



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS**

TÁSSIA REMIGIO VIEIRA

**OBTENÇÃO DE UMA NANO- EMULSÃO À BASE DE AJURÚ (*Chrysobalanus
icaco L.*) UTILIZANDO O ÓLEO DAS SEMESTES E A FASE AQUOSA
FLAVONOÍDICA OBTIDA DOS FRUTOS.**

MACAPÁ-AP

2021

TÁSSIA REMIGIO VIEIRA

OBTENÇÃO DE UMA NANO- EMULSÃO À BASE DE AJURÚ (*Chrysobalanus icaco L.*) UTILIZANDO O ÓLEO DAS SEMESTES E A FASE AQUOSA FLAVONOÍDICA OBTIDA DOS FRUTOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), na área de concentração: Ensaios Biológicos, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Raquel Rodrigues do Amaral

Co-Orientador: Dr. Caio Pinho Fernandes

**MACAPÁ-AP
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Cristina Fernandes – CRB-2/1569

Vieira, Tássia Remigio.

Obtenção de uma nano- emulsão à base de ajurú (*Chrysobalanus icaco L.*) utilizando o óleo das sementes e a fase aquosa flavonoídica obtida dos frutos. / Tássia Remigio Vieira; orientadora, Raquel Rodrigues do Amaral; coorientador, Caio Pinho Fernandes. – Macapá, 2021.

37 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá,
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Ácidos graxos. 2. Colóides. 3. Espalhamento dinâmico da luz.
4. Flavonoides. 5. Fitofarmacêutica. I. Amaral, Raquel Rodrigues do,
orientadora. II. Fernandes, Caio Pinho, coorientador. III. Fundação
Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

581.4 V658o
CDD. 22 ed.

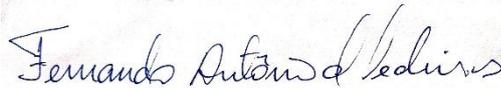
TÁSSIA REMIGIO VIEIRA

OBTENÇÃO DE UMA NANO- EMULSÃO À BASE DE AJURÚ (*Chrysobalanus icaco L.*) UTILIZANDO O ÓLEO DAS SEMESTES E A FASE AQUOSA FLAVONOÍDICA OBTIDA DOS FRUTOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), na área de concentração: Ensaios Biológicos, como requisito final para obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Raquel Rodrigues do Amaral

DATA DE APROVAÇÃO: ____/____/____



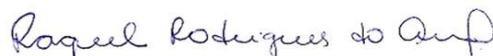
Examinador (a): Prof. Dr Fernando Antônio de Medeiros
UNIFAP



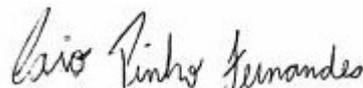
Examinador(a): Prof. Dr^o: Leandro Machado Rocha
UFF



Examinador(a): Prof. Dr^o: Rodrigo Alves Soares Cruz
UNIFAP



Orientador(a): Prof(a) Dr^a Raquel Rodrigues do Amaral
UNIFAP



Co Orientador: Pro^o Dr. Caio Pinho Fernandes

Macapá/AP
2021

A Deus pela vida e pelo toque diário da sua forte presença.

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho por suportar momentos longe de mim nesse período, que apesar de muito pequeno soube compreender e me apoiar nesse momento.

Ao meu esposo pelo incentivo diário.

Aos meus pais e irmão, por se orgulharem de cada passo que eu dou e torcerem para que eu buscasse sempre o melhor.

Ao meu Co- orientador Prof^o Dr Caio Pinho Fernandes, que foi indispensável nessa jornada.

À minha Orientadora Prof^a Dr^a Raquel Amaral pela paciência e persistência junto comigo nesse sonho.

Aos meus amigos da Nanofito pelo carinho e apoio, em especial àThamara.

À minha turma do mestrado pela troca de conhecimento e lanches de final de tarde e a todos que de forma direta ou indireta, contribuíram para este momento.

RESUMO

Os frutos de ajuru (*Chrysobalanus icaco*), uma planta que pertence à família Chrysobalanaceae, são uma fonte interessante de substâncias bioativas. Apesar de suas propriedades funcionais, a utilização de derivados desses frutos para obtenção de formulações inovadoras é escassa. Nesse contexto, este trabalho apresenta uma nova abordagem para a utilização de dois extratos (óleo das sementes e a fase aquosa) dos frutos do ajuru para obter-se uma fitonano-emulsão otimizada. O sistema coloidal foi preparado com óleos da semente (valor de equilíbrio hidrófilo lipófilo = 14, determinado com mistura de polisorbato 80/monooleato de sorbitano) e uma fase aquosa flavonoídica ($0,19 \pm 0,04$ mg/mL de flavonoides) apresentaram um diâmetro médio e índice de polidispersão em torno de 150 nm e 0,250, respectivamente. Esses resultados foram menores do que a nano-emulsão preparada com água deionizada, sendo a última também relacionada a uma curva de distribuição de gotículas mais ampla durante o armazenamento. Esses resultados ressaltam a importância de substâncias bioativas endógenas na estabilização de fitocoloides, contribuindo para o estado da arte da nanobiotecnologia fitofarmacêutica e abrindo perspectivas para a utilização de frações e/ou extratos contendo flavonóides com óleos da mesma espécie funcional, consequentemente obtendo protótipos passíveis de serem utilizados devido ao seu potencial bioativo.

Palavras-chaves: Ácidos graxos, colóides, espalhamento dinâmico da luz, flavonoides, fitofarmacêutica.

ABSTRACT

The fruits from ajuru (*Chrysobalanus icaco*), a plant species belonging to the Chrysobalanaceae family, are an interesting source of bioactive flavonoids. In spite of its functional properties, the utilization of fruits derivatives for innovative formulations is scarce. In this context, the present study presents a novel approach for utilization of two ajuru-whole fruit herbal extracts in order to achieve an optimal phytonano-emulsion. The colloidal system prepared with the oil from seeds (required hydrophilic-lipophilic balance value = 14, determined with a blend of polysorbate 80/sorbitan monooleate) and a flavonoid aqueous phase (0.19 ± 0.04 mg/mL of flavonoids) presented mean size diameter and polydispersity index around 150 nm and 0.250, respectively. These results were lower than the nano-emulsion prepared with deionized water, being the last also presenting a broader size distribution during the storage. The results highlights the importance of intrinsic bioactive compounds as endogenous phytocolloids stabilizers, contributing to the state of art of phytopharmaceutical nanobiotechnology and opening perspectives for utilization of fractions of extracts containing flavonoids with oils of the same therapeutic plant, therefore obtaining suitable prototypes that can be further accessed for their bioactive potential.

Key words: Fatty acids, colloids, dynamic light scattering.

DEDICATÓRIA

À Deus pelo dom da vida, por não deixar eu duvidar jamais da sua benevolência.

Aos meus pais pela dedicação e amor. Por acreditar no meu potencial e demonstrar todo o orgulho que sentem por mim.

Ao meu amado filho por suportar momentos de solidão enquanto eu estudava. Pelo apoio e força sempre conferida a mim na sua mais pura inocência.

Ao meu marido pelo apoio. Por suportar momentos de estresse e as vezes desespero.

À minha orientadora Professora Dr^a Raquel Rodrigues do Amaral, pela paciência e tranquilidade. Por não desistir mesmo em momentos de turbulência.

Ao meu Co- orientador Professor Dr Caio Pinho Fernandes, primeiramente por me acolher no laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica, por todos os momentos, principalmente naqueles em que eu queria desistir. Por toda a persistência, paciência e dedicação.

À minha amiga Thamara Ferraz, que foi tão lindamente parceira, me obrigando a continuar nessa lida, sempre com bons conselhos e palavras certas.

As minhas amigas Desirane Monique Yoko, pela ajuda manual e intelectual no desenrolar da pesquisa, pelas risadas e lanches diários.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Frutos de <i>Chrysobalanus icaco</i> L.	14
FIGURA 2 - Folhas e frutos de <i>Chrysobalanus icaco</i> L.	14
FIGURA 3 - Resumo gráfico do estudo desenvolvido para preparação da nano- emulsão a base de ajuru.	22
FIGURA 4 - Aspecto macroscópico dos sistemas dispersos preparados com óleo das sementes e polisorbato 80/monooleato de sorbitano.	27
FIGURA 5. Aspecto macroscópico das emulsões preparadas com óleo de ajurú e polisorbato 20/monooleato de sorbitano.	30
FIGURA 6. Nano- emulsões preparadas com: SOR1 – 2,5%, m/m de óleo das sementes; 2,5% m/m de polisorbato 80/monooleato de sorbitano e 95%, m/m de água deionizada (NE1) ou fase aquosa flavonoídica (NEF1); SOR1,5 - 2%, m/md e OS; 3% m/m de polisorbato 80/monooleato de sorbitano e 95%, m/m água deionizada (NE2) ou fase aquosa flavonoídica (NEF2); e SOR5 – 0,84%, m/md e OS; 4,16%,m/m de polisorbato 80/monooleato de sorbitano e 95%, m/m de água deionizada (NE3) ou FAF (NEF3).	31
FIGURA 7. Nano- emulsões preparadas com SOR5 – 0,84%, m/m de OS; 4,16%, m/m de polisorbato 80/monooleato de sorbitano e “i” 95%, m/m de água deionizada (NE3) no (A) dia da preparação e após (B) 1, (C) 5, (D) 7 dias de armazenamento; ou “ii” FAF (NEF3) no (F) dia da preparação e após (G) 1, (H) 5, (I) 7 dias de armazenamento. (E) e (J) representam a sobreposição dos gráficos de todas medidas dos dias 0-7 para NE3 e NEF3, respectivamente.	35

LISTA DE TABELAS

- TABELA 01.** Índice de cremagem dos sistemas dispersos preparados com óleo das sementes e polisorbato 80/monooleato de sorbitano. 28
- TABELA 02.** Índice de cremagem das emulsões preparadas com óleo de ajuru e polisorbato 20/monooleato de sorbitano. 29
- TABELA 03.** Resultados de tamanho de gotículas e índice de polidispersão para as nano- emulsões. Resultados expressos em função de média \pm desvio padrão. 33
- TABELA 04.** Variação de gotículas (%) das nano- emulsões expressas em função do tamanho de gotículas médio. 34

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	OBJETIVOS.....	12
2.1	OBJETIVO GERAL.....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
3.1	CHRYSOBALANUS ICACO L.....	13
3.1.1	GENERALIDADES.....	13
3.1.2	ASPECTOS QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS.....	15
3.2	NANO EMULSÕES.....	19
3.3	RUTINA.....	20
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

Frutas e hortaliças são descritas como essenciais para a saúde humana, uma vez que são fontes de nutrientes e constituintes nutritivos, como vitaminas, minerais e micronutrientes oriundos do metabolismo secundários de plantas (WHO, 2014).

Dentre as inúmeras espécies vegetais presentes e com potencial de exploração destaca-se o ajuru, também conhecido popularmente como guajiru, ou ainda abajerú, dentre outros nomes populares. Essa planta de porte arbustivo pode ser encontrada no Brasil e em outros países como a Colômbia e a Venezuela (Vargas 1998).

A espécie *Chrysobalanus icaco* L. é da família botânica Chrysobalanaceae e apresenta grande importância medicinal, com propriedades farmacológicas comprovadas e até mesmo associadas ao seu uso etnofarmacológico, como a sua ação hipoglicemiante. Devido às suas propriedades funcionais, o consumo desta fruta pode ser benéfico na promoção da saúde humana e até mesmo potencialmente útil na redução do risco de doenças crônicas. (Venancio et al,2017).

Novas tecnologias têm sido consideradas promissoras quando associadas aos produtos naturais, auxiliando no arsenal terapêutico e principalmente em práticas integradas de saúde. De acordo com Kim (2010), a nanotecnologia é uma área de pesquisa e desenvolvimento muito ampla e interdisciplinar, que se baseia nos mais diversificados tipos de materiais. Engloba desde metais semicondutores e biomateriais até polímeros em escala nanométrica, de modo a formar sistemas com características especiais. Na área farmacêutica, esses nanomateriais estão sendo principalmente associados ao desenvolvimento de novos veículos para a liberação de fármacos e moléculas bioativas em produtos funcionais, sendo que alguns já estão submetidos a ensaios clínicos ou já são aprovados para o uso humano pelo Food and Drug Administration (FDA).

Dentro desse contexto, observa-se um interesse crescente na busca por sistemas nanoestruturados à base de produtos naturais, dada a versatilidade e diversas vantagens que eles apresentam. Dentre os diversos tipos de nanoformulações, destacam-se as nano-emulsões, que são sistemas

nanodispersos de dois líquidos imiscíveis em que a fase dispersa (usualmente um óleo) possui gotículas de diâmetro compreendido entre 20-200 nm.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de uma nano-emulsão aquosa a partir da combinação do óleo das sementes e uma fração flavonoídica dos frutos do ajurú (*Chrysobalanus icaco* L.).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver as nano-emulsões;
- Caracterizar por espalhamento dinâmico da luz nano-emulsões otimizadas a base dos frutos de ajuru.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 *Chrysobalanus icaco* L.

3.1.1. Generalidades

A família Chrysobalanaceae tem ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, compreendendo espécies de hábito arbustivo e arbóreo (BRUMMITT, 1992; BARDON et al., 2016).

Segundo Dalhgren (1982), a espécie *Chrysobalanus icaco* apresenta a seguinte classificação botânica:

Classe: Chrysobalaneae;

Subclasse Dicotiledônea;

Ordem: Rosales;

Família: Chrysobalanaceae;

Gênero: *Chrysobalanus*;

Espécie: *Chrysobalanus icaco*

Popularmente conhecida como ajurú, é uma espécie de planta arbórea silvestre de porte médio, com altura máxima de 3 metros e ciclo de vida perenifólia. Seu tronco possui diâmetro de 15 cm a 30 cm e suas folhas são duras e ovais, de cor verde escuro brilhante na parte superior. Possui comprimento até 4 cm e largura de 3 a 6 cm (MATOS, 1999).

Seu fruto é arredondado (Figura 1), com largura de 2-5 cm, cor diversificada entre o branco-creme, a rosa e púrpura, por algumas vezes quase preto. Sua polpa é branca, um tanto esponjosa, às vezes adocicada, é insípida. É bastante adstringente quando não está bem maduro. Cada fruto possui apenas uma semente tipo noz (Figura 1), constituída por uma casca dura e uma amêndoa tenra (Vargas et al. 2000).

Figura 1: Frutos de *Chrysobalanus icaco* L.



Fonte: www.colecionandofrutas.org

Segundo Prance (1979), as flores de *C. icaco* nascem em pequenos ramos auxiliares, sendo pequenas e de cor verde e branca. São geralmente vistosas, reunidas em inflorescência, bracteadas, com tubo floral desenvolvido (hipanto), cinco sépalas, cinco pétalas, livres, cinco a numerosos estames, às vezes dispostos unilateralmente, com filetes muitas vezes evidentes, excertos e coloridos, ovário súpero, com estilete inserido na base, ou seja, ginobásico.

Figura 2: Folha e frutos de *Chrysobalanus icaco* L.



Fonte: Autoria própria.

C. icaco também é conhecido, além de ajurú, como guajurú (Santana et al. 2000), guajiru (Venancio et al. 2017), grajeru (De Oliveira Barbosa et al. 2013), abajeru (Vargas et al. 2010; De Oliveira Barbosa et al. 2013), agirú (Da Silva Port's et al. 2013) e cocoplum (do inglês) (Venancio et al. 2017).

Possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrada no Norte do Brasil (Amazonas, Amapá e Pará), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe) e Sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo) (Brasil, 2020). Essa espécie também pode ser encontrada em outros países, desde o sul dos Estados Unidos até Equador e Venezuela, incluindo as Antilhas (BRITO et al., 2007).

Segundo a flora do Brasil:

Distribuição

Distribuição Geográfica

Ocorrências confirmadas:

Norte (Amazonas, Amapá, Pará)

Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe)

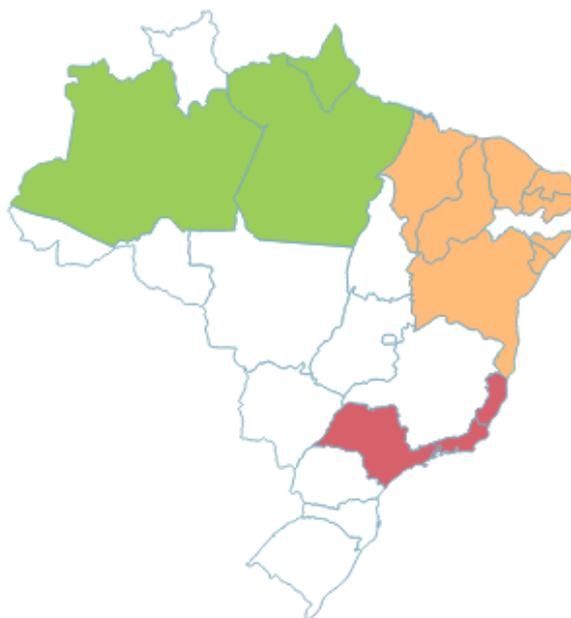
Sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo)

Domínios Fitogeográficos

Amazônia, Mata Atlântica

Tipo de Vegetação

Restinga



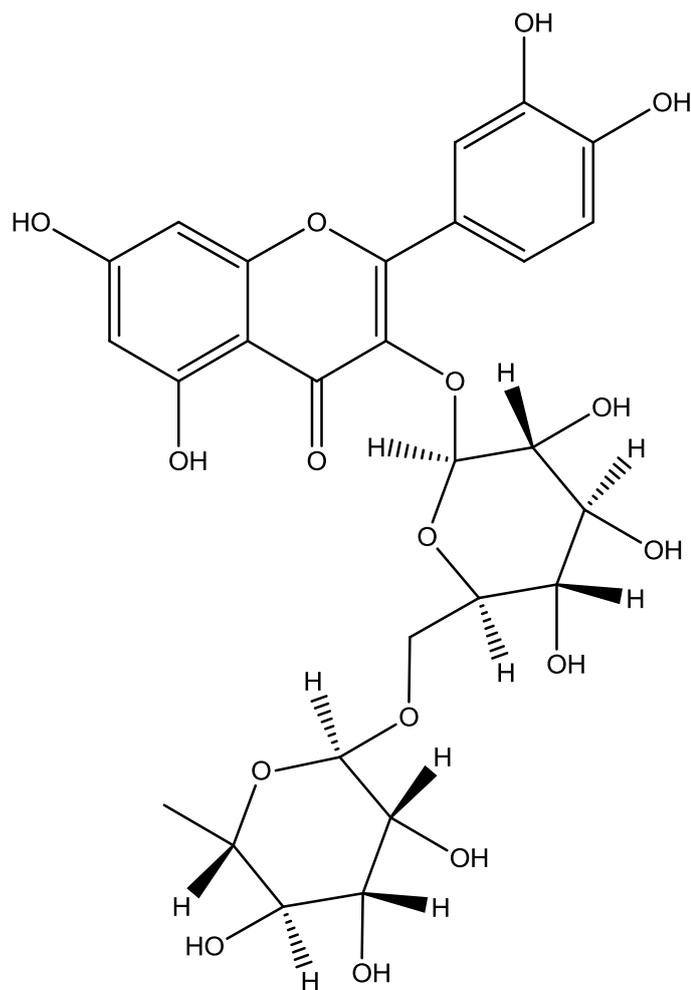
O ajurú possui alta capacidade de adaptação às condições ambientais, como resistência à salinidade e a níveis baixos de umidade. Também resiste em locais onde outras plantas não suportariam tamanho estresse hídrico, ao fogo e a geadas moderadas (Vargas 1998). Nesse contexto, ressalta-se o fato de que ocorre em domínios fitogeográficos tão distintos, como a Amazônia e a Mata Atlântica. Salienta-se também a ocorrência dessa espécie em vegetação de restinga (Brasil, 2020).

3.1.2. Aspectos químicos e farmacológicos

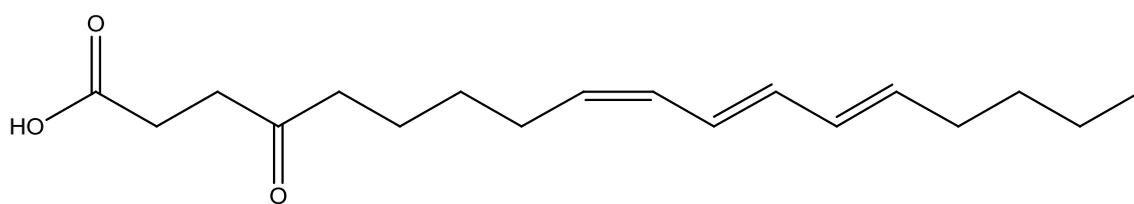
Diterpenos, incluindo agentes anti-HIV, foram relatados e isolados das raízes de ajurú (GUSTAFSON et al, 1991). Esteroides, triterpenos e flavonóides foram encontrados nas folhas da espécie (Vargas et al. 2010; Castilho e Kaplan 2011), enquanto nos frutos, a presença de flavonóis e flavonas foi sugerida (Vargas-Simón et al. 2000).

Vargas et al (2000), relatou a presença de ácido ascórbico e de alguns micronutrientes (minerais) como o cálcio e o ferro em quantidades consideráveis. O fracionamento cromatográfico dos extratos e das frações da partição do extrato metanólico possibilitou o isolamento de uma série homóloga de hidrocarbonetos de C₂₇ a C₃₃; de mistura de estigmasterol e sitosterol; de mistura estigmasterol, sitosterol e campesterol; de ácido betulínico; de ácido pomólico e de 7-metilkaempferol (CASTILHO et al, 2000). Investigações fitoquímicas de extratos etanólicos obtidos das folhas relataram a presença de miricetina (MENDEZ et al, 1995; FERNANDES et al, 2003; BARBOSA et al, 2006)

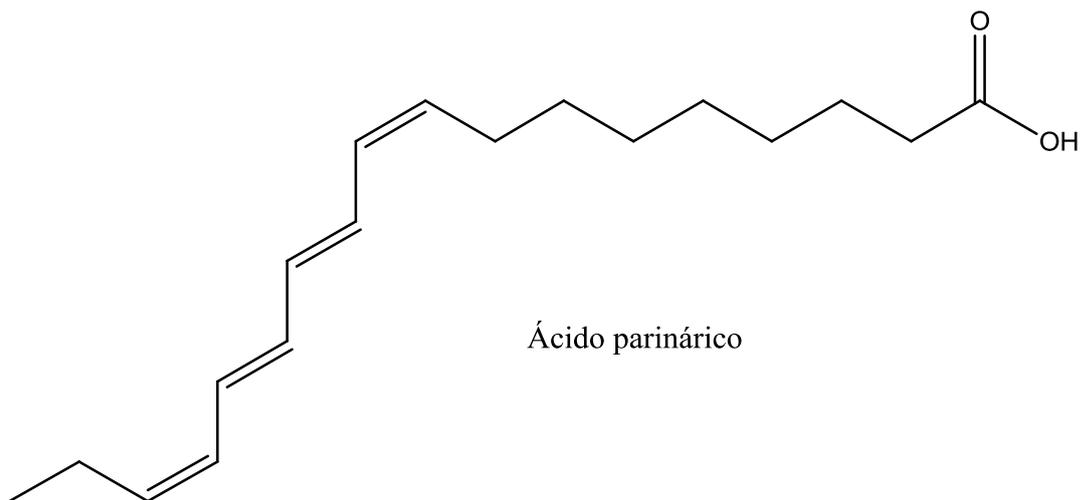
Segundo Barbosa e Peres (2006), também foi relatado a presença do flavonóide rutina (flavonol glicosídeo) nos frutos. Já no óleo das sementes, destacam-se os ácidos α -licânico e α -parinário, dentre outros ácidos graxos presentes (AGUIAR et al., 2017).



Rutina



Ácido licânico



Segundo Cavalcante (1991), as raízes, a casca, as folhas e as flores são adstringentes, por causa da quantidade de taninos presentes. São frequentemente utilizadas para combater problemas intestinais e hemorragias, sendo usadas na cura ou tratamento de doenças infecciosas. Já os frutos, são potencialmente ricos em antocianinas do tipo cianidina, delphinidina, peonidina e petunidina, sendo que a última é encontrada em maior abundância (BRITO et al., 2007).

Na Amazônia Oriental, as raízes e folhas de ajurú são utilizadas popularmente contra a diarreia aguda e leucorréia (PRESTA e PEREIRA, 1987; JARDIM et al, 2005). Segundo Bastos (1995), é utilizado na cultura popular para o tratamento de algumas patologias como cálculos renais, infecção urinária e diabetes.

No que se refere às atividades biológicas, as folhas de *C. icaco* possuem características analgésicas e anti-inflamatórias, sendo diversos estudos concentrados na sua potencialidade hipoglicemiante (CASTILHO et al, 2000; FRANCIS, 2003; AGUIAR, 2010). Extratos de ajurú foram considerados responsáveis pela redução da glicose e do HDL e de acordo com Barbosa et al (2007), também associados à efeitos de analgesia e ação antiinflamatória (CASTILHO et al, 2000), além de atividade antígeno tóxica (PRESTA et al, 2007).

O extrato aquoso de folhas foi considerado promissor na prevenção do acúmulo de gordura em camundongos, provavelmente devido ao alto teor de substâncias fenólicas (White et al. 2016b). Ele também inibiu o armazenamento

de gordura no fígado, adicionalmente ao ganho de peso, sendo responsável pela normalização dos níveis de insulina e de glicose do sangue em jejum (White et al. 2016a). Em ratos, o extrato das folhas não induziu sinais de letalidade, enquanto sua administração crônica foi capaz de induzir a redução da glicemia, sendo um sugestivo de potencial benefício para o tratamento de diabetes (De Oliveira Barbosa et al. 2013). Em outro estudo, foi observado que o extrato de folhas foi considerado potencialmente tóxico. Esse resultado foi considerado contrastante com outro efeito em que ele diminuiu o efeito letal induzido por SnCl₂ (Ferreira-Machado et al. 2004). Em células sanguíneas de ratos, o extrato aquoso da planta autenticadas botanicamente foi considerado atóxico, enquanto aquele de plantas de feiras populares foi considerado potencialmente genotóxico (Ferreira-Machado et al. 2013).

O extrato metanólico das folhas de *C. icaco* apresentou atividade antiangiogênica e efeito inibitório frente à síntese protéica de células HeLa; além de ter sido evidenciada a atividade hipoglicemiante dos extratos hexânico metanólico e frações em acetato de etila e butanol de *C. icaco* (CASTILHO et al, 2000). Além disso, o extrato metanólico das folhas apresentou atividade antimicrobiana e estudos toxicológicos do extrato aquoso de suas folhas evidenciaram ação antioxidante (FERNANDES et al, 2003; FERREIRA-MACHADO et al, 2004).

A atividade citotóxica das folhas foi associada ao ácido pomólico, substância extraída de suas folhas e capaz de eliminar 80% a 90% das células cancerígenas, inclusive em linhagens tumorais resistentes a múltiplas drogas (MDR). Além disso, extratos e frações apresentaram atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. (CASTILHO et al, 2000; GATTASS et al, 2003).

Algumas propriedades funcionais foram associadas aos frutos de ajuru. O pó dos frutos liofilizado e fitoquimicamente caracterizado em termos de antocianinas, carotenóides e fenólicos foi capaz de diminuir o dano ao DNA induzido por doxorubicina e a inflamação em tecido em modelo animal (ratos). Esses efeitos foram ao menos parcialmente explicados provavelmente devido à presença de polifenólicos (Venancio et al. 2018). Os frutos também exerceram atividade antioxidante em rins de ratos Wistar, protegendo o órgão do provável estresse oxidativo induzido pela doxorubicina (Venâncio et al. 2012). Efeitos

quimiopreventivos e antiinflamatórios foram observados e o extrato rico em antocianinas foi considerado potencialmente útil para prospecção de nutracêuticos que objetivem prevenção de doenças intestinais, uma vez que foi considerado citotóxico frente a linhagens celulares HT-29, além de reduzir marcadores de inflamação em células intestinais (Venancio et al. 2017).

As sementes, ricas em óleo e a polpa, expressam o alto potencial dos frutos de ajurú como uma matéria-prima natural que pode ser utilizada integralmente na indústria sob diferentes aspectos, especialmente para a produção de produtos funcionais, não apenas fitoterápicos, mas também cosméticos e nutracêuticos (Martínez et al. 2016).

3.2 Nano-emulsões

A nanotecnologia, ou a nanociência, envolve diferentes áreas do conhecimento e inovação que atualmente vem despertando muito interesse na comunidade científica. Na área de medicamentos, cosméticos e alimentos, especial atenção é dada aos nanocarreadores, especialmente pela sua capacidade de entrega de compostos bioativos. Esses podem estar isolados ou sob a forma de frações enriquecidas, extratos e óleos. Podem permitir, por exemplo, a potencialização de efeito e biodisponibilidade, além de favorecer os efeitos protetores frente à reações indesejáveis (BRASIL, 2011).

As nano- emulsões têm apresentado alto potencial quando comparadas as emulsões convencionais, por possuírem maior estabilidade frente à separação gravitacional e na agregação das gotículas, além de uma maior disponibilidade dos compostos encapsulados (PINHEIRO et al.; 2016). Nesse contexto, matérias-primas naturais ricas em metabólitos secundários bioativos podem ser consideradas fontes promissoras de diferentes componentes para a obtenção de protótipos de nano- emulsões. Essas teriam possíveis aplicações para diferentes segmentos que objetivem benefícios para a saúde humana dada a versatilidade desses nanofitoprodutos, como por exemplo, fitoterápicos e nutracêuticos.

Nanoemulsões são dispersões de dois líquidos imiscíveis estabilizados normalmente por meio de um ou mais tensoativos. Quando utilizados, esses componentes auxiliam na alta estabilidade física característica desse tipo de colóide, reduzindo a tensão interfacial ou aumentando a repulsão gota- gota.

(TADROS et al.; 2004; SOLANS et al., 2005). São principalmente preparadas com uma fase interna oleosa, sendo também chamadas de nano- emulsões aquosas.

As nano- emulsões são opticamente claras devido ao fraco espalhamento da luz pelas nanogotículas (<200 nm). O fato do tamanho das gotículas, apresentar diâmetro em escala nanométrica também é responsável pela alta estabilidade frente à separação pela gravidade, e pelo aspecto transparente/translúcido das nano-emulsões (McClements and Jafari 2018).

Segundo Solans et al (2005), o desenvolvimento das nano- emulsões pode ser dividido em métodos de alta e de baixa energia. São incluídos como métodos de alta energia a homogeneização por alta pressão, microfluidização e sonicação. Esse primeiro grupo necessita da utilização de equipamentos específicos, o que os tornam extremamente dispendiosos, especialmente quando se quer alcançar um baixo tamanho de gotícula. Já os métodos que empregam baixa aporte energia utilizam a própria energia química do sistema. Dentre eles, podemos citar a emulsificação espontânea e os métodos que envolvem inversão de fases com variação de temperatura (PIT, do inglês *phase inversion temperature method*) e com variação de composição (PIC, do inglês *phase inversion compositional method*). Os métodos que empregam baixa energia são considerados muito promissores devido ao baixo consumo e custo. Eles dependem principalmente das propriedades físico-químicas intrínsecas aos componentes da fase oleosa.

A maioria das nano- emulsões são do tipo óleo em água (McClements and Jafari 2018). No caso dos produtos naturais, usualmente o próprio óleo pode ser a fonte de substâncias bioativas (ex. óleos voláteis, oleoresinas). Em alguns casos um óleo inerte pode ser utilizado para dispersar substâncias de polaridade moderada (ex. rutina) (Kamel and Basha 2013). No entanto, dada a complexidade de matrizes naturais, é de se esperar que os produtos naturais presentes em uma nanoemulsão podem estar presentes não apenas na fase interna, mas também na interface ou na fase externa do coloide (Zorzi et al. 2015).

3.3. Rutina

Os flavonóides, por apresentarem uma grande diversidade de atividades biológicas benéficas para o ser humano têm sido extensamente pesquisados. Dentre eles se destaca a rutina, que pertencente à subclasse dos flavonóis e que tem sido intensamente pesquisada devido ao seu potencial biológico (PEDRIALI, 2005; CHUA, 2013). Apresenta ampla distribuição no reino vegetal e possui diversas atividades biológicas relatadas, incluindo efeito anticarcinogênico (Guerra, 2008). Além disso, possui efeitos no sistema nervoso central, analgésico, no sistema endócrino, sistema cardiovascular, gastrointestinal, respiratório, nos olhos, sistema reprodutivo, entre vários outros (GANESHPURKAR e SALUJA, 2017).

Este flavonóide é encontrado em várias fontes alimentares como cebola, uva, trigo serraceno, feijão vermelho, maçãs, tomates e bebidas como vinho tinto e chá preto (Thompson et al., 1999; Hollman et al., 1996). A rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo), é um glicosídeo de quercetina (CHUA, 2013), abundantemente encontrada e distribuída nas plantas, como em sementes de trigo, frutas e cascas de frutas, especialmente frutas cítricas (laranja, toranja, limão). Apresenta propriedades importantes na saúde humana, sendo importante salientar suas significativas propriedades de eliminação de oxidantes, como radical hidroxila, radical superóxido e radical peroxila, como mostrado por muitos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Se apresenta como um sólido cristalino amarelo com ponto de fusão de 195 °C. Sua solubilidade em água é de 0,13 g/L e logP 0,21 (GULLÓN et al, 2017) e a presença de uma porção polar e apolar pode significar uma possível localização diferenciada dentro de um sistema nanodisperso, ocasionando características interessantes em sistemas multicomponentes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Os frutos do ajurú (*Chrysobanus icaco* L.) foram coletados no Distrito de São Joaquim do Pacuí a 180 km da capital. (Coordenadas Geográfica - latitude: 0.782241 e longitude: -50.778122).

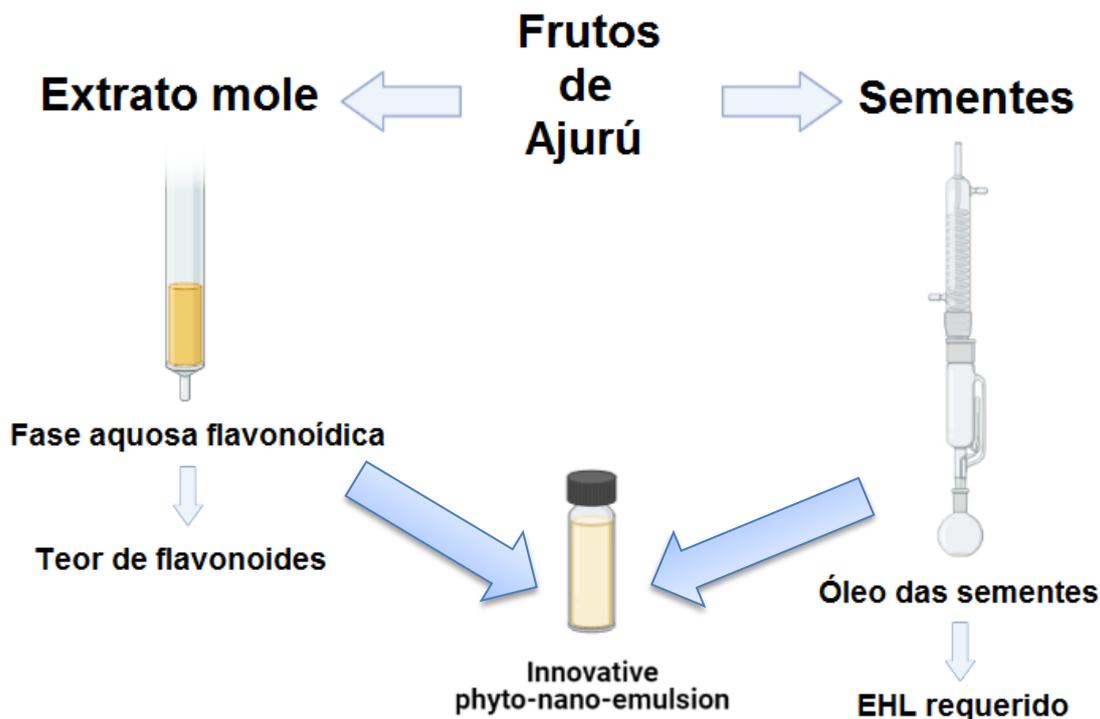
4.2 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E HERBORIZAÇÃO:

O material vegetal foi identificado pela botânica Dr. Rosângela Sarquis, herborizado e a exsicata encaminhada para depósito no Herbário da EMBRAPA-PA, sob o registro nº 200725.

4.3 INFRAESTRUTURA

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). Um resumo gráfico do estudo desenvolvido é apresentado na figura 3.

Figura 3: Resumo gráfico do estudo desenvolvido para preparação da nanoemulsão a base de ajurú.



4.4 OBTENÇÃO DA FASE AQUOSA FLAVONOÍDICA

4.4.1 EXTRATO MOLE

Foram pesados 1.108,81g dos frutos inteiros e em seguida foram adicionados 2 L de etanol:água (96:4, v/v) (proporção 1/10). Foi realizada extração dinâmica em béquer de vidro utilizando-se um agitador mecânico da marca Fisatom (Modelo 713) a uma velocidade de 100 rpm pelo período de 24h à temperatura ambiente. Em seguida, o material sólido foi separado por filtração e as sementes (292,29 g) foram separadas manualmente, lavadas com água destilada e armazenadas sob refrigeração para posterior extração do óleo. O extrato foi filtrado e o solvente removido por pressão reduzida utilizando-se um evaporador rotatório, gerando-se o extrato mole (EM) para etapa posterior de obtenção da fase aquosa flavonoídica.

4.4.2. FASE AQUOSA FLAVONOÍDICA

O EM foi resuspendido em água e submetido a fracionamento em coluna de vidro empacotada com Amberlite MB3-MIXED-2[®]. Foi realizada eluição com gradiente de água deionizada → etanol:água (96:4, v/v). Essa última fração foi

evaporada sob pressão reduzida em evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se a fase aquosa flavonoídica (FAF). Denominou-se dessa forma, pois foi coletado a fração aquosa e evaporou-se o álcool e a água foi resolubilizada.

4.4.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES

A quantificação dos flavonóides presentes na e aquosa flavonoídica foi realizada através da construção de uma curva de calibração com padrão externo. Diferentes concentrações de uma solução mãe de rutina padrão (Sigma-Aldrich, St Louis) em metanol tiveram, previamente à leitura espectrofotométrica, a adição de uma solução metanólica de AlCl_3 (2%, w/v). Após 30 min, as absorvâncias foram medidas em 421 nm utilizando-se uma cubeta de quartzo. Alíquota da fase aquosa flavonoídica foi adicionada em um balão volumétrico e também foi adicionada alíquota de solução metanólica de AlCl_3 (2%, w/v), sendo o volume final ajustado com metanol. Após 30 min, a absorvância foi medida em 421 nm e a concentração de flavonóides totais (expressos em equivalentes de rutina) na FAF foram determinados por regressão linear.

4.5 OBTENÇÃO DO ÓLEO DAS SEMENTES

As sementes do fruto foram trituradas até a obtenção de um pó. Em seguida, foram pesados 90 g e transferidos para o aparelho extrator de Soxhlet, coberto com algodão desengordurado. Foi transferido *n*-hexano para o extrator, o suficiente para três sifonagens e em seguida encaixado o condensador em refluxo. O processo extrativo foi realizado por 4 horas. Após resfriamento, o solvente foi removido sob pressão reduzida utilizando-se um evaporador rotatório e o óleo das sementes (OS) foi pesado (19,069 g), sendo o percentual calculado em relação à massa total de sementes.

4.5.1 DETERMINAÇÃO DO EQUILÍBRIO HIDRÓFILO-LIPÓFILO REQUERIDO DO ÓLEO DAS SEMENTES

Foram preparados sistemas dispersos contendo proporções variáveis de polisorbato 80 (EHL 8-15) ou polisorbato 20 (8-16,7) e monoleato de sorbitano. O EHL resultante de cada mistura de tensoativo foi determinado com base na fórmula a seguir:

$$EHL_m = (EHL_A \times m_A + EHL_B \times m_B) / (m_A + m_B)$$

Onde:

EHL_m : é o valor de EHL resultante da mistura de dois tensoativos;

EHL_A é o valor de EHL do tensoativo mais hidrofílico;

m_A : é a massa do tensoativo mais hidrofílico;

EHL_B : é o valor de EHL do tensoativo mais hidrofóbico;

m_B : é a massa do tensoativo mais hidrofóbico;

O óleo das sementes, tensoativos não iônicos e a água deionizada foram vigorosamente agitados em homogenizador do tipo vortex. O EHL_r foi determinado com base nas características dos sistemas dispersos gerados, sendo correspondente ao valor do EHL do (s) tensoativo (s) capaz (es) de gerar aquele mais estável. Foram avaliadas a formação de gotículas, opacidade, separação de fases e ainda a formação de cremagem, segundo a fórmula:

$$IC = ACC/ATC$$

Onde:

IC: é o índice de cremagem;

ACC: Altura da camada de cremagem;

ATC: Altura total da emulsão.

4.6. Desenvolvimento da nano- emulsão

4.6.1. Método de nano- emulsificação

As nano- emulsões foram preparadas por método de baixo aporte de energia, sem uso de aquecimento e sem uso de solventes orgânicos. Previamente à nano- emulsificação, a fase orgânica foi preparada pela agitação em homogenizador do tipo vortex do OS com a mistura de tensoativos não iônicos selecionado na etapa de determinação do EHLr. A fase aquosa foi adicionada gota a gota sob agitação, sendo fixada em 95% (m/m).

4.6.2. Design experimental

Diferentes valores de relação-tensoativo-óleo ($ROT = m_t / m_o$) foram utilizadas através do incremento da quantidade de tensoativos (EHLr). Todas as nano- emulsões foram preparadas com água deionizada (NEX) ou FAF (NEFX) para comparação na geração e estabilização das nano-emulsões.

4.6.3 Espalhamento Dinâmico da Luz

As nanoemulsões foram analisadas pela técnica de espalhamento dinâmico da luz utilizando-se um Zetasizer NanoZS (Malvern, United Kingdom). A distribuição do tamanho de gotícula foi expressa em termos de intensidade e índice de polidispersão (IPd). O equipamento é dotado de uma fonte de laser “vermelho” (10 mW, $\lambda = 632.8$ nm) e as amostras foram medidas sob um ângulo de espalhamento de 173° . Os resultados foram expressos em função de média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O teor de flavonóides na fase aquosa flavonoídica foi $0,19 \pm 0,04$ mg/mL (expressos em equivalentes de rutina). Algumas agliconas de flavonóides, como a miricetina e a quercetina, foram encontradas no extrato metanólico hidrolisado de folhas de ajurú (Da Silva Port's et al. 2013). Barbosa e colaboradores (2006) também encontraram rutina nas folhas dessa espécie. Comparados com outros órgãos vegetais, como folhas, poucos estudos foram encontrados relacionados aos metabólitos secundários dos frutos de ajurú. Isso é especialmente importante de se salientar, quando, se considera o fato de que a própria planta é pouco investigada, apesar de seu grande potencial fitoterápico e nutracêutico. Apesar do fator de que o glicosídeo rutina foi previamente descrito nas folhas, ele foi utilizado na análise espectrofotométrica neste estudo, uma vez que permitiu uma estimativa de flavonóides totais da fase aquosa flavonoídica. Além disso, essa subclasse de flavonóides é considerada potencialmente presente em frutos de ajurú (Vargas-Simón et al. 2000), tendo sido considerada satisfatória para os objetivos propostos.

Após a extração por Soxhlet, o rendimento do OS foi 21.19 % (m/m). Em seguida foi realizada a determinação do valor de EHLr. No preparo dos sistemas dispersos foram utilizados os tensoativos polisorbato 80 e polisorbato 20 como tensoativos mais hidrofílicos e o monooleato de sorbitano como tensoativo mais lipofílico. A figura 4 mostra as características macroscópicas daquelas preparadas com polisorbato 80 e monooleato de sorbitano. Alguns apresentaram a camada superior relacionada à cremagem com aspecto amarelado mais pronunciado, provavelmente devido a gotículas de óleo. Por outro lado, outras apresentaram a porção inferior com tendência à formação de uma camada mais transparente. Ambos os fenômenos sugerem uma tendência a desestabilização. Índices de cremagem variando entre 0,15 – 0,4 (tabela 1) foram observados e a análise macroscópica sugeriu que para esse par o EHL = 14 permitiu a obtenção do sistema disperso com melhores características.

Figura 4. Aspecto macroscópico dos sistemas dispersos preparados com óleo das sementes e polisorbato 80/monooleato de sorbitano.



Tabela 01. Índice de cremagem dos sistemas dispersos preparados com óleo das sementes e polisorbato 80/monooleato de sorbitano.

EHL	DIA 0	DIA 1	DIA 7
8	0,14	0,14	0,18
9	0,54	0,08	0,23
10	0,23	0,21	0,14
11	0,25	0,71	0,23
12	0,30	0,16	0,41
13	0,15	0,26	0,15
14	0,083	0,071	0,16
15	0.25	0,066	0,16

De forma geral, as emulsões preparadas com polisorbato 20/monooleato de sorbitano apresentaram moderados índices de cremagem (tabela 2) com maior indicativo de perda de estabilidade e separação de fases nos extremos da faixa avaliada. A parte inferior apresentou maior transparência de forma gradual ao longo da altura preenchida pelas emulsões, sugerindo a desestabilização dos sistemas (Figura 5). A análise macroscópica sugeriu que para esse par o EHL = 13 permitiu a obtenção do sistema disperso com melhores características.

As análises de IC durante após 7 dias sugeriram que dentre os melhores sistemas obtidas com cada par, houve vantagens do polisorbato 80/monooleato de sorbitano (EHL = 14) frente ao polisorbato 20/monooleato de sorbitano (EHL = 13). Além disso, o fato do polisorbato 20 (EHL = 16,7) ter sido potencialmente responsável por uma possível solubilização, evidenciada pela maior transparência na parte inferior dos sistemas de maior EHL preparados com esse par, pode ser um problema na preparação das nanoemulsões uma vez

que a Maturação de Ostwald via solubilização dos constituintes mais hidrofílicos em fases internas de óleos multicomponentes é o principal mecanismo de perda de estabilidade desse tipo de coloide.

A determinação do valor de EHLr como etapa prévia à preparação de nanoemulsões, através da seleção do sistema disperso mais estável dentre vários preparados em uma faixa ampla de EHL, tem se mostrado útil para métodos de baixo aporte de energia. Por exemplo, no caso das nano-emulsões a base do óleo de andiroba, o EHLr determinado foi em torno de 11 (Jesus et al., 2017).

Portanto, com bases nos resultados obtidos e para os propósitos desse trabalho, o EHLr do OS foi definido como 14 e o par de tensoativos não iônicos escolhido para desenvolvimento da nanoemulsão foi polisorbato 80/monooleato de sorbitano. No entanto, abre-se a perspectiva para que possam ser realizados trabalhos futuros com outros pares e/ou valores de EHL desses próximos a 14 para obtenção de novos sistemas coloidais otimizados de interesse em fitoterápicos e nutracêuticos.

Tabela 02. Índice de cremagem das emulsões preparadas com óleo de ajuru e polisorbato 20/monooleato de sorbitano.

EHL	DIA 0	DIA 1	DIA 07
8	0,38	0,071	0,30
9	0,3	0,2	0,16
10	0,23	0,23	0,25
11	0,23	0,13	0,23
12	0,38	0,2	0,28
13	0,21	0,13	0,23
14	0,30	0,2	0,25
15	0,33	0,21	0,33
16	0,23	0,26	0,23
16,7	0,076	0,26	0,38

Figura 5. Aspecto macroscópico das emulsões preparadas com óleo de ajurú e polisorbato 20/monooleato de sorbitano.



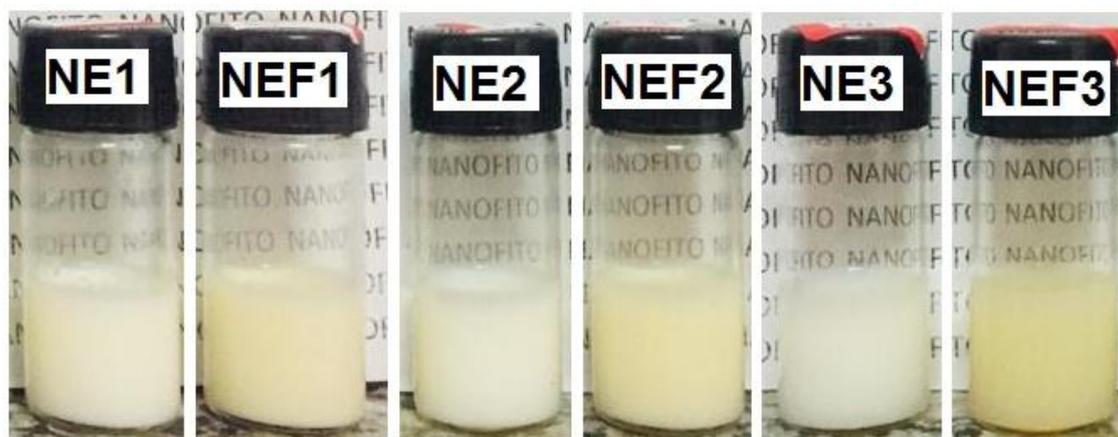
Diversas nano- emulsões a base de óleos de origem vegetal utilizam o próprio óleo como fonte de substâncias bioativas, como é o caso do óleo de copaíba (EHLr = 15) (Rodrigues et al. 2014) ou óleo de alecrim (EHLr = 16.7) (Fernandes 2013). A utilização do óleo componente da fase dispersa de uma nano- emulsão para incorporação de substâncias bioativas de um extrato também é uma estratégia que pode ser utilizada, mediante a determinação prévia do EHLr do óleo (Fernandes et al 2014).

No entanto, estudos que almejem a utilização do óleo extraído de uma espécie vegetal e a adição de suas próprias substâncias bioativas são escassos, sendo o objeto do presente estudo altamente inovador no âmbito da nanobiotecnologia fitofarmacêutica, especialmente se essas substâncias atuam como agentes facilitadores da geração e estabilização das nanogotículas, estando presentes até mesmo na fase aquosa.

A Figura 6 mostra as nano- emulsões obtidas pelo método de baixo aporte de energia após adição de água deionizada ou FAF sobre a fase orgânica contendo OS (EHLr = 14) e polisorbato 80/monooleato de sorbitano. A

avaliação macroscópica indicou que o aumento da relação tensoativo- óleo, induziu modificação da aparência dos sistemas de mais opaco para mais translúcido. As nano- emulsões de maior relação tensoativo- óleo também apresentaram aspecto mais fino e reflexo azulado, associado a esse tipo de sistema coloidal devido ao efeito Tyndall. A observação na mudança do padrão macroscópico em função da relação tensoativo- óleo está de acordo com a redução do tamanho de gotículas, uma vez que gotículas maiores promovem um maior espalhamento da luz (Zhang and McClements 2018). É de se esperar que o aumento do relação tensoativo- óleo gere a redução do tamanho das gotículas, uma vez que a maior concentração dessas moléculas anfifílicas reduz a tensão interfacial, contribuindo para a estabilização. Também permitem a formação de um filme interfacial ao redor das nanogotículas, o que também auxilia na estabilização da nano- emulsão. Portanto, as nano- emulsões com relação tensoativo- óleo = 5 preparada com água deionizada e fase aquosa flavonoídica foram escolhidas para serem caracterizadas por espalhamento dinâmico da luz e a comparação do efeito da fase aquosa na geração e estabilização das nanogotículas.

Figura 6. Nanoemulsões preparadas com: SOR1 – 2,5%, m/m de OS; 2,5% m/m de polisorbato 80/monooleato de sorbitano e 95%, m/m de água deionizada (NE1) ou fase aquosa flavonoídica (NEF1); SOR1,5 - 2%, m/md e OS; 3% m/m de polisorbato 80/monooleato de sorbitano e 95%, m/m água deionizada (NE2) ou fase aquosa flavonoídica (NEF2); e SOR5 – 0,84%, m/md e OS; 4,16%,m/m de polisorbato 80/monooleato de sorbitano e 95%, m/m de água deionizada (NE3) ou fase aquosa flavonoídica (NEF3).



A tabela 3 mostra que, no período analisado, a nano- emulsão preparada com a fase aquosa flavonoídica apresentou menor tamanho de gotícula e menor índice de polidispersão. Em relação a variação de gotículas (VG) durante o armazenamento (Tabela 4), a maior variação foi uma redução de tamanho de 6,64 % para NEF3 após 7 dias. Entretanto, deve ser ressaltado que essa variação corresponde a apenas 10 nm. Variações correspondendo a menos que 10% podem ser consideradas pequenas (Guttoff et al. 2015) alterações de tamanho e portanto, tanto a nanoemulsões preparada com água deionizada quanto com fase aquosa flavonoídica foram consideradas satisfatórias em relação a variação de gotícula, estando de acordo com o esperado para colóides estáveis.

A análise dos gráficos revela que ambas as nano- emulsões NE3 (Fig 7A-E) e NF3 (Fig 7F-J) apresentaram, de forma geral, a manutenção do perfil de distribuição de tamanho de gotículas. A presença de algumas gotículas em região de escala micrométrica pode ser atribuída à artefatos, uma vez que nenhuma grande variação de gotícula foi observada. Essa população de gotículas de maior tamanho provavelmente contribuiu para um maior índice de polidispersão medido em todas as análises (Tabela 3) A NE3 apresentou uma base da curva mais ampla, salientada na análise do dia da preparação e após 5 dias de armazenamento. Nessa data de armazenamento (Dia 5), foi observada a principal diferença de índice de polidispersão entre NE3 e NEF3 nesse estudo. A sobreposição dos gráficos mostra que a NEF3 (Fig7J) apresentou uma base da curva mais estreita, sugerindo o porquê dos menores valores de índice de polidispersão. Além disso, ela apresentou uma sobreposição mais acentuada, indicando que durante o armazenamento essa nano- emulsão teve uma maior tendência para a manutenção do seu perfil de distribuição de gotículas, sugerindo maior homogeneidade. Cabe salientar também que a NEF3 apresentou o menor tamanho, em torno de 50 nm, quando comparada à NE3.

Tabela 03. Resultados de tamanho de gotículas e índice de polidispersão para as nano- emulsões. Resultados expressos em função de média \pm desvio padrão.

	0 h		1 dias		5 dias		7 dias	
	Diâmetro (nm)	IPd						
NE3	195,8 \pm 0.4041	0,279 \pm 0.010	197,8 \pm 3.516	0,311 \pm 0.029	199,9 \pm 3.522	0,338 \pm 0.045	195,0 \pm 2,303	0,261 \pm 0.013
NEF3	156,7 \pm 2.910	0,256 \pm 0.030	151,3 \pm 0.7024	0,250 \pm 0.004	147,2 \pm 0.9713	0,248 \pm 0.006	146,3 \pm 0,6807	0,242 \pm 0.011

NE3 – nano- emulsão preparada com RTO5 – 0,84%, m/m de OS; 4,16% m/m de polisorbato 80/monooleato de sorbitano e 95%, m/m de água deionizada

NEF3 – nano- emulsão preparada com RTO5 – 0,84%, m/m de OS; 4,16% m/m de polisorbato 80/monooleato de sorbitano e 95%, m/m de fase aquosa flavonoídica.

IP-Índice de polidispersão

Tabela 04. Variação de gotículas (%) das nano- emulsões expressas em função do tamanho de gotículas médio.

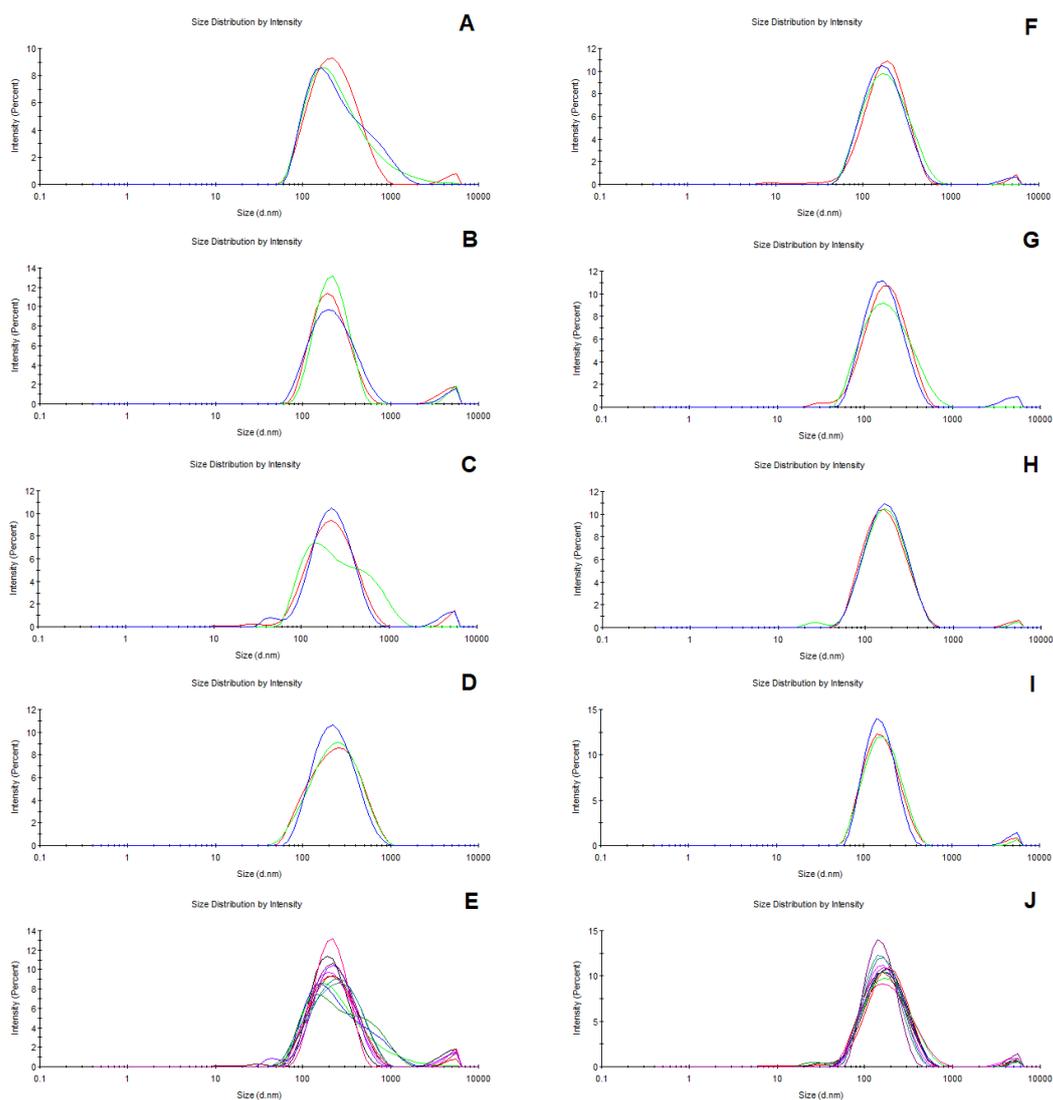
	VG_{0,1}	VG_{0,5}	VG_{0,7}	VG_{1,5}	VG_{1,7}	VG_{5,7}
NE3	1,02	2,09	- 0,4	1,06	- 1,42	- 2,45
NEF3	- 3,44	- 6,06	- 6,64	- 2,71	- 3,30	- 0,61

NE3 – nano- emulsão preparada com RTO5 – 0,84%, m/m de OS; 4,16% m/m de polisorbato 80/monooleate de sorbitano e 95%, m/m de água deionizada.

NEF3 – nano- emulsão preparada com RTO5 – 0,84%, m/m de OS; 4,16% m/m de polisorbato 80/monooleate de sorbitano e 95%, m/m de fase aquosa flavonoídica.

VG- Variação de gotícula.

Figura 7. Nano- emulsões preparadas com SOR5 – 0,84%, m/m de OS; 4,16%, m/m de polisorbato 80/monooleato de sorbitano e “i” 95%, m/m de água deionizada (NE3) no (A) dia da preparação e após (B) 1, (C) 5, (D) 7 dias de armazenamento; ou “ii” fase aquosa flavonoídica (NEF3) no (F) dia da preparação e após (G) 1, (H) 5, (I) 7 dias de armazenamento. (E) e (J) representam a sobreposição dos gráficos de todas medidas dos dias 0-7 para NE3 e NEF3, respectivamente.



Szymczyk and Taraba (2018) investigaram misturas de alcoóis conjuntamente com a rutina para verificar a influência na interface água-ar. Os resultados indicaram que misturas de rutina/etanol apresentaram boas propriedades de adsorção e foram atribuídas a elas propriedades tensoativas.

Neste contexto, a presença de uma porção aglicona (menos polar) e uma porção glicona (mais polar) na rutina pode ter contribuído para uma otimização nanoemulsificação da NEF3.

Portanto, através da utilização de uma abordagem inovadora de preparação de um nanofitoproduto e de conceitos teóricos fitocoloidais, foi possível incrementar a estabilidade da nano-emulsão de ajurú através de um possível efeito multi-mecanismo com os próprios constituintes bioativos da espécie e em consonância com possível e esperado papel preponderante de efeito co-estabilizante de alguns de seus metabólitos secundários.

O ajurú cujo potencial têm sido pouco aproveitado, apesar de ser notória a necessidade de incentivo a realização de esforços que permitam avanços na consolidação de seu aproveitamento, dados os promissores benefícios desse fruto funcional (Venancio et al. 2018). Portanto, o protótipo de nano-emulsão obtido nesse estudo abre a perspectiva de se combinar o óleo e também fração contendo flavonóides dessa espécie em um novo e elegante nanofitoproduto que pode ser utilizado para futuras aplicações fitoterapêuticas e nutracêuticas.

Salienta-se que a prova de conceito utilizada nesse estudo pode ser aplicada também a outras espécies vegetais ricas em metabólitos secundários diversos, que possam ser extraídas sob a forma de óleos e componentes bioativos passíveis de serem transformados em fases aquosas.

Desse modo, nano-emulsões com possíveis efeitos sinérgicos, estabilizadores, dentre outras vantagens que os sistemas coloidais oferecem podem em tese ser obtidas. Essa é uma perspectiva que abre muitas oportunidades no campo da nanobiotecnologia fitofarmacêutica, especialmente para plantas funcionais e na interface dos alimentos com fitoterápicos e que já possuam indícios de baixa toxicidade, com grande apelo para o rápido desenvolvimento de nanoformulações inovadoras.

6 CONCLUSÃO

Portanto, através da utilização de uma abordagem inovadora de preparação de um nanofitoproduto e de conceitos teóricos fitocoloidais, foi possível incrementar a estabilidade da nano- emulsão de Ajuru através de um efeito multimecanismo com os próprios constituintes bioativos da espécie.

O protótipo de nano- emulsão obtido nesse estudo abre a perspectiva de se combinar o óleo e também fração contendo flavonóides dessa espécie em um novo e elegante fitoproduto que pode ser utilizado para futuras aplicações fitoterapêuticas e nutracêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, T. M. **Caracterização química e física de folhas, frutos e sementes do bajuru (*Chrysobalanus icaco*, L.) e avaliação do chá dessas folhas em camundongos (Swiss) normais e diabéticos.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.

AGUIAR, M. et al. **Chemical Characterization of Cocoplum (*Chrysobalanus icaco*, L) Seed Oil and Seeds.** *Journal of Regulatory Science*. v.5. P.15-28, 2017.

ANDRADE, R. A. et al. **Caracterização morfológica e química de frutos de rambutan.** *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 30, n. 4 p. 958-963, 2008.

ARRUDA, R. J. S.; NOLASCO, F. Pomar matriz. Brasília, DF: Embrater, 1986

BARBOSA, A.P.O. et al. **Effect of the chronic treatment with aqueous extract oh *Chrysobalanus icaco* L(*Chrysobalanaceae*) in alloxan- induced diabetic rats.** In:XXII REUNIAO ANNUAL DA FEDERAÇÃO DA SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL,2007.Aguas de Lindóia. Anais da XXII região Anual da FeSBE. Aguas de Lindóia,2007.p.120.

BARBOSA, W.L.R, PERES A. **Detecção e caracterização por cromatografia liquida de alta eficiência de rutina em extratos de *Chrysobalanus icaco* L.** *XXII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, Cuiabá MT,2006

BARBOSA, W.L.R. et al. **Determination of myricetin derivatives in *Chrysobalanus icaco* L.(*Chrysobalanaceae*).** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, p. 333-337, Jul./Set..2006.

BARDON, L. et al. **Unraveling the biogeographical history of *Chrysobalanaceae* from plastid genomes.** *American journal of botany*, 1089 – 1102, 2016.

BASTOS, M.N.C. **A importancia das formações vegetais das restingas do manguezal para as comunidades pesqueiras.** Boletim do Museu paraense Dr Emilio Goeldi, ser. Antropologia, v.11, n.1, p.41-56, 1995.

Brasil 2020. *Chrysobalanus* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB16759>>. Acesso em: 02 Fev. 2020.

BLIGH, E.G.; DYER, W.L. A rapid method of lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917,1959. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica.** Dissertação apresenta à escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade

de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências área e concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

BRACA, A.; et al., **Triterpenes from *Licania licaniaea***. *Fitoterapia*. 72, 585 - 587, 2001.

BRACA, A.; LUNA, D.; MENDEZ, J. **Flavonoids from *Licania pétala* and *Licania licaniaea* (*Chrysobalanaceae*)**. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30, 271-273, 2002.

BRITO, ES et al. **Anthocyanins Present in selected Tropical Fruit: Acerola, Jambolão, Juçara, and Guajiru**. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, v.55,2007.

BRUMMITT, R.K. **Vascular Plants Families and Genera**. Royal Botanic Gardens, Kew, 1992.

CASTILHO, R.O. et al. **A survey of chemistry and biological activities of chrysobalanaceae**. *An acad. Bras. Ci*,2000.

CASTILHO, R.O.; KAPLAN, M.A.C. **PHYTOCHEMICAL STUDY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Chrysobalanus icaco***. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 47, No. três, July, 2011.

CASTILHO, R.O.; OLIVEIRA, RR; KAPLAN. M.A.C. **Licanolide, a new tri terpene lactone from *Licania tomentosa***. *Fitoterapia*, 76, 562-566, 2005.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Sed. Belém,CUJUP,1991.

CHAUDHURI, S. et al. **Lica michauxiiolic - A and-B Acids-twoent–Kaurene Diterpenoids from *Licania michauxii***. *Natural Product Letters*, 2002.

CHUA, L.S. **A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities**. *Journal of Ethnopharmacology*, V. 150. PP. 805–817,2013.

DONSI, F. et al. **Design of nanoemulsion- based entrega systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier**. *Journal of Biotechnology*, v. 159, 2012.

FERNANDES C., et al. **HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals**. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. V. 23. P. 108-114, 2013.

FERNANDES C., et al. **Development of an insecticidal nanoemulsion with *Manilkara subsericea* (Sapotaceae) extract.** *Journal of Nanobiotechnology*. P. 12-22, 2014.

FERNANDES, J. et al. **Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multi drug resistant and sensitive leukemiacell lines.** *Cancer Letters*, Irlanda, v. 190, 2003.

FERREIRA-MACHADO, S.C. et al. **Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves.** *Toxicology Letters*, Netherlands, v.151, p. 481-487, 2004.

FERREIRA-MACHADO, S.C. et al. **Antidiabetic and genotoxic effects on Wistar rats treated with aqueous extract from *Chrysobalanus icaco* L.** *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol.8 (1), pp. 52-57, três January, 2014.

FRANCIS, J. ***Chrysobalanus icaco*, L. coco-plum.** Forest Service of United. Estates Department of Agriculture (USDA), 2003. Acessado em 25 de outubro de 2010. Disponível em: <http://www.fs.fed.us/global/iitf/pdf/chrysobalanus%20icaco20L.pdf>.

GANESHPUKAR, A.; SALUJA, A.K. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*. V. 25, P.149–164, 2017.

GATTAS, C.R. et al. **Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxic city on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines.** *Cancer Letters*, Irlanda, 2003.

GULLÓN, B. et al. **Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability.** *Trends in Food Science & Technology*. V. 67. P. 220e235, 2017.

GUSTAFSON, K.R. et al. **HIV inhibitory natural products 3-diterpenes from Homalon thusacum on a thusand *Chrysobalanus icaco*.** *Tetrahedron*, v.47, n.26, 1991.

GUTTOFF, M. et al. **Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: Factors affecting particle size and stability.** *Food Chemistry*, v. 171, pp. 117-122,2015.

HOLLMAN, P. C. H.; HERTOOG, M. G. L.; KATAK, M. B. **Analysis and Walt effects of flavonoids.** *Food Chemistry, Amsterdam*, v. 57. n. 1, p. 43-46, 1996.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos.** 4^a ed. (1^a Edição digital), 2008. 1020 p.

JARDIM, M.A.G.; SILVA, J.C.Ç.; COSTA-NETO, S.V. **Populary fitoterapy and secondary metabolits in vegetable species of Algodual Island country of**

Maracanã, Pará State, Brazil preliminary results. *Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa, v. 86, n. 3, p. 117-118, 2005.*

JESUS, et al. **Preparation of a Nanoemulsion with *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) Oil by a Low-Energy/Solvent-Free Method and Evaluation of Its Preliminary Residual Larvicidal Activity.** *Journal Hindawi. Vol. 2017.*

KAMEL, R.; BASHA, M. **Preparation and in vitro evaluation of rutin nanostructured liquisolid delivery system.** *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University, v.51, PP. 262-272,2013.*

Kim BY., James T., Chan WC. *Nanomedicine. N Engl J Med. 2010.*

LACET et al. **Propriedades Farmacológicas do decocto da *Licania rígida Benth (Chrysobalanaceae)*, II Simpósio Nacional de Farmacologia e Química de Produtos Naturais, Fortaleza, 1983.**

LAKATOS, Eva Maria. **Metodologia do trabalho científico: procedimentos básicos, pesquisa bibliográfica, projeto e relatório, publicações e trabalhos científicos.**-4. Ed.- São Paulo: Atlas,1992.

MCCLEMENTS, D.J; JAFARI, S.M. **General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation.** Nanoemulsions. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00001-1>>. Elsevier,2018

MATOS, F.J.A. **Plantas da medicina popular do nordeste.** UFC edições, 1999.

MENDEZ J.;BILIA, A.R;MORELLI, I.**Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania pittieri*.** *Pharma Acta Helv 70: 223-226.*

FERNANDES J. et al . **Pentacyclic triterpenes from *Chrysobalanaceae* species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines.** *Cancer Lett 190: 165-169.*

Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físicos e Químicos para Análise de Alimentos.**V. 01. São Paulo, 2007.

PEDRIALI, C. A., Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas.Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PINHEIRO, et al. **In vitro behaviour of curcumin nanoemulsions stabilizes by biopolymer emulsifiers – Effect of interfacial composition.** *Food Hydrocolloids, v. 52, 2016.*

PRANCE, G.T. **The taxonomy and phytogeography of the Chrysobalanaceae of the Atlantic coast al forest of Brazil.** *Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v. 2, n. 5/6,p. 19-39, 1979.*

PRESTA, G.A; FONSECA A.S; BERNARD- FILHO M. **A Chrysobalanus icaco L. extract alters the plasmid topology and the effect of stannous chloride on the DNA of plamids.** *Revistabrasileira de farmacognosia, 2007.*

PRESTA, G.A. **Interferência do chá de abagerú (Chrysobalanus icaco Lin.) na glicemia de jejum de camundongos e indivíduos com diabetes mellitus - tipo II.** Rio de Janeiro, . Dissertação de Mestrado, Faculdade Nacional de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro,1986.

PRESTA, G.A.; PEREIRA, N.A. **Activity of abejeru (Chrysobanalus icaco Lin Chrysobalanaceae) in experimental study of hypogycemiant plants.** *Revista Brasileira de Farmácia, Rio de janeiro, n. 68, 1987.*

PORT'S, P.S. et al. **The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region.** *Food Research International. V. 53. PP. 875-881, 2013.*

RODRIGUES et al. **Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (Copaifera duckei) oleoresin.***Brazilian Journal of Pharmacognosy. Ed. Elsevier. V.24. p. 699-705,2014.*

Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Jimenez JP, Calixto FDS. **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH.** Comunicado Técnico Embrapa, 127: 1-4, 2007.

SANDUJA, R. et al. **Isolationand Crystal structureof 5-hydroxy-8dimethoxybezpyran-4-one fromCouepiaparaensis.** *Phytochemistry, v.2, 1982.*

SANTANA, L.M. et al. **Características de frutos e Morfológicas de Plantas de Guajurú (Chrysobalanus icaco L.) Desenvolvidas no litoral paraibano.** *Revista Ceres, V. 47. Pp187-187,2000.*

SILVA, E. E. **Frutíferas nativas do Nordeste:** qualidade fisiológica, morfologia e citogenética. 2006. 110 f.Dissertação (Mestrado em Agronomia)–Centro de CiênciasAgrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2006.

SOLANS, C. et al. Nano-emulsions. *Current Opinion in Collid and Interface Science, v.10, 2005.*

Szymczyk, K.; TARABA, A. **Thermodynamic study of quercetin and rutin mixtures with alcohols.** *Chemical Physics, V.505, pp.6-11,2018.*

TADROS, T. el al. Formation and stability of nano- emulsions. *Advances in collid and Interface Science, v.109,2004.*

THOMSON, C.; BLOCH, A.; HASLER, C. M., Position of the American Dietetic Association, Orlando, v. 99, n. 10, p. 1280- 1281, 1999.

TORRES, Elizabeth A.F.S et al. **Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [online]. 2000, vol.20, n.2, pp.145-150. ISSN 0101-2061.

VARGAS, S. G. F. et al. **Frutales tropicales de Tabasco.** 2. ed. Villahermosa: Centro de Investigación de Ciencias Biológicas, 2000.

VARGAS, S. G. F. et al. **Análisis fitoquímico preliminar del fruto de icaco (Chrysobalanus icaco L.): flavonoles y flavonas.** *Revista Chapingo Serie Horticultura* 6(2): 195-202, 2000.

VARGAS, S. G. F. et al. **Extraction of the essential oil of abajeru (Chrysobalanus icaco) using supercritical CO₂.** *The Journal of Supercritical Fluids.* V. 54, pp. 171-177, 2010.

VARGAS, S. G. et al. **icaco (Chrysobalanus icaco L.): análisis químico de flavonoides y propagación por estacas.** 1998.65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)–Colegio de Pos graduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo Edo.de México, 1998.

VENANCIO, V. P. et al. **Cocoplum (Chrysobalanus icaco L.) anthocyanin sexertanti-inflammatory activity in human colon cancer and non-malignant colon cells.** *Food & Function.* V. 8, pp.307, 2017.

VENANCIO, V. P. et al. **Cocoplum (Chrysobalanus icaco L.) decreases doxorubicin-induced DNA damage and downregulates Gadd45a, Il-1 β , and Tnf- α in vivo.** *Food Research International,* V. 105. Pp.996-1002, 2018.

WHITE, P.A.S. et al. **Aqueous extract of Chrysobalanus icaco leaves, in lower doses, prevent fat gain in obese high-fat fed mice.** *Journal of Ethnopharmacology.* V. 179. PP. 92-100, 2016.

WHITE, P.A.S. et al. **Chrysobalanus icaco L. Leaves Normalizes Insulin Sensitivity and Blood Glucose and Inhibits Weight Gain in High-Fat Diet-Induced Obese Mice.** *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD.* V. 19 (2). PP. 155–160, 2016.

WHO(2014). Global status report on non-communicable diseases 2014. Geneva: World Health Association.

ZHANG, Z.; MCCLEMENTS, D.J. Overview of Nanoemulsion Properties: Stability, Rheology, and Appearance. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00002-3>> 2018.

ZORZI, G.K. et al. **On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts.** *Revista Brasileira de Farmacognosia,* V. 25, PP. 426-436, 2015.



FORMULÁRIO DE SUBMISSÃO DA VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO

NOME DO ALUNO TÁSSIA REMIGIO VIEIRA	NÍVEL DO CURSO MESTRADO
NOME DO ORIENTADOR RAQUEL RODRIGUES DO AMARAL	DATA DA DEFESA 05/04/2021
TÍTULO DO TRABALHO "OBTENÇÃO DE UMA NANO- EMULSÃO Á BASE DE AJURÚ (CHRYSOBALANUS ICACO I.) UTILIZANDO O ÓLEO DAS SEMENTES E A FASE AQUOSA FLAVANOÍDICA OBTIDA DOS FRUTOS".	
<p>Eu, RAQUEL RODRIGUES DO AMARAL, orientador(a) do(a) aluno(a), TÁSSIA REMIGIO VIEIRA, deste PPGCS, encaminho os seguintes materiais:</p> <p>✓ (01) uma cópia impressa da versão final da dissertação do meu orientando;</p> <p>Aproveito, ainda, informar que o (a) referido (a) mestrando (a) obedeceu e respeitou as regras da ABNT em vigência e incorporou no texto de seu trabalho final as alterações sugeridas pela banca examinadora no dia da defesa, que ocorreu no dia 05 de ABRIL de 2021.</p> <p>Diante do exposto solicito a avaliação da Versão final da dissertação do meu orientando intitulada "OBTENÇÃO DE UMA NANO- EMULSÃO Á BASE DE AJURÚ (CHRYSOBALANUS ICACO I.) UTILIZANDO O ÓLEO DAS SEMENTES E A FASE AQUOSA FLAVANOÍDICA OBTIDA DOS FRUTOS".</p> <p>Na certeza de deliberação favorável, antecipo minhas considerações e agradecimentos.</p> <p>Atenciosamente, Macapá-AP, 02 de JULHO de 2021.</p> <p style="text-align: center;"></p> <hr/> <p style="text-align: center;">(Nome e assinatura do aluno)</p> <p style="text-align: center;"></p> <hr/> <p style="text-align: center;">(nome e assinatura do orientador)</p>	