid lipid nanoparticles enhance oral bioavailability of resveratrol, a natural polyphenol. *Food Research International.* 2014;62:1165–74.
169. Romero MP, Gobo NRS, de Oliveira KT, Iamamoto Y, Serra OA, Louro SRW. Photophysical properties and photodynamic activity of a novel menthol–zinc phthalocyanine conjugate incorporated in micelles. *J Photochem Photobiol A Chem.* fevereiro de 2013;253:22–9.
170. Helgason T, Awad TS, Kristbergsson K, Decker EA, McClements DJ, Weiss J. Impact of Surfactant Properties on Oxidative Stability of β -Carotene Encapsulated within Solid Lipid Nanoparticles. *J Agric Food Chem.* 9 de setembro de 2009;57(17):8033–40.

171. Ester M, Machado S. ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL E TERMOGRAVIMÉTRICA. 2008.
172. Sakurai H, Suzuki M, Itakura S, Todo H, Arce F, See G, et al. Preparation, Characterization, Solubility, and Antioxidant Capacity of Ellagic Acid-Urea Complex. *Materials*. 12 de abril de 2022;15(8):2836.
173. Aydogdu A, Yildiz E, Aydogdu Y, Sumnu G, Sahin S, Ayhan Z. Enhancing oxidative stability of walnuts by using gallic acid loaded lentil flour based electrospun nanofibers as active packaging material. *Food Hydrocoll*. 1º de outubro de 2019;95:245–55.
174. Ravichandran R, Rajendran M, Devapiriam D. Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. *Food Chem*. 2014;146:472–8.
175. Almeida CWMA, de Mescouto VA, Costa CEF, Nascimento LAS. Caracterização da manteiga de murumuru (*astrocaryum murumuru mart*) para aplicação na produção de nanocarreadores lipídicos [Internet]. Gramado: Associação Brasileira de Química; 2017 [citado 18 de janeiro de 2023]. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2017/trabalhos/3/11140-22904.html>
176. Murumurubutter - *Astrocaryum muru-muru* [Internet]. Amazon oil - The rainforest company. [citado 18 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://www.amazonoil.com.br/rainforest-products/murumurubutter-en/>
177. LIMA RP. Produção de biodiesel metílico e etílico de oleaginosas Amazônicas: caracterização físico-química e estudos térmico e cinético [Internet]. [Belém]: Universidade Federal do Pará; 2016 [citado 18 de janeiro de 2023]. Disponível em: <http://repositorio.ufpa.br:8080/jspui/handle/2011/8909>
178. Sigma-Aldrich. Brij® O10 - product specification [Internet]. Merck LGaA. [citado 18 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/p6136>
179. Sansone F, Picerno P, Mencherini T, Villecco F, D'Ursi AM, Aquino RP, et al. Flavonoid microparticles by spray-drying: Influence of enhancers of the dissolution rate on properties and stability. *J Food Eng*. março de 2011;103(2):188–96.
180. Gumireddy A, Christman R, Kumari D, Tiwari A, North EJ, Chauhan H. Preparation, Characterization, and In vitro Evaluation of Curcumin- and

- Resveratrol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*. 1º de maio de 2019;20(4).
181. da Rosa CG, de Oliveira Brisola Maciel MV, de Carvalho SM, de Melo APZ, Jummes B, da Silva T, et al. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 1º de setembro de 2015;481:337–44.
 182. Vora D, Heruye S, Kumari D, Opere C, Chauhan H. Preparation, Characterization and Antioxidant Evaluation of Poorly Soluble Polyphenol-Loaded Nanoparticles for Cataract Treatment. *AAPS PharmSciTech*. 15 de julho de 2019;20(5):163.
 183. Chen L, Yang T, Song Y, Guowei S, Chen H. Effect of xanthan-chitosan-xanthan double layer encapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB01 in simulated gastrointestinal conditions, bile salt solution and yogurt. *LWT - Food Science and Technology*. 1º de agosto de 2017;81:274–80.
 184. Naidu NB, Chowdary KPR, Murthy KVR, Satyanarayana V, Hayman AR, Becket G. Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam-cyclodextrin binary systems. *J Pharm Biomed Anal*. 1º de abril de 2004;35(1):75–86.
 185. Retamal Marín RR, Babick F, Hillemann L. Zeta potential measurements for non-spherical colloidal particles – Practical issues of characterisation of interfacial properties of nanoparticles. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 5 de novembro de 2017;532:516–21.
 186. Chaiittianan R, Sripanidkulchai B. Development of a nanoemulsion of *Phyllanthus emblica* L. branch extract. *Drug Dev Ind Pharm*. 1º de dezembro de 2014;40(12):1597–606.
 187. Hallan S, Sguizzato M, Drechsler M, Mariani P, Montesi L, Cortesi R, et al. The Potential of Caffeic Acid Lipid Nanoparticulate Systems for Skin Application: In Vitro Assays to Assess Delivery and Antioxidant Effect. *Nanomaterials*. 12 de janeiro de 2021;11(1):171.
 188. ABDELWAHED W, DEGOBERT G, STAINMESSE S, FESSI H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations☆. *Adv Drug Deliv Rev*. 30 de dezembro de 2006;58(15):1688–713.

189. Clogston JD, Patri AK. Zeta Potential Measurement. Em: McNeil SE, organizador. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. New York: Humana New York; 2011. p. 63–70.
190. Sessa M, Tsao R, Liu R, Ferrari G, Donsì F. Evaluation of the Stability and Antioxidant Activity of Nanoencapsulated Resveratrol during in Vitro Digestion. *J Agric Food Chem*. 14 de dezembro de 2011;59(23):12352–60.
191. Chanioti S, Katsouli M, Tzia C. Novel processes for the extraction of phenolic compounds from olive pomace and their protection by encapsulation. *Molecules*. 2021;26(6).
192. Isabel Landim Neves M, Socas-Rodríguez B, Valdés A, Keven Silva E, Cifuentes A, Angela A. Meireles M, et al. Synergic effect of natural deep eutectic solvent and high-intensity ultrasound on obtaining a ready-to-use genipin extract: Crosslinking and anti-neurodegenerative properties. *Food Chem X*. dezembro de 2022;16:100489.
193. di Crescenzo A, Tiecco M, Zappacosta R, Boncompagni S, di Profio P, Ettore V, et al. Novel zwitterionic Natural Deep Eutectic Solvents as environmentally friendly media for spontaneous self-assembly of gold nanoparticles. *J Mol Liq*. 15 de outubro de 2018;268:371–5.
194. Mizuta K, Matsubara T, Goto A, Addison WN, Nakatomi M, Matsuo K, et al. Plectin promotes tumor formation by B16 mouse melanoma cells via regulation of Rous sarcoma oncogene activity. *BMC Cancer*. 1º de dezembro de 2022;22(1).
195. Reatgui W da S. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas baseadas em manteiga de murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) para aplicação tópica [Internet]. [Brasília]: Universidade de Brasília; 2021 [citado 18 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/41765>
196. Sampaio MC. Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões à base de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) para avaliação de efeitos biológicos em células de câncer de mama in vitro [Internet]. [Brasília]: Universidade de Brasília; 2017 [citado 18 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/23249>
197. Silva LC da. Análise da estabilidade oxidativa e efeitos antitumorais de nanoemulsões à base de óleos derivados da biodiversidade brasileira

- associadas ao resveratrol em células de câncer de pele não melanoma [Internet]. [Brasília]: Universidade de Brasília; 2020 [citado 18 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/39212>
198. Melo MN de O, Oliveira AP, Wicikowski AF, Carvalho RS, Castro J de L, de Oliveira FAG, et al. Phenolic compounds from *Viscum album* tinctures enhanced antitumor activity in melanoma murine cancer cells. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 1º de março de 2018;26(3):311–22.
 199. Zhang XM, Chen J, Xia YG, Xu Q. Apoptosis of murine melanoma B16-BL6 cells induced by quercetin targeting mitochondria, inhibiting expression of PKC- α and translocating PKC- δ . *Cancer Chemother Pharmacol*. março de 2005;55(3):251–62.
 200. Danciu C, Vlaia L, Fetea F, Hancianu M, Coricovac DE, Ciurlea SA, et al. Evaluation of phenolic profile, antioxidant and anticancer potential of two main representants of Zingiberaceae family against B164A5 murine melanoma cells. *Biol Res*. 2015;48(1):1.
 201. Lima E Silva MCB, Bogo D, Alexandrino CAF, Perdomo RT, Figueiredo PDO, do Prado PR, et al. Antiproliferative activity of extracts of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg and isolated compound dimethylchalcone against B16-F10 murine melanoma. *J Med Food*. 1º de outubro de 2018;21(10):1024–34.
 202. Rosa MN, E Silva LRV, Longato GB, Evangelista AF, Gomes INF, Alves AL v., et al. Bioprospecting of natural compounds from brazilian cerrado biome plants in human cervical cancer cell lines. *Int J Mol Sci*. 1º de abril de 2021;22(7).
 203. Nayara Carvalho Oliveira Cambrussi A, Damasceno da Conceição I, Ribeiro Freitas A, Sousa dos Santos P, Ribeiro Magalhaes de Sousa R, Eiras C, et al. O papel da nanotecnologia na redução do estresse oxidativo: uma revisão [Internet]. 2018 ago. Disponível em: <http://www.ojs.ufpi.br/index.php/geum/>

ANEXO A: ARTIGO PUBLICADO



Article

Phenolic Compound Profile by UPLC-MS/MS and Encapsulation with Chitosan of *Spondias mombin* L. Fruit Peel Extract from Cerrado Hotspot—Brazil

Giovanna Oliveira de Brito¹, Bruna Cabral Reis¹, Eduardo A. Ferreira² , Nilton T. Vilela Junqueira³, Lívia C. L. Sá-Barreto³, Fulvio Mattivi^{4,5} , Urska Vrhovsek⁵ and Eliana Fortes Gris^{1,*}

¹ Graduate Program in Health Sciences and Technologies, Faculty of Ceilandia, University of Brasilia, Centro Metropolitano, Conjunto A, Lote 01, Brasilia 72220-275, Brazil; giovanna.odebrito@gmail.com (G.O.d.B.); brunacabralreis@gmail.com (B.C.R.)

² Faculty of Ceilandia, University of Brasilia, Centro Metropolitano, Conjunto A, Lote 01, Brasilia 72220-275, Brazil; eduardoantonioferreira@gmail.com or eduardoferreira@unb.br

³ Brazilian Agricultural Research Corporation—EMBRAPA, Embrapa Cerrados, Rodovia BR-020, Km 18, Planaltina 73310-970, Brazil; nilton.junqueira@embrapa.br (N.T.V.J.); liviabarretofarm@hotmail.com (L.C.L.S.-B.)

⁴ Department of Cellular, Computational and Integrative Biology—CIBIO, University of Trento, Via E. Mach 1, 38098 San Michele all'Adige, Italy; fulvio.mattivi@unitn.it

⁵ Edmund Mach Foundation, Via E. Mach 1, 38010 San Michele all'Adige, Italy; urska.vrhovsek@fmach.it

* Correspondence: elianagris@gmail.com or elianagris@unb.br



Citation: Brito, G.O.d.; Reis, B.C.; Ferreira, E.A.; Vilela Junqueira, N.T.; Sá-Barreto, L.C.L.; Mattivi, F.; Vrhovsek, U.; Gris, E.F. Phenolic Compound Profile by UPLC-MS/MS and Encapsulation with Chitosan of *Spondias mombin* L. Fruit Peel Extract from Cerrado Hotspot—Brazil. *Molecules* **2022**, *27*, 2382. <https://doi.org/10.3390/molecules27082382>

Academic Editors: Francesco Cacciola and Adele Papetti

Received: 23 February 2022

Accepted: 2 April 2022

Published: 7 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Taperebá (*Spondias mombin* L.) is a native species of the Brazilian Cerrado that has shown important characteristics such as a significant phenolic compound content and biological activities. The present study aimed to characterize the phenolic compound profile and antioxidant activity in taperebá peel extract, as well as microencapsulating the extract with chitosan and evaluating the stability of the microparticles. The evaluation of the profile of phenolic compounds was carried out by UPLC-MS/MS. The *in vitro* antioxidant activity was evaluated by DPPH and ABTS methods. The microparticles were obtained by spray drying and were submitted to a stability study under different temperatures. In general, the results showed a significant content of polyphenols and antioxidant activity. The results of UPLC-MS/MS demonstrated a significant content of polyphenols in taperebá peel, highlighting the high content of ellagic acid and quercetin compounds. There was significant retention of phenolic compounds when microencapsulated, demonstrating high retention at all evaluated temperatures. This study is the first to microencapsulate the extract of taperebá peel, in addition to identifying and quantifying some compounds in this fruit.

Keywords: taperebá; cajá; bioactive compounds; UPLC-MS/MS; microencapsulation; chitosan; spray drying

1. Introduction

The Cerrado biome has an extensive variety of endemic species, presenting a range of exotic fruits that have peculiar and intense sensory characteristics, attributes that arouse the interest of the food industry [1]. In addition, bioactive substances found in these fruits provide environmental protection and health benefits [2]. The adverse conditions found in the Cerrado, such as frequent fires, seasonal rains, and nutrient-poor soil, are partially responsible for the phytochemical properties of plants and can influence the profile and quantity of these substances [3]. Although this biome has very rich biodiversity and includes the largest tropical savanna in South America, there are many endangered species due to land use conversion and the scarcity of areas of environmental preservation. It is considered one of the 34 “hot spots” for conservation in the world [4], containing numerous plants and fruits with medicinal benefits that have not yet been scientifically explored [3].