UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Desenvolvimento de nanoemulsões de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) obtido por diferentes métodos de extração e avaliação de seus efeitos sobre a atividade de macrófagos RAW 264.7 *in vitro*.

SAMUEL SILVA MORAIS

Brasília - DF

2023

SAMUEL SILVA MORAIS

Desenvolvimento de nanoemulsões de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) obtido por diferentes métodos de extração e avaliação de seus efeitos sobre a atividade de macrófagos RAW 264.7 *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientadora: Prof.ª Drª. Graziella Anselmo Joanitti

Brasília - DF

SAMUEL SILVA MORAIS

Desenvolvimento de nanoemulsões de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) obtido por diferentes métodos de extração e avaliação de seus efeitos sobre a atividade de macrófagos RAW 264.7 *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora:	**Prof.ª Dra. Graziella Anselmo Joanitti** Universidade de Brasília, UnB.
Presidente da Banca:	**Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa** Universidade de Brasília, UnB.
Membro Interno:	**Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann** Universidade de Brasília, UnB.
Membro Externo:	**Prof. Dr. Brenno Noronha Matos** Universidade Euroamericana, Unieuro.
Membro Interno (Suplente):	**Prof.ª Dra. Mônica Pereira Garcia** Universidade de Brasília, UnB.

Agradecimentos

À minha família, que sempre me apoiou em todos os momentos, principalmente os mais difíceis. Te amo, mãe.

Ao meu grande amor Matheus, por ser meu parceiro inseparável e seu apoio incondicional. Obrigado por nunca me deixar desistir dos meus sonhos.

À minha irmã Deborah, por sempre puxar minha orelha e me acompanhar tarde da noite nos experimentos no laboratório. Do seu jeitinho, sempre me incentivando a seguir em frente.

À Ana Cristina, minha companheira para todos os momentos, e conforto frente às frustrações desde o momento em que nos tornamos amigos. Você me inspira e sem você, nada disso seria possível.

À Gabriela Fonseca, por tornar minha vida mais leve e colorida, mesmo distantes estamos sempre juntos.

À Isolda Monteiro, por me acompanhar ao longo de todas as noites em claro, alegrias e tristezas, problemas e mais problemas dos últimos anos. Seu apoio foi indescritível.

À Vitória, por me ajudar e ter paciência comigo, sempre estando presente nos momentos de dificuldade.

À Danielly, por todo o empenho e compromisso na colaboração dos meus experimentos. Sua companhia me trouxe calma durante os momentos mais nebulosos deste trabalho.

À minha orientadora Graziella Anselmo Joanitti, por sua confiança no meu potencial. Obrigado pela paciência, carinho e ensinamentos.

A todos os professores e colaboradores deste trabalho: Prof. Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas e seus alunos: Carlos Alexandre Rocha da Costa e Gilson Gustavo

na extração dos óleos de pequi, e caracterização dos índices de acidez e peroxidação. Prof. Dr. Valdir Florencio da Veiga Junior e sua aluna Milena, pela caracterização do perfil lipídico dos óleos. Ao Prof. Dr. Ivo Jose Curcino Vieira e sua aluna Thalya, pelas análises dos metabólitos presentes nos óleos. Prof. Dr. Jackson e sua aluna Vitória, pela caracterização dos óleos por RMN. Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa e seu aluno Atailson Oliveira da Silva, pela colaboração nos ensaios de titulação de pH das nanoemulsões. À Marina Mesquita Simões, pela sua colaboração nos ensaios de ELISA. Seu empenho e compromisso foram indispensáveis para a conclusão deste trabalho. Muito obrigado a todos.

Aos membros da banca: Prof. Dr. Breno Noronha Matos, Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann e Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa e Prof.ª Dra. Mônica Pereira Garcia.

A todos os membros do LCBNano. Sou muito grato pelo crescimento que tive em todas as reuniões, colaborações e confraternizações que tivemos. Obrigado pelo carinho e respeito.

Às agências de fomento FAPDF, CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro que me auxiliou durante a duração deste projeto.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer a mim mesmo. Ao Samuel de 17 anos que decidiu viver a vida e experimentar o que ela tem de bom. Obrigado por não desistir, mesmo quando parecia impossível.

Este trabalho é fruto de muito esforço e dedicação. Sem o apoio de todos vocês, não seria possível. Agradeço do fundo do meu coração.

Sumário

1. Introdução 14
1.1. Inflamação e tratamentos 14
1.2. Óleo de pequi 16
1.3. Nanotecnologia 18
2. Objetivos **21**
2.1. Geral 21
2.2. Específicos 21
3. Capítulo I **22**
1. Introdução **23**
2. Material e Métodos **25**
2.1. Materiais 25
2.2. Obtenção do óleo de pequi: 26
2.3. Caracterização do óleo de pequi 26
2.3.1. Índice de acidez e peroxidação 27
2.3.2. Perfil lipídico 27
2.3.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GS-MS) 27
2.3.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 27
2.4. Formulação das nanoemulsões: 28
2.5. Parâmetros físico-químicos das nanoemulsões: 28
2.5.1. Análise das nanoemulsões por *Dynamic light scattering* (DLS) 28
2.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) 28
2.5.3. Estabilidade das nanoemulsões ao longo do tempo 28
2.5.4. Estabilidade das nanoemulsões sob condições de estresse 28
2.5. Avaliação da citotoxicidade das nanoemulsões em células de macrófagos 29
2.7. Avaliação de efeitos das nanoemulsões à base de óleo de pequi em mediadores inflamatórios e pró-inflamatórios. 29
2.8. Avaliação morfológica dos macrófagos após tratamento com nanoemulsões à base de óleo de pequi e óleos livres. 30
2.9. Análises estatísticas 30
3. Resultados **30**
3.1. Caracterização do óleo de pequi obtido por meio de extração por solvente (OS), prensagem à frio (OPF) e fervura (OF) 30
3.1.1. Perfil lipídico das amostras de óleo de pequi 30
3.1.2. Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) 30

3.1.3. Análise de perfil de acidez e de peroxidação dos óleos de pequi 31
3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 31
3.3. Formulação das nanoemulsões à base de óleo de pequi 32
3.4. Aspectos macroscópicos das nanoemulsões à base de óleo de pequi 33
3.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) 33
3.6. Análise de estabilidade por DLS ao longo do tempo 34
3.7. Análise das nanoemulsões à base de óleo de pequi sob condições de estresse 36
3.7.1. Análise das nanoemulsões à base de óleo de pequi sob diluição seriada 36
3.7.2. Análise das nanoemulsões à base de óleo de pequi sob variação de pH 36
4. Análise da citotoxicidade das nanoemulsões à base de óleo de pequi em macrófagos *in vitro*. 37
4.1. Microscopia óptica após tratamento 38
4.2. Mapeamento de citocinas por ensaio de ELISA 41
5. Discussão 43
6. Conclusão 45
7. Referências 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Atuação de células do sistema imune e proteínas plasmáticas no processo inflamatório. 15
Figura 2. Árvore do pequi (*Caryocar brasiliense*) 17
Figura 3. Pequi (frutos) 17
Figura 4. Representação esquemática de nanoemulsões água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A). 19
Figura 5. Métodos de extração para obtenção do óleo de pequi. 20
Figura 6. Espectro ^{1}H NMR das amostras de óleo de pequi OS, OPF e OF em CDCl3 a 400 MHz. 32
Figura 7. Espectro $^{13}C\{^{1}H\}$ NMR das amostras de óleo de pequi OS, OPF e OF em CDCl3 a 100 MHz. 32
Figura 8. Alíquotas das nanoemulsões à base de óleo de pequi armazenadas a 25°C. 33
Figura 9. Nanoemulsões à base de óleo de pequi: NeS (A), NePF (B) e NeF (C). Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) 34
Figura 10. Avaliação da estabilidade por DLS e pH das nanoemulsões à base de óleo de pequi no período de 120 dias, armazenadas às temperaturas de 4 °C e 25°C. 35
Figura 11. Avaliação da estabilidade por DLS das nanoemulsões à base de óleo de pequi em diferentes fatores de diluição. 36
Figura 12. Avalição de estabilidade em diferentes índices de pH 37
Figura 13. Avaliação de viabilidade celular por MTT 38
Figura 14. Morfologia de macrófagos RAW 264.7 tratados com nanoemulsões à base de óleo de pequi observadas após 24h. 39
Figura 15. Morfologia de macrófagos RAW 264.7 tratados com óleo de pequi livre observadas após 24h. 40
Figura 16. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-12, e anti-inflamatória IL-10 em macrófagos RAW 264.7 tratados por 24h 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil lipídico de óleo de pequi obtido por meio de extração por solvente (OS), prensagem à frio (OPF) e fervura (OF). 30
Tabela 2. Metabólitos presentes no óleo de pequi extraído por solvente (OS), prensagem à frio (OPF) e fervura (OF). 31
Tabela 3. Índice de acidez e peroxidação dos óleos de pequi extraídos por solvente (OS), prensagem à frio (OPF) e fervura (OF). 31
Tabela 4. Características físico-químicas das nanoemulsões NBR, NeS, NePF e NeF após 1 dia de armazenamento a 4°C. 33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OS	Óleo de pequi extraído por solvente
OPF	Óleo de pequi extraído por prensagem à frio
OF	Óleo de pequi extraído por fervura
NBR	Nanogotícula sem óleo
NeS	Nanoemulsão à base de óleo de pequi (solvente)
NePF	Nanoemulsão à base de óleo de pequi (prensagem à frio)
NeF	Nanoemulsão à base de óleo de pequi (fervura)
PDI	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
mV	Milivolts
PZ	Potencial Zeta
nm	Nanômetros
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
RMN	Ressonância magnética nuclear
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
GC – MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DLS	Dynamic Light Scattering
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
AOCS	American Oil Chemists' Society
DH	Diâmetro hidrodinâmico
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
DMSO	Dimetilsulfóxido
AR	Artrite Reumatoide

Resumo:

A inflamação é um dos processos de defesa do corpo e ocorre em resposta a infecções causadas por microrganismos ou danos nos tecidos. O óleo de pequi extraído de *Caryocar brasiliense*, encontrado na região do Cerrado, é popularmente utilizado por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes devido à presença de ácidos graxos e carotenoides. A nanotecnologia serve como uma ferramenta para superar barreiras na administração de compostos hidrofóbicos. Este estudo teve como objetivo realizar o desenvolvimento de nanoemulsões de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) obtido por diferentes métodos de extração (prensagem a frio, solvente e fervura) e a avaliação de seus efeitos sobre a atividade de macrófagos RAW 264.7 *in vitro*. Os óleos de pequi foram avaliados com base em seu perfil lipídico, acidez e valores de peróxidos para garantir sua qualidade após os processos de extração. As nanoemulsões foram formuladas com óleo de pequi obtidos pelos métodos de extração por solvente (NeS), prensagem à frio (NePF) e fervura (NeF), lecitina de ovo (2:1 p/p) e estearato de polioxietileno 40 (2%) e dispersas em PBS por ultrasonicação em banho de gelo. As amostras foram avaliadas por *Dynamic light scattering* (DLS) por 120 dias a 4 °C e 25 °C para avaliar sua estabilidade, além de pH e condições de estresse (diluição seriada de 0 a 1/128 e variação de pH entre 3-11). Para os ensaios de citotoxicidade, macrófagos RAW 264.7 foram tratados com diferentes nanoemulsões por 24 horas e tiveram sua viabilidade analisada pelo ensaio MTT. A produção de citocinas de macrófagos tratados com as nanoformulações por 24 horas, e estimulados ou não por LPS (lipopolissacarídeo bacteriano), foram determinadas pelo ensaio de ELISA. Os óleos de pequi mantiveram níveis aceitáveis de acordo com os índices de acidez (mg $KOH \cdot g^{-1}$): OS = 4,59 OPF = 3,48 e OF = 1,1 e de peroxidação ($mEq \cdot kg^{-1}$): OS = 3,21 OPF = 2,87 e OF = 2,65. As nanoemulsões à base de óleo de pequi apresentaram diâmetro hidrodinâmico semelhante <100 nm, PDI <0,250, potencial zeta entre -1,5 e -2,5 mV, pH entre 6 e 7, e permaneceram estáveis durante o teste de diluição sem variação significativa. Os testes de variação de pH mostraram mudanças no potencial zeta no pH mais ácido, as nanoemulsões permaneceram neutras (3) perto de 0 mV, e no pH mais básico (11) ficaram negativas (aproximadamente -10 a -15 mV). O ensaio de MTT indicou que a concentração de 360 μg/mL de diferentes nanoemulsões e óleos livres não apresentou citotoxicidade significativa às células após 24 horas, com viabilidade celular >80%. Nos ensaios de ELISA, para o grupo IL-10 estimulados com LPS, todos os tratamentos apresentaram produção da citocina, porém sem diferença significativa comparada ao controle PBS. No grupo IL-6 com LPS, apenas os tratamentos NePF, OF e NeF apresentaram produção, porém a ausência de produção de IL-6 no controle PBS indica necessidade de um novo ensaio para comparação dos tratamentos. No grupo IL-12 com LPS, os tratamentos NeF e NBR apresentaram baixa produção da citocina IL-12, sugestivo de possível modulação anti-inflamatória presente nesses tratamentos. As nanoemulsões formuladas a partir de óleo de pequi obtido por diferentes métodos de extração permaneceram estáveis, e os métodos de extração não levaram a diferenças entre as amostras nos parâmetros avaliados. Os resultados de citotoxicidade e os dados preliminares dos ensaios de ELISA sugerem potencial na utilização das nanoemulsões à base de óleo de pequi em processos inflamatórios, sendo necessários estudos posteriores para avaliação pormenorizada desta ação.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense*, nanoemulsão, anti-inflamatório, macrófago, pequi, óleo

Abstract

Inflammation is one of the body's defense mechanisms and occurs in response to infections caused by microorganisms or tissue damage. Pequi oil extracted from *Caryocar brasiliense*, found in the Cerrado region, is popularly used for its anti-inflammatory and antioxidant properties due to the presence of fatty acids and carotenoids. Nanotechnology serves as a tool to overcome barriers in the administration of hydrophobic compounds. This study aimed to develop nanoemulsions of pequi oil (*Caryocar brasiliense*) obtained by different extraction methods (cold pressing, solvent, and boiling) and to evaluate their effects on the activity of RAW 264.7 macrophages in vitro. Pequi oils were evaluated based on their lipid profile, acidity, and peroxide values to ensure their quality after the extraction processes. Nanoemulsions were formulated with pequi oil obtained by solvent extraction (NeS), cold pressing (NePF), and boiling (NeF), egg lecithin (2:1 w/w) and polyoxyethylene stearate 40 (2%) and dispersed in PBS by ultrasonication in a ice bath. The samples were evaluated by Dynamic light scattering (DLS) for 120 days at 4 °C and 25 °C to evaluate their stability, as well as pH and stress conditions (serial dilution from 0 to 1/128 and pH variation between 3-11). For cytotoxicity assays, RAW 264.7 macrophages were treated with different nanoemulsions for 24 hours and their viability was analyzed by the MTT assay. The production of cytokines from macrophages treated with the nanoformulations for 24 hours, and stimulated or not by LPS (bacterial lipopolysaccharide), were determined by the ELISA assay. Pequi oils maintained acceptable levels according to the acidity indices (mg $KOH \cdot g^{-1}$): OS = 4.59 OPF = 3.48 and OF = 1.1 and peroxidation ($mEq \cdot kg^{-1}$): OS = 3.21 OPF = 2.87 and OF = 2.65. Pequi oil-based nanoemulsions showed similar hydrodynamic diameter <100 nm, PDI <0.250, zeta potential between -1.5 and -2.5 mV, pH between 6 and 7, and remained stable during the dilution test without significant variation. The pH variation tests showed changes in the zeta potential at the most acidic pH, the nanoemulsions remained neutral (3) near 0 mV, and at the most basic pH (11) they became negative (approximately -10 to -15 mV). The MTT assay indicated that the concentration of 360 µg/mL of different nanoemulsions and free oils did not show significant cytotoxicity to cells after 24 hours, with cell viability >80%. In the ELISA assays, for the IL-10 group stimulated with LPS, all treatments showed cytokine production, but without significant difference compared to the PBS control. In the IL-6 group with LPS, only the NePF, OF, and NeF treatments showed production, but the absence of IL-6 production in the PBS control indicates the need for a new assay for comparison of the treatments. In the IL-12 group with LPS, the NeF and NBR treatments showed low production of the cytokine IL-12, suggesting possible anti-inflammatory modulation present in these treatments. Nanoemulsions formulated from pequi oil obtained by different extraction methods remained stable, and the extraction methods did not lead to differences between the samples in the parameters evaluated. Cytotoxicity results and preliminary data from ELISA assays suggest potential for the use of pequi oil-based nanoemulsions in inflammatory processes, further studies being necessary for detailed evaluation of this action.

Keywords: *Caryocar brasiliense*, nanoemulsion, anti-inflammatory, macrophage, pequi, oil

1. Introdução

1.1. Inflamação e tratamentos

A inflamação é considerada como um dos processos fisiológicos mais antigos reportados na literatura com a descrição dos cinco sinais cardinais: edema, calor, rubor, dor e perda de função (1). Como mecanismo de defesa do organismo à uma infecção microbiana ou dano tecidual, o processo inflamatório pode apresentar dois estágios: a inflamação aguda e a inflamação crônica (1–3). Durante a fase aguda, há o recrutamento e direcionamento de células de defesa como leucócitos e proteínas plasmáticas até o sítio alvo com objetivo de eliminar o patógeno ou células danificadas (1,4). Contudo, uma resposta exagerada do organismo ou um estímulo persistente pode levar a inflamação à cronicidade. Nesta situação há a produção anormal de moléculas pró-inflamatórias, como citocinas e eicosanóides, e recrutamento contínuo de células imunitárias. Esse fenômeno pode causar danos teciduais irreversíveis associado a diversas patologias como artrose, diabetes, câncer, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, entre outras (1,3).

Durante o processo inflamatório, células do sistema imunológico como macrófagos, neutrófilos, células T e células B (Figura 1) estão presentes em ambos os estágios agudo e crônico da inflamação (5). As interleucinas também desempenham papel importante dentro do processo inflamatório, atuando como ativadores (IL-6, IL-12) ou inibidores (IL-10) de atividade inflamatória (5,6).

A incidência global de doenças com perfil inflamatório representa um desafio significativo para a saúde pública em todo o mundo. Algumas doenças de ação inflamatória crônica como a artrite reumatoide, a aterosclerose, as doenças autoimunes e o câncer, afetam milhões de pessoas. No Brasil, essas doenças apresentam também uma alta prevalência, impactando diretamente a saúde da população (7, 8, 9).

A artrite reumatoide (AR), por exemplo, afeta cerca entre 0,5 e 1% da população mundial, com maior incidência entre o sexo feminino na faixa de 40-50 anos (10). Esta doença inflamatória autoimune age principalmente em articulações periféricas e sinoviais, provocando a gradual destruição da cartilagem associada e fragilização do tecido ósseo (61). Nessas condições, e especialmente nos casos sistêmicos da doença, pode haver a redução da expectativa de vida do paciente, com perda de função de membros e mobilidade.

Outro aspecto relacionado à AR, é o impacto significativo nos serviços de saúde públicos e privados, com a sobrecarga no atendimento e consumo de recursos consideráveis. A literatura indica que a melhor fase para o tratamento e prevenção do dano tecidual é no primeiro ano desde o início dos sintomas (62). No entanto, muitas vezes o tratamento só inicia em fases adiantadas da evolução da doença, onde já está instalado comprometimento de função de órgãos e tecidos (63). Como recomendação para gestão dessas doenças inflamatórias de natureza crônica, os Conselhos de Saúde requerem a aplicação de estratégias eficazes para garantir o acesso a tratamentos adequados, a fim de reduzir o impacto socioeconômico e melhorar a qualidade de vida dos afetados (64). Neste aspecto, a utilização de alternativas para as medicações já existentes em virtude do tratamento prolongado e abordagens profiláticas podem impactar positivamente a vida do usuário dos serviços de saúde.

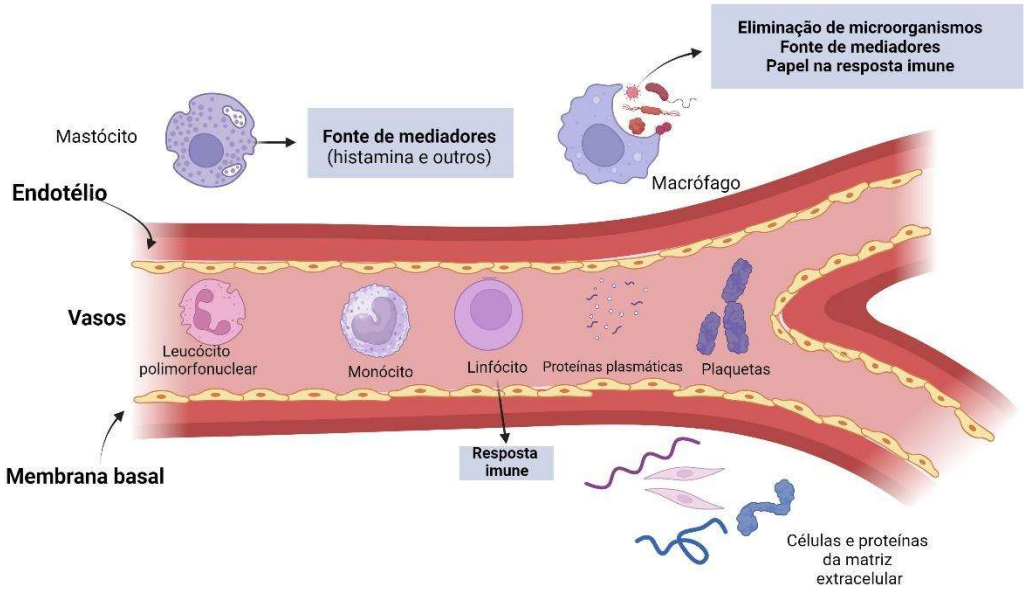


Figura 1. Atuação de células do sistema imunitário e proteínas plasmáticas no processo inflamatório. Imagem elaborada pelo autor com BioRender.

Historicamente, a descoberta do salicilato e do ácido acetilsalicílico no século XIX, marcou o ponto crucial para o crescimento do desenvolvimento de medicamentos para aliviar os efeitos da inflamação (4). Atualmente, a classe de fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) é considerada como uma das mais comercializadas e usadas no mundo e mais utilizadas em casos de dor e inflamação de natureza aguda e

crônica (4,11). O mecanismo de ação dos AINEs visa impedir a ativação do processo inflamatório atuando como inibidores da via de ciclooxigenase responsável pela produção de eicosanoides (12). Contudo, a administração prolongada desses fármacos está associada ao surgimento de diversos efeitos adversos e complicações gastrointestinais, hepática, renal, cerebral, pulmonar, entre outros (4,13).

No Brasil, o nos anos de 2014 a 2017 o mercado dos AINEs movimentou cerca de 5 bilhões de reais anualmente (14). Estes números estão atrelados ao hábito de automedicação e baixo custo dos mesmos (15), o que aumenta os riscos de efeitos colaterais ou intoxicação por dosagens excessivas ou interação medicamentosa (16).

Diante desse contexto, a busca por alternativas eficientes e mais seguras se torna uma necessidade. O potencial efeito anti-inflamatório de produtos naturais e compostos bioativos de origem vegetal como carotenoides, ácidos graxos, terpenóides, entre outros, já foi reportado na literatura e tem sido cada vez mais investigado (17,18). A biodiversidade brasileira oferece um amplo painel de espécies vegetais ricas em compostos bioativos (19). Dentre as diferentes partes da planta, os óleos vegetais são cada vez mais estudados por apresentarem propriedades biológicas tais como efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (20,21). Diante das limitações apresentadas, novos tratamentos baseados em óleos vegetais, com ênfase na biodiversidade brasileira, têm sido explorados, como o óleo de pequi.

1.2. Óleo de pequi

Na cultura popular, o *Caryocar brasiliense* ou pequi (Figura 2) é utilizado para tratar doenças respiratórias, bem como doenças inflamatórias, dores musculares e artrite crônica (22). A introdução do fruto ou óleo do pequi na dieta pode ser feita através de comidas populares sendo consumido com outros alimentos como arroz, feijão ou carne, além da comercialização de outros produtos como conservas do fruto do pequi em feiras locais ou outros municípios (TEIXEIRA et al., 2017). Proveniente do bioma Cerrado, pode ser encontrado nas regiões do Goiás, Tocantins, Ceará, Minas Gerais, Pará e Mato Grosso (23).

O óleo de pequi extraído a partir do fruto (Figura 3) é rico em carotenoides e triacilglicerídeos contendo principalmente radicais acil graxos de ácido oleico, ácido palmítico e de ácido linoleico, substâncias descritas por possuírem atividades biológicas

como efeito antioxidante (24), antimicrobiano, anti-inflamatório (25) e antitumoral (22). O efeito anti-inflamatório do óleo de pequi administrado por via oral já foi reportado em estudo *in vivo*, em camundongos Swiss (26) e em atletas adultos após atividade física intensa (27).

Os carotenoides encontrados no óleo de pequi não apenas reduzem o estresse oxidativo causado pelos radicais livres, mas também estimulam a produção de enzimas antioxidantes, como o superóxido dismutase e a catalase (59). Além disso, os ácidos graxos, como o ácido linoleico presentes no óleo de pequi, são metabolizados para se tornarem precursores de eicosanoides. Esses precursores geram ácidos araquidônico (ômega-6) e dihomo-γ-linolênico (ômega-6), enquanto o α-linolênico se converte em ácido eicosapentaenoico (ômega-3). Essas substâncias têm a capacidade de modular a intensidade e a duração da resposta imune durante processos inflamatórios (60).

Entretanto, devido ao seu caráter hidrofóbico, o óleo de pequi pode ter sua absorção e seu espectro de biodistribuição limitados, sendo necessária a busca por mecanismos para melhor aproveitamento pelo organismo (28). Como alternativa, a utilização de nanotecnologia combinada com óleos naturais pode superar tais limitações, mantendo a estabilidade dos compostos bioativos, além de melhorar sua biodisponibilidade e biodistribuição (28,29).



Figura 2. Árvore do pequi (Caryocar brasiliense). Foto: Claudio Bezerra de Melo.



Figura 3. Pequi (frutos). Foto: Acervo ISPN

1.3. Nanotecnologia

A nanociência é uma área multidisciplinar que estuda a utilização e o desenvolvimento de sistemas em escala nanométrica (30,31). Os avanços no uso de dispositivos nanométricos para a distribuição de fármacos têm contribuído para o desenvolvimento de nanoestruturas capazes de carrear de forma mais eficiente, compostos bioativos para tratamentos de doenças diversas, como alternativa às abordagens tradicionais, concedendo vantagens como melhor biodisponibilidade e menor toxicidade (29,31).

Os tipos de nanopartículas podem variar pelo seu formato, tipo de síntese e composição, fatores que estão diretamente ligados às suas aplicações. Assim, a utilização da nanotecnologia aliada à saúde pode oferecer ferramentas que, combinadas ao uso de fármacos ou biocompostos naturais, podem gerar novas alternativas aos tratamentos convencionais já utilizados (28,32,33).

Com isso, vêm crescendo o número de evidências científicas através de estudos de atividades terapêuticas com nanofitoterápicos, sendo estruturas em escala nanométrica capazes de carrear substâncias bioativas de origem vegetal. Atualmente, são produzidos fitoterápicos utilizando partes diversas das plantas, como folhas, raiz, caule, sementes e frutos, através dos extratos obtidos (34). Como objetivo, a busca de novos biocompostos e ferramentas para melhorar sua biodisponibilidade, tem como foco sua aplicação em tratamentos de doenças inflamatórias, câncer, infecções e alterações de caráter imunológico (34).

As nanoemulsões são exemplos de nanoestruturas que se apresentam como uma escolha favorável para encapsular compostos hidrofóbicos, composta pela mistura de dois líquidos imiscíveis, estabilizados por um surfactante, apresentando variações como as nanoemulsões óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) (Figura 4) (35). A presença de fosfolipídios (no papel de surfactante) na nanopartícula permite com que a fase oleosa permaneça protegida na parte interna, conferindo resistência a mudanças físico-químicas do meio (pH, variação de temperatura, diluição) (35). Essas estruturas podem ser obtidas por métodos de ultrasonicação ou microfluidização por exemplo (36). Estudos *in vitro* e *in vivo* já evidenciaram efeitos antitumorais (33) e anti-inflamatórios (37) de nanoemulsões à base de óleo de pequi. No entanto, o óleo utilizado nesses estudos foi obtido por prensagem a frio e por extração com solvente orgânico, respectivamente.

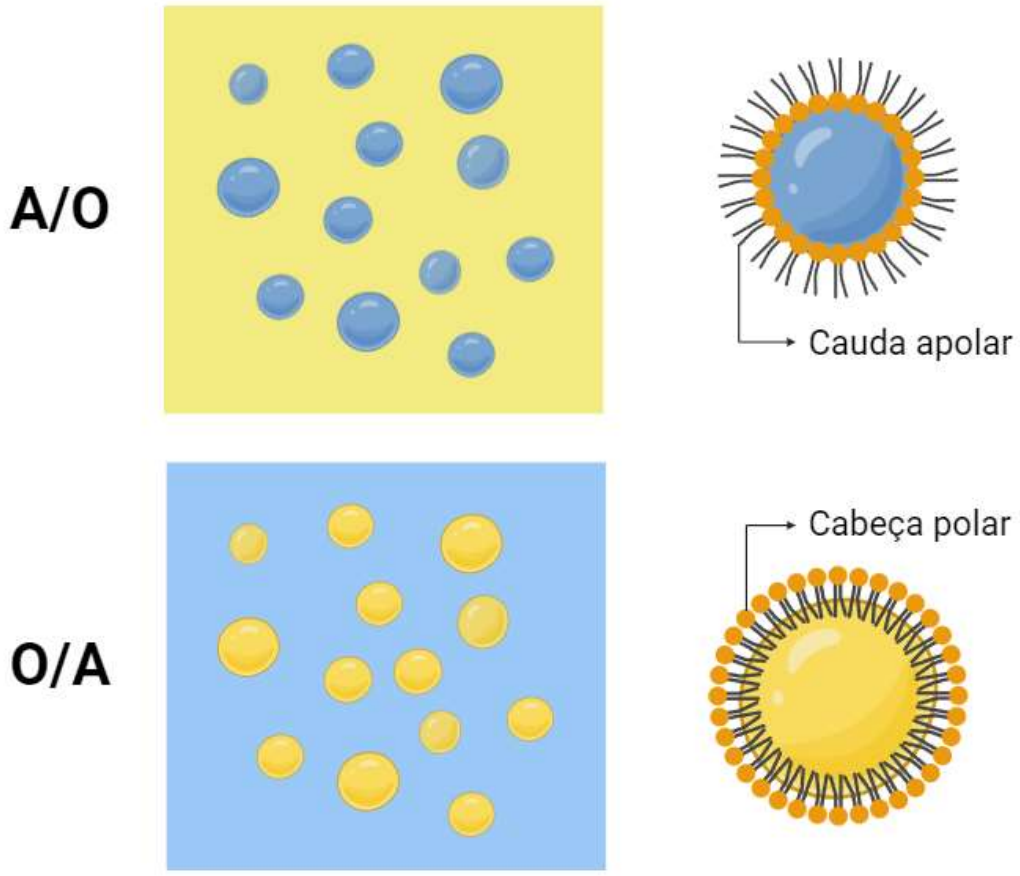


Figura 4. Representação esquemática de nanoemulsões água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A), onde a parte azul representa a fase aquosa, e a parte amarela, a fase oleosa. As caudas apolares do tensoativo sempre ficam voltadas para a fase oleosa, devido às suas características lipofílicas. Imagem elaborada com BioRender.

A prensagem à frio é uma técnica que utiliza prensa mecânica para extrair o óleo da polpa do fruto. Nesta metodologia, a polpa já devidamente separada do fruto é envolvida em organza ou outro material próprio, e recebe forças compressivas para separar os líquidos dos sólidos. O óleo obtido é recolhido diretamente sem a necessidade de outro procedimento posterior (38). Na extração por solventes, a polpa só é utilizada após remoção da umidade e moagem a fim de descompartimentar ao máximo os tecidos do mesocarpo, permitindo uma maior eficiência e interação do solvente apolar com o material vegetal (39). A fase sólida formada é separada da fase líquida oleosa e o óleo é separado do solvente, com possível recuperação e reciclagem do solvente (40). Por fim, a extração do óleo pode ser feita por fervura em água. Este é um método artesanal utilizado por comunidades extrativistas e consiste basicamente em submeter o putâmen do pequi em panelas ou caldeiras com água fervente até que pequenas partículas sobrenadantes do óleo apareçam e comecem a se aglomerar, formando bolhas maiores do óleo. Com uso de um utensílio, o óleo é recolhido em outro recipiente (23).

Estes diferentes processos de extração (Figura 5) resultam em diferenças no rendimento, composição e estabilidade do óleo (24), pode ter um impacto significativo nos efeitos biológicos do óleo, conservando ou ocasionando perdas na composição fitoquímica. Em caso de perdas de constituintes, consequentemente pode haver redução na atividade funcional do óleo. Contudo, há poucos relatos sobre os efeitos anti-inflamatórios do óleo de pequi obtido por fervura em água. Portanto, estudos avaliando efeitos do óleo obtido por este método pode contribuir também para a valorização das comunidades e agregação de valor à biodiversidade brasileira, movimentando a bioeconomia do país.

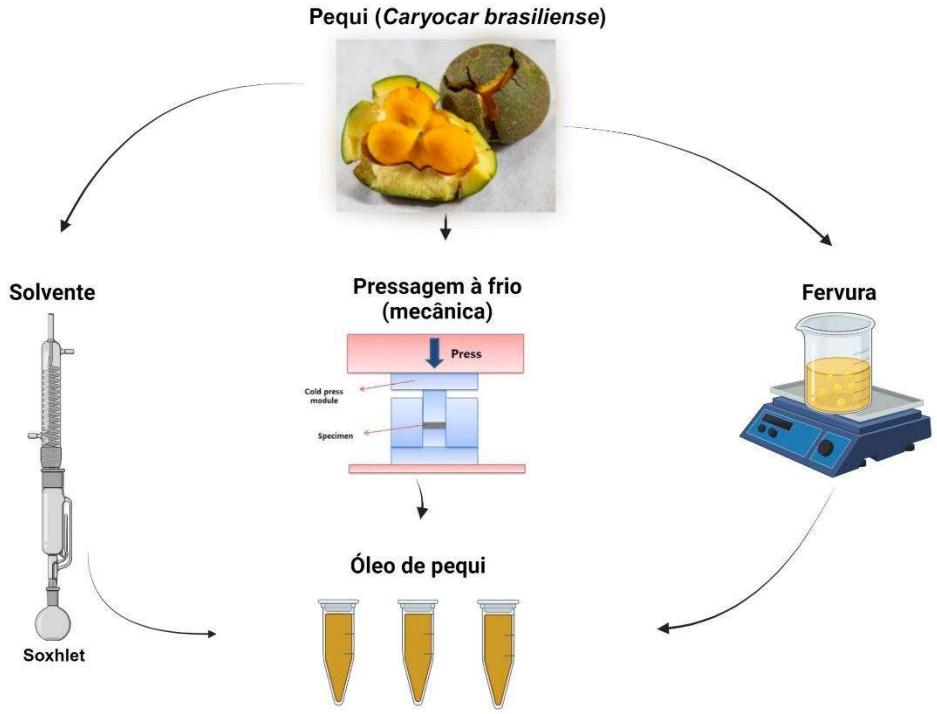


Figura 5. Métodos de extração para obtenção do óleo de pequi. Imagem elaborada com BioRender.

Os estudos com foco em biocompostos presentes na biodiversidade brasileira, já explorados e comercializados por comunidades que detêm o conhecimento sobre seus efeitos através o uso popular, agrega valor econômico e social aos produtos naturais criando uma cadeia de produção e desenvolvimento sustentável, onde a conservação ambiental e a exploração desses produtos podem coexistir, através de uma conexão cada vez mais próxima entre as comunidades extrativistas, a universidade e a indústria (34).

Diante do exposto, não foram encontradas, até o momento, publicações que abordem o desenvolvimento e uso de nanoemulsões contendo óleo de pequi, e o impacto que os métodos de extração desse óleo podem ter nas características das nanoemulsões e como isso pode influenciar em seus efeitos biológicos.

2. Objetivos

2.1. Geral:

Desenvolver nanoemulsões de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) obtido por diferentes métodos de extração (prensagem a frio, solvente e fervura) e avaliar seus efeitos sobre a atividade de macrófagos RAW 264.7 *in vitro*.

2.2. Específicos

- Caracterizar o óleo de pequi, obtido através dos métodos de extração por solvente, prensagem à frio e fervura pelo índice de acidez, índice de peroxidação, perfil lipídico e a presença de demais componentes;
- Formular, caracterizar parâmetros físico-químicos e analisar a estabilidade das nanoemulsões à base de óleo de pequi extraídos por diferentes métodos ao longo do tempo;
- Avaliar a citotoxicidade das nanoemulsões à base de óleo de pequi em macrófagos, *in vitro*;
- Avaliar os efeitos das nanoemulsões à base de óleo de pequi, sob a produção de citocinas em macrófagos RAW 264.7 estimulados ou não com LPS, *in vitro*.

3. Capítulo I

Este capítulo apresenta um artigo científico resultante desta dissertação, que será submetido à revista Journal of Drug Delivery Science and Technology.

Desenvolvimento de nanoemulsões de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) obtido por diferentes métodos de extração e avaliação de seus efeitos sobre a atividade de macrófagos RAW 264.7 *in vitro*.

Samuel Silva Morais[1,2]; Isolda de Sousa Monteiro[1,3]; Danielly Stéfany Barbosa Dias de Castro[4]; Marina Mesquita Simões[5]; Carlos Alexandre Rocha da Costa[6]; Gilson Gustavo Lucinda Machado[6]; Atailson Oliveira da Silva[7]; Thalya Soares Ribeiro Nogueira[8]; Rayssa Ribeiro[9]; Lívia Macedo Dutra[10]; Victória Laysna dos Anjos Santos[10]; Eduardo Valério de Barros Vilas Boas[6]; Marcelo Henrique Sousa[7]; Ivo Jose Curcino Vieira[8]; Valdir Florencio da Veiga Junior[9]; Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida[10]; Laise Rodrigues de Andrade[4]; Graziella Anselmo Joanitti[1,2].

[1]Laboratório de Compostos Bioativos e Nanobiotecnologia (LBCNano), Universidade de Brasília, Campus Universitário – Centro Metropolitano, Ceilândia Sul, Brasília, DF 72220-275, Brasil.
[2]Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil.
[3]Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias da Saúde, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil.
[4]Departamento de Genética e Morfologia, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brasil.
[5]Laboratório de Microscopia e Microanálise, Departamento de Biologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília – DF, Brasil.
[6]Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG CEP 37200-900, Brasil.
[7]Green Nanotechnology Group, University of Brasília Campus Ceilândia, Ceilândia DF, Brazil
[8]Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, Avenida Alberto Lamego 2000, Campos dos Goytacazes, RJ, 28013-602, Brasil.
[9]Instituto Militar de Engenharia, Praça Gen. Tibúrcio, 80, Praia Vermelha, Rio de Janeiro, RJ 22290-270, Brasil.
[10]Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais (NEPLAME), 56.304-205, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

Resumo

A inflamação é um dos processos de defesa do corpo e ocorre em resposta a infecções causadas por microrganismos ou danos nos tecidos. O óleo de pequi extraído de *Caryocar brasiliense*, encontrado na região do Cerrado, é popularmente utilizado por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes devido à presença de ácidos graxos e carotenoides. A nanotecnologia serve como uma ferramenta para superar barreiras na administração de compostos hidrofóbicos. Este estudo teve como objetivo realizar o desenvolvimento de nanoemulsões de óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) obtido por diferentes métodos de extração (prensagem a frio, solvente e fervura) e a avaliação de seus efeitos sobre a atividade de macrófagos RAW 264.7 *in vitro*. Os óleos de pequi foram

avaliados com base em seu perfil lipídico, acidez e valores de peróxidos para garantir sua qualidade após os processos de extração. As nanoemulsões foram formuladas com óleo de pequi obtidos pelos métodos de extração por solvente (NeS), prensagem à frio (NePF) e fervura (NeF), lecitina de ovo (2:1 p/p) e estearato de polioxietileno 40 (2%) e dispersas em PBS por ultrasonicação em banho de gelo. As amostras foram avaliadas por *Dynamic light scattering* (DLS) por 120 dias a 4 °C e 25 °C para avaliar sua estabilidade, além de pH e condições de estresse (diluição seriada de 0 a 1/128 e variação de pH entre 3-11). Para os ensaios de citotoxicidade, macrófagos RAW 264.7 foram tratados com diferentes nanoemulsões por 24 horas e tiveram sua viabilidade analisada pelo ensaio MTT. A produção de citocinas de macrófagos tratados com as nanoformulações por 24 horas, e estimulados ou não por LPS (lipopolissacarídeo bacteriano), foram determinadas pelo ensaio de ELISA. Os óleos de pequi mantiveram níveis aceitáveis de acordo com os índices de acidez (mg $KOH \cdot g^{-1}$): OS = 4,59 OPF = 3,48 e OF = 1,1 e de peroxidação ($mEq \cdot kg^{-1}$): OS = 3,21 OPF = 2,87 e OF = 2,65. As nanoemulsões à base de óleo de pequi apresentaram diâmetro hidrodinâmico semelhante <100 nm, PDI <0,250, potencial zeta entre -1,5 e -2,5 mV, pH entre 6 e 7, e permaneceram estáveis durante o teste de diluição sem variação significativa. Os testes de variação de pH mostraram mudanças no potencial zeta no pH mais ácido, as nanoemulsões permaneceram neutras (3) perto de 0 mV, e no pH mais básico (11) ficaram negativas (aproximadamente -10 a -15 mV). O ensaio de MTT indicou que a concentração de 360 μg/mL de diferentes nanoemulsões e óleos livres não apresentou citotoxicidade significativa às células após 24 horas, com viabilidade celular >80%. Nos ensaios de ELISA, para o grupo IL-10 estimulados com LPS, todos os tratamentos apresentaram produção da citocina, porém sem diferença significativa comparada ao controle PBS. No grupo IL-6 com LPS, apenas os tratamentos NePF, OF e NeF apresentaram produção, porém a ausência de produção de IL-6 no controle PBS indica necessidade de um novo ensaio para comparação dos tratamentos. No grupo IL-12 com LPS, os tratamentos NeF e NBR apresentaram baixa produção da citocina IL-12, sugestivo de possível modulação anti-inflamatória presente nesses tratamentos. As nanoemulsões formuladas a partir de óleo de pequi obtido por diferentes métodos de extração permaneceram estáveis, e os métodos de extração não levaram a diferenças entre as amostras nos parâmetros avaliados. Os resultados de citotoxicidade e os dados preliminares dos ensaios de ELISA sugerem potencial na utilização das nanoemulsões à base de óleo de pequi em processos inflamatórios, sendo necessários estudos posteriores para avaliação pormenorizada desta ação.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense*, nanoemulsão, anti-inflamatório, macrófago, pequi, óleo

1. Introdução

A inflamação é considerada como um dos processos fisiológicos mais antigos reportados na literatura com a descrição dos cinco sinais cardinais: edema, calor, rubor, dor e perda de função (1). A inflamação é um processo de defesa do organismo e ocorre como resposta a alguma infecção microbiana ou a dano tecidual (2). O processo inflamatório pode ser classificado em inflamação aguda e inflamação crônica (1–3). A inflamação aguda consiste em recrutar células de defesa como leucócitos, e proteínas plasmáticas que são direcionadas para o sítio alvo para eliminar o patógeno ou células danificadas (1,3). Entretanto, uma resposta exagerada do organismo pode levar à inflamação crônica associada à produção anormal e persistente de moléculas pró-inflamatórias, como citocinas e eicosanóides, e ao recrutamento contínuo de células

imunitárias. Esse fenômeno causa danos teciduais irreversíveis e está associado com diversas patologias como artrose, diabetes, câncer, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, entre outras (1,3).

Atualmente, a classe de fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) é considerada como uma das mais comercializadas e usadas no mundo (4,5). Os AINEs impedem a ativação do processo inflamatório agindo como inibidores da via de ciclooxigenase responsável pela produção de mediador pró-inflamatório (6). Contudo, a administração prolongada dessas drogas está associada ao surgimento de diversos efeitos adversos e complicações gastrointestinais, hepática, renal, cerebral, pulmonar, entre outros (4,7).

Diante desse contexto, a busca por alternativas eficientes e mais seguras se torna uma necessidade. O potencial efeito anti-inflamatório de produtos naturais e compostos bioativos de origem vegetal como carotenoides, ácidos graxos, terpenóides, entre outros, já foi reportado na literatura e tem sido cada vez mais investigado (8,9). A biodiversidade brasileira oferece um amplo painel de espécies vegetais ricas em compostos bioativos (10). Dentre as diferentes partes da planta, os óleos vegetais são cada vez mais estudados por apresentarem propriedades biológicas tais como efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (11,12).

Na cultura popular, o Caryocar spp. ou pequi é um fruto proveniente do bioma Cerrado, utilizado para tratar doenças respiratórias, bem como doenças inflamatórias, dores musculares e artrite crônica (13). O óleo de pequi extraído a partir do fruto é rico em ácidos graxos como ácido oleico e ácido palmítico, e carotenoides que lhe conferem várias atividades biológicas como efeito antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório e antitumoral (13). O efeito anti-inflamatório do óleo de pequi administrado por via oral já foi reportado em estudo *in vivo*, em camundongos Swiss (14) e em atletas adultos após atividade física intensa (15). Entretanto, devido ao seu caráter hidrofóbico, o óleo de pequi pode ter sua absorção e seu espectro de biodistribuição limitados, sendo necessárias alternativas para melhor aproveitamento pelo organismo.

A nanociência é uma área multidisciplinar que estuda a utilização e o desenvolvimento de sistemas em escala nanométrica (16,17). Os avanços no uso de dispositivos nanométricos para a distribuição de fármacos têm contribuído para o desenvolvimento de nanoestruturas capazes de carrear de forma mais eficiente, compostos bioativos para tratamentos de doenças diversas, como alternativa às abordagens tradicionais, concedendo vantagens como melhor biodisponibilidade e menor toxicidade (17,18, 34).

As nanoemulsões são exemplos de nanoestruturas e se apresentam como uma escolha favorável para encapsular compostos hidrofóbicos. Sua formulação é composta pela mistura de dois líquidos imiscíveis, como óleo e água, estabilizados por um ou mais surfactantes (35). Essas estruturas podem ser obtidas por métodos de ultrasonicação ou microfluidização por exemplo. (19). Estudos *in vitro* e *in vivo* já evidenciaram efeitos antitumorais (20) e anti-inflamatórios (21) de nanoemulsões à base de óleo de pequi. No entanto, o óleo utilizado nesses estudos foi obtido por prensagem a frio e por extração com solvente orgânico, respectivamente.

A prensagem à frio é um método mecânico que utiliza prensas para separar o óleo da polpa do fruto. (38). A extração por solventes é um método químico que utiliza solventes orgânicos para solubilizar o óleo da polpa do fruto. (39,40). A fervura em água

é um método artesanal utilizado por comunidades extrativistas que utiliza a temperatura para separar o óleo da polpa do fruto (23).

Estes diferentes processos de extração resultam em diferenças no rendimento, composição e estabilidade do óleo (24), pode ter um impacto significativo nos efeitos biológicos do óleo, conservando ou ocasionando perdas na composição fitoquímica. Em caso de perdas de constituintes, consequentemente pode haver redução na atividade biológica do óleo. não foram encontradas, até o momento, publicações que abordem o desenvolvimento e uso de nanoemulsões contendo óleo de pequi, e o impacto que os métodos de extração desse óleo podem ter nas características das nanoemulsões e como isso pode influenciar em seus efeitos biológicos. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver nanoemulsões de óleo de pequi obtido por diferentes métodos de extração (prensagem a frio, solvente e fervura) e avaliar seus efeitos sobre a atividade de macrófagos RAW 264.7 *in vitro*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Os óleos de pequi foram extraídos pelo Departamento de Ciência dos Alimentos – Ala B, Laboratório de Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças. Universidade Federal de Lavras. Os demais materiais utilizados foram os seguintes: lecitina de ovo (Lipoid, Ludwigshagen, Alemanha). MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), dimetilsulfóxido (DMSO) e estearato de polioxietileno 40 (Sigma Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), tripsina, soro fetal bovino (Thermo Gibco, USA) e kits de ELISA (BD OptEIA).

2.2. Obtenção do óleo de pequi:

As amostras de óleo de pequi foram obtidas com o uso de um mesmo conjunto de frutos coletados por uma cooperativa em Montes Claros (Latitude: -16.737, Longitude: -43.8647 16° 44′ 13″ Sul, 43° 51′ 53″ Oeste), divididos em três grupos para extração do óleo sob diferentes metodologias de extração, sendo elas (1) pela utilização de solventes químicos, (2) com prensa mecânica e (3) pelo cozimento dos frutos (fervura) (42).

Brevemente, o processo de extração de óleo a partir de solventes começou com o despolpamento dos frutos, utilizando uma faca, seguido pela secagem da polpa em uma estufa a 60°C por 24 horas. A polpa seca foi então triturada em um multiprocessador METVISA modelo LQ-6, resultando em uma farinha. Essa farinha foi dividida em dois balões de fundo chato, um contendo 1 litro de acetona e o outro contendo 1 litro de éter etílico, ambos envoltos em papel alumínio. Os balões foram deixados à temperatura ambiente por aproximadamente 4 horas. Após esse período, o material foi filtrado utilizando papel filtro Whatman e os solventes foram recuperados por meio de um aparelho Soxhlet aquecido a 60°C.

Para a extração de forma mecânica, foi realizada a retirada das amêndoas de dentro dos frutos, para utilização do endocarpo (polpa), levados para secagem em estufa a 60°C por 24 horas. Foram então colocadas em uma prensa expeller da marca WEQ® e o extrato

obtido filtrado em peneira fina a temperatura ambiente e depois em papel filtro Whatman dentro de uma estufa ventilada a 60°C.

Por fim, para o método de extração por fervura, os frutos foram colocados em um recipiente com água e submetidos ao cozimento por cerca de 40 minutos. Logo após, os frutos foram separados da água e despolpados utilizando uma colher e deixada em repouso até o resfriamento. Uma vez fria, a polpa foi levada para cozimento novamente, onde desta vez o óleo que começou a se acumular na superfície da água foi retirado com o auxílio de uma colher, colocado em um recipiente e aquecido até a total evaporação da água ainda presente.

Este estudo está de acordo com a Nova Lei Brasileira de Biodiversidade (Lei 13.123 de maio de 2015) e registrado na plataforma do Sistema Nacional de Gestão de Recursos Genéticos e Conhecimentos Tradicionais Associados (SisGen) sob o número AC22EF9.

2.3. Caracterização do óleo de pequi

As condições físico-químicas dos óleos extraídos foram avaliadas para certificar a pureza das amostras a serem utilizadas nas formulações das nanoemulsões e demais testes. Para isto, as amostras dos óleos foram submetidas a análises de índice de acidez e peroxidação, bem como análise do seu perfil lipídico e metabólitos presentes nos óleos, além de testes complementares de ressonância magnética nuclear (RMN).

2.3.1. Índice de acidez e peroxidação

O índice de acidez foi medido seguindo a AOCS (American Oil Chemists' Society) Ca 5a-40 (2004) e expressa em porcentagem de ácido oleico (mg $KOH \cdot g^{-1}$). Os valores de peróxidos seguiram os modelos da AOCS Cd 8b-90 (2000), sendo expressos em $mEq \cdot kg^{-1}$. Análises realizadas pelo Departamento de Ciência dos Alimentos – Ala B, Laboratório de Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças. Universidade Federal de Lavras. Os dados foram analisados por meio do software SISVAR versão 5.8. A análise de variância (ANOVA) e o método Scott-Knott ($p < 0,05$) foram utilizados para comparar as possíveis diferenças significativas entre os diferentes tipos de óleo.

2.3.2. Perfil lipídico

O perfil lipídico dos óleos de pequi foi caracterizado de acordo com metodologia previamente descrita (32). Resumidamente, aproximadamente 15 mg (±0.1 mg) de óleo foram pesados em tubos de vidro com tampas e adicionados 1,5 mL de uma solução de KOH 0,5 M em metanol. A transesterificação completa dos ácidos graxos foi obtida usando 14% de BF3 em metanol. A extração dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada pela adição de 2,5 mL de uma solução saturada de NaCl e 1 mL de hexano, seguida de agitação por vórtex por 1 minuto e centrifugação a 241× g por 5 minutos. As amostras foram então analisadas por cromatografia gasosa (Shimadzu GCMS-QP2010 Plus com sistema de injeção AOC-5000, Japão; e uma coluna J&W Scientific DB-23 (60 mm × 0,25 mm ID × 0,25 μm), Folsom, CA, EUA). A quantificação foi obtida com uma curva de calibração de material de referência certificado (F.A.M.E Mix C8–C24). Análises realizadas pela Seção de Química, Instituto Militar de Engenharia.

2.3.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GS-MS)

As amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas em um sistema Shimadzu modelo QP2020 NX (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), em modo impacto de elétrons a 70 eV, utilizando coluna SH-RTX-5ms (SHIMADZU)-5% fenil: 95% dimetilpolisiloxane (30m x 0,25 mm x 0,25 μm) fluxo de gás constante de 2,26 mL/min, volume de injeção 1 μL. As injeções foram realizadas inicialmente em modo Split 1:30. As amostras foram reanalisadas mais concentradas (Split 1:10), para que outras substâncias, minoritárias pudessem ser observadas. Análises realizadas pelo Laboratório de Ciências Químicas (LCQUI), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF.

2.3.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A caracterização química do óleo de pequi foi realizada por meio da análise de ressonância magnética nuclear (RMN). Para isso, dados de RMN unidimensional (1D) foram adquiridos a 298 K em CDCl3 em um espectrômetro de RMN Bruker AVANCE III 400 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemanha), operando a 9,4 T, observando 1H e 13C a 400 e 100 MHz, respectivamente. O espectrômetro de RMN estava equipado com uma sonda de detecção direta de 5 mm com gradiente de z. Todos os deslocamentos químicos de RMN de 1H e 13C (δ) foram fornecidos em ppm em relação ao sinal de TMS em 0,00 como referência interna. Os espectros foram processados no software TOPSPIN. Análises realizadas pela Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais (NEPLAME).

2.4. Formulação das nanoemulsões:

As nanoemulsões à base de óleo de pequi (NePe) foram formuladas seguindo protocolo adaptado (33). Primeiramente foi preparada uma pré-emulsão composta por uma fase oleosa contendo lecitina de ovo, óleo de pequi na proporção de 2:1 (m/m), estearato de polioxietileno 40 2% (m/m) e fase aquosa com 15 mL de PBS. A formulação da amostra NBR foi realizada com as mesmas proporções, com exceção do óleo de pequi. Em seguida, após breve homogeneização no vórtex, a mistura foi submetida ao ultrassonicador de ponteira (SONICS ULTRA CELL VCX500) em banho de gelo por 5 minutos com pulso alternado (1 seg ligado/desligado). As formulações foram armazenadas protegidas da luz à temperatura de 4 °C para futuras análises.

2.5. Parâmetros físico-químicos das nanoemulsões:

2.5.1. Análise das nanoemulsões por *Dynamic light scattering* (DLS)

O diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta (a partir de medidas de mobilidade eletroforética), foram mensurados utilizando-se o equipamento ZetaSizer® Nano ZS90 (Malvern, UK) com ângulo de detecção de difração de luz de 90° a temperatura ambiente. Foram realizadas leituras em triplicata a fim de obter as médias dos valores. O pH de cada amostra foi medido utilizando fitas de pH antes de cada leitura.

2.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Uma gota de aproximadamente 20 μL de amostra de nanoemulsão, foi colocada sobre um pedaço de parafilme e a telinha foi colocada sobre a gota por 10 minutos. Após

esse tempo, o excesso de amostra foi removido com um papel filtro. Em seguida, foi adicionada uma gota da solução de acetato de uranila a 2% (contraste) no parafilme e a telinha foi colocada sobre essa gota por 1 minuto. Na sequência, o excesso de acetato de uranila foi removido com um papel filtro. As amostras foram secas à temperatura ambiente. Após a secagem, as amostras foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), JEM-2100, Jeol, Tokyo, Japan, equipado com EDS, Thermo scientific, operando em 200kV. Imagens obtidas pelo Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic/UFG).

2.5.3. Estabilidade das nanoemulsões ao longo do tempo

As nanoemulsões foram analisadas no período de 120 dias, armazenadas sob diferentes temperaturas (4 °C e 25 °C) para avaliar seu comportamento. As amostras foram analisadas por *Dynamic light scattering* (DLS) após sua formulação, nos dias 1, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 para acompanhar possíveis variações no tamanho das nanogotículas, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta conforme descrito no tópico 2.5.1. O pH de cada amostra foi medido utilizando fitas de pH antes de cada leitura.

2.5.4. Estabilidade das nanoemulsões sob condições de estresse

As nanoemulsões foram condicionadas a diferentes condições de estresse (variação de pH e diluição seriada) para avaliar sua estabilidade. As amostras foram diluídas em PBS com fator de diluição de 2-, 4-, 8-, 16-, 32-, 64-, 128-, sendo avaliadas de acordo com os parâmetros descritos acima (estabilidade das nanoemulsões ao longo do tempo). Também foram avaliadas mudanças de pH com adição de 2 M NaOH e 2.5 M HCl a fim de avaliar os pontos de pH 3, 5, 7, 9 e 11. O potencial zeta e o diâmetro hidrodinâmico foram determinados em função do pH com um Zetasizer NanoZS (Marvern Instruments) utilizando uma célula de fluxo (DTS1070) e um MPT-2 Autotitrator (Marvern Instruments). As amostras de nanoemulsão (15 mL) com pH inicialmente neutro foi acidificada gota-a-gota com HNO_3 (1 M) até pH próximo de 3,0. Para titulação das amostras com o módulo MPT-2 (Marvern Instruments) foram utilizadas três soluções estoques inseridas nas bombas de injeção - NaOH (0,1 M); NaOH (0,01 M) e HNO_3 (0,01M); O software de operação do Zetasizer NanoZS foi configurado para elevar automaticamente o pH até aproximadamente 11 com em intervalos de 2,0 realizando medidas simultâneas de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico em triplicada. Toda a operação de aumento do pH e medição é executada automaticamente pelo equipamento.

2.6. Avaliação da citotoxicidade das nanoemulsões em células de macrófagos

Para determinar as concentrações a serem utilizadas nos testes in vitro, foi realizado o ensaio de MTT a fim de observar a citotoxicidade dos óleos e suas nanoemulsões bem como o NBR para controle. Para isso, foram utilizadas células de macrófagos murinos RAW 264.7, cultivadas em DMEM com 10 % soro fetal bovino (v/v) e 1% antibiótico (v/v) em estufa a 37 °C e 5% CO_2. Placas de 96 poços com $1x10^4$ células por poço foram organizadas de acordo com os grupos experimentais das amostras: óleo de pequi em suas formas livres e suas respectivas nanoemulsões, e os controles PBS e NBR (nanogotícula sem óleo). As células receberam a aplicação dos tratamentos nas concentrações de 90, 180 e 360 μg/mL de cada grupo, bem como o controle de PBS para as nanoemulsões e Etanol P.A (concentração final < 1%) para os óleos, e posteriormente foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO_2 por 24 horas. Após esse período, os

tratamentos foram retirados dos poços, sendo adicionado 150 µL da solução de MTT (0.5 mg/mL em DMEM) e a placa foi incubada novamente em estufa a 37 °C e 5% CO_2 por 2h. Após esse período, o meio de cultura presente nas células foi descartado, então foi adicionado 150 µL de DMSO aos poços para observar a formação dos cristais de formazan foi utilizado espectrofotômetro de placas na absorbância de 595 nm. Análises realizadas em colaboração com o Departamento de Genética e Morfologia, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília.

2.7. Avaliação de efeitos das nanoemulsões à base de óleo de pequi em produção de citocinas.

Para este ensaio, foram utilizadas duas placas de 24 poços com $1x10^8$ células por poço, a fim de separar os grupos de tratamento controle (células tratadas apenas com meio de cultura DMEM) e outra placa a ser tratada com LPS (ativador de perfil inflamatório). As células foram tratadas com óleo de pequi em suas formas livres (OS, OPF e OF) e suas respectivas nanoemulsões (NeS, NePF e NeF), e os controles PBS para os óleos livres e NBR (nanogotículas sem óleo) para as nanoemulsões, em todos os grupos a concentração utilizada foi de 360 µg/mL. As células foram incubadas em estufa por 90 minutos a 37 °C e 5° CO_2 para internalização das nanoemulsões e óleos livres nas células, para então serem adicionados LPS (12 µg/mL), ou somente meio DMEM em suas respectivas placas mantendo as mesmas condições em ambos os tratamentos. As células foram incubadas em estufa por 24 horas, e seu sobrenadante coletado para análise de mapeamento da produção de citocinas estimuladas pelos tratamentos, por meio Kit ELISA (BD OptEIA). As citocinas analisadas foram IL-12 (p70) e, IL-10 e IL-6 de acordo com as recomendações do fabricante. Análises realizadas em colaboração com o Laboratório de Microscopia e Microanálise, Departamento de Biologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília.

2.8. Avaliação morfológica dos macrófagos após tratamento com nanoemulsões à base de óleo de pequi e óleos livres.

Para avaliação morfológica das células, o procedimento de tratamento das células foi replicado como descrito no tópico 2.7, com exceção da etapa de coleta de sobrenadante, mantido nos poços para que as células pudessem manter sua estrutura durante a varredura realizada por microscopia óptica utilizando o EVOS FL Auto (Life Technologies). Para este ensaio foi utilizado o DMEM sem o vermelho fenol em sua composição, para melhor obtenção das imagens. Após o tratamento, as células foram observadas em aumento de 40x.

2.9. Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas através do GraphPad Prism versão 8.0.1 e SISVAR versão 5.8. Os valores foram expressos pela média entre as triplicatas dos grupos avaliados em todos os testes. As diferenças estatísticas foram calculadas pelos testes de One-way ANOVA e Two-way ANOVA, além dos pós testes de Tukey ou método Scott-Knott.

3. Resultados

3.1. Caracterização do óleo de pequi obtido por meio de extração por solvente (OS), prensagem à frio (OPF) e fervura (OF)

3.1.1. Perfil lipídico das amostras de óleo de pequi

O perfil lipídico das amostras demonstrou a presença de ácido oleico, palmítico e linoleico em seus compostos majoritários. Os três métodos de extração obtiveram resultados similares, com proporções maiores de ácido oleico em todas as amostras, seguidas pelo ácido palmítico e linoleico como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Perfil lipídico de óleo de pequi obtido por meio de extração por solvente (OS), prensagem à frio (OPF) e fervura (OF).

	Média (%)		
Ácidos graxos	**OS**	**OPF**	**OF**
Ácido oleico	55,77	53,33	55,70
Ácido palmítico	34,14	32,92	37,23
Ácido linoleico	1,16	1,22	0,86

3.1.2. Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)

As amostras de óleo de pequi OS, OPF e OF foram submetidas à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, podendo observar uma ampla quantidade de metabólitos presentes nesses óleos. A técnica utilizada foi capaz de apontar moléculas comuns entre os óleos, e ainda sim evidenciar a presença de diferenças dado o método de extração, como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2. Metabólitos presentes no óleo de pequi extraído por solvente (OS), prensagem à frio (OPF) e fervura (OF).

Moléculas	**OS**	**OPF**	**OF**
Ácido cáprico	x	x	
Ácido caprílico	x	x	x
Ácido monocarboxílico	x		
Ácido oleico	x		x
Ácido palmítico	x	x	
Ácido tetradecanóico	x	x	
β-sitosterol	x	x	x
Ácido vacênico			x

Ácido hidrocinâmico			x
Ácido esteárico		x	x
Esqualeno		x	x
Oleato de etila	x		x
Geranil linalol	x		
Denderalasina	x	x	
Ácido decanoico	x	x	
2-Dodecanona		x	x
Colest-5-em-3-ol, 24-propilideno-, (3β)	x	x	x
2-Heptadecanona	x		
2,4,6-Octatrieno, 3,4-dimetil	x		
(E)-2-octenoato de etila	x		x
Elaidato de dihidroxipropila			x
	Desconhecidas: 30	**Desconhecidas: 22**	**Desconhecidas: 25**

3.1.3. Análise de perfil de acidez e de peroxidação dos óleos de pequi

As análises de índice de acidez e índice de peróxidos foram realizadas em triplicata, com valores expressos por média ± desvio padrão demonstrados na tabela 3.

Tabela 3. Índice de acidez e peroxidação dos óleos de pequi extraídos por solvente (OS), prensagem à frio (OPF) e fervura (OF).

	OS	**OPF**	**OF**
Índice de acidez (mg KOH/g^{-1})	$4,59^{a} \pm 0,01$	$3,48^{b} \pm 0,01$	$1,1^{c} \pm 0,1$
Índice de peroxidação (mEq/kg^{-1})	$3,21^{a} \pm 0,03$	$2,87^{b} \pm 0,06$	$2,65^{b} \pm 0,25$

OS = Óleo por solvente, OPF = Óleo por prensagem à frio e OF = Óleo por fervura. Os valores exibidos são a média e o desvio padrão de cada tratamento, e as letras diferentes indicam diferenças significativas entre os óleos ($p < 0,05$) pela análise ANOVA seguida do teste de Scott-Knott.

3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O perfil químico obtido pela RMN de 1H (Figura 6) e 13C (Figura 7) das amostras de óleo de pequi extraído por solvente (S), prensagem à frio (PF) e fervura (F) foi caracterizado pela presença de ácidos graxos esterificados à porção de glicerol, devido à existência de sinais na faixa de 4,12 a 5,40 e os sinais em 62,21 e 69,04 ppm, respectivamente (43).

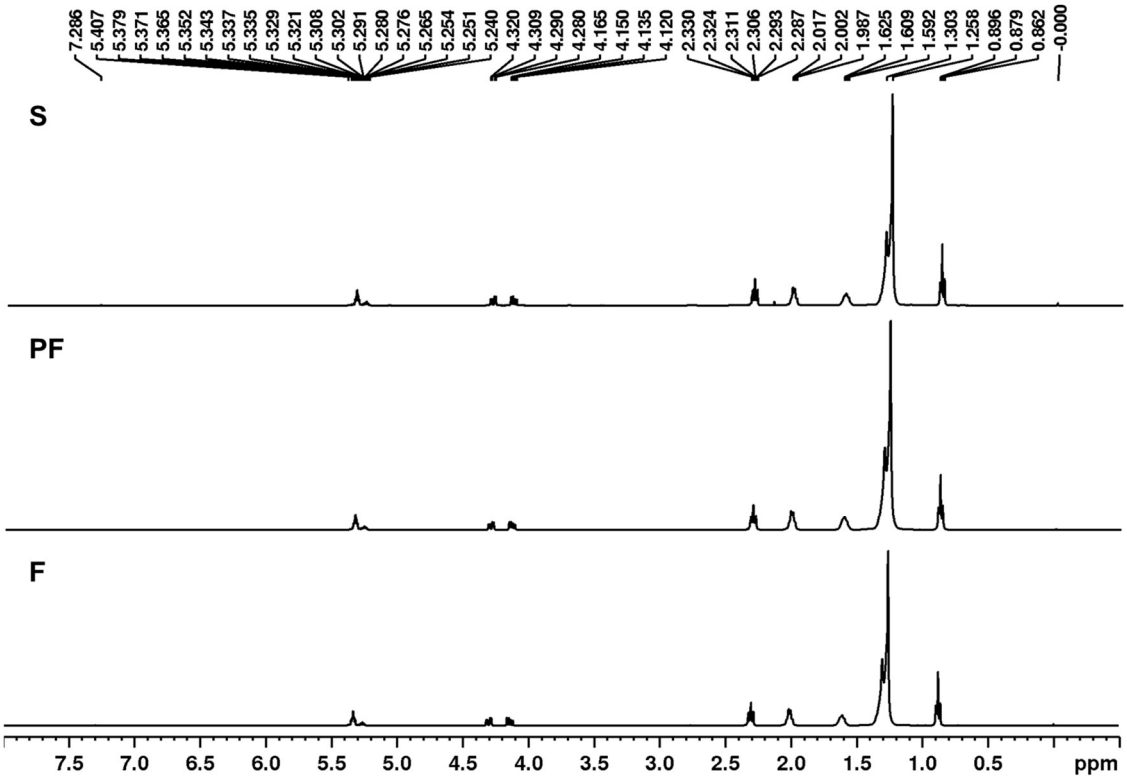


Figura 6. Espectro ^{1}H NMR das amostras de óleos de pequi extraídos por solvente (OS), prensagem à frio (OPF) e fervura (OF) em CDCl3 a 400 MHz.

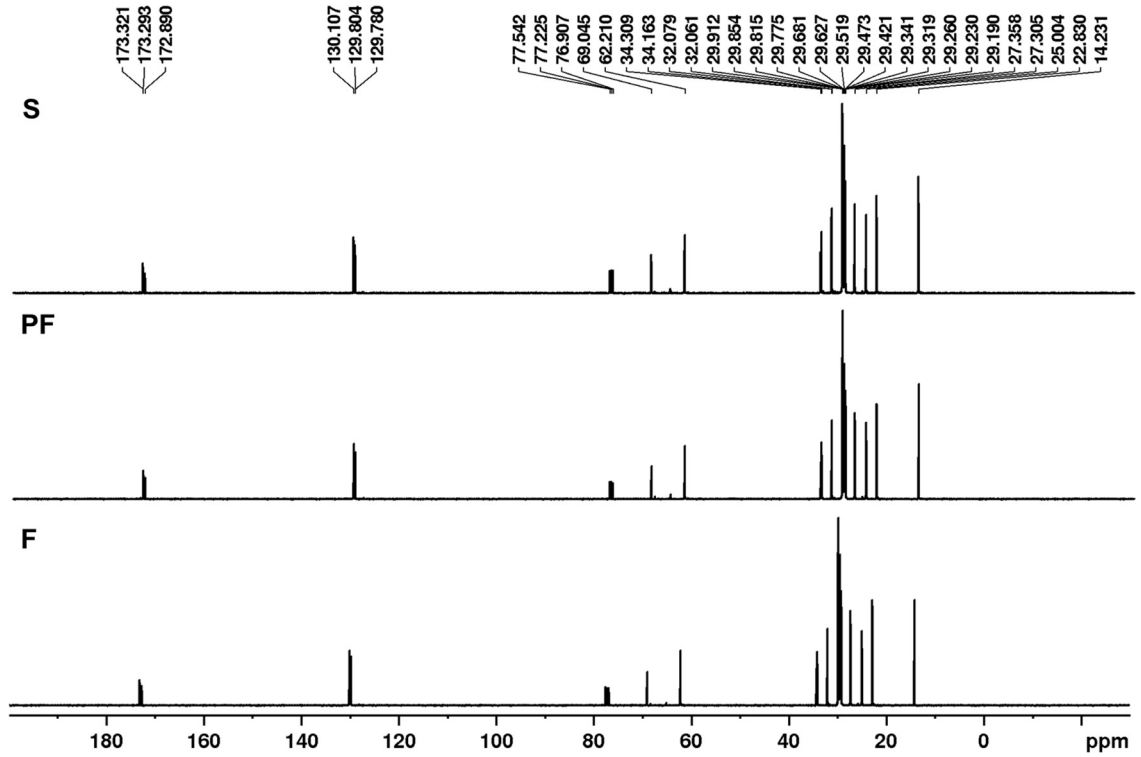


Figura 7. Espectro $^{13}C\{^{1}H\}$ NMR das amostras de óleo de pequi obtido pelos métodos de extração por solvente (OS), prensagem à frio (OPF) e fervura (OF) em CDCl3 a 100 MHz.

3.3. Formulação das nanoemulsões à base de óleo de pequi

Os valores de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e pH das nanoemulsões formuladas podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4. Características físico-químicas das nanoemulsões: NBR (nanogotícula sem óleo) e formuladas a base de óleo de pequi obtido pelos métodos de extração por solvente (NeS), prensagem à frio (NePF) e fervura (NeF) após 1 dia de armazenamento a 4°C.

Amostras	DH (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	pH
NBR	88,52 ± 1,450	0,246 ± 0,003	-1,50 ± 0,316	6
NeS	85,27 ± 0,444	0,219 ± 0,019	-2,47 ± 0,590	6
NePF	90,14 ± 0,346	0,224 ± 0,010	-1,99 ± 0,799	6
NeF	86,88 ± 1,295	0,237 ± 0,003	-1,67 ± 0,338	6

3.4. Aspectos macroscópicos das nanoemulsões à base de óleo de pequi

As nanoemulsões foram observadas pelo período de 120 dias, a partir de alíquotas feitas para leituras em DLS, como parte do protocolo de avaliação de estabilidade, a fim de apontar possíveis mudanças no estado macroscópico das formulações, por separação de fase, granulação ou quaisquer outras mudanças macroscópicas nas formulações. Passado o período de 120 dias, as nanoemulsões mantiveram seu aspecto inicial, com aparência translúcida e homogênea (Figura 8).

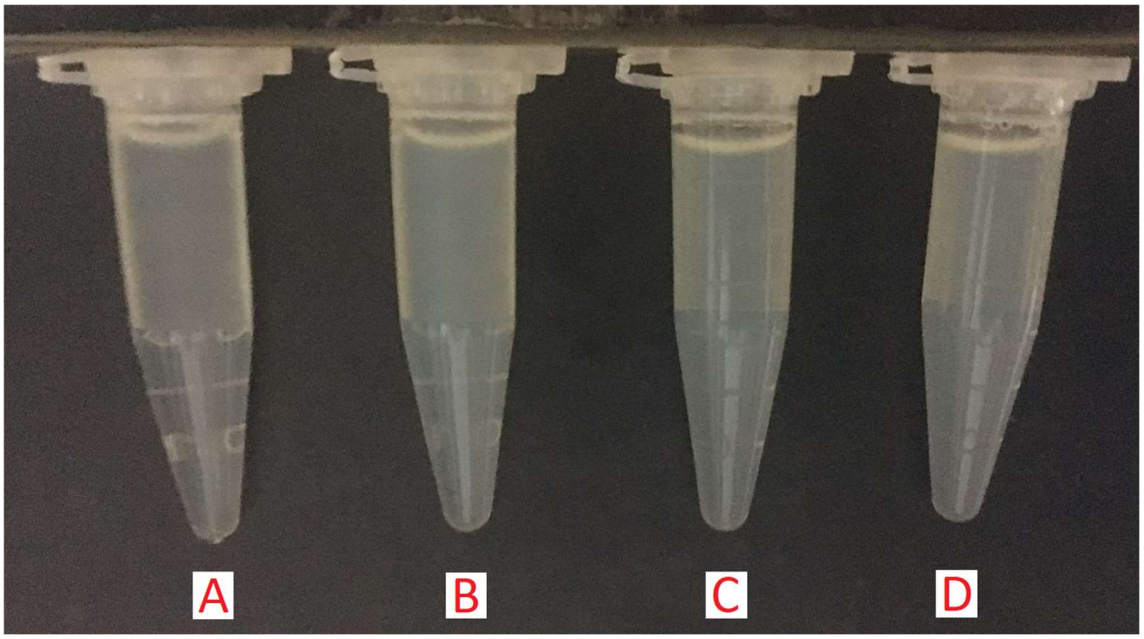


Figura 8. Alíquotas das nanoemulsões à base de óleo de pequi armazenadas a 25°C. NBR (nanogotícula sem óleo) (A) e formuladas a base de óleo de pequi obtido pelos métodos de extração por solvente (B), prensagem à frio (C) e fervura (D).

3.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (Figura 9), foi possível observar a morfologia das nanoemulsões, caracterizadas por nanoestruturas esféricas com núcleo denso, com escala parecida com os valores encontrados nas leituras de DLS das mesmas amostras.

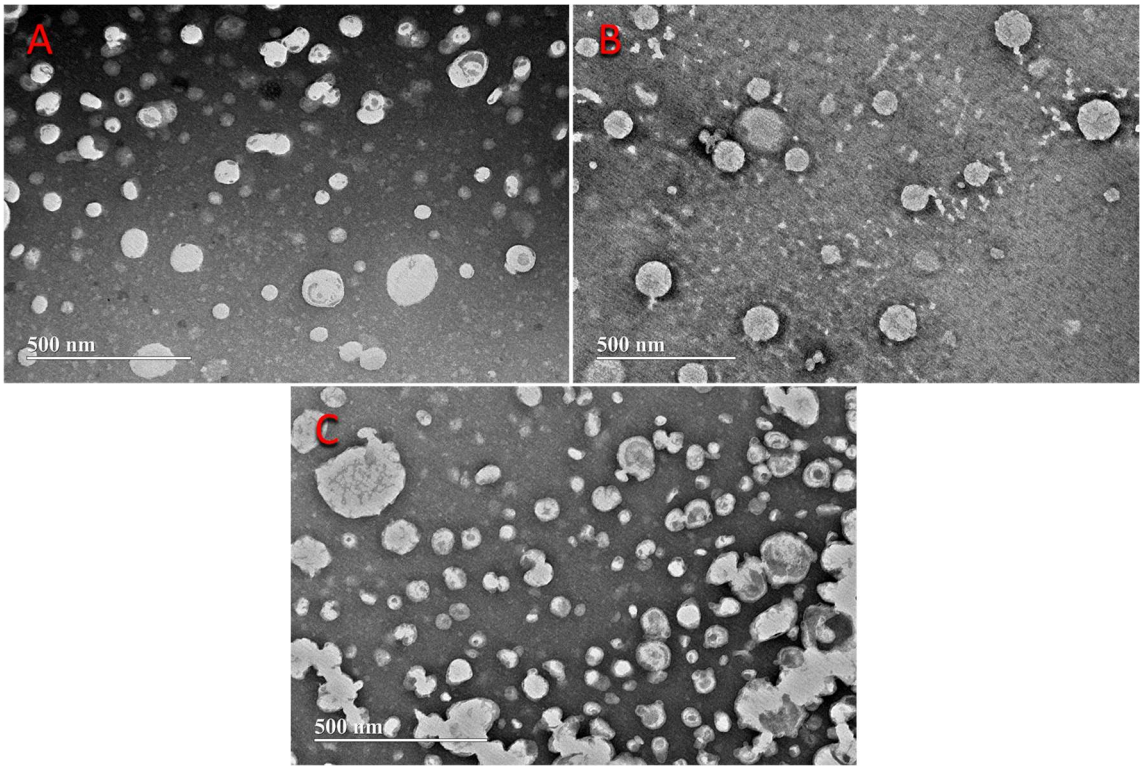


Figura 9. Nanoemulsões à base de óleo de pequi: NBR (nanogotícula sem óleo) e das nanoemulsões à base de óleo de pequi obtido pelos métodos de extração por solvente (NeS - A), prensagem à frio (NePF - B) e fervura (NeF - C). Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Barra de escala: 500 nm.

3.6. Análise de estabilidade por DLS ao longo do tempo

Após a consolidação do protocolo, as nanoemulsões foram avaliadas ao longo do tempo para observar se suas características eram mantidas quando armazenadas nas temperaturas de 4 °C e 25 °C. Sua estabilidade ao longo do tempo foi medida através de leituras por DLS nos dias 1, 5, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 (Figura 10).

É possível observar que as nanoemulsões NES, NEPF e NEF bem como o NBR mantiveram sua estabilidade durante o período avaliado e que em condições de armazenamento nas temperaturas de 4 °C e 25 °C, apresentaram resultados semelhantes, sem diferenças estatisticamente significativas.

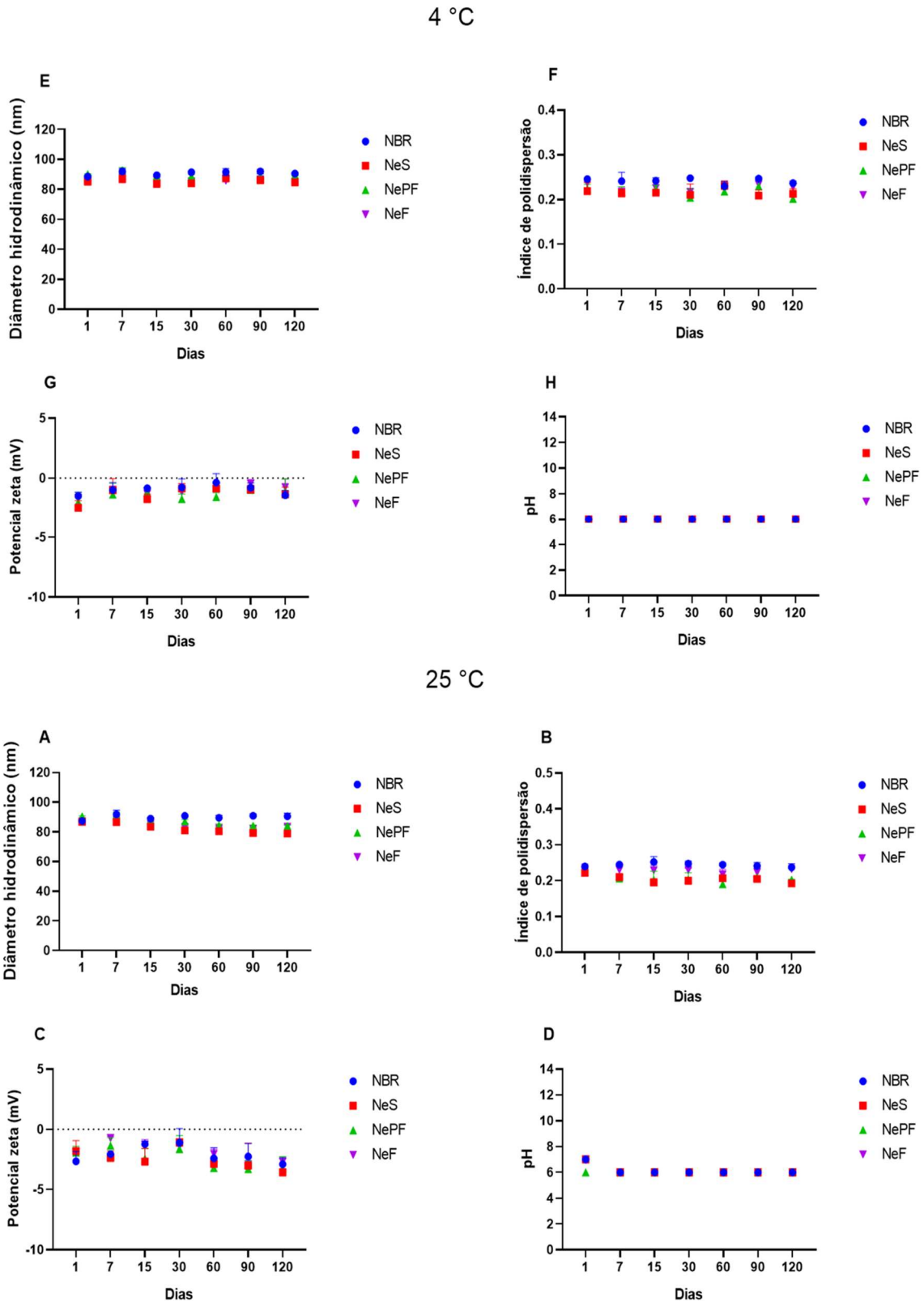


Figura 10. Avaliação da estabilidade por DLS e pH das nanoemulsões à base de óleo de pequi no período de 120 dias, armazenadas às temperaturas de 4 °C e 25°C. NBR (nanogotícula sem óleo) e das nanoemulsões à base de óleo de pequi obtido pelos métodos de extração por solvente (NeS), prensagem à frio (NePF) e fervura (NeF). Diâmetro hidrodinâmico (A/E), índice de polidispersão (B/F), potencial zeta (C/G) e pH (D/H). Os valores são expressos em média ± DP. Two-way ANOVA: não houve diferença estatística entre os grupos.

3.7. Análise das nanoemulsões à base de óleo de pequi sob condições de estresse

3.7.1. Análise das nanoemulsões à base de óleo de pequi sob diluição seriada

As amostras mantiveram estabilidade no diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta mesmo no maior fator de diluição (128 X), apresentando diferenças estatísticas em alguns pontos (Figura 11).

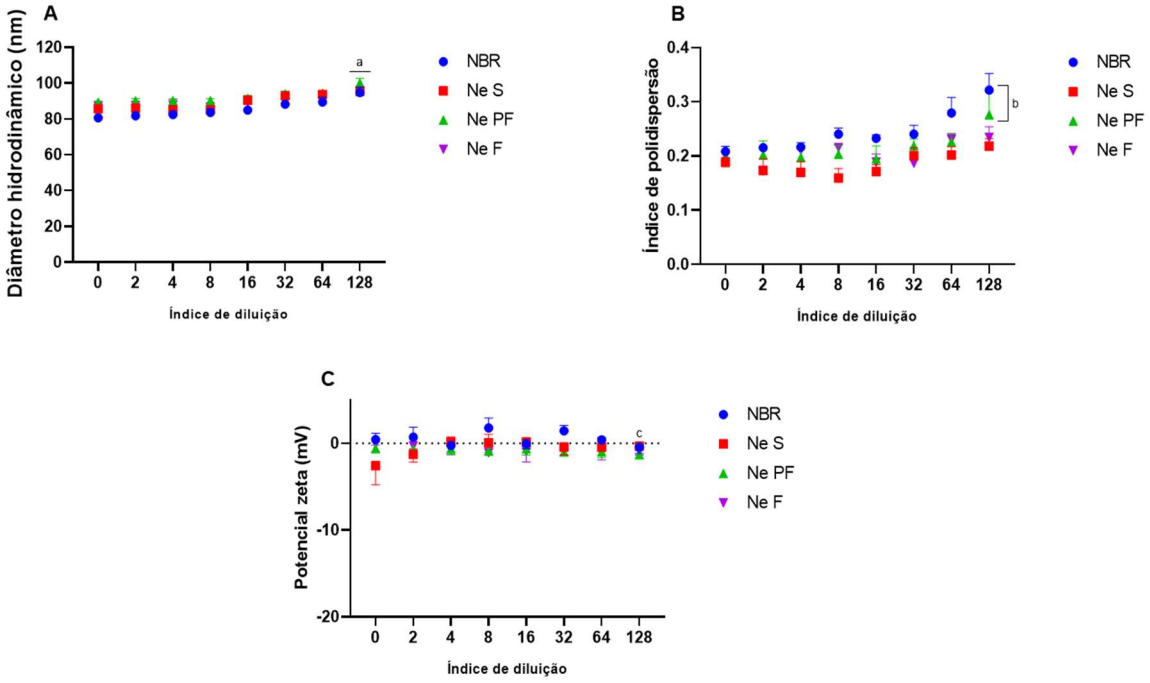


Figura 11. Avaliação da estabilidade por DLS das nanoemulsões à base de óleo de pequi em diferentes fatores de diluição. Foram avaliados o NBR (nanogotícula sem óleo) e as nanoemulsões à base de óleo de pequi obtido pelos métodos de extração por solvente (NeS), prensagem à frio (NePF) e fervura (NeF). Diâmetro hidrodinâmico (A), índice de polidispersão (B), e potencial zeta (C). Os valores são expressos em média ± DP. Two-way ANOVA: letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos: a - diferença entre índice de diluição 0 e 128 para todos os grupos $p < 0.0001$; b - diferença entre índice de diluição 0 e 128 para os grupos NBR e Ne PF, $p < 0.0001$; c - diferença entre índice de diluição 0 e 128 para o grupo NeS, $p < 0.05$.

3.7.2. Análise das nanoemulsões à base de óleo de pequi sob variação de pH

As amostras mantiveram estabilidade no diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão em toda a faixa de pH entre 3 e 11, porém o potencial zeta apresentou variações principalmente nos pontos de pH 3 ficando em torno 0, e no pH 11, em torno de –10 a –15 mV (Figura 12).

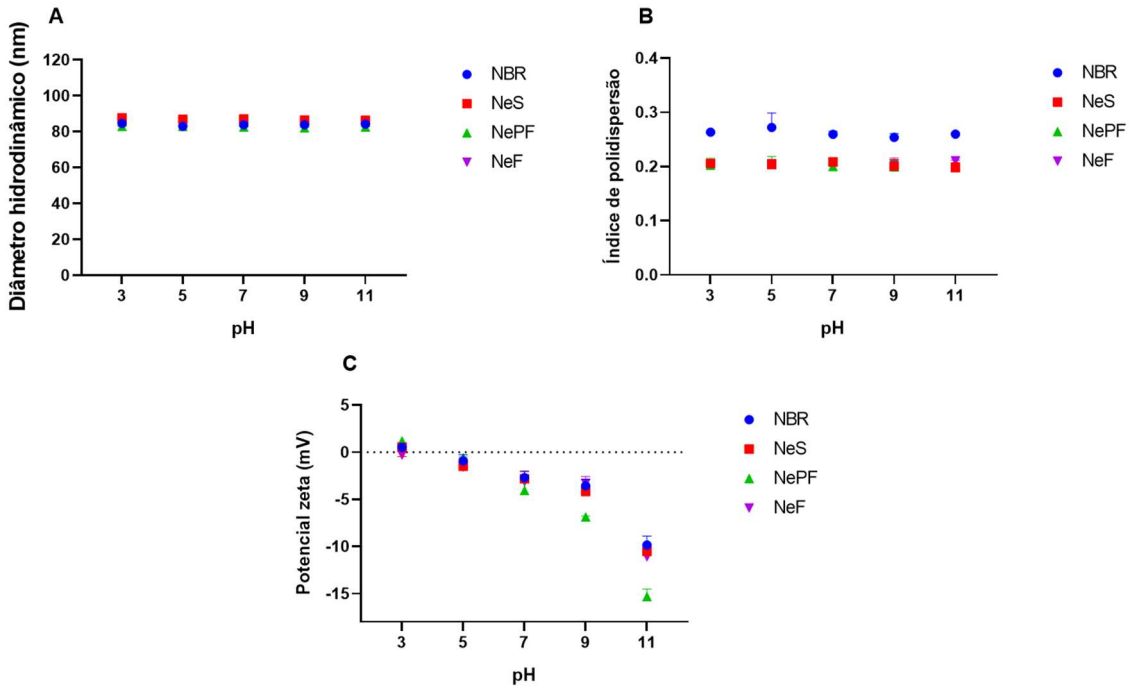


Figura 12. Avalição de estabilidade em diferentes índices de pH. Foram avaliados o NBR (nanogotícula sem óleo) e as nanoemulsões à base de óleo de pequi obtido pelos métodos de extração por solvente (NeS), prensagem à frio (NePF) e fervura (NeF). Diâmetro hidrodinâmico (A), índice de polidispersão (B), e potencial zeta (C). Os valores são expressos em média ± DP.

4. Análise da citotoxicidade das nanoemulsões à base de óleo de pequi em macrófagos *in vitro*.

Foram testadas as concentrações de 90, 180 e 360 µg/mL das nanoemulsões (controle PBS) e seus respectivos óleos livres (controle etanol) em macrófagos (RAW 264.7) pelo tempo de 24h. Pode-se observar na figura 13, nos grupos tratados com óleos livres (OS, OPF e OF), quando comparados com o controle (etanol) uma viabilidade celular maior que 100% para OS e OPF, enquanto o grupo OF entre 80-100%. Nos grupos tratados com NBR e as nanoemulsões (NeS, NePF e NeF), os valores se mantiveram próximos ao controle (PBS) apresentando uma viabilidade entre 100-80% de uma forma dose-dependente.

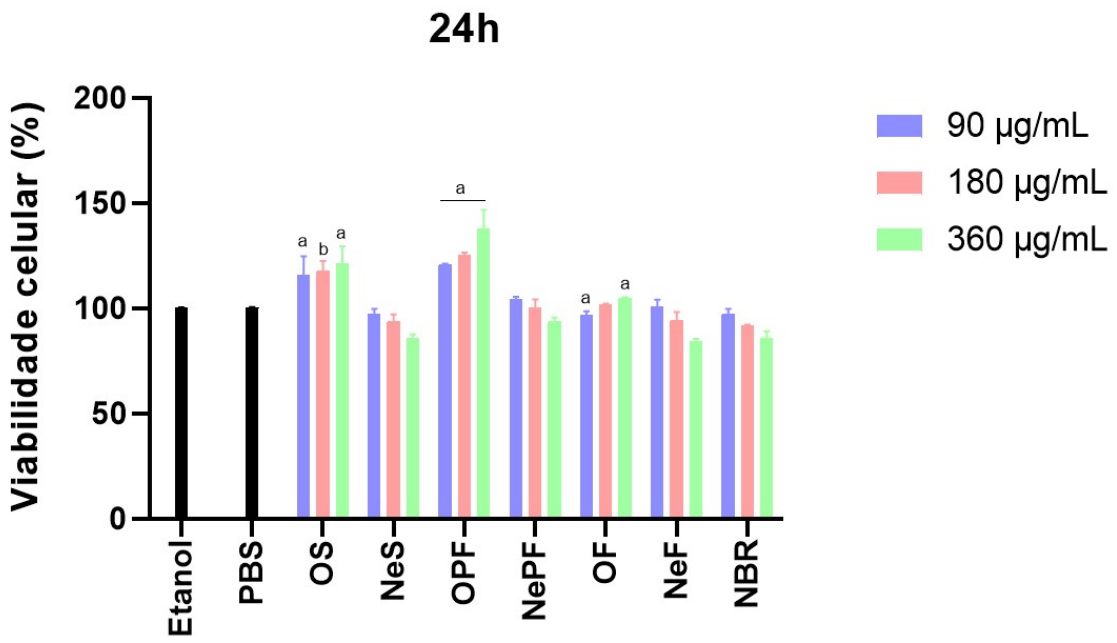


Figura 13. Avaliação de viabilidade celular por MTT comparando a NBR (nanogotícula sem óleo), nanoemulsões formuladas à base de óleo de pequi e seus respectivos óleos livres, obtidos pelos métodos de extração por solvente (NeS/OS), prensagem à frio (NePF/OPF) e fervura (NeF/OF). PBS foi utilizado como controle para as nanoemulsões, e Etanol como controle para os óleos livres. Os valores são expressos em média ± DP. Two-way ANOVA: letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos: a - diferença entre os grupos OS, OPF e OF comparados ao controle Etanol, $p < 0.0001$; b - diferença entre o grupo OS comparado ao controle Etanol, $p < 0.05$.

4.1. Microscopia óptica após tratamento

Para obtenção das imagens por microscopia óptica, as células de macrófagos foram tratadas com as nanoemulsões (Figura 14) e seus respectivos óleos livres (Figura 15), divididas em dois grupos: (1) com LPS e (2) somente meio de cultura. Foi possível observar os efeitos dos tratamentos nas estruturas das células, que se mantiveram sem grandes alterações morfológicas sendo possível observar estruturas importantes como membrana plasmática, citoplasma e núcleo. As células tratadas com LPS apresentaram

morfologia com membrana celular alongada, e presença de vacúolos no citoplasma.

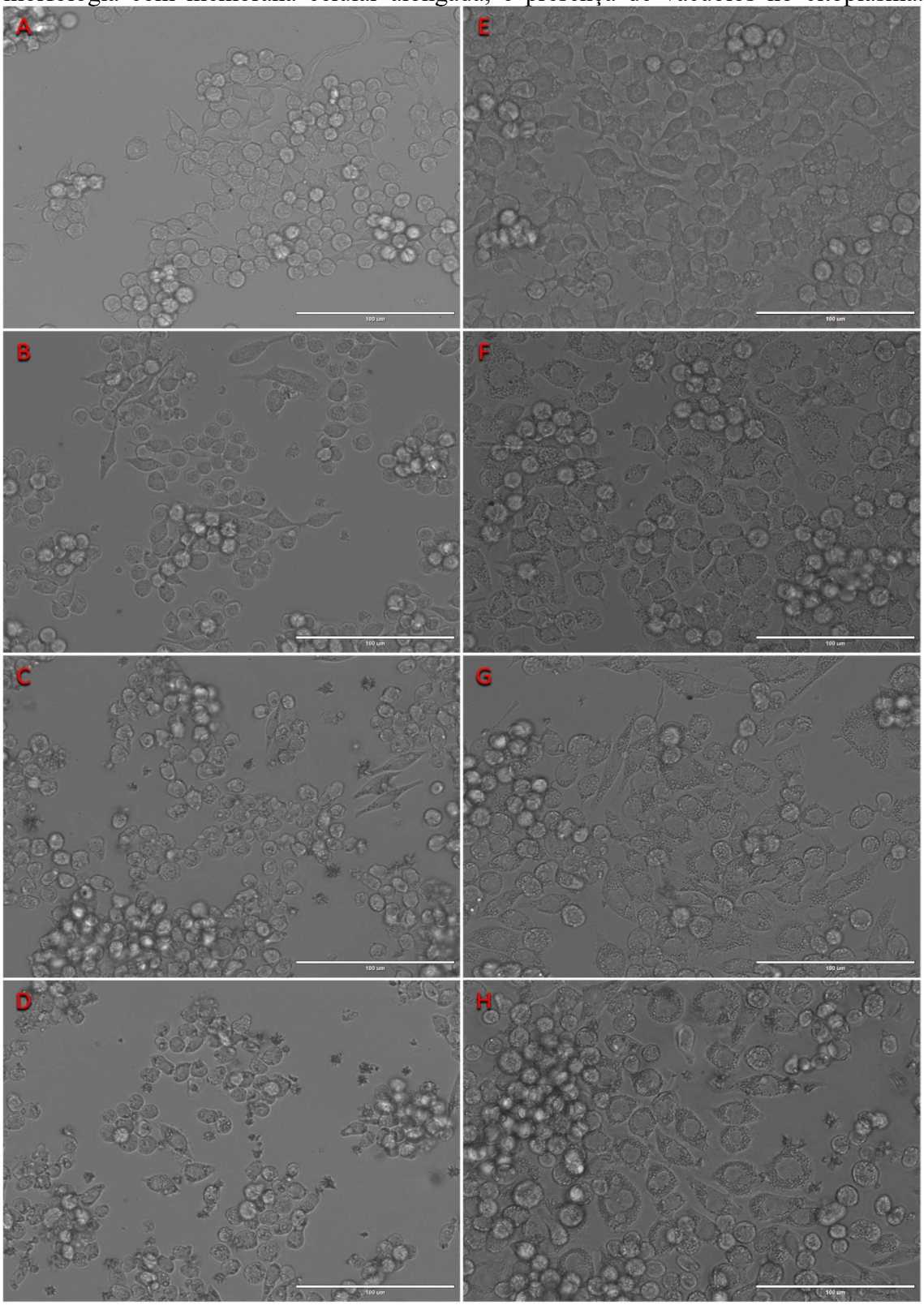


Figura 14. Macrófagos RAW 264.7 tratados com nanoemulsões à base de óleo de pequi observadas após 24h. Grupos tratados sem LPS (A-D); Grupos tratados com LPS (E-H). Tratamentos: NBR (A/E), NeS (B/F), NePF (C/G), NeS (D/H). Imagens obtidas por microscopia óptica em aumento de 40x (EVOS FL Auto). Barra de escala: 100 µm.

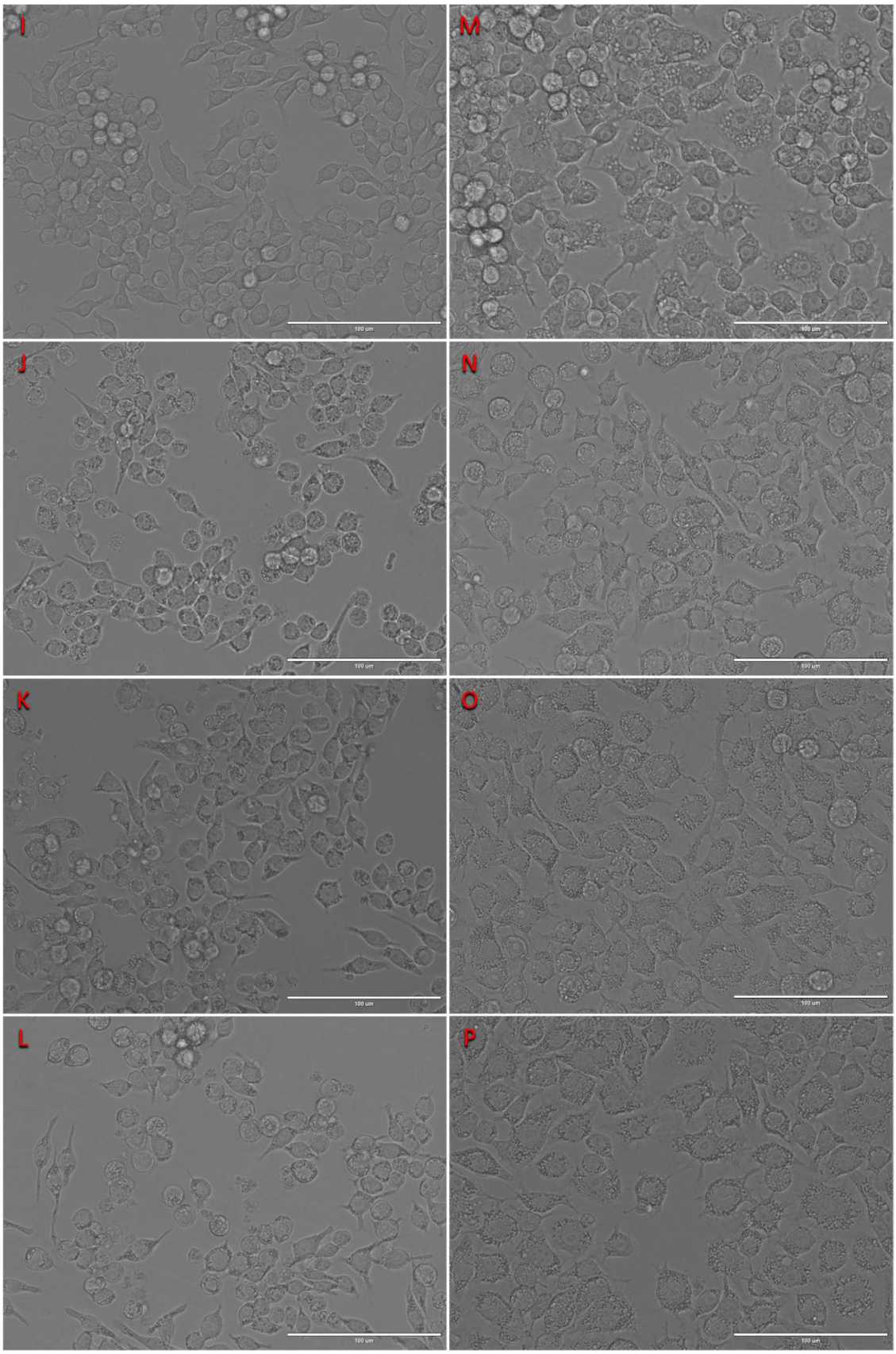


Figura 15. Macrófagos RAW 264.7 tratados com óleo de pequi livre observadas após 24h. Grupos tratados sem LPS (I-L); Grupos tratados com LPS (M-P). Tratamentos: PBS (I/M), OS (J/N), OPF (K/O), OF (L/P). Imagens obtidas por microscopia óptica em aumento de 40x (EVOS FL Auto). Barra de escala: 100 µm.

4.2. Mapeamento de citocinas por ensaio de ELISA

As concentrações das citocinas presentes nos grupos tratados foram calculadas por meio da curva de calibração (pg/ml). Não foi possível calcular a concentração dos grupos com valores de absorbância abaixo da curva de calibração, portanto os mesmos estão indicados como zero nos gráficos abaixo (Figura 16). Para a citocina IL-10 nas amostras tratadas sem LPS (A) apenas o grupo OF apresentou produção, enquanto nas amostras com LPS (B) não houve diferença significativa entre os tratamentos quando comparados ao controle PBS. Nos grupos de IL-6, o grupo tratado com LPS (D) apresentou diferença estatística apenas na amostra NeF, porém os controles não foram expressos em ambos os tratamentos (C/D). Por fim, os grupos com IL-12 apresentaram os controles de PBS em ambas as amostras com e sem LPS, apresentando diferença estatística entre os grupos NeS, NePF e NBR (F).

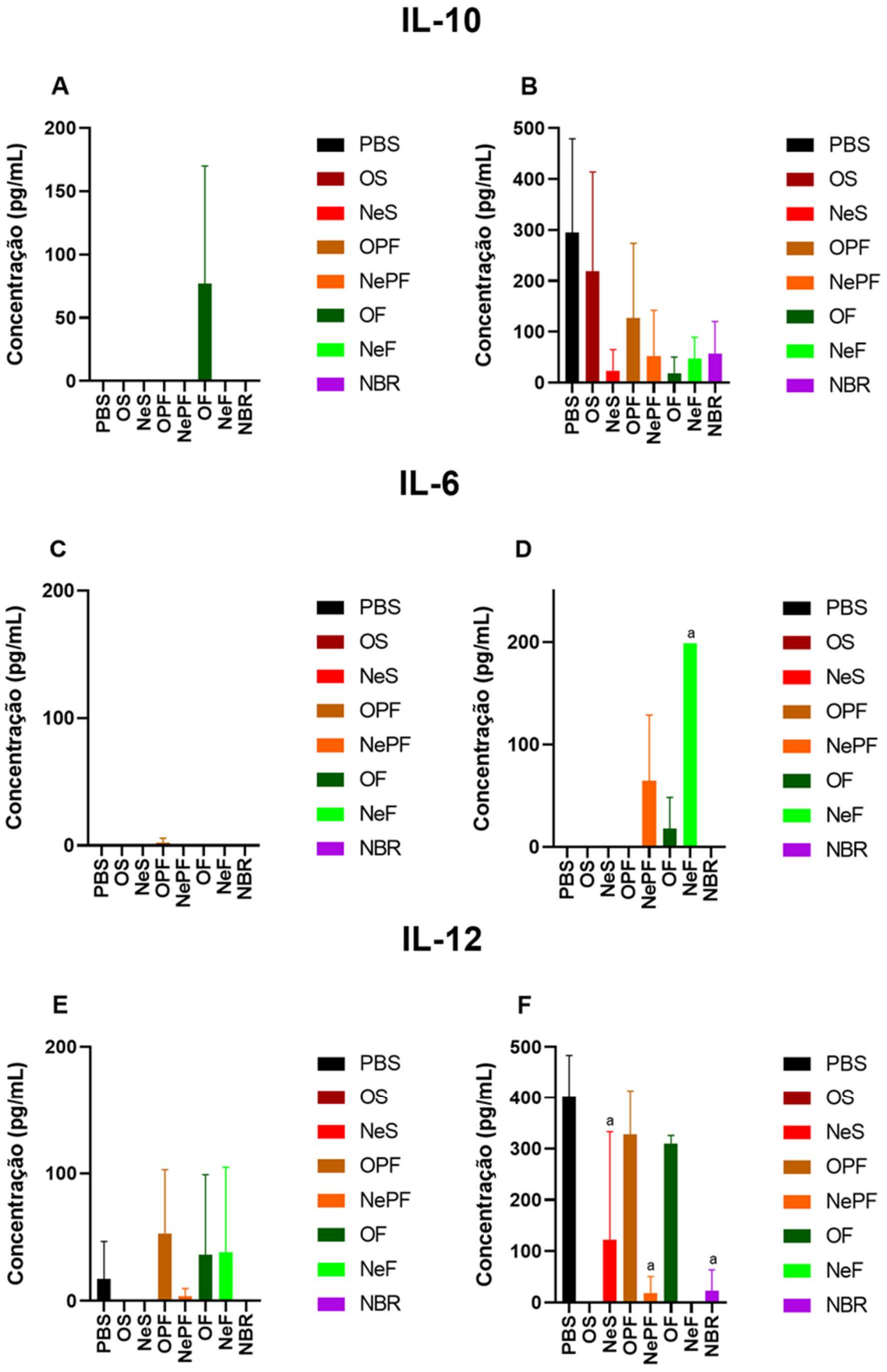

IL-10
A
B
Concentração (pg/mL)
PBS
OS
NeS
OPF
NePF
OF
NeF
NBR
IL-6
C
D
a
IL-12
E
F
a
a
a

Figura 16. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-12 (p70), e anti-inflamatória IL-10 em macrófagos tratados por 24h com NBR (nanogotícula sem óleo), nanoemulsões formuladas à base de óleo de pequi e seus respectivos óleos livres, obtidos pelos métodos de extração por solvente (NeS e OS), prensagem à frio (NePF e OPF) e fervura (NeF e OF) na concentração de 360 µg/mL. Concentrações calculadas a partir de curva de calibração (pg/mL). Grupos tratados sem LPS A/C/E. Grupos tratados com LPS: B/D/F. Valores expressos em média ± DP. One-Way ANOVA: letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos: a - diferença entre os grupos NeF (D), NeS, NePF e NBR (F), comparados com o controle PBS $p < 0.05$.

5. Discussão

O presente trabalho teve como objetivo investigar as diferenças presentes no óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*), quanto ao seu método de extração, bem como avaliar sua utilização dentro de nanoemulsões não somente como componente da fase oleosa, como também visando seus efeitos em macrófagos utilizando modelos *in vitro*.

Na tabela 3, estão apresentados os índices de acidez (IA) e índice de peróxido (IP) dos três tipos de óleos de pequi. Em óleos comestíveis, estes índices são relacionados ao padrão de qualidade comumente analisados, em que amostras fora dos padrões estabelecidos, podem ser consideradas rancificadas e não recomendadas para consumo (44). Embora não existam parâmetros específicos sobre IA e IP para o óleo de pequi, o Códex (2001) (45) relata limites máximos para óleos vegetais de diferentes espécies. Para óleos prensados a frio e não refinados, estes limites máximos são de 4,0 mg $KOH \cdot g^{-1}$ e 15 $mEq \cdot kg^{-1}$ para IA e IP, respectivamente. Todos os resultados dos três tipos de óleos estão dentro dos parâmetros estabelecidos pelo Códex, com exceção do óleo obtido pelo método de extração por solvente (OS) para IA, que ficou acima do preconizado. O menor IA foi do OF, enquanto OPF e OF apresentaram os menores resultados de IP, sem diferença estatística entre si. Autores que extraíram óleos de pequi por diferentes métodos encontraram resultados com variação de 1,44 a 5,44 mg $KOH \cdot g^{-1}$ para IA e 1,07 a 7,94 $mEq \cdot kg^{-1}$ para IP (39,46). Portanto, os óleos extraídos por diferentes tipos de métodos avaliados neste estudo não apresentam características próprias de rancificação. Embora o IA do método de extração por solvente esteja levemente acima do Códex, não podemos apontá-lo claramente como impróprio, pois outros óleos de pequi descritos na literatura exibiram valores superiores ao relatado aqui e, além disso, o IP deste método de extração está de acordo com o regulamentado. Os óleos com melhores desempenhos foram OPF e OF por terem um perfil com menor estado oxidativo, evidenciando alto grau de conservação.

A quantificação de ácidos graxos por cromatografia gasosa identificou a presença de ácido oleico, palmítico e linoleico estão presentes em proporções características descritas na literatura (47). Os metabólitos encontrados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) (Tabela 2) apontaram dentre as biomoléculas identificadas, a presença de β-sitosterol (48) e ácido caprílico (49) moléculas com atividades biológicas antitumorais e anti-inflamatórias, demonstrando aplicabilidade de óleos naturais em tratamentos variados, além de vantagens na associação destes óleos à nanoemulsões (47,50,51). Apesar de algumas dessas substâncias serem comuns entre os óleos, houve diferença na quantidade de moléculas identificadas entre os óleos obtidos por diferentes métodos de extração, sendo 15 para solvente (OS), 11 para prensagem à frio (OPF), e 12 para fervura (OF).

A análise de RMN detectou a presença dos sinais na faixa entre 172,89 e 173,32 pode ser atribuída à presença de um grupo carbonila em uma cadeia de ácido graxo. A análise quantitativa realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de

massas (GC-MS) revelou o ácido oleico e o ácido palmítico como os principais compostos do óleo de pequi após o uso de três métodos de extração (43), sem diferença significativa entre as amostras. Os resultados obtidos a partir dos espectros de RMN (Figuras 6 e 7) estão de acordo com a análise de GC-MS (Tabela 1).

Após a caracterização do óleo, o próximo passo foi a formulação das nanoemulsões à base dos óleos de pequi. A lecitina de ovo foi escolhida como surfactante por sua composição e biocompatibilidade, uma vez que se assemelha muito à membrana celular também constituída por fosfolipídios (52).

As nanoemulsões obtidas apresentaram o diâmetro hidrodinâmico médio (DH ou tamanho médio das nanogotículas) de 90 nm, PDI estável entre 0,200 – 0,300 bem como o potencial zeta parcialmente neutro devido a presença do estearato de polioxietileno 40 na formulação (53), sem diferença significativa entre as amostras (Figura 10). As imagens das nanoemulsões obtidas por MET mostraram diferença quando correlacionadas ao PDI, apresentando a presença de populações menos polidispersas, podendo estar relacionado ao preparo das amostras onde as nanogotículas podem ser afetadas pelo processo de secagem. Estudos com nanoemulsões utilizando lecitina de ovo como surfactante apresentaram características similares, mantendo sua estabilidade por pelo menos 120 dias podendo variar no PDI e potencial zeta a depender da sua composição (54,55). A diferença nas temperaturas de armazenamento (4 °C e 25 °C) não apresentou impacto significativo na estabilidade das amostras do presente estudo após 120 dias de armazenamento.

As análises seguintes à formulação das nanoemulsões tiveram como objetivo avaliar sua estabilidade sob condições de estresse, por diluição seriada e variação de pH. Como observado na figura 11, as amostras (NeS, NePF e NeF) mantiveram sua estabilidade ao serem avaliadas por DLS sob diferentes fatores de diluição, onde mesmo no maior valor (128 X), apenas discretas mudanças foram observadas no DH, PDI e potencial zeta. Em seu estudo, Ombredane e colaboradores (2020) (33) relataram estabilidade semelhante no estudo de diluição seriada nos valores de DH e PDI, apresentando potencial zeta variando aproximadamente entre -18 mV e -45 mV. Para a titulação de pH, suas nanoemulsões variaram entre 0 mV (pH 3) e -38 mV (pH 11) enquanto pode-se observar um comportamento diferente das nanoemulsões NeS, NePF e NeF (Figura 12), obtendo valores próximos a 0 mV (pH 3) e -15 mV (pH 11). Tais variações no valor do potencial zeta decorrentes da alteração de pH são esperadas, devido à presença da lecitina de ovo utilizada como surfactante das nanoemulsões e da presença de estearato de polioxietileno 40 (58).

Finalizadas as análises físico-químicas das nanoemulsões, foi dado seguimento para os testes *in vitro*. A avaliação de viabilidade celular foi realizada com as nanoemulsões e óleos livres em macrófagos.

O ensaio de MTT mostrou que a concentração de 360 µg/mL dos óleos livres não afetou a viabilidade das células de macrófagos após 24h de exposição, tendo um resultado superior a 100%, com exceção do grupo OF que ficou próximo a 90% na maior concentração. Já os grupos das nanoemulsões apresentaram valores de viabilidade celular próximos a 80% (Figura 13). Mudanças nos grupos tratados com LPS puderam ser observadas, onde as células estimuladas apresentaram membrana celular e citoplasma alongados, além de pequenos vacúolos no interior das células (Figuras 15 e 16). Ombredane e colaboradores (2020) utilizando nanoemulsões com óleo de pequi obtido por prensagem à frio na concentração de 360 µg/mL, avaliaram a viabilidade celular em

células de câncer de mama incubadas em estufa após 24h, as quais apresentaram valores de viabilidade celular inferiores próximos a 65%, sugerindo toxicidade das nanoemulsões à base de óleo de pequi para estas células (33). Pinheiro e colaboradores (2022) também avaliaram a toxicidade de nanoemulsões à base de óleo de pequi extraído por prensagem à frio seguido de filtragem na concentração de 360 µg/mL, em células de macrófagos J774.16 incubadas em estufa após 24h, obtendo valores de viabilidade celular próximos a 100% (56).

A figura 16 apresenta os resultados obtidos com as análises de citocinas IL-10, IL-6 e IL-12 (p70) por ensaio de ELISA. Os tratamentos nos grupos sem LPS das citocinas IL-10 e IL-6 (Figura 16 A e C) não apresentaram produção nos grupos controle, sendo necessária uma melhor avaliação através de novos ensaios para a comparação entre os demais tratamentos com as nanoemulsões e os óleos livres. O grupo IL-6 sem LPS (E) apresentou produção das citocinas com exceção dos tratamentos OS, NeS, e NBR, sem diferença significativa entre os tratamentos. O grupo IL-10 com LPS (B) apresentou produção da citocina em todos os tratamentos, porém sem diferença significativa comparada ao controle PBS. No grupo IL-6 com LPS (D) apenas os tratamentos NePF, OF e NeF apresentaram produção, porém a ausência da produção desta citocina no grupo controle PBS indica necessidade de um novo ensaio para comparação dos tratamentos. Para o grupo IL-12 com LPS (F) os tratamentos OS e NeF apresentaram redução total na produção de IL-12, enquanto em NeS e OF apenas reduziram a produção comparada ao controle PBS. Além disso, NePF e NBR apresentaram baixa produção desta citocina, sugestivo de possível modulação anti-inflamatória presente nesses tratamentos, uma vez que a IL-12 é uma das citocinas envolvidas no processo pró-inflamatório (9,57).

6. Conclusão

Neste trabalho, foram avaliados os efeitos dos métodos de extração do óleo de pequi em sua composição físico-química, sua citotoxicidade em sua forma livre e incorporado à nanoemulsões, caracterizando-as e avaliando seus efeitos em macrófagos *in vitro*. A caracterização dos óleos apresentou proporções semelhantes nos resultados de perfil lipídico entre as amostras OS, OPF e OF, bem como a presença de metabólitos comuns entre os mesmos. As nanoemulsões NeS, NePF e NeF formuladas utilizando os diferentes óleos se mantiveram estáveis por 120 dias, indicando que os métodos de extração não influenciaram no processo de nanoencapsulação, bem como sua estabilidade ao longo do tempo ou sob condições de estresse (diluição e variação de pH). Sua citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 apresentou valores de viabilidade celular > 80%, demonstrando a aplicabilidade das nanoemulsões para testes *in vitro* com estas células. Apesar de iniciais, os ensaios de ELISA demonstraram indícios de que as nanoemulsões à base de óleo de pequi podem apresentar modulação no perfil pró-inflamatório das células através da diferença de produção das citocinas IL-10, IL-6 e IL-12. Em vista dos resultados promissores obtidos com a formulação das nanoemulsões à base de óleo de pequi, torna-se necessário conduzir estudos complementares a fim de aprofundar a avaliação de seu potencial anti-inflamatório, para uma compreensão abrangente de seus efeitos e sua viabilidade em aplicações futuras.

7. Referências

1. Leuti A, Fazio D, Fava M, Piccoli A, Oddi S, Maccarrone M. Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Nov 18];159:133–69. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32628989/

2. Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. Vet World [Internet]. 2018 May 15 [cited 2023 Nov 18];11(5):627–35. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29915501/

3. Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E. Markers of Inflammation. Methods Mol Biol [Internet]. 2018 [cited 2023 Nov 18];1803:57–79. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29882133/

4. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. Biochem Pharmacol [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Nov 18];180. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32653589/

5. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2014 [cited 2023 Nov 18];1843(11):2563–82. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24892271/

6. Gouwy M, Struyf S, Proost P, Van Damme J. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. Cytokine Growth Factor Rev. 2005;16(6):561–80.

7. GERMANO, J. L. et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in south america: A systematic review and meta-analysis. Ciencia e Saude Coletiva, v. 26, p. 5371–5382, 2021.

8. MINISTERIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: Incidencia de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro,RJ: INCA/Ministério da Saúde, 2019. v. 1

9. NUNES, V. M. R.; DA SILVA, P. F. Uso de antiflamatórios não esteroidais em pacientes diagnosticados com hipertensão arterial: uma revisão integrativa / Use of non-steroid anti-flamatory agents in patients diagnosed with arterial hypertension an integrative review. Brazilian Journal of Development, v. 8, n. 6, p. 43928–43947, 6 jun. 2022.

10. FACKLAM AUGUSTO, M. et al. Fisiopatologia e tratamento da artrite reumatoide: uma revisão narrativa Pathophysiology and treatment of rheumatoid arthritis: a narrative review Fisiopatología y tratamiento de la artritis reumatoide: una revisión narrativa. Revista Eletronica Acervo Médico, v. 9, p. 1–6, 2022.

11. Bereketoglu C, Pradhan A, Olsson PE. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) cause male-biased sex differentiation in zebrafish. Aquat Toxicol [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2023 Nov 18];223. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32315829/

12. Pereira-Leite C, Nunes C, Jamal SK, Cuccovia IM, Reis S. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Therapy: A Journey Toward Safety. Med Res Rev [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2023 Nov 18];37(4):802–59. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28005273/

13. Wongrakpanich S, Wongrakpanich A, Melhado K, Rangaswami J. A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. Aging Dis [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2023 Nov 18];9(1):143–50. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29392089/

14. Ko LTY, Albuquerque CN de. A evolução do mercado de anti-inflámatorios não esteroidais (AINES) e o papel do farmacêutico frente á automedicação [Internet]. 2018 [cited 2023 Nov 21]. Available from: https://bdta.abcd.usp.br/item/002954756

15. Silva A de J, Silva ML, Teixeira HS. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs being used indiscriminately by residents of a municipality in the interior of Bahia – Brazil. Research, Society and Development [Internet]. 2022 Dec 15 [cited 2023 Nov 20];11(16):e475111638441–e475111638441. Available from: https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/38441

16. Romaine AP, Loureiro FF, Silva FVM da. Reações adversas no uso de Anti-inflamatório não esteroidais (AINES) no Brasil: uma revisão sistemática / Adverse reactions to nonsteroidal Anti-Inflammatory drugs (NSAIDS) in Brazil: a systematic review. Brazilian Journal of Development [Internet]. 2021 Jun 2 [cited 2023 Nov 20];7(6):54653–61. Available from: https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/30709

17. Zhu F, Du B, Xu B. Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. Crit Rev Food Sci Nutr [Internet]. 2018 May 24 [cited 2023 Nov 18];58(8):1260–70. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28605204/

18. Dhingra AK, Chopra B, Bonthagarala B. Natural Anti-Inflammatory Agents: Recent Progress and Future Perspectives. Ann Pharmacol Pharm. 2018 Sep 4;3(5):1158.

19. Ribeiro VP, Arruda C, El-Salam MA, Bastos JK. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. Pharm Biol [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2023 Nov 18];56(1):253–68. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13880209.2018.1454480

20. Lin TK, Zhong L, Santiago JL. Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. Int J Mol Sci [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2023 Nov 18];19(1). Available from: /pmc/articles/PMC5796020/

21. Bordoni L, Fedeli D, Nasuti C, Maggi F, Papa F, Wabitsch M, et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Nigella sativa Oil in Human Pre-Adipocytes. Antioxidants (Basel) [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2023 Nov 18];8(2). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30823525/

22. Torres • L R O, Santana FC, Shinagawa FB, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and functional potential of pequi (Caryocar spp.), a native Brazilian fruit: a

review ; Compuestos bioactivos y funcionalidad potencial del pequi (Caryocar spp.), fruta nativa brasileña. Revisión. GRASAS Y ACEITES [Internet]. [cited 2023 Nov 17];69(2). Available from: https://doi.org/10.3989/gya.1222172

23. Guedes AMM, Antoniassi R, De Faria-Machado AF. Pequi: A Brazilian fruit with potential uses for the fat industry. OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2023 Nov 18];24(5). Available from: https://www.researchgate.net/publication/319545396_Pequi_A_Brazilian_fruit_with_potential_uses_for_the_fat_industry

24. Physicochemical and antioxidant properties of the pequi (Caryocar brasiliense Camb.) almond oil obtained by handmade and cold-pressed processes. - Portal Embrapa [Internet]. [cited 2023 Nov 18]. Available from: https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1049137/physicochemical-and-antioxidant-properties-of-the-pequi-caryocar-brasiliense-camb-almond-oil-obtained-by-handmade-and-cold-pressed-processes

25. Fábio F, De Oliveira B. Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do óleo da polpa de pequi Caryocar coriaceum Wittm na artrite induzida por zymosan em ratos. 2013 [cited 2023 Nov 22]; Available from: http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/7696

26. Junior AJ, Leitão MM, Bernal LPT, dos Santos E, Kuraoka-Oliveira ÂM, Justi P, et al. Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Caryocar brasiliense. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem [Internet]. 2020 Apr 9 [cited 2023 Nov 18];19(3):313–22. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30961515/

27. Miranda-Vilela AL, Pereira LCS, Gonçalves CA, Grisolia CK. Pequi fruit (Caryocar brasiliense Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. Nutr Res [Internet]. 2009 Dec [cited 2023 Nov 18];29(12):850–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19963158/

28. Wilson RJ, Li Y, Yang G, Zhao CX. Nanoemulsions for drug delivery. Particuology. 2022 May 1;64:85–97.

29. Watkins R, Wu L, Zhang C, Davis RM, Xu B. Natural product-based nanomedicine: recent advances and issues. Int J Nanomedicine [Internet]. 2015 Sep 28 [cited 2023 Nov 18];10:6055–74. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26451111/

30. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. Molecules [Internet]. 2020 [cited 2023 Nov 18];25(1):112. Available from: /pmc/articles/PMC6982820/

31. Barani M, Bilal M, Sabir F, Rahdar A, Kyzas GZ. Nanotechnology in ovarian cancer: Diagnosis and treatment. Life Sci [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2023 Nov 18];266. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33340527/

32. Wang L, Li X, Zhang G, Dong J, Eastoe J. Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations. J Colloid Interface Sci. 2007 Oct 1;314(1):230–5.

33. Ombredane AS, Araujo VHS, Borges CO, Costa PL, Landim MG, Pinheiro AC, et al. Nanoemulsion-based systems as a promising approach for enhancing the antitumoral activity of pequi oil (Caryocar brasilense Cambess.) in breast cancer cells. J Drug Deliv Sci Technol. 2020 Aug 1;58:101819.

34. Leite CRM, Fernandes LA, Rosa MFF, Silva M dos S, Binsfeld PC, Campos SJM, et al. E-book Ecossistema de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Saúde. 2022. 211–261 p.

35. Anselmo G, Paulo J, De Morais C, Bentes R, Azevedo DE. NANOTECNOLOGIA: CONSIDERAÇÕES EM MATERIAIS, SAÚDE E MEIO AMBIENTE. Brasília; 2022. 45–56 p.

36. Kumar M, Bishnoi RS, Shukla AK, Jain CP. Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. Prev Nutr Food Sci [Internet]. 2019 [cited 2023 Nov 18];24(3):225. Available from: /pmc/articles/PMC6779084/

37. Coutinho D de S, Pires J, Gomes H, Pohlmann AR, Guterres SS, E Silva PMR, et al. Pequi (Caryocar brasiliense Cambess)-Loaded Nanoemulsion, Orally Delivered, Modulates Inflammation in LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice. Pharmaceutics [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Nov 18];12(11):1–17. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33187057/

38. Carneiro CR, Alhaji AM, da Silva CAS, de Sousa R de CS, Monteiro S, Coimbra JS dos R. Potential Challenges of the Extraction of Carotenoids and Fatty Acids from Pequi (Caryocar brasiliense) Oil. Foods [Internet]. 2023 May 1 [cited 2023 Nov 17];12(9). Available from: /pmc/articles/PMC10178395/

39. Ribeiro MC, Vilas Boas EV de B, Riul TR, Pantoja L, Marinho HA, Santos AS dos. Influence of the extraction method and storage time on the physicochemical properties and carotenoid levels of pequi (Caryocar brasiliense Camb.) oil. Food Science and Technology [Internet]. 2012 May 10 [cited 2023 Nov 18];32(2):386–92. Available from: https://www.scielo.br/j/cta/a/mRndF3rSwqVwzXHFZFfht5d/?lang=en

40. Yara-Varón E, Li Y, Balcells M, Canela-Garayoa R, Fabiano-Tixier AS, Chemat F. Vegetable Oils as Alternative Solvents for Green Oleo-Extraction, Purification and Formulation of Food and Natural Products. Molecules. 2017 Sep 5;22(9):1474.

41. Ramos-Souza C, Nass P, Jacob-Lopes E, Zepka LQ, Braga ARC, De Rosso VV. Changing Despicable Me: Potential replacement of azo dye yellow tartrazine for pequi carotenoids employing ionic liquids as high-performance extractors. Food Research International. 2023 Dec 1;174:113593.

42. ÓLEO DE PEQUI: QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA, TEOR DE CAROTENÓIDES E USO EM ANIMAIS COM CARÊNCIA DE VITAMINA A.

43. Santos ONA, Folegatti MV, Dutra LM, Andrade IP de S, Fanaya ED, Lena BP, et al. Tracking lipid profiles of Jatropha curcas L. seeds under different pruning types and water managements by low-field and HR-MAS NMR spectroscopy. Ind Crops Prod. 2017 Dec 15;109:918–22.

44. Ribeiro PPC, Damasceno KSF da SC, de Veras BO, de Oliveira JRS, Lima VL de M, de Assis CRD, et al. Chemical and biological activities of faveleira (Cnidoscolus quercifolius Pohl) seed oil for potential health applications. Food Chem. 2021 Feb 1;337:127771.

45. Food and Agriculture Organization ;, Organization WH. Codex alimentarius, Volume 8: fats, oils and related products. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) [Internet]. 2001 [cited 2023 Nov 30];81. Available from: https://books.google.com/books/about/Codex_Alimentarius.html?hl=pt-BR&id=OpggG_hDaXsC

46. Ferreira BS, De Almeida CG, Faza LP, De Almeida A, Diniz CG, Da Silva VL, et al. Comparative Properties of Amazonian Oils Obtained by Different Extraction Methods. Molecules 2011, Vol 16, Pages 5875-5885 [Internet]. 2011 Jul 13 [cited 2023 Nov 24];16(7):5875–85. Available from: https://www.mdpi.com/1420-3049/16/7/5875/htm

47. Deus TN de, CPF:69393664153, http://lattes.cnpq.br/1361536479037506. EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEO DO PEQUI (Caryocar brasiliensis Camb.) PARA O USO SUSTENTÁVEL EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS ÓLEO/ÁGUA (O/A). 2008 Dec 15 [cited 2023 Nov 17]; Available from: http://tede2.pucgoias.edu.br:8080/handle/tede/2591

48. Bouic PJD, Clark A, Lamprecht J, Freestone M, Pool EJ, Liebenberg RW, et al. The effects of B-sitosterol (BSS) and B-sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. Int J Sports Med [Internet]. 1999 [cited 2023 Nov 29];20(4):258–62. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10376483/

49. Altinoz MA, Ozpinar A, Seyfried TN. Caprylic (Octanoic) Acid as a Potential Fatty Acid Chemotherapeutic for Glioblastoma. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2020 Aug 1;159:102142.

50. De Almeida DP, Da Capela Pompilio A, Lima AFM, De Almeida NC, Aparecida CL. Biological activities of pequi (Caryocar brasiliense Camb.) pulp oil. Multiple Biological Activities of Unconventional Seed Oils. 2022 Jan 1;257–67.

51. Torres LRO, Santana FC, Shinagawa FB, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and functional potential of pequi (Caryocar spp.), a native brazilian fruit: A review. Grasas y Aceites. 2018 Apr 1;69(2).

52. Prasad C, Bhatia E, Banerjee R. Curcumin Encapsulated Lecithin Nanoemulsions: An Oral Platform for Ultrasound Mediated Spatiotemporal Delivery of Curcumin to the Tumor. Scientific Reports 2020 10:1 [Internet]. 2020 May 22 [cited 2023 Nov 17];10(1):1–15. Available from: https://www.nature.com/articles/s41598-020-65468-1

53. Devalapally H, Zhou F, Mcdade J, Goloverda G, Owen A, Hidalgo IJ, et al. (electronic) Drug Delivery. 2015 [cited 2023 Nov 17];22(4):467–74. Available from: https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=idrd20http://informahealthcare.com/

54. Jiang SP, He SN, Li YL, Feng DL, Lu XY, Du YZ, et al. Preparation and characteristics of lipid nanoemulsion formulations loaded with doxorubicin. Int J Nanomedicine [Internet]. 2013 Aug 17 [cited 2023 Nov 17];8:3141. Available from: /pmc/articles/PMC3753155/

55. Ombredane AS, Araujo VHS, Borges CO, Costa PL, Landim MG, Pinheiro AC, et al. Nanoemulsion-based systems as a promising approach for enhancing the antitumoral activity of pequi oil (Caryocar brasilense Cambess.) in breast cancer cells. J Drug Deliv Sci Technol. 2020 Aug 1;58.

56. Pinheiro AC, Ombredane AS, Pinheiro WO, Andrade LR, Silva VRP, Felice GJ, et al. Evaluation of Biocompatibility, Anti-Inflammatory, and Antinociceptive Activities of Pequi Oil-Based Nanoemulsions in In Vitro and In Vivo Models. Nanomaterials (Basel) [Internet]. 2022 Nov 30 [cited 2023 Nov 17];12(23). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36500883

57. Guo Y, Cao W, Zhu Y. Immunoregulatory Functions of the IL-12 Family of Cytokines in Antiviral Systems. Viruses 2019, Vol 11, Page 772 [Internet]. 2019 Aug 22 [cited 2023 Nov 29];11(9):772. Available from: https://www.mdpi.com/1999-4915/11/9/772/htm

58. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? Journal of Controlled Release. 2016 Aug 10;235:337–51.

59. Queiroz, Jaluza Luana Carvalho de. Encapsulação de carotenoides: um estudo do efeito na atividade antioxidante e anti-inflamatória no tecido adiposo / Jaluza Luana Carvalho de Queiroz. - 2022. 112 f.: il.

60. GOMES, T. K. C.; OLIVEIRA, S. L. The role of essential fatty acids on the eicosanoids profi le and its impact on immune response. Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP, v. 35, n. 1, p. 167-186, abr. 2010.

61. PECIAL, S. et al. Artrite Reumatóide: Diagnóstico e Tratamento. Revista Brasileira de Reumatologia, v. 44, n. 6, p. 435–442, dez. 2004.

62. MUELLER, A. L. et al. Recent advances in understanding the pathogenesis of rheumatoid arthritis: New treatment strategies. CellsMDPI, , 1 nov. 2021.

63. MOTA, L. M. H. et al. Diretrizes para o tratamento de artrite reumatóide. Revista Brasileira de Reumatologia, v. 53, n. 2, p. 158–183, 12 abr. 2013.

64. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Artrite Reumatoide. Brasília, DFCONITEC Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS, , 1 jun. 2020.