UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

ANA PAULA STRACK MARINHO

# NADES COMO COMPONENTE ESTRUTURAL DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS DE COPRODUTOS DO CERRADO: REDIRECIONAMENTO FENOTÍPICO EM MELANOMA MURINO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BRASÍLIA
2026

ANA PAULA STRACK MARINHO

# NaDES como componente estrutural de carreadores lipídicos nanoestruturados de coprodutos do Cerrado: redirecionamento fenotípico em melanoma murino

Dissertação de mestrado apresentado ao PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em nanociência e nanobiotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Carlos Mello Da Silva

BRASÍLIA

2026

Aos meus filhos e ao meu marido, fontes inesgotáveis de amor, força e inspiração. Conciliar a pesquisa e a vida em família exigiu sacrifícios que fizemos juntos. Obrigada por compreenderem as minhas ausências, por celebrarem cada pequeno avanço e por encherem os meus dias de alegria e propósito. Vocês são a minha maior inspiração e o meu porto seguro. Tudo o que construo é para vocês e por vocês. Esta dissertação é nossa.

## Agradecimentos

A Deus, fonte inesgotável de amor e misericórdia. Obrigada por me capacitar para o Teu chamado, por ter me dado força e perseverança, por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava. Sem o SENHOR, nada é possível.

Ao meu orientador, Dr. Victor, por me aceitar como aluna. Logo nós dois. Você ateu, eu cristã. Você que vive com os olhos na terra, eu com os olhos no céu. Você agitação, eu calmaria. Você de coração inquieto, eu com coração sereno. Você líquido, eu sólida. Ainda bem, só assim pudemos formar a matriz perfeita para este trabalho. Assim como nas nossas nanos, foi exatamente a mistura entre o líquido e o sólido que impediu a cristalização rígida das ideias. As nossas diferenças criaram as 'imperfeições' estruturais necessárias para abrir espaço, encapsular o conhecimento e dar estabilidade a esta pesquisa. Obrigada por confiar nessa mistura.

À professora Sônia, exemplo do servir ao trabalho. Obrigada por abrir as portas de seu laboratório para mim, e me acolher com carinho.

À Capes, ao CNPq, à FAPDF e à Finep pelo fomento necessário para realização desse mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos amigos do laboratório, que tornaram a jornada mais leve. Cada um de vocês me ensinou algo, e tenham a certeza de que, de alguma maneira, fazem parte de quem eu sou agora. Admiro todos vocês! Brenda e Leo, meus braços direito e esquerdo; sem vocês essa pesquisa não teria sido possível. Sou eternamente grata a toda ajuda e dedicação de vocês. Que Deus transborde abundantemente na vida de vocês. “Se alguém quiser prevalecer contra um, os dois lhe resistirão; o cordão de três dobras não se rebenta com facilidade.” Eclesiastes 4:12. Marina, muito obrigada por todo o suporte que você me deu ao longo dessa jornada, pelas horas na microscopia, pelos momentos de conversa, pelas discussões sobre meu trabalho, pelo tempo que passamos juntas e que pude aprender muito com você. Obrigada por ter se tornado a minha sócia. Ingrid, obrigada por toda a ajuda nos processamentos do meu material, pelas horas na microscopia, e, não menos importante, pelos momentos em que rimos, que almoçamos, que trocamos figurinhas. Pelos momentos em que me acalmou de meu desespero. “Melhor é serem dois do que um, porque têm melhor paga do seu trabalho. Porque, se um cair, o outro levanta o seu companheiro; mas ai do que estiver só; pois, caindo, não haverá outro que o levante.” Eclesiastes 4:9-10

Aos meus pais, por terem me dado o recurso mais caro dessa vida: o amor ao conhecimento. Às minhas irmãs, por todo o amor e companheirismo.

À minha família, pois sem vocês nada tem sentido na minha vida. Obrigada por preencherem a minha vida e fazê-la transbordar. Jivago, sem você nada disso teria sido possível; obrigada por ser meu maior incentivador e apoiador. Amo-te. Lara, Benjamim e José, obrigada por me tirarem de uma vida de egoísmo, e me darem uma vida de doação. Ser a mãe de vocês é a melhor parte da minha vida. À minha estrelinha que está no céu ao lado do Senhor, prometo ter uma vida santa, para que eu possa conhecê-lo(a) um dia.

Meus sinceros agradecimentos!

Que variedade, SENHOR, nas tuas obras!
Todas com sabedoria as fizeste;
cheia está a terra das tuas riquezas.
Salmos 104:24

**Resumo**

O melanoma é uma neoplasia cutânea agressiva cuja progressão está associada a desequilíbrios redox e remodelamento celular, tornando relevante a investigação de estratégias baseadas em compostos bioativos naturais e sistemas de entrega nanoestruturados. Solventes eutéticos naturais profundos (NaDES) têm sido explorados principalmente como solventes de extração, permanecendo pouco compreendido seu papel como componente estrutural de nanoformulações. Este estudo investigou o papel do NaDES como componente estrutural de carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) sobre a resposta de células de melanoma murino B16-F10, comparando um par de nanoformulações contendo o mesmo extrato de coproduto de taperebá (*Spondias mombin* L.) e idêntica matriz lipídica, diferindo exclusivamente pela presença do NaDES (NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES). De forma complementar, avaliou-se se o padrão de resposta observado se estendia a uma nanoformulação de composição distinta, obtida a partir do coproduto de seriguela (*Spondias purpurea* L., NLC-SER-NaDES). A viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTT, e as concentrações citotóxicas medianas ($CC_{50}$) obtidas (expressas em massa de lipídio por volume: 106,2 µg/mL para NLC-TAP, 67,2 µg/mL para NLC-TAP-NaDES e 24,1 µg/mL para NLC-SER-NaDES) orientaram os ensaios morfológicos, ultraestruturais e de estresse oxidativo, realizados por microscopia óptica, confocal, eletrônica de varredura, eletrônica de transmissão e pela sonda CellROX™ Green. Os NaDES livres preservaram, em geral, a morfologia celular, enquanto sua incorporação à formulação de taperebá esteve associada às alterações mais pronunciadas do estudo. A comparação entre NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES revelou que a incorporação do NaDES não intensificou um mesmo padrão de resposta, mas esteve associada a um fenótipo morfológico e ultraestrutural qualitativamente distinto, caracterizado como redirecionamento fenotípico dependente de NaDES. O padrão de remodelação observado nas formulações de taperebá estendeu-se, em menor magnitude, à formulação de seriguela. Os resultados de estresse oxidativo não permitiram estabelecer um efeito antioxidante consistente nas condições avaliadas, compatível com uma possível seletividade dependente de dose e de contexto redox. Esses achados reforçam a relevância de investigar NaDES não apenas como veículos de extração, mas como determinantes ativos do comportamento biológico de nanoformulações, associando valorização de coprodutos do Cerrado, química verde e nanotecnologia no desenvolvimento de plataformas bioativas.

**Palavras-chave:** Solvente eutético natural profundo. Bioeconomia. B16-F10. Microscopia eletrônica. *Spondias*.

**Abstract**

Melanoma is an aggressive skin neoplasm whose progression is associated with redox imbalance and cellular remodeling, making the investigation of strategies based on natural bioactive compounds and nanostructured delivery systems relevant. Natural deep eutectic solvents (NaDES) have been mainly explored as extraction solvents, while their role as a structural component of nanoformulations remains poorly understood. This study investigated the role of NaDES as a structural component of nanostructured lipid carriers (NLC) on the response of murine melanoma B16-F10 cells, comparing a pair of nanoformulations containing the same taperebá (*Spondias* mombin L.) byproduct extract and identical lipid matrix, differing exclusively by the presence of NaDES (NLC-TAP and NLC-TAP-NaDES). As a complementary approach, it was assessed whether the observed response pattern extended to a nanoformulation of distinct composition, obtained from the seriguela byproduct (*Spondias* purpurea L., NLC-SER-NaDES). Cell viability was evaluated by MTT assay, and the median cytotoxic concentrations ($CC_{50}$) obtained (expressed as lipid mass per volume: 106.2 µg/mL for NLC-TAP, 67.2 µg/mL for NLC-TAP-NaDES, and 24.1 µg/mL for NLC-SER-NaDES) guided the morphological, ultrastructural, and oxidative stress assays, performed by optical, confocal, scanning electron, and transmission electron microscopy, as well as the CellROX™ Green probe. Free NaDES generally preserved cell morphology, whereas its incorporation into the taperebá formulation was associated with the most pronounced alterations observed in the study. The comparison between NLC-TAP and NLC-TAP-NaDES revealed that NaDES incorporation did not intensify the same response pattern, but was instead associated with a qualitatively distinct morphological and ultrastructural phenotype, characterized as a NaDES-dependent phenotypic redirection. The remodeling pattern observed in the taperebá formulations extended, to a lesser magnitude, to the seriguela formulation. Oxidative stress results did not establish a consistent antioxidant effect under the conditions evaluated, consistent with a possible dose- and redox-context-dependent selectivity. These findings reinforce the relevance of investigating NaDES not only as extraction vehicles, but as active determinants of the biological behavior of nanoformulations, linking the valorization of Cerrado byproducts, green chemistry, and nanotechnology in the development of bioactive platforms.

**Keywords:** Natural deep eutectic solvent. Bioeconomy. B16-F10. Electron microscopy. *Spondias*.

## Lista de tabelas

Tabela 1 — Composição das nanoformulações (NLC-TAP, NLC-TAP-NaDES e NLC-SER-NaDES) utilizadas neste estudo.
Tabela 2 — Propriedades físico-químicas das nanoformulações de taperebá, incluindo PDI, HD, ZP, TP e EE%.
Tabela 3 — Perfil de compostos fenólicos do extrato de casca de taperebá, quantificados por UPLC-MS/MS.
Tabela 4 — Propriedades físico-químicas da nanoformulação de seriguela (NLC-SER-NaDES), incluindo HD, PDI e ZP.
Tabela 5 — Perfil de compostos fenólicos do extrato de casca de seriguela, quantificados por UPLC-MS/MS.
Tabela 6 — Grupos experimentais e concentrações utilizadas nos ensaios biológicos.
Tabela 7 — Comparação entre NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES nas diferentes técnicas empregadas neste estudo.
Tabela 8 — Posição do NLC-SER-NaDES em relação ao padrão de alterações observado nas formulações de taperebá.

## Lista de Figuras


Figura 1 — Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para o extrato de casca de taperebá encapsulado em carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES)

Figura 2 — Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para a nanoformulação de seriguela (NLC-SER-NaDES)

Figura 3 — Delineamento experimental: plaqueamento (Dia 0), adesão celular (24 h), tratamento (24 h) e destinação das células às análises morfológicas, estruturais e de estresse oxidativo (48 h após o plaqueamento)

Figura 4 — Curvas dose-resposta da viabilidade celular de células B16-F10 avaliadas pelo ensaio de MTT após 24 horas de tratamento

Figura 5 — Efeitos morfológicos gerais em células B16-F10 após os diferentes tratamentos, avaliados por microscopia óptica em campo claro e contraste de fase

Figura 6 — Efeitos na organização do citoesqueleto de F-actina em células B16-F10 após os diferentes tratamentos, avaliados por microscopia confocal de fluorescência em campo geral

Figura 7 — Efeitos na organização do citoesqueleto de F-actina em células B16-F10 após os diferentes tratamentos, avaliados por microscopia confocal de fluorescência em maior aumento

Figura 8 — Detalhe das estruturas intracitoplasmáticas com aspecto vacuoliforme em NLC-SER-NaDES e NLC-TAP-NaDES

Figura 9 — Efeitos na morfologia de superfície de células B16-F10 após os diferentes tratamentos, avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Figura 10 — Efeitos na ultraestrutura celular de células B16-F10 após os diferentes tratamentos, avaliados por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Figura 11 — Validação do modelo experimental de estresse oxidativo em células B16-F10, avaliada por marcação com CellROX™ Green, DAPI e overlay

Figura 12 — Efeitos do NaDES 1 e NaDES 2 sobre o estresse oxidativo em células B16-F10

Figura 13 — Efeitos das nanoformulações sobre o estresse oxidativo em células B16-F10

Figura 14 — Razão entre a área sob a curva (AUC) do sinal de CellROX™ Green e a AUC do sinal de DAPI nas células B16-F10, por grupo experimental

Figura 15 — Síntese qualitativa do grau de alteração observado por técnica e grupo experimental

Figura 16 — Representação esquemática do redirecionamento fenotípico dependente de NaDES nas formulações de taperebá

Figura 17 — Representação esquemática da relação entre os achados de microscopia confocal de fluorescência e de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para as três nanoformulações avaliadas

## Lista de abreviações

| | |
|---|---|
| AUC | Área sob a curva (*Area Under the Curve*) |
| BCRJ | Banco de Células do Rio de Janeiro |
| $CC_{50}$ | Concentração citotóxica mediana |
| CLN | Carreador Lipídico Nanoestruturado |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-fenilindol |
| DLS | Espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*) |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DTA | Análise térmica diferencial |
| EAG | Equivalente de ácido gálico |
| EE% | Eficiência de encapsulação |
| FT-IR | Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier |
| HBA | Aceptor de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Acceptor*) |
| HBD | Doador de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Donor*) |
| HD | Diâmetro hidrodinâmico |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| MET | Microscopia Eletrônica de Transmissão |
| MTT | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio |
| NaDES | Solventes Eutéticos Naturais Profundos (*Natural Deep Eutectic Solvents*) |
| NLC | Carreador Lipídico Nanoestruturado (*Nanostructured Lipid Carrier*) |
| ODS | Objetivos de Desenvolvimento Sustentável |
| PBS | Tampão fosfato-salino (*Phosphate-Buffered Saline*) |
| PDI | Índice de polidispersão |
| ROS | Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*) |
| SisGen | Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado |
| TGA | Análise termogravimétrica |
| TheDES | Sistemas Eutéticos Profundos Terapêuticos (*Therapeutic Deep Eutectic Systems*) |
| TP | Teor de fenólicos totais |
| UPLC-MS/MS | Cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem |
| UV | Radiação ultravioleta |
| ZP | Potencial zeta |

Sumário

1. INTRODUÇÃO ..... 14
2. REVISÃO DA LITERATURA ..... 17
2.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E SUSTENTABILIDADE ..... 17
2.2 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO GÊNERO *SPONDIAS*: SERIGUELA E TAPEREBÁ ..... 18
2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS NATURAIS E LIMITAÇÕES BIOLÓGICAS ..... 20
2.4 NADES COMO SOLVENTES VERDES E COMPONENTES DE FORMULAÇÃO ..... 21
2.5 NANOTECNOLOGIA APLICADA À ENTREGA DE BIOATIVOS ..... 23
2.6 MELANOMA E MODELO CELULAR B16-F10 ..... 24
2.7 JUSTIFICATIVA ..... 26
3. OBJETIVOS ..... 27
3.1 OBJETIVO GERAL ..... 27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 27
4. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 28
4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE COPRODUTOS DE SERIGUELA E TAPEREBÁ ..... 28
4.2 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS UTILIZADOS NO ESTUDO ..... 28
4.2.1 CLNs Contendo Extrato de Taperebá ..... 28
4.2.2 CLN Contendo Extrato de Seriguela ..... 29
4.2.3 Caracterização Físico-Química das Nanoformulações ..... 30
4.3 CULTURA CELULAR E TRATAMENTOS ..... 39
4.3.1 Cultura Celular ..... 39
4.3.2 Ensaio De Viabilidade Celular ..... 39
4.3.3 Tratamentos Celulares ..... 40
4.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E ESTRUTURAIS ..... 42
4.4.1 Avaliação Morfológica Geral ..... 42
4.4.2 Avaliação da Organização do Citoesqueleto ..... 42
4.4.3 Avaliação da Morfologia de Superfície ..... 44
4.4.4 Avaliação da Ultraestrutura Celular ..... 44
4.5 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO ..... 45
4.6 ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA ..... 47
4.7 DECLARAÇÃO SOBRE O USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL ..... 47
5. RESULTADOS ..... 49

5.1 VIABILIDADE CELULAR ..... 49
5.2 EFEITOS MORFOLÓGICOS GERAIS ..... 50
5.3 EFEITOS NA ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO ..... 53
5.4 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS ..... 58
5.4.1 Efeitos na Morfologia de Superfície ..... 58
5.4.2 Efeitos na Ultraestrutura Celular ..... 61
5.5 CONTRIBUIÇÃO DO NaDES COMO COMPONENTE ESTRUTURAL: NLC-TAP VERSUS NLC-TAP-NaDES ..... 65
5.6 EXTENSÃO DO PADRÃO OBSERVADO A UMA FORMULAÇÃO DE COMPOSIÇÃO DISTINTA (NLC-SER-NaDES) ..... 66
5.7 ESTRESSE OXIDATIVO ..... 68
5.7.1 Validação Do Modelo Experimental ..... 68
5.7.2 Efeitos dos Tratamentos sobre o Estresse Oxidativo ..... 70
6. DISCUSSÃO ..... 75
6.1 SÍNTESE INTEGRADA DOS ACHADOS ..... 75
6.2 VIABILIDADE CELULAR E EFEITO DEPENDENTE DA FORMULAÇÃO ..... 77
6.3 PAPEL DOS NADES LIVRES E INCORPORADOS ..... 78
6.4 REMODELAÇÃO MORFOLÓGICA, F-ACTINA E SUPERFÍCIE CELULAR ..... 80
6.5 COMPARTIMENTALIZAÇÃO CITOPLASMÁTICA E ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS ..... 81
6.6 RESPOSTA AO DESAFIO OXIDATIVO ..... 83
6.7 LIMITAÇÕES, IMPLICAÇÕES E PERSPECTIVAS ..... 86
7. CONCLUSÃO ..... 89

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente geração de resíduos agroindustriais, especialmente no processamento de frutas tropicais, constitui um desafio ambiental e econômico relevante. O Brasil figura entre os maiores produtores mundiais de frutas, ocupando a terceira posição no ranking global desse setor (Embrapa, 2025). Cascas, sementes e bagaços representam parcela significativa da biomassa processada e, quando descartados inadequadamente, contribuem para o desperdício de recursos naturais e para impactos ambientais associados ao acúmulo de resíduos orgânicos (Ayala-Zavala *et al*., 2011; Cheok *et al*., 2018; Villacís-Chiriboga *et al*., 2020). Em contraposição ao modelo linear de produção, a economia circular propõe a valorização desses coprodutos por meio de sua reinserção nas cadeias produtivas como matérias-primas secundárias para obtenção de produtos de maior valor agregado, promovendo o uso eficiente dos recursos naturais e o desenvolvimento de processos mais sustentáveis (Carrillo-Rodríguez; Cajigas Romero; Galindo Larrahondo, 2025; Wagh *et al*., 2024; Yaashikaa; Kumar; Varjani, 2022). Nesse contexto, a recuperação de compostos bioativos presentes em resíduos agroindustriais representa uma estratégia promissora para integrar sustentabilidade, bioeconomia e inovação tecnológica.

Entre as espécies frutíferas com elevado potencial para essa abordagem destacam-se *Spondias purpurea* L. (seriguela) e *Spondias mombin* L. (taperebá), pertencentes à família Anacardiaceae e amplamente distribuídas nas regiões tropicais da América, incluindo o Brasil (Brito *et al*., 2022; Sinan *et al*., 2021). O processamento industrial desses frutos gera quantidades expressivas de coprodutos, especialmente cascas e sementes, que concentram elevada diversidade de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides e taninos, aos quais são atribuídas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antitumorais (Cangussu *et al*., 2024; Freitas *et al*., 2024; Morais *et al*., 2025; Santana Neto *et al*., 2022; Sinan *et al*., 2021). Essa riqueza fitoquímica, aliada à disponibilidade desses resíduos e à importância econômica das espécies, torna seus coprodutos matérias-primas promissoras para estratégias de valorização biotecnológica e para o desenvolvimento de sistemas de liberação de compostos bioativos.

Apesar do reconhecido potencial terapêutico dos compostos bioativos de origem vegetal, sua aplicação é frequentemente limitada por características físico-químicas desfavoráveis, como baixa solubilidade em meio aquoso, instabilidade frente à luz, ao oxigênio, às variações de pH e à temperatura, além de rápida metabolização e reduzida biodisponibilidade (Bertoncini-Silva *et al*., 2024; Bhalani *et al*., 2022; Dabulici *et al*., 2020; Teng; Chen, 2019). Essas limitações comprometem sua estabilidade durante o processamento e armazenamento,

bem como sua absorção e eficácia biológica, restringindo a aplicação terapêutica de diversos compostos naturais. Nesse contexto, torna-se necessária a utilização de estratégias tecnológicas capazes de proteger essas moléculas da degradação, aumentar sua estabilidade, modular sua liberação e potencializar sua interação com sistemas biológicos.

Nesse cenário, os solventes eutéticos naturais profundos (*Natural Deep Eutectic Solvents* – NaDES) emergem como uma alternativa promissora no contexto da química verde. Formados pela combinação de compostos naturais que interagem por meio de ligações de hidrogênio, esses sistemas apresentam baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade e alta capacidade de solubilização de compostos bioativos, favorecendo tanto sua extração quanto sua estabilidade (Cannavacciuolo *et al*., 2023; Hikmawanti *et al*., 2021; Liu *et al*., 2018). Inicialmente empregados como solventes sustentáveis para extração de metabólitos vegetais, os NaDES vêm sendo investigados também como componentes funcionais de formulações, podendo atuar como cossolventes, componentes estruturais e agentes estabilizantes, contribuindo para a estabilidade físico-química e o desempenho de sistemas nanoestruturados (Bragagnolo *et al*., 2024; Chevé-Kools *et al*., 2025; Schuh *et al*., 2024). Apesar desse potencial, a incorporação de NaDES em carreadores lipídicos nanoestruturados ainda é uma abordagem recente, e permanecem escassos os estudos que avaliem sua contribuição específica para as propriedades das nanoformulações e para a modulação das respostas celulares. Em especial, são raros os trabalhos que comparem diretamente uma mesma formulação lipídica contendo o mesmo extrato vegetal, com e sem a incorporação de NaDES, dificultando a distinção entre os efeitos atribuídos ao solvente eutético e aqueles decorrentes do próprio composto bioativo encapsulado (Mello *et al*., 2025; Schuh *et al*., 2024).

A nanotecnologia aplicada à liberação de compostos bioativos tem se consolidado como uma estratégia eficaz para superar as limitações relacionadas à estabilidade, biodisponibilidade e eficácia terapêutica de moléculas naturais. Dentre os sistemas de liberação disponíveis, os carreadores lipídicos nanoestruturados (*Nanostructured Lipid Carriers* – NLCs) destacam-se por apresentarem elevada capacidade de encapsulação, proteção dos compostos bioativos contra degradação química e enzimática, além de promoverem liberação controlada e maior interação com membranas biológicas (Donahue *et al*., 2019; Khosa *et al*., 2018; Shamsuddin; Zulfakar, 2023). Essas características favorecem o aumento da estabilidade físico-química das formulações e podem resultar em maior biodisponibilidade e atividade biológica dos compostos encapsulados (Favas *et al*., 2024; Patel *et al*., 2024). Nesse contexto, a associação entre extratos vegetais ricos em compostos bioativos, NaDES e carreadores lipídicos nanoestruturados representa uma abordagem inovadora para o desenvolvimento de formulações mais

sustentáveis e potencialmente mais eficazes, reunindo princípios da química verde, da nanotecnologia e da valorização de coprodutos agroindustriais (Mello *et al*., 2025).

A avaliação dos efeitos dessas nanoformulações em células de melanoma murino B16-F10 permite investigar alterações morfológicas, ultraestruturais e oxidativas decorrentes da interação entre as formulações e o sistema celular. A linhagem B16-F10 constitui um modelo amplamente empregado em estudos que investigam respostas celulares a compostos bioativos e sistemas nanoestruturados, possibilitando a análise integrada de diferentes parâmetros biológicos em condições experimentais controladas (Becker; Indra, 2023; Cannavò *et al*., 2019; Culp *et al*., 2006; Emanuelli *et al*., 2022; Remigante *et al*., 2023). Nesse contexto, este estudo teve como objetivo investigar a contribuição dos NaDES como componentes estruturais de carreadores lipídicos nanoestruturados, avaliando como sua incorporação influencia a resposta celular. Para isso, foi comparado um par de nanoformulações contendo o mesmo extrato de coproduto de *Spondias mombin* e idêntica composição lipídica, diferindo exclusivamente pela presença ou ausência do NaDES, permitindo isolar a contribuição desse componente sobre a morfologia celular, a organização do citoesqueleto, a ultraestrutura e o estresse oxidativo. De forma complementar, foi avaliado se o padrão de resposta observado se estende a uma nanoformulação de composição distinta, obtida a partir do coproduto de *Spondias purpurea*.

# 2. REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E SUSTENTABILIDADE

A intensificação da produção e do processamento de alimentos tem resultado na geração de grandes volumes de resíduos agroindustriais, como cascas, sementes, bagaço, polpa residual e águas de processo, que atualmente são reconhecidos como biomassa de valor agregado e não apenas como "lixo". Na cadeia produtiva de frutas, especialmente na indústria de sucos, estima-se que entre 20% e 80% do fruto seja convertido em coprodutos, o que acarreta custos de disposição e impactos ambientais significativos (Kandemir *et al.*, 2022; Koul *et al.*, 2022; Villacís-Chiriboga *et al.*, 2020). Em frutas tropicais, até metade da produção pode ser perdida ou descartada ao longo da cadeia produtiva, reforçando a necessidade urgente de estratégias de aproveitamento mais sustentáveis (García-Mahecha *et al.*, 2023; Villacís-Chiriboga *et al.*, 2020). Esse cenário é impulsionado pelo crescimento da demanda global por frutas e seus derivados, aliado à predominância de um modelo de economia linear baseado na lógica "extrair–produzir–descartar", que contribui para o aumento contínuo da geração de resíduos (Kandemir *et al.*, 2022; Koul *et al.*, 2022; Wagh *et al.*, 2024). Além do volume expressivo, resíduos de frutas como cascas, sementes, engaços e bagaços apresentam elevada carga orgânica e rápida deterioração, favorecendo a formação de odores, a proliferação microbiana e a emissão de gases de efeito estufa quando manejados de forma inadequada (García-Mahecha *et al.*, 2023; Nirmal *et al.*, 2023; Villacís-Chiriboga *et al.*, 2020).

Paralelamente aos desafios ambientais, diversas revisões demonstram que coprodutos de frutas tropicais, como manga, cítricos, abacaxi, mamão e maracujá, constituem fontes expressivas de fibras, polifenóis, flavonoides, carotenoides, taninos e vitamina C, frequentemente em concentrações iguais ou superiores às encontradas na polpa comestível (Ayala-Zavala *et al.*, 2011; Cheok *et al.*, 2018; García-Mahecha *et al.*, 2023; Kandemir *et al.*, 2022; Nirmal *et al.*, 2023; Otero-Guzmán; Andrade-Pizarro, 2025; Romero-Martínez *et al.*, 2025; Villacís-Chiriboga *et al.*, 2020). Esses compostos bioativos podem apresentar atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e potencial anticancerígena, sustentando seu aproveitamento como ingredientes funcionais, aditivos naturais, como antioxidantes, corantes e conservantes, e insumos para o desenvolvimento de embalagens ativas, cosméticos e fármacos (Ayala-Zavala *et al.*, 2011; Kandemir *et al.*, 2022; Nirmal *et al.*, 2023; Otero-Guzmán; Andrade-Pizarro, 2025; Romero-Martínez *et al.*, 2025).

Nesse contexto, os princípios da economia circular e da bioeconomia propõem a transformação desses resíduos de passivos ambientais em matérias-primas estratégicas para a produção de biocombustíveis, biogás, bioplásticos, enzimas, biopolímeros, fertilizantes,

materiais de construção e ingredientes bioativos de alto valor agregado (Carrillo-Rodríguez; Cajigas Romero; Galindo Larrahondo, 2025; Koul *et al.*, 2022; Leong; Chang, 2022). Conceitos de biorrefinaria aplicados a frutas tropicais defendem o uso em cascata dessa biomassa, integrando múltiplas rotas tecnológicas, para energia, materiais e extração de compostos bioativos, em modelos orientados ao "resíduo zero" (Villacís-Chiriboga *et al.*, 2020; Yaashikaa; Kumar; Varjani, 2022).

A valorização de resíduos agroindustriais, portanto, contribui para a redução das emissões de gases de efeito estufa, da demanda por aterros e da poluição de solo e água, ao mesmo tempo em que diminui a pressão sobre recursos naturais ao substituir insumos fósseis e sintéticos por fontes renováveis (Koul *et al.*, 2022; Maqsood *et al.*, 2025; Nesterov *et al.*, 2024; Ricciardi *et al.*, 2020; Wagh *et al.*, 2024; Yaashikaa; Kumar; Varjani, 2022). Revisões sistemáticas recentes destacam que o aproveitamento de resíduos para produção de biocombustíveis, materiais e extração de compostos bioativos constitui eixo central na transição para sistemas agroalimentares mais sustentáveis e alinhados às metas globais de desenvolvimento sustentável (Carrillo-Rodríguez; Cajigas Romero; Galindo Larrahondo, 2025; Koul *et al.*, 2022; Maqsood *et al.*, 2025; Sharma *et al.*, 2023; Wagh *et al.*, 2024). Assim, os resíduos agroindustriais de frutas tropicais configuram simultaneamente um passivo ambiental volumoso e um estoque estratégico de compostos bioativos e biomassa para energia e materiais; quando inseridos em modelos de economia circular e biorrefinaria, podem sustentar inovação tecnológica, geração de valor econômico e mitigação de impactos ambientais, fundamentando sua exploração em propostas de pesquisa voltadas à sustentabilidade e à biotecnologia de frutas tropicais.

## 2.2 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO GÊNERO *SPONDIAS*: SERIGUELA E TAPEREBÁ

As espécies seriguela (*Spondias purpurea L.*) e taperebá ou cajá (*Spondias mombin L.*) são frutos tropicais amplamente distribuídos e adaptados ao contexto brasileiro, ocorrendo em biomas como Caatinga e Cerrado e apresentando forte inserção na agricultura familiar e na agroindústria de polpas (Abreu *et al.*, 2022; Freitas *et al.*, 2024; Morais *et al.*, 2025; Villacís-Chiriboga *et al.*, 2020). *S. purpurea*, embora nativa da América Central, encontra-se bem adaptada em diferentes regiões do Brasil, sendo amplamente utilizada na produção de sucos, polpas, sorvetes e doces (Abreu *et al.*, 2022; Cangussu *et al.*, 2024; Silva; Castro, 2025). Por sua vez, *S. mombin* é descrita como espécie nativa do Brasil, com destaque para o Cerrado, e

vem sendo valorizada tanto pelo consumo alimentar quanto por seu potencial funcional (Brito *et al.*, 2022; Freitas *et al.*, 2024; Villacís-Chiriboga *et al.*, 2020).

O processamento industrial dessas frutas para obtenção de polpas e sucos resulta na geração de quantidades expressivas de resíduos agroindustriais, principalmente cascas, sementes, frações fibrosas e tortas provenientes da extração de óleo. No caso da seriguela, a fruta madura é composta por aproximadamente 70% de polpa, 14% de casca e 16% de sementes, o que implica a geração de centenas de toneladas de resíduos de sementes ao longo da cadeia produtiva (Abreu *et al.*, 2022; Cangussu *et al.*, 2024). Para o taperebá, as cascas e sementes correspondem a cerca de 16% e 33% do fruto, respectivamente, configurando um resíduo de alto volume que, em geral, permanece subaproveitado (Santana Neto *et al.*, 2022; Villacís-Chiriboga *et al.*, 2020).

Do ponto de vista composicional, tanto a polpa quanto os coprodutos de seriguela e taperebá apresentam perfis ricos em compostos fenólicos e carotenoides, frequentemente em maiores concentrações nas frações não comestíveis. Em seriguela, farinhas obtidas de casca e semente exibem elevados teores de fibras, polifenóis e carotenoides, além de ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis, com bioacessibilidade relevante de fenólicos após digestão *in vitro* (Cangussu *et al.*, 2024; Morais *et al.*, 2025). Em taperebá, especialmente na casca, são relatados teores significativos de polifenóis, incluindo ácido elágico, quercetina e outros flavonoides, bem como xantofilas como zeinoxantina e β-criptoxantina (Brito *et al.*, 2022; Sinan *et al.*, 2021; Villacís-Chiriboga *et al.*, 2020). Além disso, resíduos de *S. mombin* apresentam elevado conteúdo de ácidos fenólicos, como gálico, elágico, salicílico e 4-hidroxibenzóico, e flavonoides como rutina, catequina e miricetina, compostos associados a alta capacidade antioxidante (Santana Neto *et al.*, 2022).

Para além da atividade antioxidante, compostos fenólicos do gênero *Spondias* têm sido relacionados a propriedades antihipertensiva, neuroprotetora, anti-inflamatória, antimicrobiana e gastroprotetora, reforçando o interesse biotecnológico dessas espécies para aplicação em alimentos funcionais, nutracêuticos, embalagens ativas e produtos farmacêuticos e cosméticos (Freitas *et al.*, 2024; Morais *et al.*, 2025; Nunes *et al.*, 2025; Rodrigues *et al.*, 2021; Sinan *et al.*, 2021).

Nesse conjunto, a escolha de seriguela (*S. purpurea*) e taperebá (*S. mombin*) como matérias-primas estratégicas fundamenta-se em sua relevância socioeconômica regional, por serem espécies nativas ou amplamente adaptadas ao Brasil e integradas à agricultura familiar e à agroindústria de polpas (Abreu *et al.*, 2022; Freitas *et al.*, 2024; Morais *et al.*, 2025; Villacís-Chiriboga *et al.*, 2020); na geração de grandes volumes de resíduos agroindustriais durante o

processamento, especialmente cascas, sementes e tortas, atualmente subvalorizados (Abreu *et al.*, 2022; Cangussu *et al.*, 2024; Santana Neto *et al.*, 2022; Villacís-Chiriboga *et al.*, 2020); e na presença de perfis composicionais convergentes, ricos em compostos fenólicos e carotenoides com comprovada capacidade antioxidante e potencial funcional e terapêutico (Brito *et al.*, 2022; Cangussu *et al.*, 2024; Morais *et al.*, 2025; Santana Neto *et al.*, 2022; Sinan *et al.*, 2021; Villacís-Chiriboga *et al.*, 2020). Dessa forma, essas espécies integram de maneira exemplar a agenda de valorização de resíduos, economia circular e desenvolvimento de ingredientes bioativos de origem tropical.

## 2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS NATURAIS E LIMITAÇÕES BIOLÓGICAS

Compostos fenólicos, carotenoides, peptídeos e outros bioativos de origem vegetal apresentam reconhecido potencial antioxidante, anti-inflamatório e terapêutico; entretanto, sua eficácia *in vivo* é frequentemente muito inferior àquela observada em ensaios *in vitro*, em razão de limitações físico-químicas e biológicas que reduzem significativamente a fração do composto que alcança intacta o sítio de ação. Entre os principais entraves está a instabilidade química, uma vez que muitos desses compostos são sensíveis à luz, ao oxigênio, ao calor, a variações de pH e às condições de processamento, como secagem, armazenamento e cocção, o que resulta em degradação estrutural e perda de atividade antioxidante e terapêutica (Durić *et al.*, 2019; Elgamal *et al.*, 2023; Jaidee *et al.*, 2025; Scrob *et al.*, 2022). Polifenóis, vitaminas, carotenoides e compostos voláteis podem sofrer oxidação ou hidrólise rápida, sendo sua estabilidade fortemente dependente do pH, da temperatura, da matriz alimentar e do tempo de armazenamento (Elgamal *et al.*, 2023; Jaidee *et al.*, 2025; Scrob *et al.*, 2022).

Além da instabilidade, a baixa biodisponibilidade constitui um dos maiores desafios para a aplicação prática desses compostos. Muitos bioativos naturais apresentam solubilidade limitada em água ou em lipídios, o que compromete a dissolução e, consequentemente, a absorção gastrointestinal (Elmowafy *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2024; Kyriakoudi *et al.*, 2021; Patel *et al.*, 2024). No trato digestivo, podem ainda ser degradados por variações de pH e pela ação de enzimas, reduzindo a fração disponível para absorção sistêmica (Amigo; Hernández-Ledesma, 2020; Bao *et al.*, 2019; Chai *et al.*, 2018; Elmowafy *et al.*, 2023; Patel *et al.*, 2024). Mesmo quando absorvidos, muitos desses compostos sofrem metabolismo de primeira passagem e rápida excreção, resultando em concentrações plasmáticas frequentemente inferiores a 10% da dose ingerida (Bertoncini-Silva *et al.*, 2024; Dabulici *et al.*, 2020; Elmowafy *et al.*, 2023; Teng; Chen, 2019). Adicionalmente, a baixa permeabilidade através de membranas biológicas, especialmente no caso de moléculas grandes ou polares, e a presença

de barreiras como o muco intestinal e as *tight junctions* limitam a penetração celular e a eficácia biológica (Amigo; Hernández-Ledesma, 2020; Bao *et al.*, 2019; Chai *et al.*, 2018; Patel *et al.*, 2024).

Diante dessas limitações, a literatura aponta a necessidade de sistemas de entrega nano e microestruturados capazes de proteger, estabilizar e direcionar os bioativos. Entre as principais estratégias destacam-se nanopartículas poliméricas e lipídicas, lipossomas, nanoemulsões, micelas, hidrogéis e sistemas baseados em coacervação, os quais vêm sendo amplamente investigados para aplicação em alimentos, nutracêuticos e fármacos (Bao *et al.*, 2019; Chai *et al.*, 2018; Elmowafy *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2024; Kyriakoudi *et al.*, 2021; Lv *et al.*, 2024; Patel *et al.*, 2024). Esses sistemas são capazes de aumentar a estabilidade térmica e à luz, proteger contra variações de pH e degradação enzimática, melhorar a solubilidade e a dispersibilidade, favorecer a permeabilidade e a penetração celular e permitir liberação controlada e direcionada do composto bioativo (Amigo; Hernández-Ledesma, 2020; Bao *et al.*, 2019; Bertoncini-Silva *et al.*, 2024; Chai *et al.*, 2018; Elmowafy *et al.*, 2023; Joyce *et al.*, 2021; Kyriakoudi *et al.*, 2021; Patel *et al.*, 2024). Entre esses sistemas, os carreadores lipídicos nanoestruturados destacam-se por reunir vantagens específicas para a proteção e liberação de compostos bioativos (Khosa *et al*., 2018; Shamsuddin; Zulfakar, 2023).

Assim, embora compostos bioativos naturais apresentem elevado potencial funcional, sua instabilidade, baixa biodisponibilidade e limitada penetração celular reduzem substancialmente seu impacto biológico. Nesse contexto, o desenvolvimento de sistemas de entrega nano e microestruturados torna-se elemento central em propostas biotecnológicas que busquem explorar de forma eficiente esses compostos em alimentos funcionais, nutracêuticos ou aplicações farmacêuticas, ampliando sua eficácia e viabilidade tecnológica.

## 2.4 NADES COMO SOLVENTES VERDES E COMPONENTES DE FORMULAÇÃO

Os solventes eutéticos profundos naturais (NaDES) consistem em misturas líquidas formadas por metabólitos naturais, como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, colina e polióis, combinados em proporções específicas nas quais interações intensas por ligações de hidrogênio entre doadores (HBD) e aceptores (HBA) promovem redução significativa do ponto de fusão em relação aos componentes isolados (Acosta-Vega *et al.*, 2025; Chevé-Kools *et al.*, 2025; Jauregi *et al.*, 2024; Liu *et al.*, 2018; Usmani *et al.*, 2023). Esses sistemas mimetizam o microambiente intracelular e apresentam propriedades físico-químicas ajustáveis, como polaridade e viscosidade, o que permite sua adaptação a diferentes aplicações em matrizes

biológicas e tecnológicas (Jauregi *et al.*, 2024; Kaoui *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2018; Usmani *et al.*, 2023).

Do ponto de vista ambiental, os NaDES destacam-se por serem biodegradáveis, de baixa toxicidade, não voláteis, não inflamáveis, de baixo custo e facilmente preparados, características que os alinham aos princípios da química verde e os posicionam como alternativas promissoras a solventes orgânicos convencionais e a determinados líquidos iônicos (Cannavacciuolo *et al.*, 2023; Chevé-Kools *et al.*, 2025; Hikmawanti *et al.*, 2021; Jauregi *et al.*, 2024; Kaoui *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2018; Mišan *et al.*, 2019; Usmani *et al.*, 2023). Em processos de extração, esses solventes têm demonstrado aumento da solubilidade, da estabilidade e do rendimento de fitoquímicos, incluindo compostos fenólicos, carotenoides, alcaloides e óleos essenciais, frequentemente superando solventes convencionais, inclusive quando aplicados a matrizes alimentares e coprodutos agroindustriais (Acosta-Vega *et al.*, 2025; Cannavacciuolo *et al.*, 2023; Hikmawanti *et al.*, 2021; Jauregi *et al.*, 2024; Kaoui *et al.*, 2023; Li, 2022; Mišan *et al.*, 2019). Além disso, a possibilidade de obtenção de extratos "prontos para uso", sem necessidade de etapas subsequentes de remoção de solvente, representa vantagem tecnológica relevante em formulações alimentícias e farmacêuticas (Bragagnolo *et al.*, 2024; Mišan *et al.*, 2019; Villa *et al.*, 2024).

Apesar de seu reconhecimento crescente como solubilizantes, estabilizantes, excipientes e promotores de absorção em formulações (Chevé-Kools *et al.*, 2025; Freitas *et al.*, 2025; Hikmawanti *et al.*, 2021; Jauregi *et al.*, 2024; Liu *et al.*, 2018; Villa *et al.*, 2024), o emprego de NaDES como componentes estruturais de nanopartículas, atuando, por exemplo, como fase interna, co-solvente estruturante ou parte integrante da matriz nanométrica, ainda permanece pouco explorado. Revisões na área de nanotecnologia mencionam majoritariamente os NaDES como meios de reação ou estabilizantes durante a síntese de partículas, especialmente inorgânicas, e não como blocos construtivos centrais de nanocarregadores orgânicos destinados à veiculação de compostos bioativos (Chevé-Kools *et al.*, 2025; Długosz, 2023; Freitas *et al.*, 2025; Usmani *et al.*, 2023; Villa *et al.*, 2024). Tal cenário evidencia uma lacuna científica e tecnológica que configura oportunidade clara de inovação no desenvolvimento de sistemas de entrega. Em particular, são raros os estudos que comparem diretamente uma mesma formulação nanoestruturada com e sem a incorporação do NaDES, o que dificulta isolar a contribuição desse componente sobre o comportamento da partícula e sobre a resposta celular, distinguindo-a do papel do extrato vegetal encapsulado.

Adicionalmente, muitos NaDES são constituídos por componentes com atividade biológica própria, como ácidos orgânicos, colina, aminoácidos e até mesmo polifenóis, podendo

atuar como cofatores metabólicos, agentes terapêuticos (no caso dos chamados TheDES, do inglês *Therapeutic Deep Eutectic Systems*, sistemas nos quais um dos componentes constitui, por si só, princípio ativo farmacêutico) ou moduladores de biodisponibilidade, com relatos de atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e efeitos sobre permeabilidade e absorção de fármacos (Chevé-Kools *et al.*, 2025; Jauregi *et al.*, 2024; Koh *et al.*, 2023; Li, 2022; Liu *et al.*, 2018; Usmani *et al.*, 2023). Dessa forma, além de exercerem função de solventes ou veículos, esses sistemas podem contribuir diretamente para o efeito biológico global da formulação.

Em síntese, os NaDES combinam um conceito bioinspirado, perfil ambiental favorável e desempenho superior como solventes de extração, ao mesmo tempo em que apresentam potencial funcional intrínseco. Contudo, seu papel como componente estrutural de nanossistemas ainda é incipiente, e a integração entre veículo verde e possível atividade biológica própria sustenta a exploração desses sistemas como elementos centrais no desenvolvimento de formulações nanoestruturadas para entrega eficiente de compostos bioativos.

## 2.5 NANOTECNOLOGIA APLICADA À ENTREGA DE BIOATIVOS

A nanotecnologia aplicada à entrega de compostos bioativos tem se consolidado como estratégia eficaz para proteger, solubilizar e direcionar moléculas com limitações físico-químicas e biológicas, superando entraves típicos de formulações convencionais, frequentemente ricas em água e com baixa capacidade de estabilização de compostos hidrofóbicos ou instáveis. Nesse contexto, destacam-se os carreadores lipídicos nanoestruturados, como nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), nanoemulsões e lipossomas, que utilizam matrizes lipídicas sólidas ou mistas (lipídio sólido + lipídio líquido) para encapsular compostos hidrofóbicos e anfifílicos, ampliando sua aplicabilidade em sistemas biológicos (Akhavan *et al.*, 2018; Bhalani *et al.*, 2022; Favas *et al.*, 2024; Shamsuddin; Zulfakar, 2023).

Esses sistemas promovem proteção contra oxidação, radiação luminosa, variações de pH e degradação enzimática, aumentando a estabilidade química e a vida de prateleira dos bioativos encapsulados, além de proporcionar maior solubilidade aparente e biodisponibilidade para compostos pouco solúveis em água, favorecendo sua absorção e desempenho biológico (Akhavan *et al.*, 2018; Bhalani *et al.*, 2022; Favas *et al.*, 2024; Shamsuddin; Zulfakar, 2023). Outro benefício relevante é a possibilidade de liberação controlada e, em determinados casos, alvo-específica, em diferentes vias de administração, como oral, cutânea ou injetável (Bhalani

*et al.*, 2022; Favas *et al.*, 2024; Khosa *et al.*, 2018; Shamsuddin; Zulfakar, 2023). Formulações de CLN contendo quercetina, por exemplo, demonstram aumento da eficiência de encapsulação, maior estabilidade coloidal e potencial aprimoramento da fotoproteção cutânea, evidenciando a versatilidade desses sistemas em aplicações biomédicas e cosméticas (Costa *et al.*, 2025; Favas *et al.*, 2024).

A eficiência desses nanossistemas também está diretamente relacionada à forma como interagem com as células. A interação entre nanopartículas e células é governada por parâmetros como tamanho, morfologia, carga superficial e composição química da superfície (Akhtar; Zuhair, 2025; Donahue *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2017; Nanda; Yi, 2024; Zhang *et al.*, 2021). A internalização ocorre predominantemente por mecanismos de endocitose mediados por clatrina ou caveolina, além de macropinocitose ou fagocitose, dependendo das dimensões e propriedades físico-químicas da partícula (Akhtar; Zuhair, 2025; Donahue *et al.*, 2019; Nanda; Yi, 2024; Zhang *et al.*, 2021). A chamada interface nanobiológica, caracterizada pela formação de corona proteica e pela presença de grupos funcionais na superfície, influencia a captação celular, o tráfego intracelular, a toxicidade e o destino subcelular das nanopartículas (Donahue *et al.*, 2019; Ho *et al.*, 2019; Kroll *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Nanda; Yi, 2024; Zhang *et al.*, 2021).

Em comparação com formulações convencionais predominantemente aquosas, que apresentam limitações como baixa solubilização de compostos hidrofóbicos, instabilidade química e rápida degradação, os sistemas nanolipídicos oferecem ambiente lipofílico estruturado, maior capacidade de encapsulação e melhor controle cinético de liberação. Assim, carreadores lipídicos nanoestruturados viabilizam a entrega eficiente de bioativos instáveis ou pouco solúveis, ao mesmo tempo em que modulam a interação entre a nanopartícula e a célula para aplicações biomédicas avançadas, reduzindo as limitações associadas a sistemas tradicionais baseados em grandes volumes de água e ampliando o potencial terapêutico e funcional dessas moléculas.

## 2.6 MELANOMA E MODELO CELULAR B16-F10

O melanoma é considerado o câncer de pele mais letal, apresentando incidência crescente em diversas regiões do mundo e elevada capacidade metastática; apesar dos avanços em terapias-alvo e imunoterapias, a sobrevida em estágios avançados ainda permanece limitada (Becker; Indra, 2023; Cannavò *et al*., 2019; Emanuelli *et al*., 2022; Gieniusz *et al*., 2024; Kaminski *et al*., 2022). A exposição à radiação ultravioleta e a outros estressores ambientais promove a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), induzindo danos em DNA,

proteínas e lipídios, o que favorece a transformação melanocítica, a instabilidade genômica e mecanismos de evasão imune (Becker; Indra, 2023; Gieniusz *et al*., 2024; Kaminski *et al*., 2022). Nesse contexto, o melanoma destaca-se como modelo paradigmático de neoplasia fortemente associada a desequilíbrios redox, em um microambiente tumoral também marcado por inflamação crônica.

Do ponto de vista fisiopatológico, o melanoma apresenta níveis elevados de espécies reativas e adaptações no sistema redox celular que modulam proliferação, invasão, resistência terapêutica e plasticidade fenotípica (Becker; Indra, 2023; Cannavò *et al*., 2019; Emanuelli *et al*., 2022; Kaminski *et al*., 2022). A biologia do melanoma também envolve componentes inflamatórios, associados à ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias e à participação de células do microambiente tumoral, como fibroblastos associados ao tumor e macrófagos infiltrados, que contribuem para mutagênese, angiogênese e remodelamento da matriz extracelular (Emanuelli *et al*., 2022; Kaminski *et al*., 2022; Remigante *et al*., 2023; Sikorski *et al*., 2025; Trzeciak *et al*., 2022; Wang *et al*., 2025). Estresse oxidativo e inflamação encontram-se, portanto, intimamente relacionados na progressão tumoral, estabelecendo um ciclo que remodela o microambiente e favorece crescimento, invasão e disseminação metastática (Emanuelli *et al*., 2022; Kaminski *et al*., 2022; Li *et al*., 2018; Remigante *et al*., 2023; Wang *et al*., 2025).

Para investigar esses processos, a linhagem murina B16-F10 é amplamente empregada como modelo experimental padrão em estudos de melanoma, progressão tumoral e metástase (Culp *et al*., 2006; Potez *et al*., 2018). Em camundongos C57BL/6, tumores derivados de B16-F10 apresentam crescimento rápido, intensa angiogênese e linfangiogênese, além de infiltração significativa de macrófagos e linfócitos, acompanhadas por alterações temporais na expressão de proteínas relacionadas à glicólise, cicatrização e metabolismo de superóxido (Culp *et al*., 2006; Potez *et al*., 2018). Esse modelo também demonstra forte resposta à hipóxia intermitente, com aumento de ROS, maior expressão de HIF-1α e incremento da metástase pulmonar, acompanhados de elevação de mediadores inflamatórios, efeitos que podem ser atenuados por intervenções antioxidantes (Li *et al*., 2018; Qi *et al*., 2022).

Dessa forma, o modelo B16-F10 mostra-se particularmente adequado para investigar processos associados ao estresse oxidativo e ao remodelamento morfológico no contexto tumoral, permitindo a avaliação de estratégias com potencial antioxidante ou pró-oxidante (Culp *et al*., 2006; Fontes *et al*., 2022; Mîndrilă *et al*., 2021; Potez *et al*., 2018; Qi *et al*., 2022; Varol *et al*., 2026). Essa combinação entre relevância clínica do melanoma e robustez

experimental do modelo B16-F10 fundamenta sua escolha para estudos voltados à modulação redox e morfológica no contexto tumoral.

## 2.7 JUSTIFICATIVA

O melanoma é uma neoplasia altamente agressiva, marcada por intensa plasticidade celular, remodelamento do citoesqueleto e estresse oxidativo, processos que favorecem progressão tumoral e potencial metastático. Apesar dos avanços terapêuticos recentes, ainda há necessidade de estratégias complementares capazes de modular esses processos celulares de forma eficaz e segura. Nesse contexto, compostos bioativos de origem vegetal surgem como candidatos promissores, particularmente aqueles com reconhecido potencial antioxidante. Entretanto, limitações relacionadas à estabilidade e biodisponibilidade desses compostos impõem a necessidade de abordagens tecnológicas que potencializem sua ação biológica. Nesse cenário, o NaDES desponta como componente de formulação ainda pouco explorado, cuja contribuição estrutural sobre o comportamento de carreadores lipídicos nanoestruturados e sobre a resposta celular permanece pouco compreendida. Assim, o desenvolvimento de um par de nanoformulações contendo o mesmo extrato de coproduto de taperebá e idêntica matriz lipídica, diferindo exclusivamente pela presença ou ausência do NaDES, representa uma estratégia experimental capaz de isolar a contribuição desse componente sobre a interação com células de melanoma, avaliando seus efeitos morfológicos, ultraestruturais e oxidativos no modelo B16-F10. De forma complementar, investiga-se se o padrão de resposta observado se estende a uma nanoformulação de composição distinta, obtida a partir do coproduto de seriguela.

Paralelamente, a utilização de resíduos agroindustriais de *Spondias purpurea* e *Spondias mombin* como fonte desses compostos insere a proposta em uma perspectiva de bioeconomia sustentável, na qual a sustentabilidade atua como ferramenta para geração de inovação biomédica. Ao transformar coprodutos em insumos estratégicos para pesquisa em câncer, o estudo dialoga com o ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis), ao promover reaproveitamento de biomassa; com o ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura), ao integrar nanotecnologia e química verde em soluções tecnológicas; e com o ODS 3 (Saúde e Bem-estar), ao contribuir para o avanço do conhecimento sobre novas abordagens experimentais no contexto do melanoma. Dessa forma, a sustentabilidade não é apenas um pano de fundo ambiental, mas parte integrante de uma estratégia científica voltada à descoberta e ao aprimoramento de potenciais intervenções terapêuticas.

# 3. OBJETIVOS

## 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel do NaDES como componente estrutural de carreadores lipídicos nanoestruturados sobre a resposta de células de melanoma B16-F10, comparando uma mesma formulação com e sem sua incorporação (NLC-TAP vs. NLC-TAP-NaDES).

## 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Mensurar a viabilidade celular das formulações por meio do ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), para determinar a concentração citotóxica mediana ($CC_{50}$) e definir as concentrações a serem utilizadas nos ensaios biológicos subsequentes;

II. Caracterizar as alterações morfológicas de células B16-F10 submetidas aos NaDES isolados e às formulações nanoestruturadas, por meio de microscopia óptica (campo claro e contraste de fase);

III. Investigar a organização do citoesqueleto em células B16-F10 por microscopia confocal de fluorescência, utilizando marcação por faloidina conjugada ao fluoróforo Alexa Fluor 488™;

IV. Analisar a morfologia de superfície e a ultraestrutura de células B16-F10 por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), respectivamente;

V. Isolar a contribuição do NaDES como componente estrutural comparando NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES, em um sistema lipídico idêntico;

VI. Verificar se a resposta celular observada se estende a uma formulação de composição distinta (NLC-SER-NaDES);

VII. Avaliar, de forma exploratória, o estresse oxidativo por CellROX™ Green.

# 4. MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE COPRODUTOS DE SERIGUELA E TAPEREBÁ

A obtenção dos extratos de seriguela e taperebá utilizados neste estudo foi realizada previamente pelo grupo de pesquisa; os extratos já preparados foram empregados nos ensaios biológicos descritos nesta dissertação.

Os frutos de seriguela (*Spondias purpurea*) e taperebá (*Spondias mombin* L.) foram coletados na área experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Cerrados, localizada em Planaltina, Distrito Federal (15°54′16,50″ S; 47°22′37,49″ O, a 855 m de altitude), inserida no bioma Cerrado. O acesso ao patrimônio genético encontra-se registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob os números AAC830E e A002D4B.

Os frutos foram colhidos no estágio ideal de maturação, respeitando os períodos de colheita de cada variedade. Para cada espécie, foram utilizados aproximadamente 200 frutos por lote. As cascas dos frutos foram removidas manualmente, separadas da polpa e secas naturalmente à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 24 horas.

Os extratos das cascas de seriguela e taperebá foram preparados seguindo a metodologia descrita por Cabral *et al*. (2018), com adaptações. O etanol foi adicionado às cascas secas, na proporção de 1:2 (p/v), e a mistura foi submetida à maceração por sete dias, sob refrigeração e ao abrigo da luz. Após a maceração, os extratos foram filtrados e armazenados em frascos âmbar, sob refrigeração, para uso nas análises subsequentes e no desenvolvimento dos carreadores lipídicos nanoestruturados.

## 4.2 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS UTILIZADOS NO ESTUDO

O desenvolvimento e a caracterização físico-química dos CLNs contendo extrato de taperebá e de seriguela foram realizados previamente pelo grupo de pesquisa. A nanoformulação contendo extrato de taperebá foi descrita por Mello *et al*. (2025), enquanto a nanoformulação contendo extrato de seriguela é objeto de artigo científico atualmente em elaboração pelo grupo. Nesta dissertação, essas formulações já estabelecidas foram utilizadas para a condução dos ensaios biológicos em células B16-F10.

Os CLNs utilizados neste estudo continham extratos obtidos das cascas de seriguela e taperebá previamente encapsulados em matriz lipídica nanoestruturada.

### 4.2.1 CLNs Contendo Extrato de Taperebá

A nanoformulação contendo extrato de taperebá (NLC-TAP) foi desenvolvida por meio do método de inversão de fase (PIT), conforme descrito por Mello *et al*. (2025). A fase lipídica foi composta por manteiga de murumuru (lipídio sólido) e óleo de buriti (lipídio líquido), utilizando o surfactante não iônico Brij® O10. As fases lipídica e aquosa foram aquecidas separadamente até completa homogeneização, combinadas sob agitação para formação da emulsão, e então rapidamente resfriadas em banho de gelo para solidificação da matriz lipídica e formação das nanopartículas. Os demais parâmetros de processamento seguiram integralmente o protocolo descrito por Mello *et al*. (2025).

Para as formulações associadas a NaDES (NLC-TAP-NaDES), o extrato concentrado foi previamente diluído em solução de NaDES (proporção 1:6, m/v), composta por cloreto de colina, ácido cítrico e glicerol na proporção molar 1:1:4, com 25% de água, sendo posteriormente incorporado à fase lipídica após a fusão da manteiga de murumuru. Para as formulações sem NaDES (NLC-TAP), o extrato concentrado foi incorporado diretamente à fase lipídica.

As formulações foram avaliadas quanto ao índice de polidispersão (PDI < 0,25) e ao diâmetro hidrodinâmico (< 200 nm), por espalhamento dinâmico de luz (DLS), sendo selecionadas as formulações com os melhores parâmetros coloidais para as etapas subsequentes de caracterização e avaliação biológica.

### 4.2.2 CLN Contendo Extrato de Seriguela

O NLC contendo extrato de seriguela (NLC-SER-NaDES) foi desenvolvido com base na metodologia descrita por Schuh *et al*. (2024), integrando o uso de solventes eutéticos naturais profundos (NaDES) ao sistema nanoestruturado. A matriz lipídica foi composta por manteiga de tucumã e óleo de pracaxi, associados ao surfactante Brij® O10. As proporções exatas de cada componente não são apresentadas nesta dissertação por integrarem dados inéditos do manuscrito em elaboração pelo grupo, ainda não publicado.

O extrato foi previamente solubilizado em NaDES antes da incorporação à fase lipídica. A fase lipídica foi fundida, seguida da incorporação do extrato solubilizado; a fase aquosa foi então adicionada sob agitação, e o sistema foi submetido a resfriamento para promover a formação das nanopartículas, conforme protocolo previamente desenvolvido pelo grupo.

As formulações selecionadas apresentaram parâmetros físico-químicos compatíveis com estabilidade coloidal, conforme caracterização previamente realizada pelo grupo de pesquisa.

A Tabela 1 resume a composição das nanoformulações utilizadas nos ensaios biológicos descritos nas seções seguintes.

**Tabela 1.** Composição das nanoformulações (NLC-TAP, NLC-TAP-NaDES e NLC-SER-NaDES) utilizadas neste estudo. Proporções da formulação NLC-SER-NaDES omitidas por corresponderem a dados inéditos de manuscrito do grupo ainda em elaboração.

| Formulação | Lipídio sólido | Lipídio líquido | Surfactante | NaDES |
|---|---|---|---|---|
| **NLC-TAP** | Manteiga de murumuru | Óleo de buriti | Brij® O10 | Não |
| **NLC-TAP-NaDES** | Manteiga de murumuru | Óleo de buriti | Brij® O10 | Cloreto de colina + ácido cítrico + glicerol (1:1:4) |
| **NLC-SER-NaDES** | Manteiga de tucumã | Óleo de pracaxi | Brij® O10 | Betaína + ácido málico |

### 4.2.3 Caracterização Físico-Química das Nanoformulações

4.2.3.1 Caracterização das nanoformulações de taperebá (NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES)

Os dados de caracterização físico-química das nanoformulações de taperebá, obtidos previamente pelo grupo de pesquisa, foram descritos originalmente por Mello *et al*. (2025), enquanto dados complementares de reformulação e estabilidade em longo prazo foram relatados por Chang *et al*. (2026), em continuidade biológica da mesma plataforma.

As nanoformulações contendo extrato de casca de taperebá apresentaram dimensões nanométricas e distribuição relativamente homogênea de tamanho (Mello *et al*., 2025). O NLC-TAP apresentou diâmetro hidrodinâmico de 199,13 ± 0,91 nm, índice de polidispersão (PDI) de 0,23 ± 0,01 e potencial zeta de −4,31 ± 0,16 mV, enquanto o NLC-TAP-NaDES apresentou diâmetro de 159,00 ± 0,66 nm, PDI de 0,21 ± 0,03 e potencial zeta de −2,35 ± 0,35 mV. Os valores de potencial zeta próximos da neutralidade estão abaixo do limiar clássico de estabilização eletrostática (|ZP| > 30 mV); como o Brij® O10 é um tensoativo não iônico, a estabilidade coloidal dessas formulações é atribuída predominantemente a mecanismos de estabilização estérica, proporcionados pelas cadeias de polioxietileno do tensoativo na superfície da partícula, e não à repulsão eletrostática entre partículas. As eficiências de encapsulação foram de 83,95% e 85,81%, respectivamente (Tabela 2).

**Tabela 2.** Propriedades físico-químicas das nanoformulações de taperebá, incluindo índice de polidispersão (PDI), diâmetro hidrodinâmico (HD), potencial zeta (ZP), teor de fenólicos totais (TP) e eficiência de encapsulação (EE%). Dados de Mello *et al*. (2025).

| Formulação | PDI | HD (nm) | ZP (mV) | TP (mg EAG/mL NLC) | EE% |
|---|---|---|---|---|---|
| **NLC-TAP** | 0,23 ± 0,01 | 199,13 ± 0,91 | −4,31 ± 0,16 | 27,05 ± 0,97 | 83,95% |
| **NLC-TAP-NaDES** | 0,21 ± 0,03 | 159,00 ± 0,66 | −2,35 ± 0,35 | 20,64 ± 0,58 | 85,81% |

A microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas revelou partículas predominantemente esféricas em ambas as formulações. O NLC-TAP apresentou contornos mais definidos e organização aparente mais homogênea, compatível com uma matriz lipídica mais cristalina e estruturada, enquanto o NLC-TAP-NaDES exibiu aspecto mais difuso, sugerindo uma transição para uma configuração mais amorfa da matriz lipídica, possivelmente decorrente da interferência do sistema eutético na organização do retículo cristalino durante a solidificação (Mello *et al*., 2025) (Figura 1).

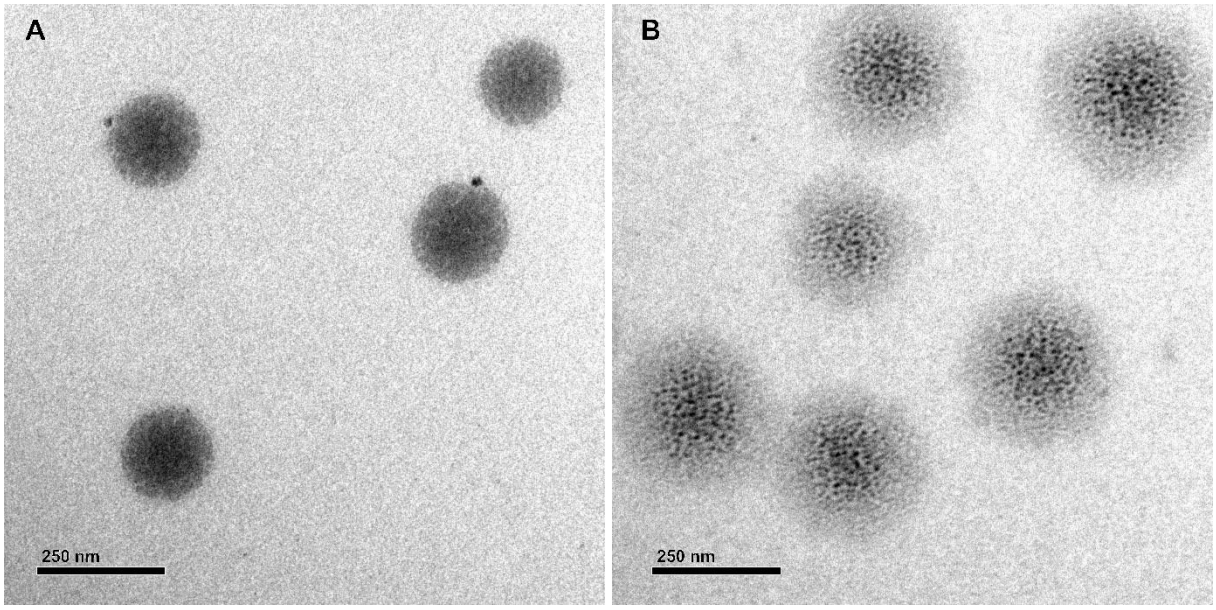



**Figura 1.** Fotomicrografia obtida por MET para o extrato de casca de taperebá encapsulado em carreadores lipídicos nanoestruturados. (A) NLC sem NaDES (NLC-TAP) e (B) NLC com NaDES (NLC-TAP-NaDES). Barra de escala: 500 nm. Fonte: acervo do grupo de pesquisa.

Quanto à estabilidade coloidal, as formulações apresentaram maior estabilidade sob armazenamento em temperatura ambiente e refrigerada, enquanto condições de congelamento e temperatura elevada promoveram maiores oscilações no diâmetro hidrodinâmico e no índice de polidispersão. A incorporação de NaDES também esteve associada a maior retenção de compostos fenólicos totais sob condições adversas de armazenamento, quando comparada à formulação sem NaDES (Mello *et al*., 2025).

A caracterização térmica (DTA/TGA) e a espectroscopia de infravermelho (FT-IR) indicaram que a incorporação do extrato às matrizes lipídicas modificou o perfil térmico em comparação ao extrato livre, e que as formulações contendo NaDES apresentaram eventos térmicos e curvas de perda de massa distintos, compatíveis com interações entre o sistema eutético, os lipídios e os compostos encapsulados (Mello *et al*., 2025).

Complementarmente à quantificação de fenólicos totais, o extrato de casca de taperebá teve seu perfil individual de compostos caracterizado por UPLC-MS/MS, identificando 48 compostos fenólicos distribuídos entre derivados de ácido benzoico, cumarinas, fenilpropanoides, estilbenos, di-hidrochalconas, flavonas, flavanonas e flavonóis (Tabela 3). Os compostos majoritários foram o ácido elágico (79,080 µg/g), a quercetina (66,402 µg/g), o ácido gálico (21,994 µg/g), o cis-piceídeo (21,106 µg/g), o ácido clorogênico (10,236 µg/g) e a miricetina (8,137 µg/g) (Brito *et al*., 2022; Mello *et al*., 2025).

**Tabela 3.** Perfil de compostos fenólicos do extrato de casca de taperebá, quantificados por UPLC-MS/MS (µg/g de extrato). Adaptado de Mello *et al*. (2025), com dados originais de De Brito *et al*. (2022).

| Categoria | Composto | Concentração (µg/g) |
|---|---|---|
| **Derivados de ácido benzoico** | Ácido 2,5-di-hidroxibenzoico | 0,102 ± 0,090 |
| **Derivados de ácido benzoico** | Ácido cinâmico | 1,254 ± 0,040 |
| **Derivados de ácido benzoico** | Ácido elágico | 79,080 ± 3,272 |
| **Derivados de ácido benzoico** | Ácido gálico | 21,994 ± 0,361 |
| **Derivados de ácido benzoico** | Antranilato de metila | 0,003 ± 0,002 |
| **Derivados de ácido benzoico** | Galato de metila | 0,031 ± 0,010 |
| **Derivados de ácido benzoico** | Siringaldeído | 0,136 ± 0,053 |
| **Derivados de ácido benzoico** | Ácido vanílico | 0,006 ± 0,003 |
| **Derivados de ácido benzoico** | Vanilina | 0,869 ± 0,080 |
| **Cumarinas** | Dafnetina | 0,377 ± 0,121 |
| **Cumarinas** | Esculina | 4,016 ± 0,371 |
| **Cumarinas** | Fraxina | 0,088 ± 0,030 |
| **Cumarinas** | Escopoletina | 0,382 ± 0,161 |
| **Fenilpropanoides** | Ácido cafeico | 0,239 ± 0,031 |

| | | |
|---|---|---|
| **Fenilpropanoides** | Ácido clorogênico | 10,236 ± 0,211 |
| **Fenilpropanoides** | Ácido criptoclorogênico | 0,141 ± 0,012 |
| **Fenilpropanoides** | Ácido ferúlico | 0,163 ± 0,025 |
| **Fenilpropanoides** | Ácido neoclorogênico | 0,129 ± 0,011 |
| **Fenilpropanoides** | Ácido p-cumárico | 1,868 ± 0,211 |
| **Fenilpropanoides** | Álcool sinapílico | 1,142 ± 0,042 |
| **Fenilpropanoides** | Ácido trans-cutárico | 0,036 ± 0,031 |
| **Estilbenos** | cis-Piceída | 21,106 ± 1,330 |
| **Estilbenos** | trans-Piceída | 3,577 ± 0,181 |
| **Estilbenos** | trans-Resveratrol | 0,650 ± 0,022 |
| **Di-hidrochalconas** | Floretina | 0,017 ± 0,004 |
| **Di-hidrochalconas** | Floridzina | 0,215 ± 0,041 |
| **Di-hidrochalconas** | Trilobatina | 0,051 ± 0,011 |
| **Flavonas** | Apigenina | 0,035 ± 0,011 |
| **Flavonas** | Hesperidina | 0,129 ± 0,071 |
| **Flavonas** | Luteolina | 0,214 ± 0,011 |
| **Flavonas** | Luteolina-7-O-glicosídeo | 1,185 ± 0,081 |
| **Flavonas** | Sinensetina | 1,453 ± 0,031 |
| **Flavanonas** | Naringenina | 1,037 ± 0,061 |
| **Flavonóis** | Isorramnetina | 0,769 ± 0,051 |
| **Flavonóis** | Isorramnetina-3-O-glicosídeo | 1,788 ± 0,081 |
| **Flavonóis** | Canferol | 0,374 ± 0,061 |
| **Flavonóis** | Canferol-3-O-glicosídeo | 2,997 ± 0,091 |
| **Flavonóis** | Canferol-3-O-rutinosídeo | 0,089 ± 0,011 |
| **Flavonóis** | Miricetina | 8,137 ± 0,141 |
| **Flavonóis** | Quercetina | 66,402 ± 1,131 |
| **Flavonóis** | Quercetina-3-Glc-Ara | 0,065 ± 0,021 |
| **Flavonóis** | Quercetina-3-O-glicuronídeo | 0,078 ± 0,021 |
| **Flavonóis** | Quercetina-3-O-ramnosídeo | 0,305 ± 0,041 |
| **Flavonóis** | Ranetina | 0,150 ± 0,071 |
| **Flavonóis** | Rutina | 1,326 ± 0,081 |
| **Flavonóis** | Siringetina | 1,811 ± 0,051 |
| **Flavonóis** | Siringetina-3-O-glicosídeo | 0,023 ± 0,011 |
| **Derivado de hidroquinona** | Arbutina | 1,279 ± 0,071 |

Adicionalmente, foi caracterizado o perfil de proantocianidinas (taninos condensados) do extrato, revelando conteúdo total de oligômeros de procianidina de 4.809,130 μg/g, com grau médio de polimerização (mDP) de 59,394. As unidades monoméricas apresentaram

predomínio de galocatequina (30,685 a 31,492 μg/g, considerando as formas terminal e após floroglucinólise, respectivamente), seguida por epigalocatequina e catequina gálata (dados ainda não publicados, gentilmente cedidos pelo grupo de pesquisa).

Posteriormente, Chang *et al*. (2026) reformularam e recaracterizaram a plataforma NLC-TAP-NaDES, obtendo parâmetros físico-químicos compatíveis com os relatados por Mello *et al*. (2025), com diâmetro médio de aproximadamente 150 nm. Após 365 dias sob armazenamento refrigerado, a formulação apresentou diâmetro hidrodinâmico médio de 120 nm, PDI de 0,59 e potencial zeta de −3,43 mV. O valor de PDI observado após esse período está acima do limiar geralmente considerado confiável para o ajuste por DLS (~0,5), sugerindo uma população mais heterogênea, possivelmente associada à coexistência de partículas menores e agregados, e não permitindo caracterizar a formulação como monodispersa nessas condições. A redução simultânea do diâmetro hidrodinâmico médio é compatível com esse cenário, no qual o ajuste do equipamento passa a ser influenciado por subpopulações distintas, o que reforça a necessidade de reavaliação da estabilidade em estudos futuros com essa formulação após armazenamento prolongado (Chang *et al*., 2026).

4.2.3.2 Caracterização da nanoformulação de seriguela (NLC-SER-NaDES)

Os dados de caracterização físico-química da nanoformulação de seriguela, obtidos previamente pelo grupo de pesquisa, foram descritos na tese de Silva (2025) e complementados pelo manuscrito atualmente em elaboração pelo grupo.

A nanoformulação de seriguela (NLC-SER-NaDES) foi desenvolvida pelo método de inversão de fase (PIT), utilizando manteiga de tucumã como lipídio sólido, óleo de pracaxi como lipídio líquido, Brij® O10 como tensoativo, e extrato etanólico da casca de seriguela (*Spondias purpurea* L.) incorporado à matriz lipídica. Na versão mais recente da plataforma, foi incorporado também um sistema NaDES composto por betaína e ácido málico (Silva, 2025).

Os parâmetros físico-químicos foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS), utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS® a 25 °C. A formulação apresentou diâmetro hidrodinâmico médio de aproximadamente 33 nm, índice de polidispersão (PDI) de aproximadamente 0,10 e potencial zeta de −30,27 mV, valores interpretados como indicativos de elevada homogeneidade e boa estabilidade coloidal (Silva, 2025) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Propriedades físico-químicas da nanoformulação de seriguela (NLC-SER-NaDES), incluindo diâmetro hidrodinâmico (HD), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ZP). Dados de Silva (2025).

| Formulação | PDI | HD (nm) | ZP (mV) | TP (mg EAG/mL NLC) | EE% |
|---|---|---|---|---|---|
| **NLC-SER-NaDES** | ≈ 0,10 | ≈ 33 | −30,27 | não determinado | não determinado |

Nota: valores de HD e PDI correspondem a médias aproximadas relatadas na tese-fonte, sem desvio-padrão disponível. Eficiência de encapsulação e teor de fenólicos totais não constam nos documentos consultados.

A microscopia eletrônica de transmissão revelou nanopartículas predominantemente esféricas e relativamente homogêneas, com distribuição de tamanho compatível com perfil aproximadamente gaussiano, corroborando os resultados obtidos por DLS (Silva, 2025) (Figura 2).

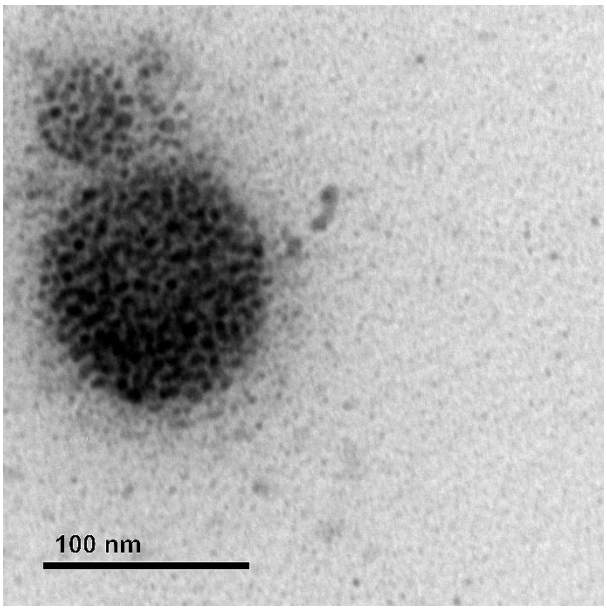



**Figura 2.** Fotomicrografia obtida por MET para a nanoformulação de seriguela (NLC-SER-NaDES). Fonte: acervo do grupo de pesquisa.

A estabilidade coloidal foi monitorada por 120 dias, avaliando diâmetro hidrodinâmico, PDI e pH, sob armazenamento a 4 °C, 25 °C e 37 °C. O diâmetro permaneceu relativamente constante ao longo do período, com pequenas variações no PDI, sem alterações compatíveis com agregação importante (Silva, 2025).

A espectroscopia de infravermelho (FT-IR) confirmou a preservação das bandas lipídicas características da manteiga de tucumã e do óleo de pracaxi, além de bandas atribuídas ao extrato em aproximadamente 880, 1047 e 1647 $cm^{-1}$. Não foram identificadas novas bandas

indicativas de formação de ligações covalentes, resultado compatível com encapsulação do extrato por interação intermolecular com a matriz lipídica, possivelmente por ligações de hidrogênio, sem modificação química da matriz (Silva, 2025).

O perfil fenólico do extrato de casca de seriguela foi caracterizado por UPLC-MS/MS, identificando 38 compostos fenólicos distribuídos entre derivados de ácido benzoico, cumarinas, fenilpropanoides, estilbenos, di-hidrochalconas, flavonas e flavonóis (Tabela 5). Os compostos majoritários foram o ácido elágico (262,406 µg/g), a soma de quercetina-3-O-glicosídeo e quercetina-3-O-galactosídeo (132,858 µg/g), a rutina (64,553 µg/g), o ácido gálico (59,202 µg/g), o ácido clorogênico (49,901 µg/g) e o kaempferol-3-O-rutinosídeo (35,271 µg/g) (Silva, 2025).

**Tabela 5.** Perfil de compostos fenólicos do extrato de casca de seriguela, quantificados por UPLC-MS/MS (µg/g de extrato). Dados de Silva (2025).

| Categoria | Composto | Concentração (µg/g) |
|---|---|---|
| **Derivados do ácido benzoico** | Ácido gálico | 59,202 |
| **Derivados do ácido benzoico** | Ácido 2,4-di-hidroxibenzoico | 0,106 |
| **Derivados do ácido benzoico** | Ácido 2,5-di-hidroxibenzoico | 0,060 |
| **Derivados do ácido benzoico** | Ácido protocatecuico | 0,886 |
| **Derivados do ácido benzoico** | Galato de metila | 0,069 |
| **Derivados do ácido benzoico** | Ácido elágico | 262,406 |
| **Cumarinas** | Dafnetina | 0,757 |
| **Cumarinas** | Escopoletina | 16,468 |
| **Cumarinas** | Esculina | 4,571 |
| **Cumarinas** | Fraxina | 0,855 |
| **Fenilpropanoides** | Ácido p-cumárico | 3,608 |
| **Fenilpropanoides** | Ácido cafeico | 2,128 |
| **Fenilpropanoides** | Ácido ferúlico | 0,756 |
| **Fenilpropanoides** | Ácido neoclorogênico | 3,452 |
| **Fenilpropanoides** | Ácido criptoclorogênico | 2,303 |
| **Fenilpropanoides** | Ácido clorogênico | 49,901 |
| **Estilbenos** | trans-Resveratrol | 0,043 |
| **Estilbenos** | trans-Piceídeo | 0,365 |
| **Estilbenos** | cis-Piceídeo | 1,126 |
| **Di-hidrochalconas** | Floretina | 0,537 |
| **Di-hidrochalconas** | Floridzina | 8,255 |
| **Di-hidrochalconas** | Trilobatina | 0,405 |
| **Flavonas** | Sinensetina | 1,498 |

| | | |
|---|---|---|
| **Flavonas** | Luteolina | 0,014 |
| **Flavonas** | Luteolina-7-O-glicosídeo | 0,198 |
| **Flavonas** | Hesperidina | 0,116 |
| **Flavanonas** | Naringenina | 0,216 |
| **Flavonóis** | Quercetina | 4,291 |
| **Flavonóis** | Canferol | 0,335 |
| **Flavonóis** | Miricetina | 5,585 |
| **Flavonóis** | Isorramnetina | 0,648 |
| **Flavonóis** | Ranetina | 0,301 |
| **Flavonóis** | Siringetina | 1,804 |
| **Flavonóis** | Canferol-3-glicosídeo | 12,863 |
| **Flavonóis** | Quercetina-3-glicosídeo + Quercetina-3-galactosídeo | 132,858 |
| **Flavonóis** | Quercetina-3-Glc-Ara | 24,507 |
| **Flavonóis** | Isorramnetina-3-glicosídeo | 0,371 |
| **Flavonóis** | Canferol-3-O-rutinosídeo | 35,271 |
| **Flavonóis** | Rutina | 64,553 |

Adicionalmente, foi caracterizado o perfil de proantocianidinas (taninos condensados) do extrato de seriguela, revelando conteúdo total de oligômeros de procianidina de 154,323 µg/g, com grau médio de polimerização (mDP) de 12,650. As unidades monoméricas apresentaram predomínio de galocatequina (5,845 a 6,250 µg/g, considerando as formas terminal e após floroglucinólise, respectivamente), seguida por epigalocatequina e catequina gallata (dados ainda não publicados, gentilmente cedidos pelo grupo de pesquisa).

4.2.3.3 Síntese comparativa das nanoformulações

As nanoformulações desenvolvidas a partir dos coprodutos de seriguela (*Spondias purpurea* L.) e taperebá (*Spondias mombin* L.) apresentaram características físico-químicas compatíveis com sistemas nanoestruturados destinados à aplicação tópica. Ambas foram produzidas pelo método de inversão de fase, empregado de forma padronizada pelo grupo de pesquisa. Apesar das diferentes matrizes lipídicas e estratégias de incorporação dos extratos vegetais entre os dois sistemas, ambas as formulações apresentaram dimensões nanométricas, distribuição de tamanho relativamente homogênea e morfologia predominantemente esférica, conforme evidenciado pelas análises de espalhamento dinâmico de luz e microscopia eletrônica de transmissão.

As nanoformulações contendo extrato de taperebá (NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES) apresentaram diâmetro hidrodinâmico inferior a 200 nm, baixos índices de polidispersidade e elevada eficiência de encapsulação (Mello *et al*., 2025). A incorporação do NaDES promoveu redução do tamanho médio das partículas e discreto aumento da eficiência de encapsulação, mantendo a morfologia predominantemente esférica observada por microscopia eletrônica de transmissão. As análises de FT-IR e de comportamento térmico indicaram que a incorporação do extrato ocorreu sem comprometer a integridade estrutural da matriz lipídica, enquanto os ensaios de estabilidade demonstraram manutenção das propriedades físico-químicas durante o armazenamento (Chang *et al*., 2026; Mello *et al*., 2025).

A nanoformulação contendo extrato de seriguela (NLC-SER-NaDES) apresentou índice de polidispersão (PDI ≈ 0,10) bem abaixo do limiar geralmente considerado indicativo de sistemas monodispersos (PDI < 0,3), consistente com elevada homogeneidade de tamanho de partícula, e potencial zeta de −30,27 mV, valor que ultrapassa o limiar clássico de estabilização eletrostática (|ZP| > 30 mV), compatível com estabilidade coloidal por repulsão eletrostática entre partículas. Essas características físico-químicas foram mantidas durante o período de armazenamento avaliado (Silva, 2025). A análise por FT-IR demonstrou a preservação das bandas características da matriz lipídica, associada à presença de bandas atribuídas aos compostos fenólicos do extrato, indicando sua incorporação sem evidências de formação de novas ligações covalentes. Além disso, a caracterização fitoquímica revelou um perfil rico em compostos fenólicos, destacando-se ácido elágico, ácido gálico, ácido clorogênico, rutina e derivados de quercetina, compostos reconhecidos por seu potencial antioxidante (Silva, 2025).

Entre as três formulações, o par NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES constitui a única comparação genuinamente controlada deste estudo, uma vez que compartilham o mesmo extrato, a mesma matriz lipídica e o mesmo tensoativo, diferindo exclusivamente pela presença do sistema NaDES. Nesse par, a incorporação do NaDES esteve associada a uma partícula de menor diâmetro hidrodinâmico (159 versus 199 nm), potencial zeta menos negativo (−2,35 versus −4,31 mV) e organização morfológica mais amorfa por microscopia eletrônica de transmissão, em comparação à formulação sem NaDES (Mello *et al*., 2025). Essas diferenças físico-químicas constituem parâmetro de referência para interpretação dos ensaios biológicos apresentados nos Capítulos 5 e 6.

Em conjunto, essas características indicam que as nanoformulações utilizadas neste estudo apresentam características compatíveis com sistemas lipídicos nanoestruturados estáveis e potencialmente adequados para aplicações biológicas. As diferenças observadas entre as formulações refletem principalmente suas distintas composições lipídicas, os extratos vegetais

utilizados e a utilização de solventes eutéticos naturais nos sistemas contendo taperebá e seriguela, não permitindo atribuir as variações físico-químicas exclusivamente à origem do coproduto vegetal. Dessa forma, a caracterização apresentada constitui a base para a interpretação dos ensaios biológicos descritos no Capítulo 5.

## 4.3 CULTURA CELULAR E TRATAMENTOS

### 4.3.1 Cultura Celular

A linhagem de melanoma murino B16-F10 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium – High Glucose (DMEM-High; Elabscience) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco) e 1% de solução de penicilina (10.000 U/mL) e estreptomicina (10.000 µg/mL) (Gibco), resultando em concentração final de 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina no meio de cultura.

As células foram incubadas a 37 °C, sob atmosfera umidificada contendo 5% de $CO_2$. A manutenção das culturas foi realizada por meio de subcultivos periódicos, utilizando procedimentos padrão de tripsinização e replaqueamento, conforme a confluência celular observada.

### 4.3.2 Ensaio De Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As nanoformulações foram testadas em sete concentrações, obtidas por diluição seriada na razão 1:5 a partir do ponto inicial de 25.008 µg/mL de lipídio (massa de lipídio por volume), resultando nas concentrações finais de 2; 8; 40; 200; 1.000; 5.002; e 25.008 µg/mL de lipídio.

As células B16-F10 foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de $5\times10^3$ células por poço, e incubadas por 24 horas para adesão. Após esse período, foram tratadas com diferentes concentrações das formulações e mantidas por 24 horas, em triplicata técnica.

Ao final do tratamento, foi adicionada solução de MTT na concentração de 0,5 mg/mL, e as células permaneceram incubadas por 2 horas a 37 °C. Em seguida, o meio foi removido e os cristais de formazan formados foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi determinada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 595 nm.

Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade em relação ao grupo controle, e a concentração citotóxica mediana ($CC_{50}$) foi determinada por regressão não linear, conforme descrito no item 4.6.

### 4.3.3 Tratamentos Celulares

As concentrações utilizadas nos ensaios biológicos subsequentes foram definidas com base no valor de concentração citotóxica mediana ($CC_{50}$) de cada uma das três formulações (NLC-TAP, NLC-TAP-NaDES e NLC-SER-NaDES), determinado no ensaio de viabilidade celular (item 4.3.2; resultados apresentados no item 5.1). Para as formulações contendo extrato de taperebá, os experimentos subsequentes utilizaram a mesma concentração experimental para NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES, permitindo isolar a contribuição do NaDES como componente de formulação em um sistema lipídico idêntico, comparação que constitui o eixo central do desenho experimental deste estudo.

Os tratamentos foram realizados com carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo extratos de seriguela (*Spondias purpurea*) e taperebá (*Spondias mombin* L.), bem como com os respectivos NaDES livres. As nanoformulações foram previamente diluídas diretamente no meio DMEM-High suplementado e adicionadas às células. As concentrações dos NaDES livres corresponderam exatamente à fração de NaDES presente nas respectivas nanoformulações, sendo igualmente diluídos no meio de cultura antes da aplicação. A Tabela 6 resume os grupos experimentais e as concentrações utilizadas.

**Tabela 6.** Grupos experimentais e concentrações utilizadas nos ensaios biológicos.

| Grupo | Tratamento | Concentração |
|---|---|---|
| **Controle** | DMEM-High | — |
| **NaDES 1** | Betaína + ácido málico | Equivalente à fração presente na formulação NLC-SER-NaDES |
| **NaDES 2** | Cloreto de colina + ácido cítrico + glicerol | Equivalente à fração presente na formulação NLC-TAP-NaDES |
| **NLC-SER-NaDES** | Nanoformulação de seriguela | $CC_{50}$ = 24,1 µg/mL |
| **NLC-TAP** | Nanoformulação de taperebá (sem NaDES) | $CC_{50}$ próprio = 106,2 µg/mL; concentração experimental utilizada = $CC_{50}$ do NLC-TAP-NaDES (67,2 µg/mL)* |
| **NLC-TAP-NaDES** | Nanoformulação de taperebá + NaDES | $CC_{50}$ = 67,2 µg/mL |

*mesma concentração adotada para permitir comparação direta entre NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES, conforme explicado no texto.

As células foram semeadas (Dia 0) e mantidas em cultura por 24 horas para adesão. Decorrido esse período, o meio foi substituído pelo meio contendo os tratamentos (CLN ou NaDES livres), que permaneceram em contato com as células por 24 horas adicionais, completando 48 horas desde o plaqueamento.

A Figura 3 esquematiza o delineamento experimental, desde o plaqueamento até as análises finais.

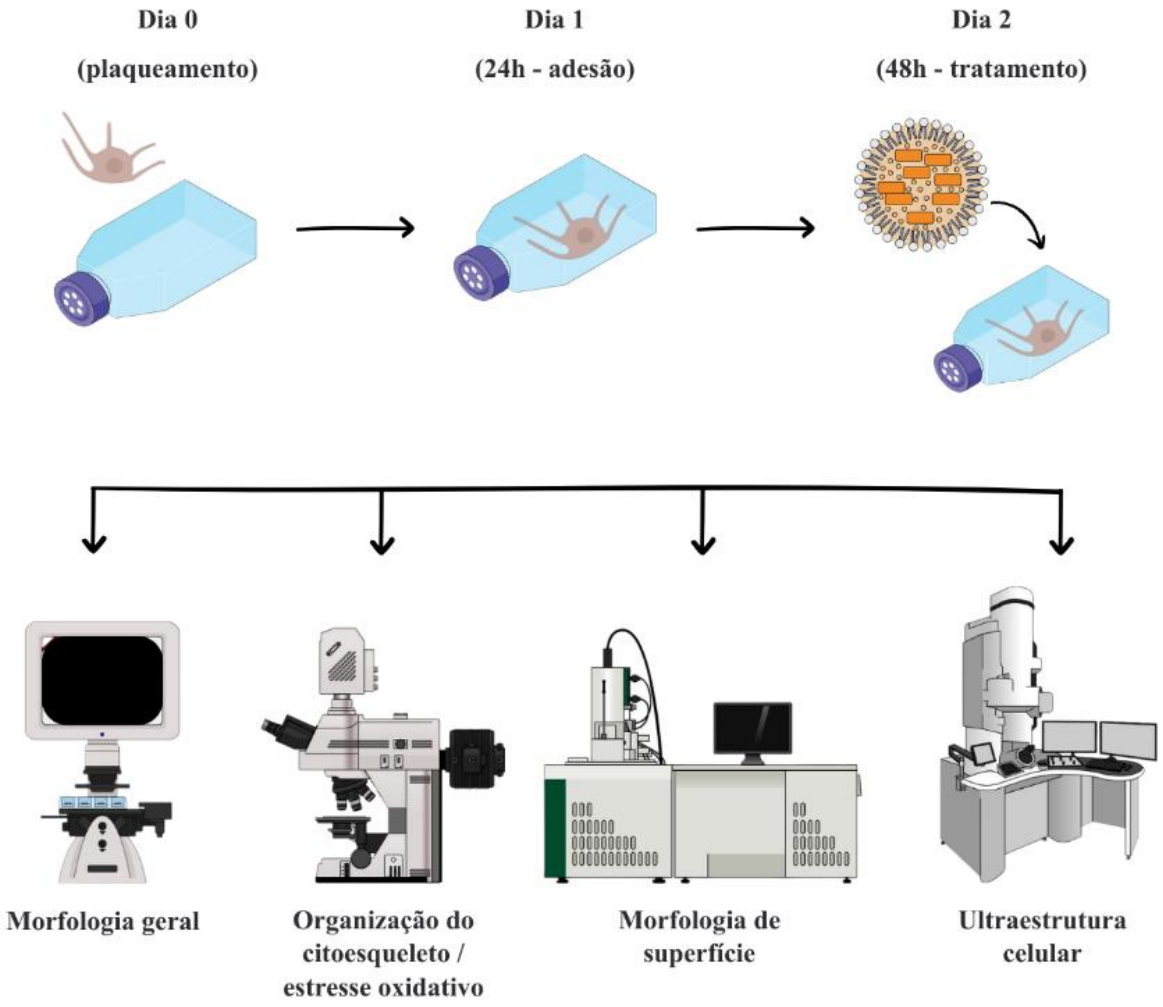



**Figura 3.** Delineamento experimental: plaqueamento (Dia 0), adesão celular (24 h) e tratamento (24 h), conduzidos em placas independentes para cada uma das análises morfológicas, estruturais e de estresse oxidativo (48 h após o plaqueamento).

Cada análise (microscopia óptica, microscopia confocal do citoesqueleto, MEV, MET e avaliação de estresse oxidativo) foi conduzida em placas de cultivo independentes, semeadas e tratadas em paralelo, cada uma com a densidade celular e o tipo de placa apropriados à técnica correspondente, mas sob as mesmas concentrações e o mesmo tempo de tratamento, e não a partir da divisão de uma cultura única entre as diferentes técnicas. Ao final das 24 horas de

tratamento (48 horas após o plaqueamento), as células de cada placa foram processadas conforme a análise correspondente. Para a microscopia óptica (campo claro e contraste de fase), as células foram analisadas vivas, diretamente a partir do cultivo, sem fixação prévia. Para a microscopia confocal do citoesqueleto e para a MEV e de MET, as amostras foram fixadas conforme descrito nos itens correspondentes. Já para a avaliação de estresse oxidativo, as células foram submetidas ao protocolo de indução de estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$, 500 μM) por mais 1 hora, seguida de marcação com CellROX™ Green e fixação, conforme descrito no item 4.5.

## 4.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E ESTRUTURAIS

### 4.4.1 Avaliação Morfológica Geral

Para a avaliação morfológica geral, as células B16-F10 foram semeadas em placas de 6 poços, na densidade de 150.000 células por poço, padronizada entre todos os grupos experimentais. A avaliação morfológica geral das células após os diferentes tratamentos foi realizada por microscopia óptica, nos modos de campo claro e contraste de fase, permitindo a análise qualitativa da confluência e da organização da monocamada, do formato e do espalhamento celular, da presença de prolongamentos citoplasmáticos, dos contatos célula-célula, da frequência de células arredondadas e da ocorrência de áreas acelulares. As imagens em campo claro foram utilizadas para avaliar a organização geral da monocamada, enquanto as imagens em contraste de fase permitiram analisar detalhadamente a morfologia individual das células.

Após o período de tratamento, as células foram mantidas em meio de cultura e analisadas vivas, diretamente na própria placa de tratamento, sem tripsinização, replaqueamento ou fixação prévia. As placas foram retiradas da incubadora e imediatamente encaminhadas para observação em microscópio óptico invertido EVOS™ M7000 Cell Imaging System (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), utilizando objetivas de 10× e 40×, com as mesmas condições de iluminação, ampliação e aquisição mantidas entre os grupos experimentais. Para cada condição experimental, foram analisados múltiplos campos microscópicos, sendo selecionadas imagens representativas do padrão morfológico predominante observado em cada grupo.

### 4.4.2 Avaliação da Organização do Citoesqueleto

A organização do citoesqueleto de actina foi avaliada por microscopia confocal de fluorescência, por meio da marcação de filamentos de actina (F-actina) com faloidina conjugada

ao fluoróforo Alexa Fluor 488™ e marcação nuclear com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), permitindo a análise comparativa qualitativa da organização do citoesqueleto entre os grupos experimentais. As imagens foram adquiridas em plano focal único (single plane), utilizando a mesma objetiva de imersão em óleo HCX PL APO lambda blue 63×/1,40 (Leica Microsystems) em todas as aquisições. As imagens de campo geral foram obtidas com zoom 1×, enquanto as imagens de maior aumento foram obtidas com zoom digital 2,5×, permitindo a avaliação da arquitetura geral do citoesqueleto e de detalhes da organização dos filamentos de actina, respectivamente.

As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro posicionadas no interior dos poços de cultura. Após o período de tratamento celular, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído a 3,7% por 15 minutos, em temperatura ambiente. Após a fixação, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS (5 minutos cada).

Para permeabilização, as células foram incubadas com Triton X-100 a 0,1% por 15 minutos, seguido de duas lavagens com PBS. A marcação de F-actina foi realizada com solução de faloidina-Alexa Fluor 488™, preparada pela diluição de 30 unidades (15 µL) em 1400 µL de PBS. Foram adicionados 100 µL da solução por poço, com incubação por 1 hora. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS (5 minutos cada).

A marcação nuclear foi realizada com DAPI na concentração de 1 µg/mL, utilizando 300 µL por poço, por 5 minutos. Após essa etapa, as amostras foram lavadas três vezes com PBS (5 minutos cada) e as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro utilizando meio de montagem com *antifade* (ProLong™ Gold Antifade Reagent, Invitrogen™). As lâminas foram armazenadas ao abrigo da luz, em congelador, até a aquisição das imagens no dia seguinte.

As imagens foram adquiridas em microscópio confocal de varredura a laser LEICA TCS SP5 (Leica Microsystems), utilizando laser de Argônio (488 nm) para excitação da faloidina-Alexa Fluor 488™ (488 nm de excitação/520 nm de emissão) e laser de diodo violeta (405 nm) para excitação do DAPI (358 nm de excitação/461 nm de emissão). Para cada condição experimental, foram analisados múltiplos campos, sendo selecionadas imagens representativas do padrão predominante observado em cada grupo. As imagens finais foram analisadas individualmente nos canais de F-actina e DAPI, bem como na sobreposição dos canais (*overlay*), permitindo avaliar o posicionamento relativo entre o núcleo e o citoesqueleto. Para fins de melhor distinção visual entre os marcadores fluorescentes, e para evitar confusão com a marcação verde utilizada no ensaio de estresse oxidativo (CellROX™ Green), a sinalização da

F-actina foi exibida em pseudocoloração vermelha, enquanto o DAPI foi mantido em sua coloração de emissão nativa (azul), nas imagens finais.

### 4.4.3 Avaliação da Morfologia de Superfície

A topografia celular e as alterações morfológicas de superfície das células B16-F10 após os diferentes tratamentos foram avaliadas por MEV, utilizando o microscópio JEOL JSM-7001F (Jeol Ltd., Akishima, Tokyo, Japan), operado com tensão de aceleração de 15 kV. As imagens foram adquiridas em diferentes magnificações, permitindo avaliar tanto a organização geral da monocamada quanto detalhes da topografia da superfície celular. As imagens obtidas foram analisadas qualitativamente quanto ao grau de espalhamento celular, área de adesão ao substrato, prolongamentos citoplasmáticos, contornos celulares e características da superfície da membrana plasmática.

As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro posicionadas no interior dos poços de cultura. Após o período de tratamento, as lamínulas foram retiradas do poço e submetidas ao protocolo de preparo para MEV.

Inicialmente, as células foram fixadas com solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% e sacarose 3%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,20), por 2 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada lavagem com água destilada.

Posteriormente, realizou-se pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1%, adicionando-se volume suficiente para cobrir a lamínula, com incubação por 30 minutos. As amostras foram então lavadas duas vezes com água destilada.

A desidratação foi conduzida por meio de série crescente de acetona nas concentrações de 50%, 70% e 90% (10 minutos cada), seguida de duas etapas em acetona 100% (10 minutos cada).

Após a desidratação, as amostras foram submetidas à secagem por ponto crítico utilizando o equipamento Balzers CPD 030. Em seguida, procedeu-se à metalização das amostras com camada condutora de ouro, no equipamento Leica EM SCD 500.

Para cada condição experimental, foram analisados múltiplos campos, sendo selecionadas imagens representativas do padrão morfológico predominante de cada grupo. As amostras foram então analisadas no microscópio eletrônico de varredura.

### 4.4.4 Avaliação da Ultraestrutura Celular

A ultraestrutura das células B16-F10 foi avaliada por MET, utilizando o microscópio JEM-1011 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan), operado com tensão de aceleração de 80 kV, permitindo a análise qualitativa da organização intracelular, da integridade do núcleo e das organelas, bem como da presença de compartimentos intracitoplasmáticos delimitados por membrana.

Ao final do período de tratamento, as células foram desaderidas da placa com tripsina-EDTA 0,25% e coletadas em microtubos, obtendo-se um pellet celular após centrifugação, sendo submetidas a agitação em vórtex entre as etapas subsequentes do protocolo. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky, preparada em tampão cacodilato 0,1 M, overnight, em geladeira. Em seguida, foram lavadas três vezes e preservadas em tampão cacodilato 0,1 M.

A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio 2% e ferricianeto de potássio 1,6%, por 30 minutos, seguida de três lavagens com água destilada. A contrastação *in block* foi realizada em solução aquosa de acetato de uranila 0,5%, ao abrigo da luz, overnight.

A desidratação foi conduzida em série crescente de acetona (50%, 70%, 90% e 100%, esta última, duas vezes), por 10 minutos cada etapa. A inclusão foi realizada por meio de infiltração progressiva em misturas de acetona:resina nas proporções 2:1 (*overnight*), 1:1 (mínimo de 6 horas) e 1:2 (*overnight*), seguida de resina pura (mínimo de 6 horas, em recipiente aberto). As amostras foram então emblocadas em resina pura, devidamente identificadas, e polimerizadas em estufa a 67 °C por 48 horas.

Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo Leica EM UC7 (Leica Microsystems), coletados em telas de cobre, sem contrastação pós-corte. Para cada condição experimental, foram analisados múltiplos campos, sendo selecionadas imagens representativas do padrão ultraestrutural predominante observado em cada grupo. As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan).

## 4.5 AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

A produção intracelular de ROS foi avaliada por microscopia confocal utilizando a sonda fluorescente CellROX™ Green. A análise compreendeu a comparação qualitativa das imagens adquiridas em plano focal único (*single plane*) e uma análise descritiva da intensidade relativa da fluorescência obtida a partir de imagens em formato *z-stack*.

Ao final do período de tratamento, os poços foram divididos em dois grupos experimentais: metade recebeu apenas substituição do meio por DMEM-High fresco (grupo sem indução de estresse), enquanto a outra metade foi exposta ao peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$, 500 μM) como agente indutor de estresse oxidativo, conforme descrito no item 4.3.3.

Após o período de indução, o meio foi removido e adicionou-se solução contendo CellROX™ Green (5 μM), na proporção de 100 μL por poço, seguida de incubação por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 3,7% por 15 minutos, em temperatura ambiente.

Após a fixação, as amostras foram novamente lavadas com PBS (duas vezes, 5 minutos cada) e submetidas à marcação nuclear com DAPI na concentração de 1 μg/mL, utilizando 300 μL por poço, por 5 minutos, seguida de lavagem final com PBS.

As lâminas foram analisadas em microscópio confocal de varredura a laser LEICA TCS SP5 (Leica Microsystems), utilizando laser de Argônio (488 nm) para excitação do CellROX™ Green (485 nm de excitação/520 nm de emissão) e laser de diodo violeta (405 nm) para excitação do DAPI (358 nm de excitação/461 nm de emissão), em dois modos de aquisição distintos. Para a análise comparativa qualitativa entre os grupos experimentais, foram adquiridas imagens confocais em plano focal único (*single plane*), permitindo a comparação qualitativa padronizada entre os grupos experimentais. Todos os grupos experimentais foram adquiridos utilizando os mesmos parâmetros de aquisição (potência do laser, ganho do detector, resolução e demais configurações do microscópio), previamente definidos no grupo controle. Para cada condição experimental, foram adquiridos múltiplos campos, sendo selecionados para apresentação aqueles representativos do padrão predominante observado em cada grupo.

Como análise complementar da intensidade relativa da fluorescência, foram adquiridas imagens em formato *z-stack*, com 45 secções ópticas consecutivas por aquisição e espaçamento de 0,44 μm entre planos, utilizando objetiva de imersão em óleo HCX PL APO lambda blue 63×/1,40 (Leica Microsystems), com resolução de 1024 × 1024 pixels (8 bits). Em função de variação no número de secções adquiridas entre os tratamentos (45 a 47), os *z-stacks* foram padronizados em 45 secções, correspondendo ao menor número comum entre todos os grupos experimentais, a fim de permitir a comparação entre as condições.

A intensidade relativa da fluorescência foi estimada por meio da razão entre a área sob a curva (AUC) do perfil de intensidade de fluorescência do sinal de CellROX™ Green e a AUC do sinal de DAPI, ambas obtidas a partir do perfil de intensidade ao longo do *z-stack* (Stack Profile, LAS X, Leica Microsystems) e exportadas para o software GraphPad Prism®. A AUC do sinal de DAPI foi utilizada como estimativa indireta da quantidade de células presentes no campo analisado, servindo como parâmetro de normalização em razão da variação no número de células entre os diferentes campos. Devido ao número de réplicas disponível (um *z-stack* representativo por condição experimental), os resultados provenientes da análise do *z-stack*

foram apresentados de forma descritiva, sem submissão a testes estatísticos inferenciais, sendo utilizados como complemento à interpretação qualitativa das imagens confocais.

## 4.6 ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism® (GraphPad Software, EUA). A criação, o desenho e a diagramação das imagens e pranchas foram realizados nos softwares Corel PHOTO-PAINT e Corel DRAW (Corel, Canadá). Todas as imagens apresentadas são originais e produzidas para esta dissertação.

Os dados do ensaio de viabilidade celular (MTT) foram analisados por regressão não linear, conforme descrito no item 4.3.2, permitindo a determinação da concentração citotóxica mediana ($CC_{50}$) para cada tratamento.

Os ensaios de microscopia óptica, microscopia confocal (F-actina), MEV e MET foram analisados qualitativamente.

Para o ensaio de estresse oxidativo, a intensidade relativa da fluorescência foi estimada pela razão entre as áreas sob a curva (AUC) dos sinais de CellROX™ Green e DAPI, conforme descrito no item 4.5. Em razão do número de réplicas disponíveis, esses resultados foram apresentados de forma descritiva, sem aplicação de testes estatísticos inferenciais.

## 4.7 DECLARAÇÃO SOBRE O USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

Em conformidade com as orientações da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) quanto à transparência no uso de ferramentas de inteligência artificial em trabalhos acadêmicos, declara-se que:

Foram utilizadas as ferramentas de inteligência artificial Claude (Anthropic), ChatGPT (OpenAI) e Consensus. As ferramentas Claude e ChatGPT foram empregadas para revisão e correção textual (ortografia, gramática e coesão) e para apoio na padronização das referências bibliográficas conforme as normas da ABNT, ao longo de todo o texto da dissertação. A ferramenta Consensus foi utilizada para busca e triagem de artigos científicos, subsidiando a construção da base bibliográfica empregada na revisão da literatura e na discussão dos resultados.

Adicionalmente, a ferramenta ChatGPT (OpenAI) foi utilizada para a geração da representação esquemática apresentada na Figura 17 (item 6.5), ilustrando a relação entre os achados de microscopia confocal e de microscopia eletrônica de transmissão para as três nanoformulações avaliadas.

Todo o conteúdo científico, a interpretação dos dados, as análises e as conclusões apresentadas nesta dissertação são de inteira responsabilidade da autora, que revisou e validou criticamente todo o material produzido com apoio dessas ferramentas.

# 5. RESULTADOS

## 5.1 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade das células B16-F10 tratadas com as nanoformulações de taperebá (com e sem NaDES) e, de forma complementar, com a nanoformulação de seriguela, foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT, visando determinar as concentrações citotóxicas medianas ($CC_{50}$) utilizadas nos experimentos subsequentes.

As células foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações das nanoformulações, e a viabilidade celular foi expressa como percentual em relação ao grupo controle não tratado. As curvas dose–resposta permitiram determinar o $CC_{50}$ de cada nanoformulação.

Observou-se redução da viabilidade celular de forma dependente da concentração para as nanoformulações avaliadas. As nanoformulações contendo extrato de taperebá, com e sem NaDES, foram testadas na faixa de 2 a 25,008 µg/mL de lipídio. O NLC-TAP-NaDES apresentou $CC_{50}$ de 67,2 µg/mL, enquanto o NLC-TAP, sem NaDES, apresentou $CC_{50}$ de 106,2 µg/mL, valor aproximadamente 1,6 vezes maior, indicando menor potência citotóxica aparente da formulação sem NaDES nas condições experimentais avaliadas.

De forma complementar, a nanoformulação contendo extrato de seriguela (NLC-SER-NaDES), testada na faixa de 0,12 a 1.878 µg/mL, apresentou $CC_{50}$ de 24,1 µg/mL, valor aproximadamente 2,8 vezes menor que o do NLC-TAP-NaDES (Figura 4).

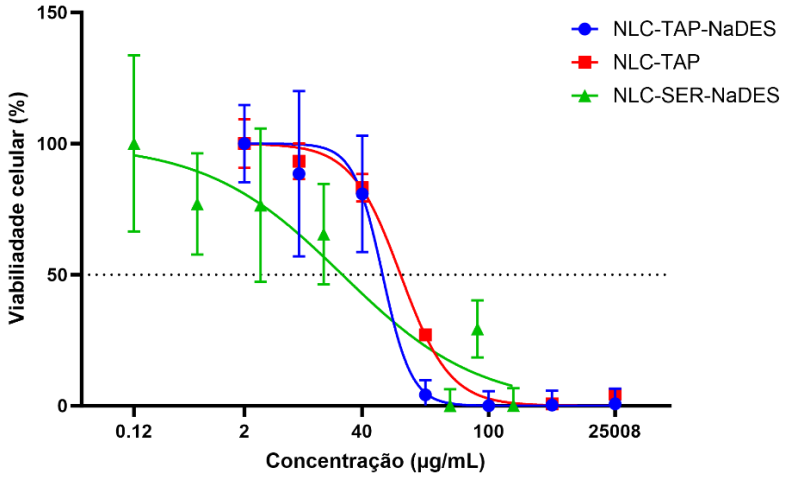



**Figura 4**. Curvas dose-resposta da viabilidade celular de células B16-F10 avaliadas pelo ensaio de MTT após 24 horas de tratamento com as três nanoformulações: NLC-TAP-NaDES ($CC_{50}$ = 67,2 µg/mL), NLC-TAP ($CC_{50}$ = 106,2 µg/mL) e NLC-SER-NaDES ($CC_{50}$ = 24,1 µg/mL), expressos em massa de lipídio por volume. Os dados estão expressos como percentual de viabilidade celular em relação ao grupo controle (média ± desvio padrão de replicatas técnicas), com ajuste da curva por regressão não linear (modelo sigmoidal de dose–resposta inibitória) no software GraphPad Prism®.

As concentrações correspondentes aos respectivos $CC_{50}$ foram adotadas nos experimentos subsequentes de avaliação morfológica, estrutural e de estresse oxidativo, com exceção do NLC-TAP, para o qual foi utilizada a mesma concentração do NLC-TAP-NaDES, permitindo a comparação direta entre as duas formulações, conforme descrito no item 4.3.3.

O ensaio de MTT foi realizado exclusivamente com as nanoformulações, não sendo conduzida avaliação isolada dos extratos livres. Nos experimentos comparativos com NaDES isolados, a concentração utilizada correspondeu à mesma proporção presente nas respectivas formulações nanoestruturadas.

## 5.2 EFEITOS MORFOLÓGICOS GERAIS

As alterações morfológicas induzidas pelos diferentes tratamentos foram avaliadas por microscopia óptica em campo claro (10×) e contraste de fase (40×). As imagens em campo claro permitiram avaliar a confluência e a organização da monocamada celular, enquanto as imagens em contraste de fase possibilitaram analisar a morfologia individual das células, incluindo o espalhamento celular, os prolongamentos citoplasmáticos e os contatos célula-célula.

Os grupos controle (Figura 5A, D), NaDES 1 (Figura 5B, E) e NaDES 2 (Figura 5C, F) apresentaram características morfológicas semelhantes entre si. Em campo claro, os três grupos exibiram confluência elevada, monocamada contínua, densidade celular alta e distribuição homogênea, com áreas acelulares pouco frequentes. Em contraste de fase, as células mostraram-se predominantemente alongadas ou poligonais, com bom espalhamento sobre o substrato, prolongamentos citoplasmáticos evidentes e contatos célula-célula preservados, sem diferenças morfológicas relevantes entre esses três grupos. No grupo NaDES 2, uma parcela discreta das células apresentou-se ligeiramente menos alongada que no controle e no NaDES 1, embora essa diferença tenha sido pequena e não represente um padrão predominante da população.

A partir do tratamento com a nanoformulação de seriguela (NLC-SER-NaDES) (Figura 5G, J), as alterações tornaram-se claramente perceptíveis. Em campo claro, a confluência mostrou-se reduzida, com monocamada menos contínua, densidade celular intermediária, distribuição mais irregular e áreas acelulares mais frequentes. Em contraste de fase, observou-se discreta redução do espalhamento celular, acompanhada de menor frequência de prolongamentos citoplasmáticos e leve diminuição dos contatos célula-célula em parte da população, coexistindo com células de morfologia semelhante ao controle; a frequência de células arredondadas aumentou em relação aos grupos anteriores, sem, contudo, ser predominante.

No tratamento com a nanoformulação de taperebá sem NaDES (NLC-TAP) (Figura 5H, K), essas alterações tornaram-se mais evidentes. Em campo claro, a confluência foi reduzida, com monocamada interrompida, densidade celular baixa e numerosas áreas acelulares, as células distribuindo-se em pequenos agrupamentos separados por regiões livres. Em contraste de fase, observou-se redução do espalhamento celular e menor frequência de contatos célula-célula, com células alongadas coexistindo com células de menor espalhamento e formato mais compacto.

O tratamento com a nanoformulação de taperebá associada a NaDES (NLC-TAP-NaDES) (Figura 5I, L) apresentou o maior comprometimento entre todos os grupos. Em campo claro, a confluência foi baixa, com monocamada ausente na maior parte do campo, densidade celular reduzida, distribuição irregular e áreas acelulares extensas, correspondendo à maior parte do campo observado. Em contraste de fase, observou-se espalhamento celular reduzido na maior parte das células, prolongamentos citoplasmáticos pouco numerosos, contatos célula-célula pouco frequentes e arredondamento celular frequente.

Em conjunto, os achados sugeriram, por avaliação qualitativa, um gradiente de alterações morfológicas entre os grupos (Controle / NaDES 1 / NaDES 2 → NLC-SER-NaDES → NLC-TAP → NLC-TAP-NaDES), sustentado pela redução progressiva da confluência e do espalhamento celular, pela diminuição dos prolongamentos citoplasmáticos e dos contatos célula-célula, e pelo aumento das áreas acelulares e da frequência de células arredondadas. Essa ordenação reflete o padrão observado pela análise visual das imagens e não foi submetida a quantificação ou teste estatístico, constituindo uma hipótese descritiva a ser confirmada por métricas objetivas em estudos futuros. Nos grupos NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES, observou-se a coexistência de células fortemente aderidas e alongadas com células arredondadas e pouco espalhadas, evidenciando resposta morfológica heterogênea ao tratamento.

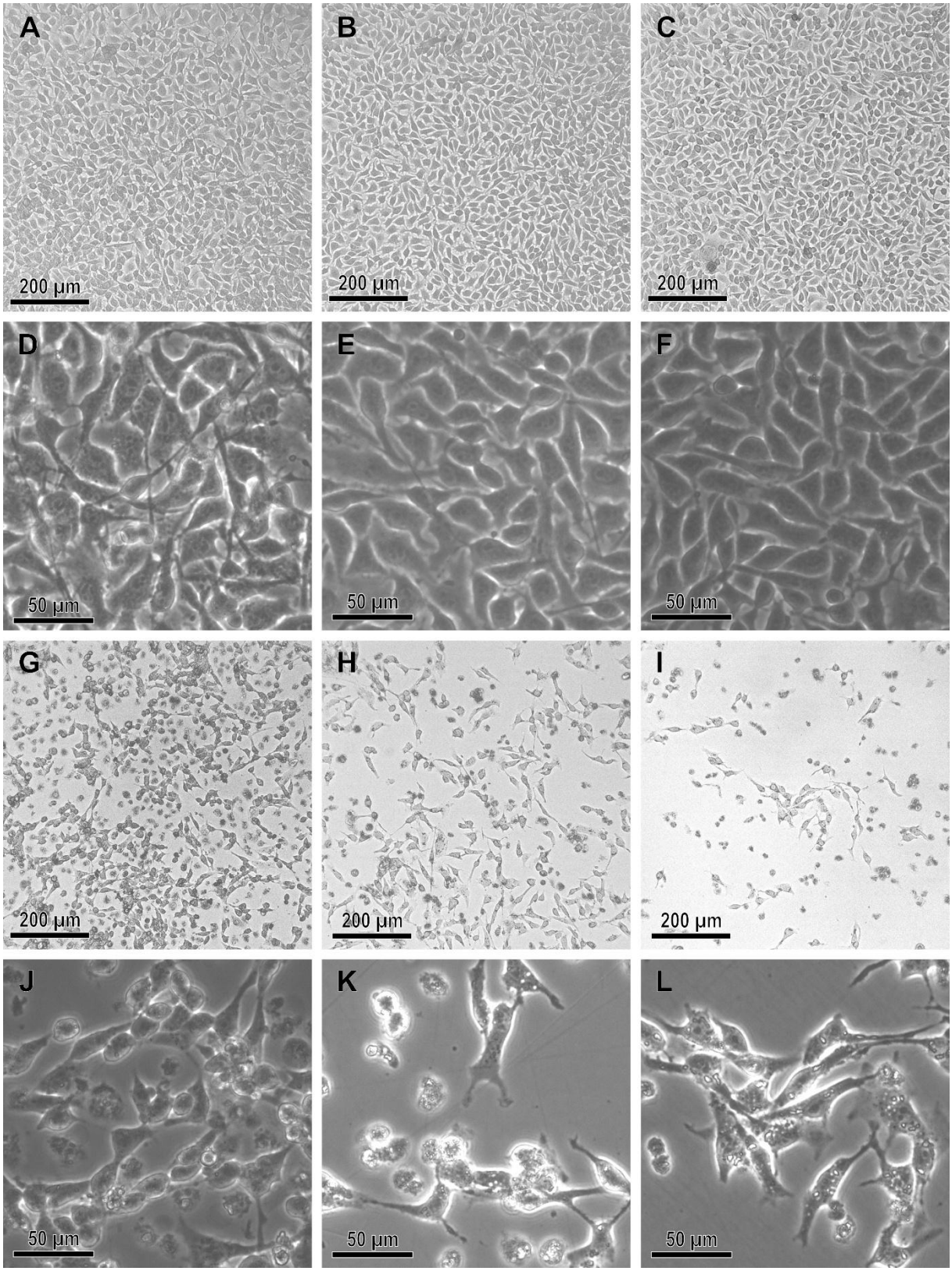



**Figura 5.** Efeitos morfológicos gerais em células B16-F10 após os diferentes tratamentos, avaliados por microscopia óptica em campo claro (10×) e contraste de fase (40×). A: controle; B: NaDES 1; C: NaDES 2; D: controle; E: NaDES 1; F: NaDES 2; G: NLC-SER-NaDES; H: NLC-TAP; I: NLC-TAP-NaDES; J: NLC-SER-NaDES; K: NLC-TAP; L: NLC-TAP-NaDES. Campo claro: A-C, G-I. Contraste de fase: D-F, J-L.

## 5.3 EFEITOS NA ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO

A organização do citoesqueleto de actina (F-actina) e a morfologia nuclear das células B16-F10 foram avaliadas por microscopia confocal de fluorescência. Inicialmente, foram analisadas imagens em campo geral (Figura 6), permitindo a comparação da organização global da população celular entre os grupos. Em seguida, imagens obtidas em maior aumento (Figura 7) possibilitaram a avaliação detalhada da organização da rede de F-actina, da morfologia celular e da presença de estruturas intracitoplasmáticas, permitindo ainda avaliar o espalhamento celular, a distribuição e a morfologia nuclear, bem como a relação espacial entre núcleo e citoesqueleto evidenciada pelas imagens de sobreposição (*overlay*).

O grupo controle (Figura 6 e Figura 7, linha Controle) apresentou rede de F-actina bem organizada, distribuída por todo o citoplasma, com filamentos de orientação relativamente paralela formando feixes bem definidos, intensa marcação cortical acompanhando o contorno celular e numerosos prolongamentos citoplasmáticos ricos em F-actina; as células mostraram-se amplamente espalhadas, com morfologia predominantemente alongada ou poligonal e monocamada homogênea. Os núcleos, marcados por DAPI, apresentaram distribuição homogênea, morfologia ovalada ou discretamente arredondada, contornos regulares e tamanho uniforme, acompanhando a elevada densidade celular observada. A sobreposição dos canais evidenciou núcleos centralmente posicionados na área citoplasmática delimitada pela rede de F-actina, compatível com a organização celular preservada observada em ambos os canais isolados.

Os tratamentos com NaDES 1 (Figura 6 e Figura 7, linha Nades 1) e NaDES 2 (Figura 6 e Figura 7, linha Nades 2) preservaram a organização da F-actina, mantendo feixes bem definidos, marcação cortical contínua, elevado espalhamento celular e prolongamentos citoplasmáticos semelhantes aos observados no grupo controle; os núcleos mantiveram tamanho e formato homogêneos, com contornos regulares e distribuição uniforme, e a sobreposição dos canais evidenciou, em ambos os grupos, padrão de posicionamento núcleo-citoesqueleto compatível com a organização celular preservada. No NaDES 2, uma parcela das células apresentou-se discretamente menos alongada que no controle e no NaDES 1, embora essa diferença não tenha configurado alteração consistente na arquitetura global.

A partir do tratamento com a nanoformulação de seriguela (NLC-SER-NaDES) (Figura 6 e Figura 7, linha NLC-SER-NaDES), observou-se o início de alterações mais evidentes na organização celular. Os feixes de F-actina permaneceram presentes, porém menos uniformes entre as células, com aumento da variabilidade na orientação dos filamentos e maior heterogeneidade citoplasmática; as células apresentaram menor uniformidade de espalhamento,

coexistindo células amplamente aderidas com células mais compactas, e os prolongamentos permaneceram presentes, embora menos extensos em parte da população. Nas imagens de maior aumento (Figura 7, coluna Faloidinha, linha NLC-SER-NaDES), destacou-se a presença recorrente de áreas intracitoplasmáticas arredondadas delimitadas pela F-actina, conferindo aspecto vacuoliforme (termo empregado aqui em sentido estritamente morfológico, sem caracterização adicional, como marcadores de membrana ou de lúmen, que permita atribuir identidade definitiva a essas estruturas), distribuídas em diferentes regiões do citoplasma. Em relação aos núcleos, a densidade permaneceu relativamente elevada, com distribuição um pouco mais heterogênea e discreta variabilidade no tamanho e na intensidade de fluorescência entre células, sem evidências de fragmentação nuclear. A sobreposição dos canais (Figura 7, coluna *Overlay*, linha NLC-SER-NaDES) confirmou que as estruturas com aspecto vacuoliforme não correspondiam à posição dos núcleos, estando distribuídas em outras regiões do citoplasma.

O tratamento com a nanoformulação de taperebá sem NaDES (NLC-TAP) (Figura 6 e Figura 7, linha NLC-TAP) evidenciou alteração mais acentuada da organização celular, com aumento significativo da heterogeneidade: os feixes de F-actina permaneceram presentes e relativamente bem definidos, sobretudo nas células mais aderidas, mas com grande variação na orientação entre diferentes células; observou-se ampla diversidade morfológica, coexistindo células espalhadas, fusiformes e mais compactas, mantendo-se os prolongamentos citoplasmáticos nas células aderidas. A principal alteração neste grupo correspondeu à perda de uniformidade da população celular, e não à desorganização da rede de actina; diferentemente do NLC-SER-NaDES e do NLC-TAP-NaDES, o aspecto vacuoliforme não constituiu achado consistente neste grupo. Quanto aos núcleos, observou-se maior espaçamento entre células e discreta variabilidade no tamanho nuclear, mantendo-se a morfologia nuclear preservada. A sobreposição dos canais evidenciou maior variabilidade no posicionamento relativo entre núcleos e rede de F-actina, acompanhando a heterogeneidade morfológica observada nos canais isolados.

O grupo tratado com a nanoformulação de taperebá associada a NaDES (NLC-TAP-NaDES) (Figura 6 e Figura 7, linha NLC-TAP-NaDES) apresentou a remodelação mais pronunciada entre todos os tratamentos, com distribuição irregular dos feixes de F-actina e orientação variável entre células, acompanhando a intensa heterogeneidade morfológica observada, na qual coexistiram células alongadas, compactas e parcialmente espalhadas, com contornos celulares mais difíceis de individualizar em alguns campos. Nas imagens de maior aumento (Figura 7, coluna Faloidina, linha NLC-TAP-NaDES), a presença de estruturas intracitoplasmáticas com aspecto vacuoliforme mostrou-se mais frequente e evidente do que

nos demais grupos, representando um dos principais achados morfológicos observados. Quanto à distribuição nuclear, este grupo apresentou a maior heterogeneidade entre todos os tratamentos, com núcleos predominantemente íntegros e contornos preservados, sem evidência consistente de condensação de cromatina ou fragmentação nuclear. A sobreposição dos canais (Figura 7, coluna *Overlay*, linha NLC-TAP-NaDES) confirmou a natureza extranuclear das estruturas vacuoliformes, mais numerosas neste grupo. A Figura 8 apresenta, em maior detalhe, as estruturas vacuoliformes observadas em NLC-SER-NaDES e NLC-TAP-NaDES, os dois grupos em que esse padrão foi mais consistentemente identificado.

Em conjunto, a análise do citoesqueleto de F-actina acompanhou o mesmo gradiente qualitativo de remodelação descrito no item 5.3 (Controle / NaDES 1 / NaDES 2 → NLC-SER-NaDES → NLC-TAP → NLC-TAP-NaDES). Mesmo nos grupos que apresentaram alterações morfológicas mais pronunciadas, os feixes de F-actina permaneceram evidentes, indicando reorganização espacial da rede de actina, e não perda de sua organização, acompanhando as alterações de forma, espalhamento e heterogeneidade celular já observadas na microscopia óptica. A presença recorrente de estruturas intracitoplasmáticas com aspecto vacuoliforme nos grupos NLC-SER-NaDES e, principalmente, NLC-TAP-NaDES, confirmada como extranuclear pela sobreposição dos canais, representa um achado adicional relevante, cuja natureza não pode ser determinada apenas pela marcação de F-actina. Em contraste, a morfologia nuclear permaneceu predominantemente preservada em todos os grupos, com alterações discretas mesmo nos tratamentos que promoveram maior remodelação do citoesqueleto.

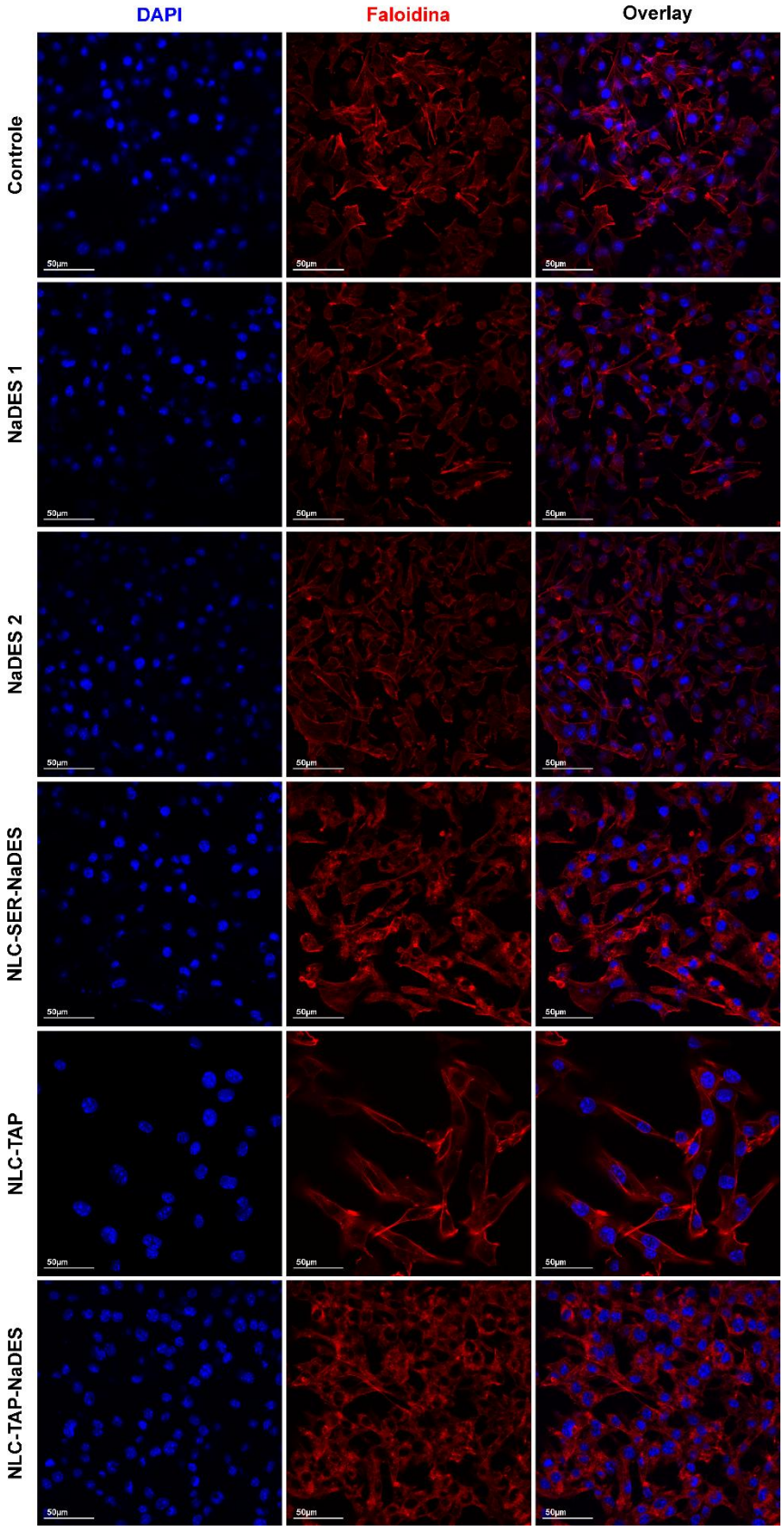



**Figura 6.** Efeitos na organização do citoesqueleto de F-actina em células B16-F10 após os diferentes tratamentos, avaliados por microscopia confocal de fluorescência em campo geral. Colunas: DAPI, F-actina, *Overlay*. Linhas, de cima para baixo: Controle, NaDES 1, NaDES 2, NLC-SER-NaDES, NLC-TAP, NLC-TAP-NaDES.

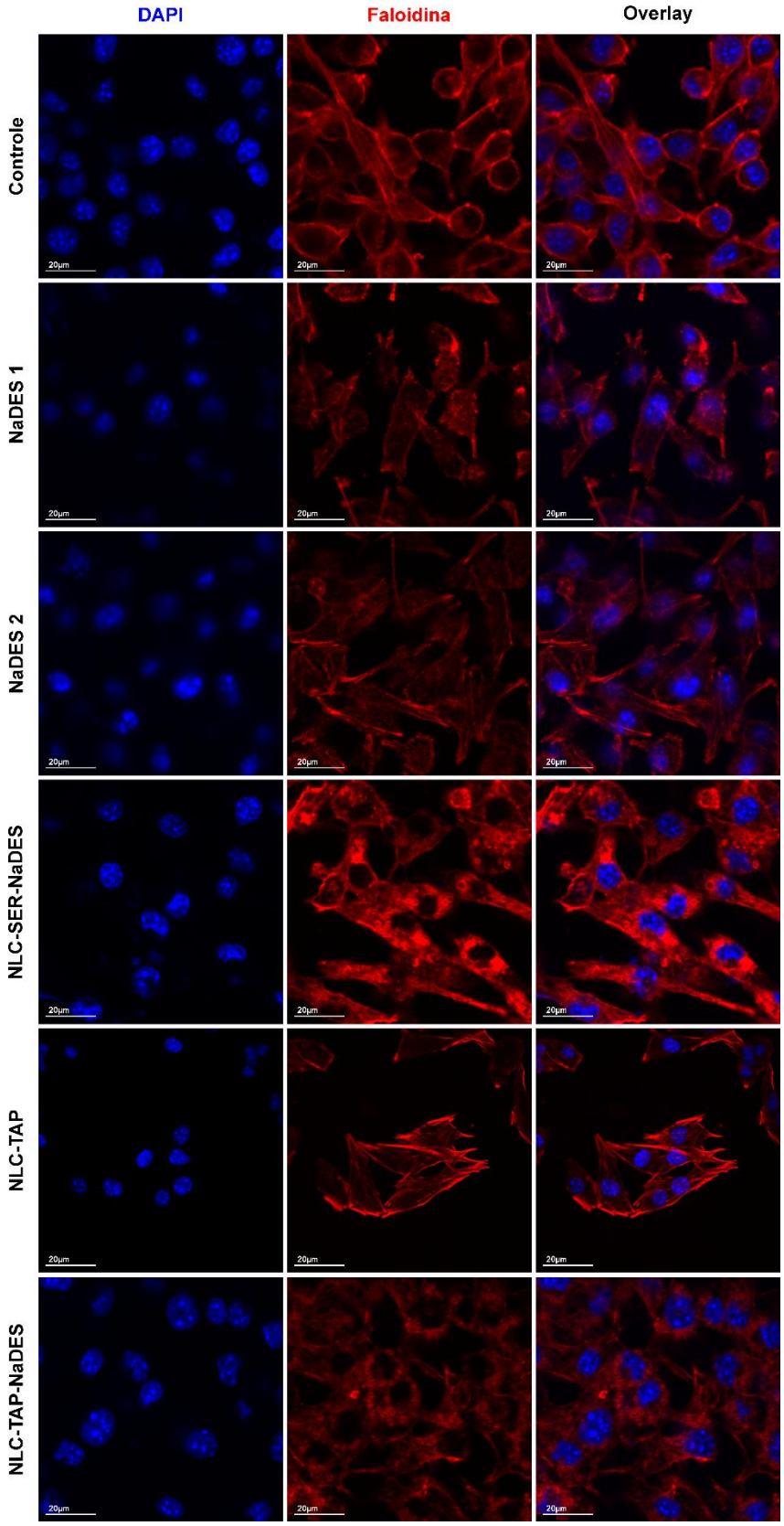



**Figura 7.** Efeitos na organização do citoesqueleto de F-actina em células B16-F10 após os diferentes tratamentos, avaliados por microscopia confocal de fluorescência em maior aumento. Colunas: DAPI, F-actina, *Overlay*. Linhas, de cima para baixo: Controle, NaDES 1, NaDES 2, NLC-SER-NaDES, NLC-TAP, NLC-TAP-NaDES.

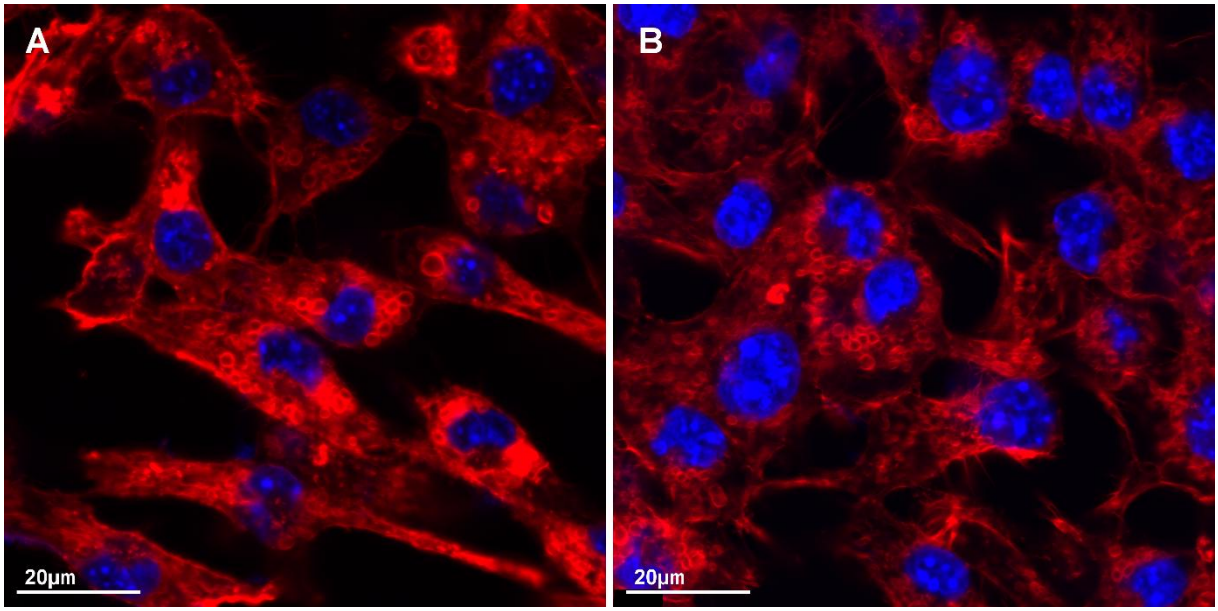



**Figura 8.** Detalhe das estruturas intracitoplasmáticas com aspecto vacuoliforme em NLC-SER-NaDES (A) e NLC-TAP-NaDES (B), os dois grupos em que esse padrão foi mais consistentemente observado por microscopia confocal. Ampliação em relação aos painéis gerais apresentados na Figura 7. As duas formulações não compartilham composição lipídica, extrato ou sistema NaDES; a coocorrência do achado é discutida no item 6.5.

## 5.4 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS

As alterações ultraestruturais das células B16-F10 foram avaliadas por MEV e por MET, permitindo a análise complementar da topografia de superfície e da ultraestrutura interna das células nos diferentes grupos experimentais.

### 5.4.1 Efeitos na Morfologia de Superfície

A topografia da superfície das células B16-F10 foi avaliada por MEV, em baixa magnificação (visão geral) e em alta magnificação, permitindo analisar o grau de espalhamento celular, a área de adesão ao substrato, os prolongamentos citoplasmáticos e a rugosidade da membrana plasmática entre os grupos experimentais.

O grupo controle (Figura 9A) apresentou morfologia predominantemente alongada ou poligonal, com células amplamente espalhadas e extensa área de adesão ao substrato, distribuídas de forma homogênea. Observaram-se numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos estabelecendo contato com células adjacentes e com o substrato. Em alta magnificação (Figura 9D), a superfície celular mostrou-se relativamente homogênea, com discretas ondulações fisiológicas da membrana plasmática, sem irregularidades marcantes, evidenciando arquitetura superficial preservada.

Os tratamentos com NaDES 1 (Figura 9B, E) e NaDES 2 (Figura 9C, F) preservaram o padrão geral observado no controle, mantendo células alongadas, espalhamento celular e prolongamentos citoplasmáticos semelhantes. Em alta magnificação, o NaDES 1 apresentou, em algumas células, discreto aumento de pequenas projeções superficiais, sem constituir alteração predominante da população; o NaDES 2 apresentou padrão semelhante, com pequenas projeções distribuídas principalmente ao longo das bordas celulares, acompanhadas de leve aumento da heterogeneidade do relevo superficial, alterações discretas em ambos os grupos e não representativas de um padrão predominante da população.

A partir do tratamento com a nanoformulação de seriguela (NLC-SER-NaDES) (Figura 9G), observou-se aumento da heterogeneidade morfológica em relação aos grupos controle e NaDES, com formatos celulares variados, coexistindo células mais espalhadas e células de aspecto mais compacto; o espalhamento celular manteve-se relativamente preservado, embora com redução de área de adesão em algumas células, e os prolongamentos citoplasmáticos permaneceram presentes em boa parte da população. Em alta magnificação (Figura 9J), a topografia da membrana mostrou-se discretamente mais irregular, com aumento moderado da rugosidade em comparação ao grupo controle, caracterizando remodelação inicial da arquitetura superficial, sem indicação de destruição celular, e acompanhando as alterações já observadas na microscopia óptica e confocal.

O tratamento com a nanoformulação de taperebá sem NaDES (NLC-TAP) (Figura 9H) evidenciou população celular significativamente mais heterogênea, com coexistência de células amplamente espalhadas e células com menor área de adesão ao substrato, e prolongamentos citoplasmáticos com maior variabilidade morfológica. Em alta magnificação (Figura 9K), este grupo apresentou um dos achados mais marcantes da análise ultraestrutural: a superfície celular exibiu numerosas projeções filiformes distribuídas por praticamente toda a membrana plasmática, conferindo aspecto piloso ou fibrilar e aumento evidente da rugosidade, distintas das discretas ondulações observadas nos grupos controle e NaDES. Assim como no confocal, a principal alteração neste grupo correspondeu ao aumento da heterogeneidade da população celular, e não à perda da integridade estrutural das células.

O grupo tratado com a nanoformulação de taperebá associada a NaDES (NLC-TAP-NaDES) (Figura 9I) apresentou a maior heterogeneidade morfológica entre todos os tratamentos, com células de diferentes formatos e graus de espalhamento, e prolongamentos citoplasmáticos com grande variabilidade entre células. Em alta magnificação (Figura 9L), a topografia da membrana apresentou remodelação marcante, porém com padrão distinto do observado no grupo NLC-TAP: em vez de numerosas projeções filiformes distribuídas pela

superfície, observou-se relevo bastante irregular, formado por pregas, ondulações e estruturas lamelares sobrepostas, conferindo aspecto escamiforme e intensamente rugoso, lembrando uma superfície composta por pequenas lâminas ou placas sobrepostas, claramente distinto da textura pilosa observada no grupo NLC-TAP.

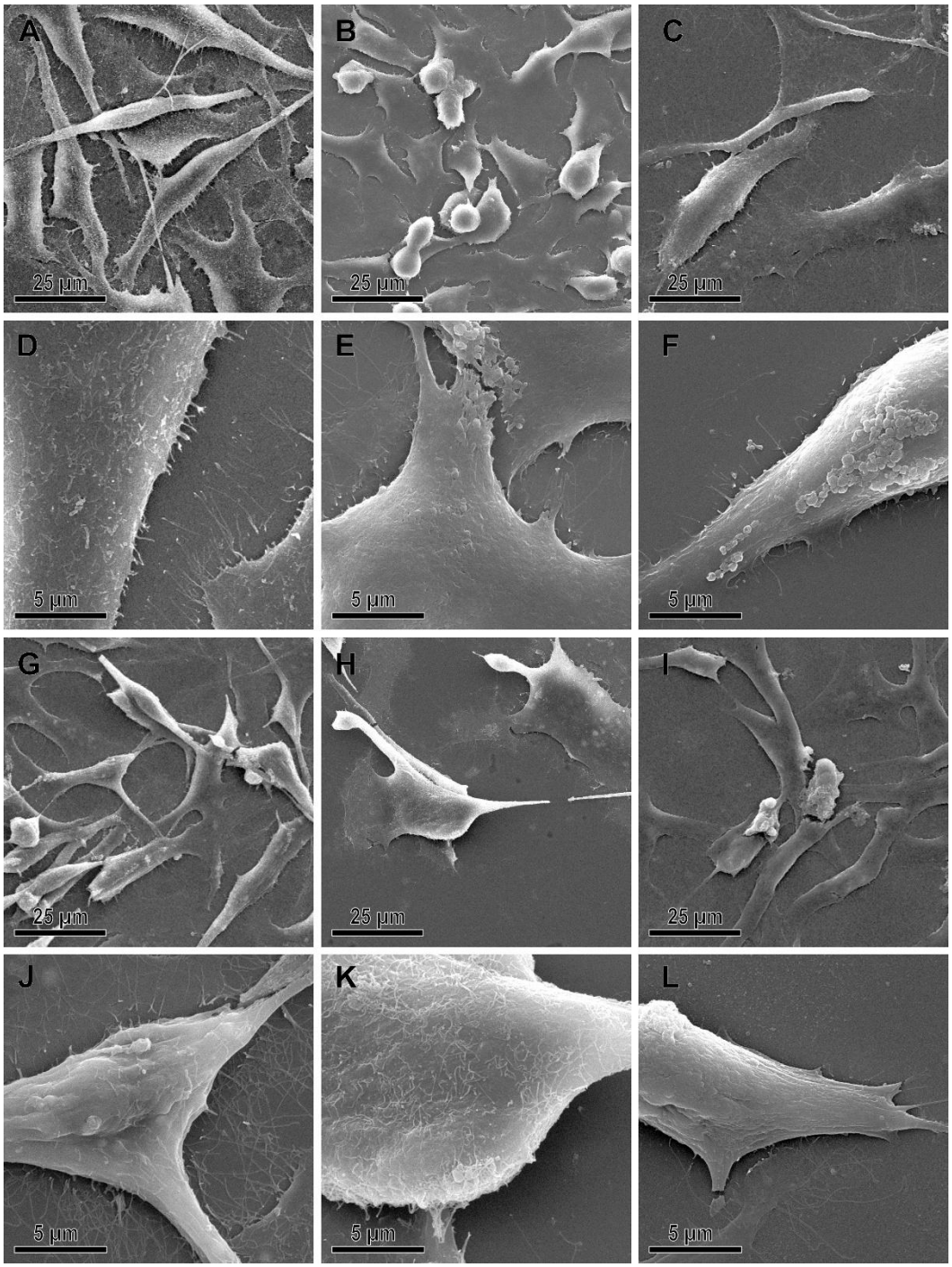



**Figura 9.** Efeitos na morfologia de superfície de células B16-F10 após os diferentes tratamentos, avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em baixa magnificação (A-C, G-I) e alta magnificação (D-F, J-L). Colunas, da esquerda para a direita: controle (A, D), NaDES 1 (B, E) e NaDES 2 (C, F); NLC-SER-NaDES (G, J), NLC-TAP (H, K) e NLC-TAP-NaDES (I, L).

De forma geral, a análise por MEV evidenciou um gradiente progressivo de remodelamento da superfície celular entre os grupos experimentais. Enquanto os tratamentos com NaDES isolados promoveram apenas alterações discretas, as nanoformulações, especialmente o NLC-TAP-NaDES, apresentaram modificações mais evidentes na topografia superficial, preservando, entretanto, a adesão celular e a integridade estrutural global. Um achado particularmente relevante foi a identificação de dois padrões distintos de remodelação nas formulações de taperebá: o NLC-TAP caracterizou-se por projeções filiformes conferindo aspecto piloso à membrana, enquanto o NLC-TAP-NaDES exibiu remodelação com padrão distinto, marcado por relevo pregueado e escamiforme, formado por estruturas lamelares sobrepostas.

### 5.4.2 Efeitos na Ultraestrutura Celular

A ultraestrutura interna das células B16-F10 foi avaliada por MET, em visão geral da célula e em detalhe ultraestrutural, permitindo avaliar a integridade nuclear, a organização citoplasmática, a preservação das organelas e a presença de compartimentos eletronlúcidos delimitados por membrana entre os grupos experimentais.

O grupo controle (Figura 10A) apresentou arquitetura global preservada, com contorno celular contínuo e organização intracelular homogênea. O núcleo ocupou grande parte do citoplasma, com envelope nuclear íntegro, cromatina predominantemente frouxa e nucléolo evidente, sem alterações nucleares marcantes. O citoplasma apresentou eletrondensidade relativamente homogênea, com perfis membranosos e numerosas organelas preservadas e facilmente identificáveis; observaram-se pequenas vesículas fisiológicas distribuídas pelo citoplasma, sem vacuolização exuberante, caracterizando ultraestrutura compatível com células B16-F10 em condições basais.

O tratamento com NaDES 1 (Figura 10B) manteve arquitetura celular semelhante ao controle, com envelope nuclear preservado, cromatina distribuída de maneira semelhante e nucléolo facilmente identificado. O citoplasma mostrou boa preservação, com organelas bem distribuídas e identificáveis, e pequenas vesículas presentes, sem aumento evidente de grandes compartimentos eletronlúcidos, não sendo observadas alterações ultraestruturais relevantes em relação ao controle.

O tratamento com NaDES 2 (Figura 10C), por sua vez, apresentou importante comprometimento da preservação ultraestrutural em comparação aos grupos controle e NaDES 1. O núcleo permaneceu identificável, com envelope nuclear reconhecível e preservação relativamente maior que o restante da célula, mas o citoplasma exibiu intensa rarefação e perda

da organização estrutural, com a membrana plasmática pouco delimitável em parte das micrografias, dificultando a definição dos limites celulares; não se observou aumento de compartimentos eletronlúcidos organizados, predominando perda da arquitetura citoplasmática e dificuldade de individualização das organelas. Embora esse padrão seja compatível com importante comprometimento da organização citoplasmática, não pode ser descartada a contribuição de artefatos decorrentes do processamento da amostra.

A partir do tratamento com a nanoformulação de seriguela (NLC-SER-NaDES) (Figura 10D), a organização nuclear permaneceu relativamente preservada, com envelope nuclear íntegro, nucléolo evidente e distribuição da cromatina semelhante aos grupos controle e NaDES. A principal alteração ocorreu na organização do citoplasma, com numerosos compartimentos eletronlúcidos de diferentes tamanhos, delimitados por membrana, distribuídos tanto na região perinuclear quanto ao longo de praticamente todo o citoplasma, ocupando parcela significativa da célula, além de aumento do número de pequenas estruturas vesiculares. Esse padrão corresponde ao aspecto vacuoliforme previamente observado na microscopia confocal (item 5.3), sendo confirmado pela microscopia eletrônica de transmissão.

O tratamento com a nanoformulação de taperebá sem NaDES (NLC-TAP) (Figura 10E) manteve a organização nuclear relativamente preservada, com envelope nuclear íntegro e nucléolo identificado, sem alterações nucleares importantes. O citoplasma apresentou grande quantidade de compartimentos eletronlúcidos de tamanhos variados, distribuídos por praticamente todo o citoplasma, alguns com conteúdo pouco eletrondenso e outros com material membranoso, muitos aparentemente delimitados por membrana, em quantidade claramente superior aos grupos controle e NaDES, caracterizando intensa compartimentalização citoplasmática.

O grupo tratado com a nanoformulação de taperebá associada a NaDES (NLC-TAP-NaDES) (Figura 10F) apresentou o padrão ultraestrutural mais alterado entre todos os tratamentos. O núcleo permaneceu identificável, com preservação relativamente maior que o restante da célula, enquanto o citoplasma exibiu intensa rarefação, acompanhada por perda acentuada da organização intracelular, com aspecto desestruturado que dificultou a individualização de organelas e membranas intracelulares em grande parte da célula. Diferentemente do observado no grupo NLC-TAP, não predominaram compartimentos eletronlúcidos organizados, mas sim um padrão difuso de desorganização citoplasmática. A exemplo do observado no grupo NaDES 2, a menor preservação ultraestrutural deste grupo limita a distinção entre alterações decorrentes do tratamento e possíveis artefatos de

processamento, ainda que o padrão observado seja compatível com intenso comprometimento da organização celular.

Em conjunto, a microscopia eletrônica de transmissão revelou que os tratamentos promoveram diferentes padrões de alteração ultraestrutural nas células B16-F10, para além de um simples gradiente de intensidade. Em todos os grupos tratados, as alterações concentraram-se predominantemente no compartimento citoplasmático, enquanto a organização nuclear permaneceu relativamente preservada. Enquanto os grupos controle e NaDES 1 mantiveram integridade estrutural preservada, o grupo NaDES 2 caracterizou-se por importante perda da organização citoplasmática. Já entre as nanoformulações de taperebá, identificaram-se dois padrões ultraestruturais qualitativamente distintos: o grupo NLC-TAP caracterizou-se pelo predomínio de compartimentalização e vacuolização citoplasmática, com preservação relativa da morfologia intracelular; já o grupo NLC-TAP-NaDES apresentou predomínio de perda da organização citoplasmática e rarefação celular, configurando um padrão distinto, e não apenas uma intensificação do observado no NLC-TAP.

Vale destacar que o padrão de compartimentalização identificado por MET não coincide integralmente com o aspecto vacuoliforme observado por microscopia confocal (item 5.3): no grupo NLC-SER-NaDES, a vacuolização foi identificada por ambas as técnicas; no grupo NLC-TAP, a compartimentalização citoplasmática foi evidenciada pela MET, embora o aspecto vacuoliforme não tenha constituído achado consistente na microscopia confocal; e no grupo NLC-TAP-NaDES, observou-se o padrão inverso, com aspecto vacuoliforme identificado por confocal, porém sem compartimentalização organizada correspondente na MET, que revelou antes um padrão difuso de rarefação citoplasmática.

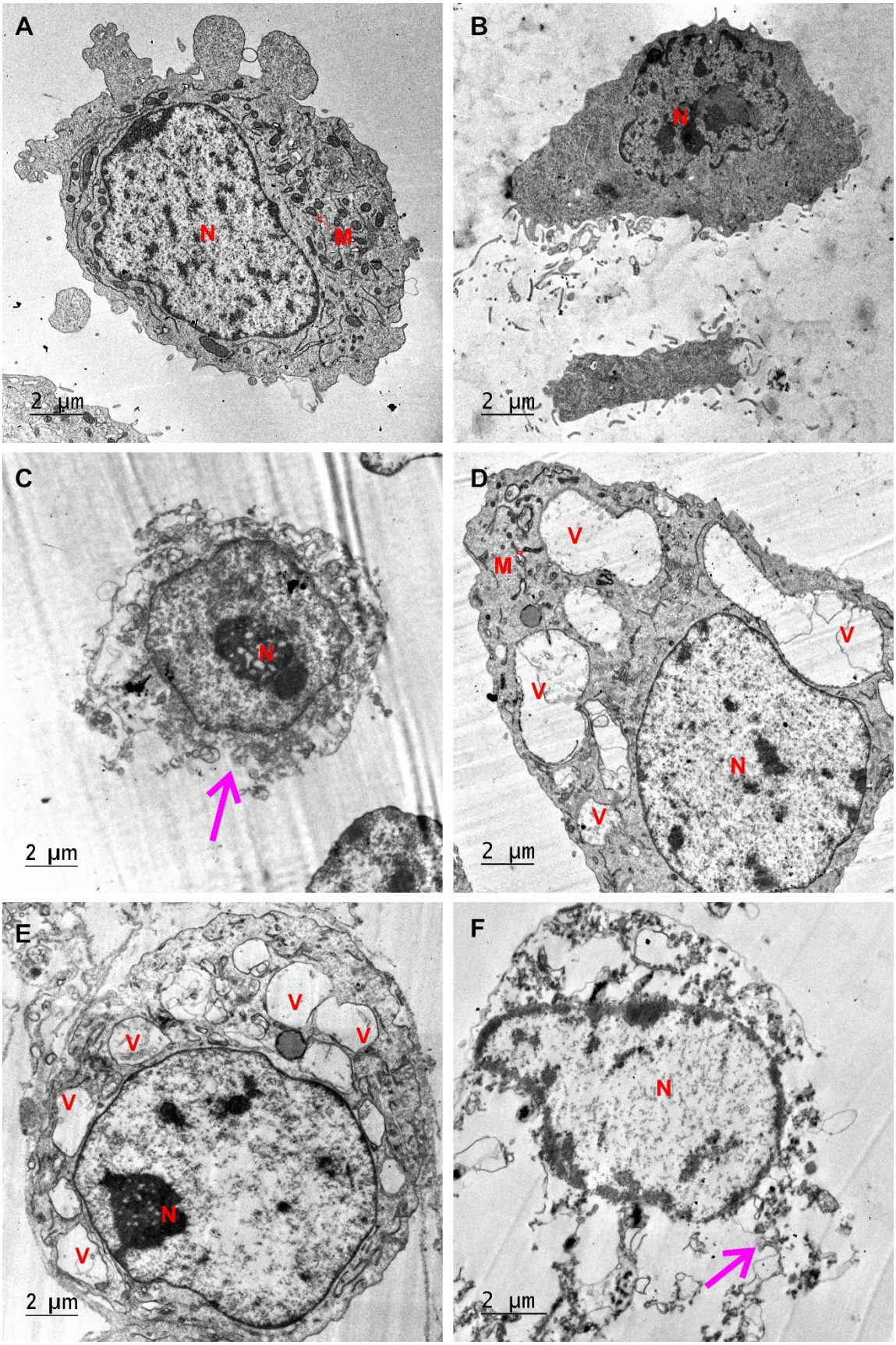



**Figura 10.** Efeitos na ultraestrutura celular de células B16-F10 após os diferentes tratamentos, avaliados por MET. A: controle; B: NaDES 1; C: NaDES 2; D: NLC-SER-NaDES; E: NLC-TAP; F: NLC-TAP-NaDES. N: núcleo; M: mitocôndria; V: vacuolização/aspecto vacuoliforme; seta rosa: rarefação citoplasmática.

## 5.5 CONTRIBUIÇÃO DO NaDES COMO COMPONENTE ESTRUTURAL: NLC-TAP VERSUS NLC-TAP-NaDES

Entre as formulações avaliadas, o par NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES corresponde ao único sistema em que extrato, matriz lipídica e tensoativo são idênticos, diferindo exclusivamente pela presença do NaDES. A Tabela 7 reúne, para esse par, os resultados já apresentados nas seções anteriores, técnica por técnica.

**Tabela 7.** Comparação entre NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES nas diferentes técnicas empregadas neste estudo.

| **Parâmetro/Técnica** | **NLC-TAP** | **NLC-TAP-NaDES** | **Referência** |
|---|---|---|---|
| **Caracterização físico-química** | | | |
| *Diâmetro hidrodinâmico* | 199,13 ± 0,91 nm | 159,00 ± 0,66 nm | Tabela 3, item 4.2.3.1 |
| *Potencial zeta* | −4,31 ± 0,16 mV | −2,35 ± 0,35 mV | Tabela 3, item 4.2.3.1 |
| *Morfologia das nanopartículas por MET* | Partículas mais organizadas | Partículas mais difusas/amorfas | Figura 2, item 4.2.3.1 |
| **Ensaios biológicos** | | | |
| *Viabilidade celular ($CC_{50}$)* | 106,2 µg/mL | 67,2 µg/mL | Figura 4, item 5.1 |
| *Microscopia óptica* | Confluência reduzida, monocamada interrompida, células alongadas coexistindo com células de menor espalhamento | Confluência mais baixa entre todos os grupos, espalhamento reduzido na maior parte das células, arredondamento frequente | Figura 5, item 5.2 |
| *Citoesqueleto/F-actina (confocal)* | Feixes de F-actina presentes, com aumento da heterogeneidade morfológica da população; aspecto vacuoliforme não | Distribuição irregular dos feixes de F-actina; estruturas vacuoliformes mais frequentes e | Figuras 6 e 7, item 5.3 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | constituiu achado consistente | evidentes que nos demais grupos | |
| *Morfologia de superfície celular (MEV)* | Numerosas projeções filiformes, conferindo aspecto piloso ou fibrilar | Relevo formado por pregas, ondulações e estruturas lamelares sobrepostas, conferindo aspecto escamiforme | Figura 9, item 5.4 |
| *Ultraestrutura celular (MET)* | Numerosos compartimentos elétron-lúcidos delimitados por membrana, caracterizando intensa compartimentalização citoplasmática | Intensa rarefação citoplasmática e perda da organização intracelular, sem predomínio de compartimentos organizados | Figura 10, item 5.4 |

Em conjunto, os dados indicam que a diferença entre as duas formulações não se limita a uma variação de intensidade dentro do mesmo padrão morfológico ou ultraestrutural. Em cada técnica empregada, o NLC-TAP e o NLC-TAP-NaDES corresponderam a padrões distintos entre si: na MEV, aspecto piloso/fibrilar versus escamiforme; na MET, compartimentalização organizada versus rarefação difusa; no confocal, heterogeneidade populacional sem aspecto vacuoliforme predominante versus remodelação acompanhada de vacuolização mais frequente.

## 5.6 EXTENSÃO DO PADRÃO OBSERVADO A UMA FORMULAÇÃO DE COMPOSIÇÃO DISTINTA (NLC-SER-NaDES)

Diferentemente do par NLC-TAP/NLC-TAP-NaDES, a nanoformulação de seriguela (NLC-SER-NaDES) difere das demais formulações em praticamente todos os componentes (extrato, lipídio sólido, lipídio líquido e sistema NaDES), o que impede a atribuição de qualquer diferença isolada a um único fator. A Tabela 8 situa o NLC-SER-NaDES em relação ao padrão já descrito para as formulações de taperebá nas seções anteriores.

**Tabela 8.** Posição do NLC-SER-NaDES em relação ao padrão de alterações observado nas formulações de taperebá.

| **Parâmetro/Técnica** | **NLC-SER-NaDES** | **Padrão das formulações de taperebá** | **Referência** |
|---|---|---|---|
| **Caracterização físico-química** | | | |
| *Diâmetro hidrodinâmico* | ≈ 33 nm | 159 a 199 nm | Tabela 5, item 4.2.3.2 |
| *Potencial zeta* | −30,27 mV | −2,35 a −4,31 mV | Tabela 5, item 4.2.3.2 |
| **Ensaios biológicos** | | | |
| *Viabilidade celular ($CC_{50}$)* | 24,1 µg/mL (menor valor entre as três formulações) | 67,2 a 106,2 µg/mL | Figura 4, item 5.1 |
| *Microscopia óptica* | Confluência reduzida, distribuição irregular, discreto aumento de células arredondadas, sem ser predominante | Redução mais acentuada de confluência e espalhamento, com arredondamento mais frequente | Figura 5, item 5.2 |
| *Citoesqueleto/F-actina (confocal)* | Feixes de F-actina presentes, com aumento da heterogeneidade; estruturas vacuoliformes presentes, confirmadas como extranucleares | Remodelação mais acentuada da rede de F-actina; estruturas vacuoliformes também presentes, mais frequentes no NLC-TAP-NaDES | Figuras 6 e 7, item 5.3 |
| *Morfologia de superfície celular (MEV)* | Discreto aumento de rugosidade, sem padrão de projeções | Projeções filiformes (NLC-TAP) ou relevo escamiforme (NLC- | Figura 9, item 5.4 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | filiformes ou escamiforme comparável | TAP-NaDES), ambos mais acentuados | |
| *Ultraestrutura celular (MET)* | Numerosos compartimentos elétron-lúcidos delimitados por membrana, distribuídos pelo citoplasma | Compartimentalização organizada (NLC-TAP) ou rarefação difusa (NLC-TAP-NaDES) | Figura 10, item 5.4 |

Em conjunto, os dados posicionam o NLC-SER-NaDES em um patamar intermediário do gradiente qualitativo de alterações descrito no item 5.3 (Controle / NaDES 1 / NaDES 2 → NLC-SER-NaDES → NLC-TAP → NLC-TAP-NaDES), com direção semelhante de alterações em relação às formulações de taperebá (redução de confluência e espalhamento, remodelação do citoesqueleto, presença de compartimentos elétron-lúcidos), ainda que com magnitude e padrão topográfico distintos, particularmente na microscopia eletrônica de varredura, onde não foi observado o mesmo aspecto piloso ou escamiforme identificado nas formulações de taperebá.

## 5.7 ESTRESSE OXIDATIVO

### 5.7.1 Validação Do Modelo Experimental

A validação do modelo experimental de estresse oxidativo foi realizada por meio da indução aguda com peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) por 1 hora, seguida de marcação com o fluoróforo CellROX™ Green, específico para detecção de ROS, e com DAPI, para marcação nuclear. A intensidade relativa da fluorescência foi estimada por meio da razão entre a área sob a curva (AUC) do sinal de CellROX™ e a AUC do sinal de DAPI, conforme descrito no item 4.5. O grupo não submetido ao desafio oxidativo foi designado como controle sem $H_2O_2$, enquanto o grupo exposto ao $H_2O_2$ constituiu o controle + $H_2O_2$.

As células do grupo controle sem $H_2O_2$ (Figura 11, linha Controle) apresentaram fluorescência basal de CellROX™ Green distribuída predominantemente no citoplasma, com intensidade moderada e discreta heterogeneidade entre células individuais. A marcação esteve amplamente associada ao citoplasma celular, enquanto os núcleos identificados pelo DAPI

permaneceram homogêneos e regularmente distribuídos, sem evidências de fragmentação ou condensação nuclear. Após a indução com $H_2O_2$ (Figura 11, linha Controle + $H_2O_2$), observou-se aumento evidente da intensidade da fluorescência de CellROX™ Green em praticamente toda a população celular, com distribuição difusa e relativamente homogênea, predominando nas regiões citoplasmática e perinuclear, mantendo-se adequada preservação dos núcleos marcados por DAPI.

O grupo controle sem $H_2O_2$ apresentou razão CellROX/DAPI de 4,83, enquanto o grupo controle + $H_2O_2$ apresentou razão de 5,74, correspondendo a um aumento de aproximadamente 19% no sinal relativo após a indução. Esse resultado é compatível com o esperado para um modelo funcional de indução de estresse oxidativo, confirmando que a exposição ao $H_2O_2$ por 1 hora foi suficiente para promover aumento detectável de fluorescência de ROS nas células B16-F10, permitindo a posterior avaliação do padrão de resposta dos tratamentos frente ao desafio oxidativo.

Ressalva-se que, em decorrência do número de réplicas disponível (um *z-stack* representativo por condição experimental), os valores de razão CellROX/DAPI apresentados neste item e no item seguinte têm caráter descritivo, não sendo submetidos a teste estatístico inferencial.

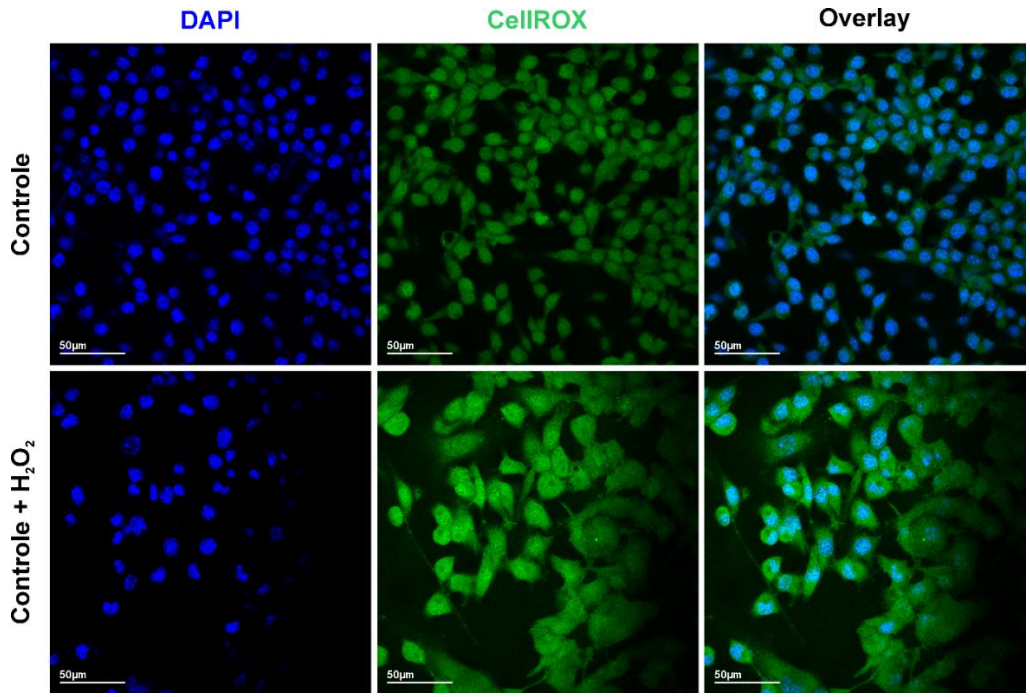



**Figura 11.** Validação do modelo experimental de estresse oxidativo em células B16-F10, avaliada por marcação com CellROX™ Green, DAPI e *overlay*. Colunas, da esquerda para a direita: DAPI, CellROX, *overlay*. Razão CellROX/DAPI: controle sem $H_2O_2$ = 4,83; controle + $H_2O_2$ = 5,74. Linhas, de cima para baixo: Controle, Controle + $H_2O_2$. Razão CellROX/DAPI: controle sem $H_2O_2$ = 4,83; controle + $H_2O_2$ = 5,74.

### 5.7.2 Efeitos dos Tratamentos sobre o Estresse Oxidativo

O tratamento com NaDES 1, na ausência de $H_2O_2$ (Figura 12, linha NaDES 1), apresentou intensidade de fluorescência de CellROX™ Green semelhante ao controle, com distribuição heterogênea entre as células, marcação discreta a moderada e núcleos com distribuição homogênea e boa densidade celular. Após a indução oxidativa (Figura 12, linha NaDES 1 + $H_2O_2$), observou-se aumento da fluorescência em relação ao grupo sem estresse, com sinal elevado, porém distribuído de forma heterogênea entre as células, mantendo-se predominantemente citoplasmático, com núcleos preservados. A razão CellROX/DAPI foi de 2,19 na ausência de $H_2O_2$ e 1,46 após a indução oxidativa.

O tratamento com NaDES 2, na ausência de $H_2O_2$ (Figura 12, linha NaDES 2), apresentou fluorescência basal discreta a moderada, distribuída de maneira relativamente homogênea, com intensidade visual semelhante ao controle e morfologia celular preservada. Após a exposição ao $H_2O_2$ (Figura 12, linha NaDES 2 + $H_2O_2$), verificou-se aumento da intensidade de fluorescência em grande parte das células, com distribuição ampla e heterogeneidade moderada entre células individuais, mantendo predominância citoplasmática e organização nuclear preservada. A razão CellROX/DAPI foi de 1,54 na ausência de $H_2O_2$ e 2,21 após a indução oxidativa.

O tratamento com a nanoformulação de seriguela (NLC-SER-NaDES), na ausência de $H_2O_2$ (Figura 13, linha NLC-SER-NaDES), apresentou fluorescência basal discreta, distribuída de forma heterogênea entre as células, semelhante à observada nos demais grupos sem indução oxidativa, com núcleos uniformemente distribuídos. Após a indução com $H_2O_2$ (Figura 13, linha NLC-SER-NaDES + $H_2O_2$), observou-se aumento da fluorescência em relação ao grupo sem estresse, com intensidade variando entre as células, predominantemente citoplasmática, mantendo-se densidade celular preservada e adequada correspondência entre a marcação de CellROX™ Green e os núcleos. A razão CellROX/DAPI foi de 5,08 na ausência de $H_2O_2$ e 3,14 após a indução oxidativa.

O tratamento com a nanoformulação de taperebá sem NaDES (NLC-TAP), na ausência de $H_2O_2$ (Figura 13, linha NLC-TAP), apresentou fluorescência basal discreta a moderada, distribuída de forma relativamente homogênea, com intensidade semelhante à observada nos demais grupos não submetidos ao estresse oxidativo. Após a indução oxidativa (Figura 13, linha NLC-TAP + $H_2O_2$), a fluorescência apresentou-se distribuída de forma heterogênea entre as células, com o campo analisado exibindo menor densidade celular aparente em comparação aos demais grupos e intensidade variável, mantendo-se os núcleos identificáveis nas células

remanescentes. A razão CellROX/DAPI manteve-se praticamente inalterada entre as condições (1,04 sem $H_2O_2$; 1,05 com $H_2O_2$).

O tratamento com a nanoformulação de taperebá associada a NaDES (NLC-TAP-NaDES), na ausência de $H_2O_2$ (Figura 13, linha NLC-TAP-NaDES), apresentou fluorescência basal discreta, distribuída de maneira relativamente homogênea, com intensidade semelhante à observada nos demais grupos sem indução oxidativa, sem áreas extensas de fluorescência acentuada. Após a exposição ao $H_2O_2$ (Figura 13, linha NLC-TAP-NaDES + $H_2O_2$), observou-se aumento da fluorescência em relação ao grupo correspondente sem estresse, com intensidade variável entre as células, distribuindo-se predominantemente no citoplasma, com boa distribuição celular e adequada correspondência entre o sinal fluorescente e os núcleos. A razão CellROX/DAPI foi de 1,47 na ausência de $H_2O_2$ e 1,88 após a indução oxidativa.

De forma geral, a avaliação qualitativa das imagens confocais indicou aumento da fluorescência de CellROX™ Green após a indução com $H_2O_2$ em todos os grupos experimentais, quando comparados aos respectivos controles sem estresse, com variação na intensidade, homogeneidade do sinal e densidade celular entre os tratamentos, notadamente no grupo NLC-TAP sem NaDES. Embora a avaliação qualitativa tenha indicado aumento visual da fluorescência após a indução oxidativa em todos os grupos, a análise descritiva da razão CellROX/DAPI (Figura 14) revelou comportamento distinto entre os tratamentos, evidenciando que diferenças observadas em campos representativos nem sempre se refletiram proporcionalmente na intensidade relativa estimada ao longo do *z-stack*: enquanto controle, NaDES 2 e NLC-TAP-NaDES apresentaram aumento da razão após a indução oxidativa, os grupos NaDES 1, NLC-SER-NaDES e NLC-TAP apresentaram razão estável ou reduzida na condição com $H_2O_2$ em relação à condição sem $H_2O_2$, sendo o NLC-SER-NaDES o grupo com a maior discrepância entre a impressão qualitativa e o valor quantitativo observado. Essas observações, obtidas a partir de um único *z-stack* representativo por condição experimental, têm caráter descritivo e não permitem, neste momento, o estabelecimento de conclusões definitivas sobre o comportamento de cada formulação frente ao desafio oxidativo.

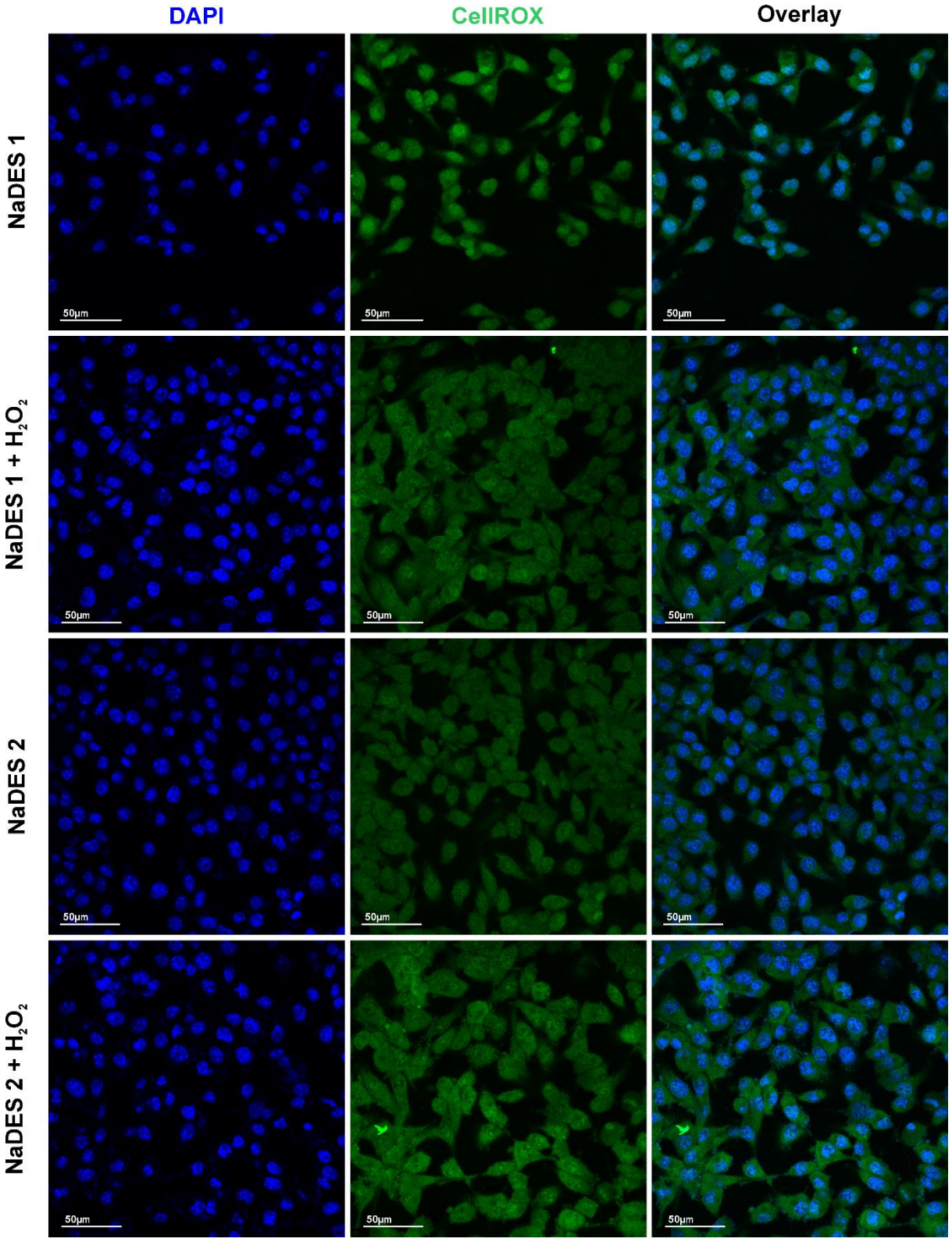



**Figura 12.** Efeitos do NaDES 1 e NaDES 2 sobre o estresse oxidativo em células B16-F10, avaliados por marcação com CellROX™ Green, DAPI e *overlay*, em plano focal único. Colunas: DAPI, CellROX, *overlay*. Linhas, de cima para baixo: NaDES 1, NaDES 1 + $H_2O_2$, NaDES 2, NaDES 2 + $H_2O_2$.

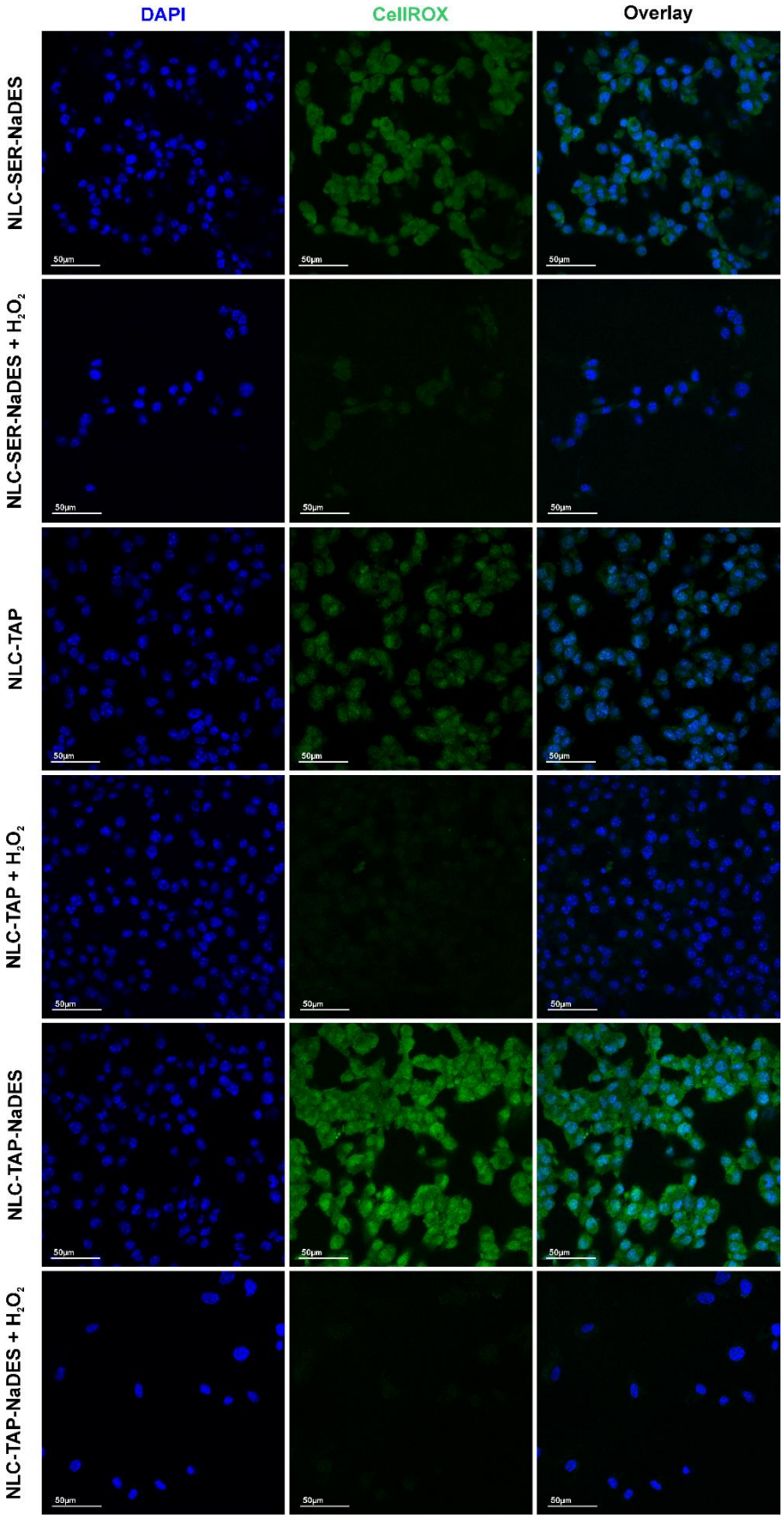



**Figura 13.** Efeitos das nanoformulações sobre o estresse oxidativo em células B16-F10, avaliados por marcação com CellROX™ Green, DAPI e *overlay*, em plano focal único. Colunas: DAPI, CellROX, *overlay*. Linhas, de cima para baixo: NLC-SER-NaDES, NLC-SER-NaDES + $H_2O_2$, NLC-TAP, NLC-TAP + $H_2O_2$, NLC-TAP-NaDES, NLC-TAP-NaDES + $H_2O_2$.

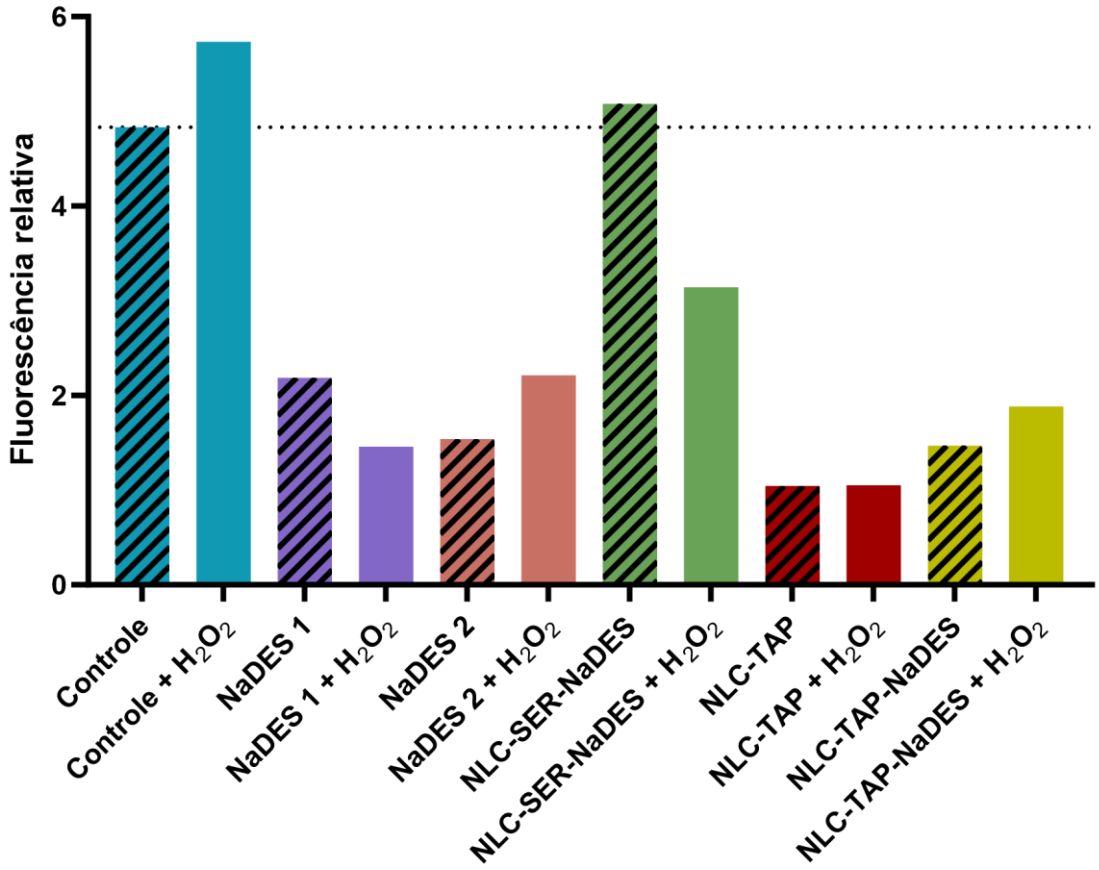



**Figura 14.** Razão entre a área sob a curva (AUC) do sinal de CellROX™ Green e a AUC do sinal de DAPI nas células B16-F10, por grupo experimental, na ausência e na presença de indução com $H_2O_2$.

# 6. DISCUSSÃO

## 6.1 SÍNTESE INTEGRADA DOS ACHADOS

Este estudo demonstrou que carreadores lipídicos nanoestruturados contendo extratos de coprodutos de seriguela e taperebá promoveram alterações morfológicas, metabólicas e ultraestruturais distintas em células B16-F10 após 24 horas de exposição. Considerados em conjunto, os resultados de microscopia óptica, microscopia confocal, MEV e MET indicam que as nanoformulações exerceram efeitos mais pronunciados que os NaDES livres nas concentrações equivalentes às presentes nos sistemas. O ensaio de MTT, por sua vez, evidenciou redução da atividade metabólica de forma dependente da concentração nas nanoformulações avaliadas. Esses efeitos compreenderam menor confluência e espalhamento celular, aumento da heterogeneidade morfológica, remodelação da rede de F-actina e da superfície plasmática, além de alterações na compartimentalização citoplasmática. O núcleo permaneceu relativamente preservado na maioria das condições, enquanto as modificações mais evidentes ocorreram no citoplasma e na interface célula-substrato. Esse conjunto de evidências favorece a interpretação de uma resposta celular dependente da composição da formulação, caracterizada por alterações morfológicas e ultraestruturais convergentes, sem permitir, isoladamente, a atribuição de um mecanismo específico de morte celular (Figura 15).

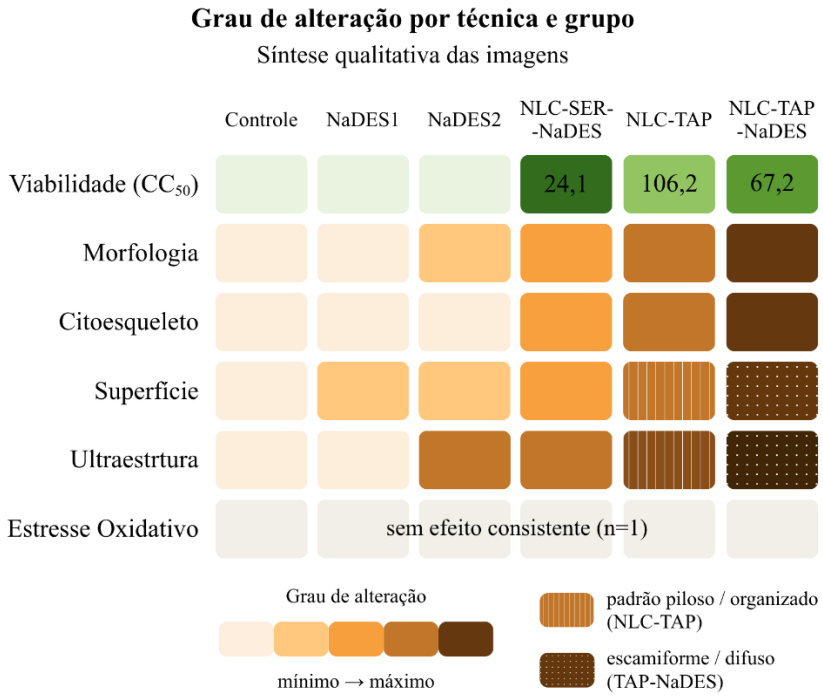



**Figura 15.** Síntese qualitativa do grau de alteração observado por técnica e por grupo experimental, com base em inspeção visual das imagens, não em medida quantificada. NLC-TAP avaliado na concentração equivalente ao $CC_{50}$ do NLC-TAP-NaDES. A hachura em NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES indica padrões qualitativamente distintos, não graus de uma mesma alteração.

O principal resultado comparativo foi a diferença entre as duas formulações de taperebá. NLC-TAP foi caracterizada por menor confluência celular, maior heterogeneidade morfológica, abundantes projeções filiformes de superfície e intensa compartimentalização citoplasmática, preservando relativamente a arquitetura nuclear. Em contraste, NLC-TAP-NaDES apresentou células menos espalhadas, com maior frequência de arredondamento, superfície pregueada e escamiforme e rarefação citoplasmática difusa. A presença de NaDES na formulação não aumentou a intensidade de um mesmo efeito: esteve associada a um fenótipo morfológico e ultraestrutural qualitativamente distinto, um padrão que será tratado neste trabalho como redirecionamento fenotípico dependente de NaDES (Figura 16). A comparação é especialmente informativa porque as duas formulações compartilham o extrato de taperebá, a matriz de manteiga de murumuru, o óleo de buriti e o surfactante Brij® O10, diferindo principalmente pela presença do sistema cloreto de colina–ácido cítrico–glicerol (NaDES).

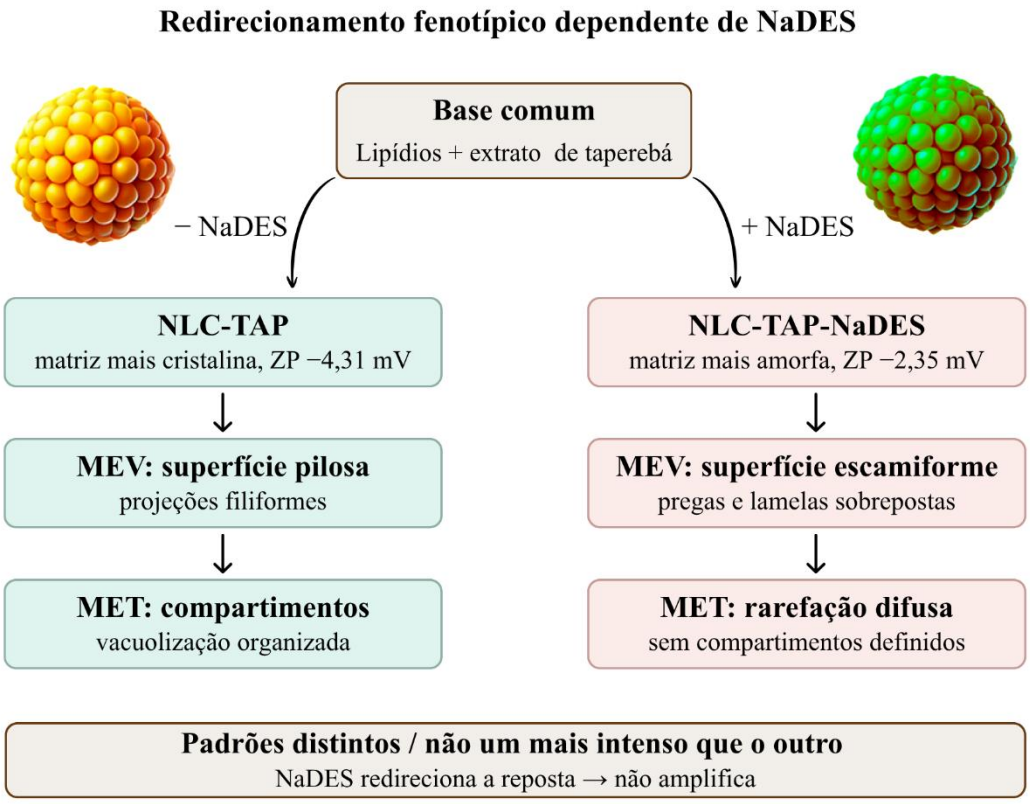



**Figura 16.** Representação esquemática do redirecionamento fenotípico dependente de NaDES: a partir da mesma base (extrato de taperebá e matriz lipídica), a ausência ou presença do NaDES resultou em dois padrões distintos e não graduais de resposta celular, evidenciados por MEV (superfície pilosa versus escamiforme) e MET (compartimentalização organizada versus rarefação difusa).

## 6.2 VIABILIDADE CELULAR E EFEITO DEPENDENTE DA FORMULAÇÃO

A redução dependente da concentração observada no ensaio de MTT evidencia que NLC-SER-NaDES e NLC-TAP-NaDES alteram a atividade metabólica das células B16-F10. O $CC_{50}$ de NLC-SER-NaDES (24,1 µg/mL) foi aproximadamente 2,8 vezes menor que o de NLC-TAP-NaDES (67,2 µg/mL), indicando maior potência aparente nas condições experimentais empregadas. Esse resultado é coerente com estudos em melanoma nos quais a nanoencapsulação de compostos naturais aumentou a captação e reduziu o $CC_{50}$ em comparação ao composto livre. Carreadores lipídicos contendo fisetina, por exemplo, apresentaram $CC_{50}$ cerca de 3,2 vezes menor e captação celular aproximadamente 1,8 vez maior que a fisetina livre em células A375 e B16-F10 (Kumar *et al*., 2023). Formulações lipídicas de extrato padronizado de *Betula pendula* também modularam viabilidade, ciclo celular e apoptose em B16-F10, reforçando que a matriz nanoestruturada pode modificar a disponibilidade intracelular de misturas fitoquímicas complexas (RUGINĂ *et al*., 2024).

O NLC-TAP, sem NaDES, apresentou $CC_{50}$ de 106,2 µg/mL, aproximadamente 1,6 vezes maior que o do NLC-TAP-NaDES (67,2 µg/mL). Como as duas formulações compartilham o mesmo extrato, a mesma matriz lipídica (manteiga de murumuru, óleo de buriti) e o mesmo tensoativo, diferindo apenas pela presença do sistema NaDES, essa diferença de potência é mais diretamente atribuível à incorporação do NaDES do que a comparação entre NLC-SER-NaDES e NLC-TAP-NaDES, que envolve formulações completamente distintas em composição.

A diferença entre os valores de $CC_{50}$ de NLC-SER-NaDES e NLC-TAP-NaDES não deve ser interpretada como superioridade intrínseca do extrato de seriguela. As formulações diferem simultaneamente quanto ao extrato, ao lipídio sólido, ao óleo, ao sistema NaDES e à concentração final dos componentes; assim, o resultado representa o efeito biológico da formulação como um todo. Para separar o efeito do bioativo daquele produzido pelo veículo, seriam necessários controles com os extratos livres, carreadores brancos correspondentes e, idealmente, formulações pareadas com e sem NaDES para cada espécie. Essas diferenças são particularmente relevantes porque coprodutos de *Spondias* apresentam potencial antioxidante e composição fitoquímica dependentes da espécie, da fração vegetal e do método de extração. Extratos de *S. purpurea* contêm flavonoides e ácidos fenólicos com atividade antioxidante *in vitro* (Almeida *et al*., 2017), enquanto sementes de *S. mombin* apresentaram capacidade de sequestrar DPPH e $H_2O_2$ e baixa citotoxicidade em outro modelo celular (Abiodun; Nnoruka; Tijani, 2020). A caracterização fitoquímica dos extratos utilizados neste estudo é compatível com esse potencial: o extrato de taperebá apresentou como compostos majoritários o ácido

elágico e a quercetina, enquanto o extrato de seriguela apresentou como majoritários o ácido elágico, derivados de quercetina e a rutina, compostos amplamente documentados por atividade antioxidante e sequestro de radicais livres (itens 4.2.3.1 e 4.2.3.2). Essas evidências apoiam o potencial bioativo do gênero, mas não predizem diretamente a resposta da casca encapsulada em células de melanoma.

Também é necessário considerar que o MTT estima redução de tetrazólio e, portanto, atividade metabólica, não constituindo medida direta de número de células vivas ou de um mecanismo de morte. A leitura pode ser influenciada pela densidade de plaqueamento, pelo estado metabólico e pela interação do material testado com o reagente ou com a detecção óptica (Ghasemi *et al*., 2021). Nanomateriais podem adsorver reagentes, reduzir substratos ou interferir na absorbância, dependendo da composição e da concentração (Kroll *et al*., 2012). No presente estudo, a concordância entre a queda da atividade metabólica e a redução de confluência nas imagens fortalece a interpretação de que a redução da atividade metabólica refletiu um efeito biológico consistente, e não apenas uma interferência analítica. Ainda assim, controles acelulares das formulações e um ensaio ortogonal, como ensaios de integridade de membrana (LDH), exclusão por corantes ou métodos automatizados de contagem celular, seriam necessários para confirmar a magnitude da citotoxicidade.

A definição das concentrações empregadas nas análises morfológicas a partir dos valores de $CC_{50}$ permitiu investigar alterações celulares em condições biologicamente responsivas, porém sem exposição excessivamente citotóxica, favorecendo a interpretação das mudanças estruturais observadas nos experimentos subsequentes.

## 6.3 PAPEL DOS NADES LIVRES E INCORPORADOS

Os grupos NaDES 1 e NaDES 2 livres preservaram, de modo geral, confluência, espalhamento, organização da F-actina e morfologia nuclear nas concentrações equivalentes às presentes nas nanoformulações. Esse achado indica que a exposição aos NaDES, nessas condições específicas, não foi suficiente para reproduzir o conjunto de alterações provocado pelos carreadores. A baixa perturbação observada para NaDES 1 é compatível com a literatura que descreve baixa citotoxicidade para diversos sistemas eutéticos baseados em componentes naturais. Contudo, a segurança não é uma propriedade uniforme da classe. A toxicidade depende da identidade do aceitador e do doador de ligações de hidrogênio, da proporção molar, do teor de água, da concentração no meio e do tipo celular. Em uma comparação de doze NaDES à base de cloreto de colina, sistemas contendo ácidos orgânicos foram os mais citotóxicos, e a formulação com ácido cítrico mostrou efeito dependente da concentração (Popović *et al*., 2023).

Estudos anteriores também mostraram baixa toxicidade para sistemas cloreto de colina-glicerol, associada a boa biodegradabilidade (Radošević *et al*., 2015).

A discrepância entre NaDES 2 livre, pouco alterado nas análises óptica e confocal, e NLC-TAP-NaDES, que exibiu o fenótipo mais pronunciado, sugere que a incorporação ao carreador modificou a apresentação celular dos componentes. Um modelo mecanístico plausível para essa discrepância está na própria caracterização físico-química da nanoformulação: a incorporação do NaDES esteve associada a partículas de menor diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta menos negativo e organização morfológica mais amorfa da matriz lipídica (Mello *et al*., 2025; item 4.2.3.1). Uma superfície com menor densidade de carga aniônica reduz a repulsão eletrostática entre a partícula e a membrana plasmática, enquanto uma matriz lipídica mais amorfa tende a favorecer maior contato e possivelmente fusão com a bicamada lipídica celular, em comparação a uma matriz mais cristalina e organizada. Essa combinação de propriedades físicas fornece uma explicação plausível para a transição observada, do padrão de compartimentalização citoplasmática organizada no NLC-TAP para o padrão de rarefação difusa no NLC-TAP-NaDES, sem que seja necessário recorrer a diferenças na composição química do extrato incorporado, que é o mesmo nas duas formulações. Essas possibilidades são compatíveis com o princípio de que nanoestruturas lipídicas podem aumentar solubilização, estabilidade e captação de bioativos; os dados atuais, entretanto, não permitem confirmar diretamente o mecanismo de interação membrana-partícula proposto, que permanece uma hipótese a ser testada por ensaios específicos de captação e fusão de membrana. A publicação referente à formulação de taperebá descreveu partículas em torno de 150 nm, baixa toxicidade e redução de espécies reativas em queratinócitos HaCaT e melanócitos SH-4 (Chang *et al*., 2026). A resposta mais intensa observada aqui em B16-F10 evidencia que o efeito do mesmo sistema nanoestruturado é dependente do modelo celular e da concentração, aspecto relevante para sua caracterização biológica e para a definição de faixa terapêutica.

A preservação aparente de NaDES 2 na microscopia óptica e confocal, acompanhada de rarefação e baixa preservação citoplasmática na MET, deve ser interpretada com cautela. A MET avalia uma fração muito pequena da população e é sensível a fixação, desidratação, inclusão e corte. Como não houve correspondência consistente entre técnicas, não se pode atribuir ao NaDES 2 uma lesão ultraestrutural generalizada. A repetição com maior número de campos e blocos independentes, associada a marcadores de integridade de membrana e função mitocondrial, permitiria esclarecer se o achado representa uma subpopulação responsiva ou um artefato de processamento.

Em conjunto, esses achados sugerem que a resposta observada não decorreu simplesmente da presença do NaDES, mas da sua associação ao sistema nanoestruturado, reforçando a importância da formulação como determinante da atividade biológica e sustentando o redirecionamento fenotípico dependente de NaDES descrito no item 6.1.

## 6.4 REMODELAÇÃO MORFOLÓGICA, F-ACTINA E SUPERFÍCIE CELULAR

A redução do espalhamento, a perda de contatos célula-célula e o aumento do arredondamento nas nanoformulações são compatíveis com alteração da adesão e da tensão do citoesqueleto. A F-actina permaneceu detectável e organizada em feixes mesmo nos tratamentos mais intensos, indicando remodelação espacial, em vez de despolimerização global. Em células tumorais, a rede de actina desempenha papel central na manutenção da forma celular, adesão ao substrato, geração de forças mecânicas, migração e processos endocíticos. Nanopartículas podem modificar essas funções sem causar perda imediata da viabilidade; nanopartículas de polidopamina direcionadas a MUC18 alteraram citoesqueleto, rigidez, morfologia e migração de células de melanoma sem induzir morte celular nas condições estudadas (Liu *et al*., 2021). Desse modo, a preservação de feixes de actina neste estudo não exclui comprometimento funcional da adesão ou da motilidade.

As alterações observadas por MEV ampliam essa interpretação. As projeções filiformes no grupo NLC-TAP podem corresponder a protrusões ricas em actina, como filopódios, ou a remodelamento de membrana associado ao contato e à internalização de partículas. Pregas e ondulações também podem participar de macropinocitose, processo dependente de actina no qual rufos de membrana capturam nanopartículas e originam vesículas intracelulares. Em endotélio tumoral, a densidade de rufos de membrana e a macropinocitose foram determinantes para o transporte de nanopartículas (Wu *et al*., 2025). Esses achados da literatura sustentam a hipótese de uma associação entre topografia de membrana, F-actina e compartimentalização citoplasmática observada no presente trabalho. A MEV não identifica a composição das estruturas e, portanto, os termos filopódio, lamelipódio ou macropinocitose devem permanecer como hipóteses a serem testadas por colocalização com marcadores específicos e ensaios de internalização.

A superfície rica em projeções filiformes observada em NLC-TAP e o padrão pregueado/escamiforme de NLC-TAP-NaDES não representam graus distintos de uma mesma alteração topográfica, mas dois padrões qualitativamente diferentes de reorganização da superfície celular. Projeções filiformes finas e numerosas são consistentes com um modo de interação mais pontual e localizado entre a partícula e a membrana, como o observado em

processos de captura por filopódios. Já um relevo pregueado e lamelar, formado por dobras e estruturas sobrepostas, é mais consistente com uma interação de maior superfície de contato entre a partícula e a bicamada lipídica, compatível com o modelo de maior contato ou fusão de membrana proposto no item 6.3 para explicar os efeitos da menor carga superficial e da matriz mais amorfa conferidas pelo NaDES. Essa distinção topográfica reforça diretamente a interpretação de que a presença do NaDES não intensificou o mesmo modo de interação entre a formulação e a célula, mas redirecionou esse modo de interação para um padrão distinto, reforçando o redirecionamento fenotípico dependente de NaDES já descrito no item 6.1.

A menor confluência nos grupos tratados também pode ter contribuído para mudanças no formato e na distribuição de F-actina, uma vez que células isoladas experimentam condições mecânicas diferentes daquelas presentes em monocamada confluente. Por isso, parte da remodelação pode ser secundária à redução do número de células aderidas, enquanto outra parte pode resultar de interação direta da formulação com membranas e vias de endocitose. Estudos futuros utilizando concentrações subcitotóxicas e densidades celulares equivalentes entre os grupos permitirão distinguir esses dois componentes. Essa distinção será particularmente importante para interpretar as alterações ultraestruturais observadas por microscopia eletrônica de transmissão, discutidas na seção seguinte.

## 6.5 COMPARTIMENTALIZAÇÃO CITOPLASMÁTICA E ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS

As alterações de superfície discutidas na seção anterior encontram possível continuidade na compartimentalização citoplasmática observada por confocal e MET. As estruturas vacuoliformes observadas por confocal em NLC-SER-NaDES e NLC-TAP-NaDES, bem como os compartimentos elétron-lúcidos delimitados por membrana identificados por MET em NLC-SER-NaDES e NLC-TAP, constituem um dos achados mais relevantes. Vacuolização induzida por nanopartículas pode estar associada a endossomos, macropinossomos, lisossomos, autofagossomos, dilatação do retículo endoplasmático ou outras respostas de estresse. Nanopartículas de bismuto foram internalizadas e induziram resposta autofágica dependente de dose e tempo (Liu *et al*., 2017), enquanto óxido de neodímio em nanoescala produziu vacuolização maciça associada à morte autofágica em células NCI-H460 (Chen *et al*., 2005). Esses precedentes demonstram que vacuolização e nanopartículas podem estar funcionalmente relacionadas, mas não permitem classificar as estruturas observadas neste estudo como autofágicas.

A ausência de fragmentação nuclear consistente, condensação acentuada da cromatina ou perda nuclear generalizada não sustenta, pelas imagens disponíveis, um padrão morfológico clássico de apoptose. Da mesma forma, vacuolização isolada não demonstra autofagia, paraptose ou outro tipo regulado de morte celular. Para distinguir essas possibilidades seriam necessários ensaios complementares: fluxo autofágico com LC3-II e p62 na presença e ausência de inibidor lisossomal; colocalização com marcadores de endossomos e lisossomos; avaliação do retículo endoplasmático e mitocôndrias; caspases e anexina V; permeabilidade de membrana; e registro temporal em células vivas. O texto dos resultados, portanto, acerta ao utilizar descrições como "aspecto vacuoliforme", "compartimentalização" e "rarefação", preservando a distinção entre observação e mecanismo.

A divergência entre confocal e MET observada neste estudo, mais do que uma limitação a ser contornada, constitui um achado metodológico relevante sobre a natureza dos compartimentos identificados (Figura 17). O confocal avaliou F-actina e DAPI em células inteiras e hidratadas, sem marcador específico do conteúdo vacuolar, enquanto a MET examinou secções ultrafinas de células fixadas, desidratadas e incluídas em resina. A concordância entre as técnicas em NLC-SER-NaDES, onde estruturas vacuoliformes foram identificadas tanto por confocal quanto por MET, é compatível com compartimentos suficientemente estáveis e organizados para resistir ao processamento necessário para a microscopia eletrônica. Já a discordância observada em NLC-TAP e, sobretudo, em NLC-TAP-NaDES, no qual a MET revelou rarefação citoplasmática difusa em vez de compartimentos bem delimitados, é compatível com a hipótese de que essas duas formulações induzem processos celulares distintos entre si: um padrão de compartimentalização organizada, com membranas suficientemente estáveis para serem preservadas durante o processamento (como em NLC-SER-NaDES e, parcialmente, em NLC-TAP), e um padrão de desorganização difusa da matriz citoplasmática, menos dependente de estruturas de membrana bem definidas e, portanto, menos capturável por uma técnica que depende da preservação estrutural durante a fixação (como em NLC-TAP-NaDES). É importante reconhecer, contudo, que essa hipótese não pode ser dissociada, com os dados atuais, da mesma ressalva metodológica aplicada ao grupo NaDES 2 (item 6.3): na ausência de blocos independentes ou marcadores de integridade de membrana que confirmem a natureza biológica dessa rarefação, a menor preservação ultraestrutural do NLC-TAP-NaDES também poderia refletir, ao menos parcialmente, artefato de processamento, e não exclusivamente um padrão genuíno de desorganização citoplasmática. Essa leitura é uma hipótese, não uma conclusão definitiva, e sua confirmação dependeria de abordagens de microscopia correlativa, nas quais a mesma amostra é avaliada sequencialmente por confocal e

por MET, permitindo relacionar diretamente estruturas identificadas por fluorescência a suas contrapartes ultraestruturais. Essa recomendação metodológica, aplicável para além do sistema aqui estudado, ilustra como técnicas de imagem com diferentes princípios físicos podem capturar seletivamente diferentes fenótipos de compartimentalização celular induzidos por nanomateriais.

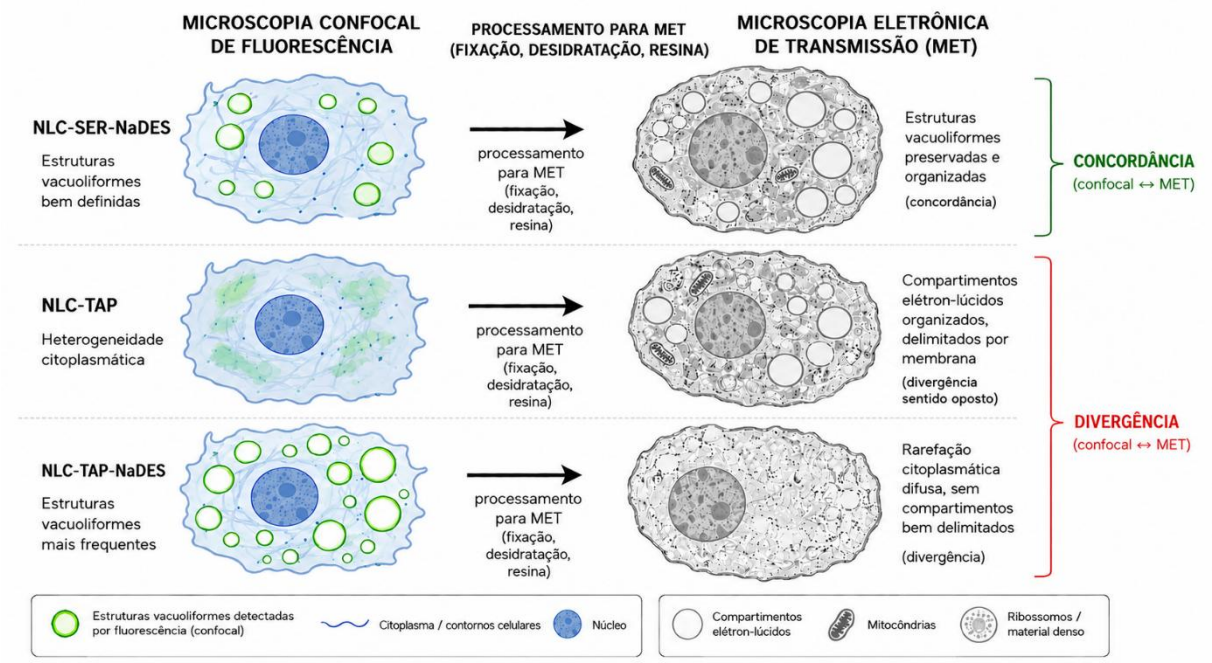



**Figura 17.** Representação esquemática da relação entre os achados de microscopia confocal de fluorescência e de MET para as três nanoformulações avaliadas. NLC-SER-NaDES apresenta concordância entre as técnicas, com vácuolos identificados por fluorescência preservados como compartimentos elétron-lúcidos organizados na MET. NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES apresentam divergência entre as técnicas, em sentidos opostos: no NLC-TAP, a MET revela compartimentos elétron-lúcidos organizados não evidenciados como estruturas vacuoliformes distintas no confocal; no NLC-TAP-NaDES, o confocal identifica estruturas vacuoliformes frequentes que, na MET, correspondem a rarefação citoplasmática difusa, sem compartimentos bem delimitados.

Em conjunto, esses achados reforçam que as alterações induzidas pelas nanoformulações concentraram-se predominantemente no compartimento citoplasmático, enquanto a arquitetura nuclear permaneceu relativamente preservada, sugerindo que os eventos observados envolveram inicialmente organelas e sistemas de membranas intracelulares.

## 6.6 RESPOSTA AO DESAFIO OXIDATIVO

A exposição do controle a 500 µM de $H_2O_2$ por uma hora elevou em aproximadamente 19% a razão CellROX/DAPI, indicando que o protocolo foi capaz de produzir aumento

detectável da fluorescência do CellROX, compatível com maior estresse oxidativo. A interpretação dos tratamentos, porém, deve integrar duas observações parcialmente divergentes: as imagens em plano focal único sugeriram aumento visual do CellROX após $H_2O_2$ em todos os grupos, enquanto a razão calculada em um único *z-stack* diminuiu em NaDES 1 e NLC-SER-NaDES, permaneceu praticamente estável em NLC-TAP e aumentou em NaDES 2 e NLC-TAP-NaDES. Com uma única aquisição por condição, essas diferenças descrevem os campos analisados, sem estimar a variabilidade biológica, sustentar efeito antioxidante, ou permitir inferir o comportamento da população celular como um todo.

Observa-se, ainda, um padrão descritivo adicional nos valores brutos: com exceção de NLC-SER-NaDES sem indução, todos os grupos tratados apresentaram razão CellROX/DAPI inferior à do controle, tanto na ausência quanto na presença de $H_2O_2$, sugerindo, de forma meramente descritiva, um efeito basal de contenção do sinal oxidativo associado à presença das formulações e dos NaDES livres. Entre os grupos, dois padrões distintos emergiram frente ao desafio adicional com $H_2O_2$: em NaDES 2 e NLC-TAP-NaDES, a razão aumentou em relação à condição sem indução, embora permanecendo bem abaixo do valor do controle desafiado; já em NaDES 1 e NLC-SER-NaDES, a razão diminuiu com a indução, sem sinal de perda de contenção do estresse adicional, padrão que, em NLC-TAP, apareceu de forma marginal e possivelmente não distinguível de estabilidade. Notavelmente, NaDES 1 corresponde ao sistema eutético empregado na formulação de NLC-SER-NaDES, o que levanta a hipótese, ainda exploratória e não passível de confirmação estatística com os dados atuais, de que a composição betaína/ácido málico esteja associada a uma capacidade de contenção do estresse oxidativo que se mantém ou se intensifica sob desafio adicional, tanto na forma livre quanto incorporada à nanoformulação.

A possibilidade de modulação redox é biologicamente plausível. Coprodutos de *Spondias* contêm compostos fenólicos e carotenoides com atividade antioxidante, e a caracterização fitoquímica dos extratos utilizados neste estudo confirma essa composição: o ácido elágico e a quercetina, compostos com atividade antioxidante bem documentada, figuram entre os majoritários tanto no extrato de taperebá quanto no de seriguela, ao lado de proantocianidinas (taninos condensados), classe de composto também reconhecida por sua capacidade antioxidante (itens 4.2.3.1 e 4.2.3.2), e a formulação de taperebá associada a NaDES reduziu espécies reativas em HaCaT e SH-4 submetidas a estresse oxidativo (Chang *et al*., 2026).

A ausência de um efeito antioxidante claro e consistente neste estudo contrasta, à primeira vista, com achados prévios do próprio grupo de pesquisa sobre a mesma plataforma:

a formulação foi avaliada em células não tumorais, na concentração de 3,61 µg/mL, aproximadamente o $IC_{15}$ para ambas as linhagens (Chang *et al*., 2026), enquanto neste trabalho as nanoformulações foram avaliadas em células de melanoma B16-F10, em concentrações entre 24,1 e 106,2 µg/mL, correspondentes ao $CC_{50}$ de cada uma. Essa comparação, no entanto, envolve *endpoints* distintos ($IC_{15}$ versus $CC_{50}$), faixas de concentração muito diferentes e linhagens celulares distintas, de modo que a diferença de resposta não pode ser atribuída, com rigor, a uma seletividade celular verdadeira: o padrão observado (proteção em dose baixa, citotoxicidade em dose alta) é compatível com o comportamento esperado para a grande maioria dos compostos bioativos, e não constitui, isoladamente, evidência específica de seletividade tumoral. Ainda assim, a diferença sugere que o efeito da mesma nanoformulação sobre o equilíbrio redox celular depende do contexto biológico e da faixa de concentração empregada: citoprotetor em células não tumorais expostas a doses baixas, e potencialmente citotóxico, sem efeito antioxidante líquido detectável, em células de melanoma expostas próximo ao seu limiar de citotoxicidade. Essa hipótese de uma janela de seletividade dependente de dose e de contexto redox permanece biologicamente plausível e compatível com a complexidade redox do melanoma, ainda que sua confirmação exija um desenho experimental que compare a mesma formulação, no mesmo *endpoint*, em células normais e tumorais, sob a mesma faixa de dose. Contudo, a resposta redox em melanoma é particularmente complexa. Células de melanoma apresentam estresse oxidativo basal elevado e adaptações antioxidantes que influenciam progressão, sobrevivência e resistência terapêutica; tanto aumentar ROS acima do limite tolerável quanto interferir nas defesas antioxidantes pode ter efeito antitumoral (Becker; Indra, 2023). Portanto, menor fluorescência após o tratamento poderia refletir ação antioxidante, menor número de células metabolicamente ativas, alteração de captação/retenção da sonda, mudança na distribuição subcelular, ou combinação desses fatores, e não necessariamente proteção celular.

A normalização pelo DAPI buscou corrigir a variação de densidade celular, mas a AUC do DAPI não é equivalente a uma contagem direta quando variam espessura do campo, sobreposição nuclear, intensidade de marcação ou número de planos. Esse aspecto é especialmente relevante para NLC-TAP, que exibiu menor densidade celular aparente no campo analisado. A comparação entre campos representativos e *z-stacks* distintos pode também explicar parte da discrepância entre inspeção visual e razão calculada. Para demonstrar efeito antioxidante, ou para testar diretamente a hipótese de seletividade dependente de dose e contexto celular, o desenho deve incluir réplicas biológicas independentes, uma curva de concentrações abaixo do $CC_{50}$, vários campos predefinidos por poço, segmentação individual

de células em múltiplos campos independentes, intensidade de CellROX por célula e medidas complementares, como glutationa, peroxidação lipídica, superóxido mitocondrial ou atividade de enzimas antioxidantes. Até essa confirmação, os resultados sustentam modulação descritiva do sinal oxidativo, sem hierarquizar as formulações quanto à proteção frente ao desafio oxidativo induzido por $H_2O_2$.

Em conjunto, esses achados sugerem que as alterações morfológicas e ultraestruturais observadas nas nanoformulações, associadas ao redirecionamento fenotípico dependente de NaDES descrito ao longo deste capítulo, não foram necessariamente acompanhadas por uma resposta antioxidante detectável nas condições experimentais avaliadas, condições essas que correspondem a um regime de dose citotóxica, e não citoprotetora, para o modelo celular estudado.

## 6.7 LIMITAÇÕES, IMPLICAÇÕES E PERSPECTIVAS

A abordagem multimodal constitui uma força do estudo, porque permitiu relacionar atividade metabólica, morfologia global, F-actina, superfície e ultraestrutura. A convergência entre as diferentes técnicas indica de forma consistente que as nanoformulações remodelam células B16-F10 de forma dependente da composição. A principal limitação é o caráter predominantemente qualitativo das análises, incluindo a seleção de imagens representativas sem cegamento ou quantificação para as diferentes técnicas de microscopia, associado à ausência de réplicas biológicas suficientes no ensaio oxidativo e à existência de apenas um *z-stack* representativo por condição. Da mesma forma, o ensaio de viabilidade celular por MTT, utilizado para a determinação dos valores de $CC_{50}$, foi conduzido com replicatas técnicas dentro de um único experimento, e não com réplicas biológicas independentes, o que limita a robustez estatística dos valores de $CC_{50}$ reportados e a extrapolação desses resultados para além do experimento realizado. A repetição do ensaio em triplicata biológica ($n \geq 3$ experimentos independentes) constitui uma etapa prioritária para consolidar os valores de $CC_{50}$ e fundamentar com maior segurança as concentrações empregadas nos ensaios subsequentes. Somam-se a isso a ausência de extratos livres e de carreadores brancos, com e sem NaDES, como grupos controle. As concentrações dos NaDES livres foram definidas, por desenho experimental, como a fração equivalente presente em cada nanoformulação correspondente, e não a partir de um $CC_{50}$ próprio; da mesma forma, para NLC-TAP, foi utilizada a concentração equivalente ao $CC_{50}$ do NLC-TAP-NaDES, permitindo a comparação direta entre as duas formulações. Essas escolhas atendem ao objetivo de isolar a contribuição do NaDES sobre a resposta celular, mas

impedem a leitura do gradiente morfológico observado como uma escala de potência entre as seis condições avaliadas, o que, de todo modo, não constituiu objetivo deste estudo.

O avanço experimental prioritário consiste em repetir as comparações com maior número de réplicas biológicas independentes e múltiplos *z-stacks* por condição no ensaio de CellROX, o que permitiria estimar a variabilidade biológica e fortalecer a interpretação da resposta oxidativa. A contagem do número de núcleos por campo, planejada como análise complementar aos *z-stacks*, ofereceria uma estimativa mais direta da densidade celular do que a AUC do DAPI, reduzindo a limitação discutida no item 6.6. Para NLC-TAP, NLC-TAP-NaDES e NLC-SER-NaDES, a comparação pareada deve ser estendida para incluir extrato livre e carreador branco, com e sem NaDES, permitindo isolar mais precisamente a contribuição de cada componente da formulação. A avaliação de marcadores inflamatórios e de remodelamento tecidual, incluindo citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-6, TNF-α, IL-1β), citocinas regulatórias/anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, TGF-β) e metaloproteinases de matriz associadas à invasão tumoral (MMP-7, MMP-13), complementaria a caracterização do papel do NaDES na resposta celular, articulando os eixos oxidativo, inflamatório e de remodelamento da biologia do melanoma discutidos no item 2.6. Nesse sentido, a quantificação de ao menos um desfecho-chave por avaliadores independentes e cegados quanto ao grupo experimental (por exemplo, percentual de células arredondadas, número ou área de estruturas vacuoliformes por célula, ou um índice de rugosidade de superfície) fortaleceria a robustez do gradiente morfológico descrito neste estudo, hoje sustentado por análise qualitativa.

Os resultados apresentados estabelecem uma base morfológica consistente para a hipótese do redirecionamento fenotípico dependente de NaDES. A biocompatibilidade geral da plataforma em células não tumorais já foi demonstrada em estudos prévios do grupo. Em queratinócitos e melanócitos humanos, isso ocorreu em concentração substancialmente inferior ao $CC_{50}$ aqui empregado, com efeito citoprotetor sob desafio oxidativo (Chang *et al*., 2026, 3,61 µg/mL). Já em fibroblastos murinos, o $IC_{50}$ relatado para a mesma formulação (Mello *et al*., 2025, 56,48 µg/mL), medida operacionalmente equivalente ao $CC_{50}$ empregado neste trabalho, já que ambas correspondem, pelo ensaio de MTT, à concentração associada a 50% de redução na viabilidade celular, situou-se em faixa semelhante aos $CC_{50}$ observados neste estudo em células B16-F10, não permitindo sustentar, nesse caso, a mesma diferença de sensibilidade entre tipos celulares. Essa comparação é compatível com a hipótese de seletividade dependente de dose e de contexto redox discutida no item 6.6, sustentada principalmente pelo contraste com os dados de Chang *et al*. (2026). A transição para uma compreensão mecanística e para aplicações terapêuticas dependerá, contudo, da identificação dos componentes responsáveis

pelo fenótipo observado, da quantificação desses padrões e de sua confirmação em sistemas tridimensionais e modelos *in vivo*.

## 7. CONCLUSÃO

Este estudo investigou o papel do NaDES como componente estrutural de carreadores lipídicos nanoestruturados sobre a resposta de células de melanoma B16-F10, comparando um par de nanoformulações contendo o mesmo extrato de coproduto de taperebá e idêntica matriz lipídica, diferindo exclusivamente pela presença do NaDES (NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES). De forma complementar, avaliou-se se o padrão de resposta observado se estendia a uma nanoformulação de composição distinta, obtida a partir do coproduto de seriguela (NLC-SER-NaDES).

O ensaio de viabilidade celular indicou redução da atividade metabólica dependente da concentração para as três nanoformulações, com $CC_{50}$ de 24,1 µg/mL para NLC-SER-NaDES, 67,2 µg/mL para NLC-TAP-NaDES e 106,2 µg/mL para NLC-TAP. As análises de microscopia óptica, confocal, eletrônica de varredura e eletrônica de transmissão revelaram um gradiente de alterações morfológicas e ultraestruturais entre os grupos, com o NaDES livre preservando, de modo geral, a morfologia celular nas concentrações avaliadas, enquanto sua incorporação às nanoformulações esteve associada às alterações mais pronunciadas observadas neste estudo. Esse gradiente descreve o comportamento observado nas condições experimentais empregadas, definidas para isolar a contribuição do NaDES, e não configura uma escala de potência entre as seis condições avaliadas, objetivo que não fez parte da proposta deste trabalho.

O padrão de remodelação observado nas formulações de taperebá estendeu-se, em menor magnitude, à formulação de seriguela, que ocupou posição intermediária no gradiente qualitativo de alterações descrito no item 5.2 (Controle / NaDES 1 / NaDES 2 → NLC-SER-NaDES → NLC-TAP → NLC-TAP-NaDES). Como essa formulação difere das demais em praticamente todos os seus componentes, essa observação não permite atribuir o padrão de resposta a um único fator, mas indica que a remodelação celular induzida pelas nanoformulações não é exclusiva do sistema de taperebá.

O achado central deste trabalho refere-se à comparação entre NLC-TAP e NLC-TAP-NaDES, a única constituída por formulações idênticas em composição, exceto pela presença do NaDES. Essa comparação demonstrou que a incorporação do NaDES não intensificou um mesmo padrão de resposta celular, mas esteve associada a um fenótipo morfológico e ultraestrutural qualitativamente distinto, caracterizado neste trabalho como redirecionamento fenotípico dependente de NaDES. Esse padrão manifestou-se de forma consistente entre técnicas: na microscopia eletrônica de varredura, projeções filiformes no NLC-TAP contrastaram com um relevo pregueado e escamiforme no NLC-TAP-NaDES; na microscopia eletrônica de transmissão, compartimentalização citoplasmática organizada no NLC-TAP

contrastou com rarefação citoplasmática difusa no NLC-TAP-NaDES. A caracterização físico-química prévia da mesma plataforma, indicando menor diâmetro, potencial zeta menos negativo e matriz mais amorfa na presença do NaDES, oferece uma base física plausível para essa distinção, ainda que os mecanismos moleculares subjacentes permaneçam a ser confirmados.

O padrão de remodelação observado nas formulações de taperebá estendeu-se, em menor magnitude, à formulação de seriguela, que ocupou posição intermediária no gradiente de alterações observado (Controle / NaDES 1 / NaDES 2 → NLC-SER-NaDES → NLC-TAP → NLC-TAP-NaDES). Como essa formulação difere das demais em praticamente todos os seus componentes, essa observação não permite atribuir o padrão de resposta a um único fator, mas indica que a remodelação celular induzida pelas nanoformulações não é exclusiva do sistema de taperebá.

Quanto ao estresse oxidativo, os resultados obtidos por CellROX™ Green não permitiram estabelecer um efeito antioxidante consistente entre os grupos nas condições avaliadas, condições essas correspondentes a um regime de dose citotóxica para o modelo celular estudado. A biocompatibilidade geral da mesma plataforma já foi demonstrada em estudos prévios do grupo, em células não tumorais e em concentrações substancialmente inferiores (queratinócitos e melanócitos humanos, Chang *et al*., 2026; fibroblastos murinos, Mello *et al*., 2025). Essa aparente divergência não configura contradição entre os achados, mas é compatível com a hipótese de uma janela de seletividade dependente de dose e de contexto redox, própria da biologia complexa do melanoma.

Este trabalho apresenta limitações inerentes ao seu caráter predominantemente qualitativo e exploratório, relacionadas à ausência de replicatas biológicas independentes no ensaio de viabilidade celular (MTT) e no ensaio de estresse oxidativo, à ausência de controles com extratos livres e carreadores brancos, e à necessidade de confirmação direta dos mecanismos de interação entre membrana celular e nanopartícula propostos como hipótese. Essas limitações, e os experimentos capazes de endereçá-las, são discutidos em detalhe no item 6.7.

Em síntese, este estudo evidencia que o NaDES, quando incorporado como componente estrutural de um carreador lipídico nanoestruturado, redireciona, mais do que amplifica, a resposta celular ao sistema nanoestruturado, um achado que reforça a relevância de investigar solventes eutéticos naturais não apenas como veículos de extração, mas como determinantes ativos do comportamento biológico de nanoformulações. Associado à valorização de coprodutos do Cerrado brasileiro, este trabalho contribui para a integração entre sustentabilidade, química verde e nanotecnologia no desenvolvimento de plataformas bioativas.

**Referências Bibliográficas**

ABIODUN, O. O.; NNORUKA, M. C.; TIJANI, R. O. Phytochemical Constituents, Antioxidant Activity, and Toxicity Assessment of the Seed of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, Ankara, v. 17, n. 3, p. 343-348, 2020. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2020.38801.

ABREU, D.; CARVALHO, E.; VILAS BOAS, E.; ASQUIERI, E.; DAMIANI, C. Ultrasound-assisted extraction of red mombin seed oil (*Spondias purpurea* L.): phenolic profile, fatty acid profile and chemical characterization of the cake, residue from the oil extraction. **Grasas y Aceites**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. e451, 2022. DOI: 10.3989/gya.0110211.

ACOSTA-VEGA, L.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.; GALEANO GARCIA, P. Exploring Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) for Enhanced Essential Oil Extraction: Current Insights and Applications. **Molecules**, Basel, v. 30, p. e 284, 2025. DOI: 10.3390/molecules30020284.

AKHAVAN, S.; ASSADPOUR, E.; KATOUZIAN, I.; JAFARI, S. M. Lipid nano scale cargos for the protection and delivery of food bioactive ingredients and nutraceuticals. **Trends in Food Science & Technology**, v. 74, p. 132-146, 2018. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.02.001.

AKHTAR, S.; ZUHAIR, F. Advancing nanomedicine through electron microscopy: insights into nanoparticle cellular interactions and biomedical applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 20, p. 2847-2878, 2025. DOI: 10.2147/IJN.S500978.

ALMEIDA, C. L. F. de; BRITO, S. A.; SANTANA, T. I. de; COSTA, H. B. A.; CARVALHO JÚNIOR, C. H. R. de; SILVA, M. V. da; ALMEIDA, L. L. de; ROLIM, L. A.; SANTOS, V. L. dos; WANDERLEY, A. G.; SILVA, T. G. da. *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae): Antioxidant and Antiulcer Activities of the Leaf Hexane Extract. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Cairo, v. 2017, p. e6593073, 2017. DOI: 10.1155/2017/6593073.

AMIGO, L.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Current evidence on the bioavailability of food bioactive peptides. **Molecules**, v. 25, n. 19, art. 4479, 2020. DOI: 10.3390/molecules25194479.

AYALA-ZAVALA, J. F.; VEGA-VEGA, V.; ROSALVA, C.; GONZÁLEZ-LEÓN, A.; RODRÍGUEZ-CASADO, A.; PACHECO-AGUILAR, R.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. **Food Research International**, Ottawa, v. 44, n. 7, p. 1866-1874, 2011. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.02.044.

BAO, C.; JIANG, P.; CHAI, J.; JIANG, Y.; LI, D.; BAO, W.; LIU, B.; LIU, B.; NORDE, W.; LI, Y. The delivery of sensitive food bioactive ingredients: absorption mechanisms, influencing

factors, encapsulation techniques and evaluation models. **Food Research International**, Ottawa, v. 120, p. 130-140, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.02.024.

BECKER, A. L.; INDRA, A. K. Oxidative Stress in Melanoma: Beneficial Antioxidant and Pro-Oxidant Therapeutic Strategies. **Cancers**, Basel, v. 15, n. 11, p. e 3038, 2023. DOI: 10.3390/cancers15113038.

BERTONCINI-SILVA, C.; VLAD, A.; RICCIARELLI, R.; FASSINI, P. G.; SUEN, V. M. M.; ZINGG, J.-M. Enhancing the Bioavailability and Bioactivity of Curcumin for Disease Prevention and Treatment. **Antioxidants**, Basel, v. 13, n. 3, p. e331, 2024. DOI: 10.3390/antiox13030331.

BHALANI, D. V.; NUTAN, B.; KUMAR, A.; CHANDEL, A. K. S. Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics. **Biomedicines**, Basel, v. 10, n. 9, p. e2055, 2022. DOI: 10.3390/biomedicines10092055.

BRAGAGNOLO, F. S.; STRIEDER, M. M.; PIZANI, R. S.; MESQUITA, L. M. de S.; GONZÁLEZ-MIQUEL, M.; ROSTAGNO, M. A. Revisiting natural deep eutectic solvents (NADES) as extraction media and ready-to-use purposes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry, Amsterdam**, v. 175, p. e117726, 2024. DOI: 10.1016/j.trac.2024.117726.

BRITO, G. O. de; REIS, B. C.; FERREIRA, E. A.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SÁ-BARRETO, L. C. L.; MATTIVI, F.; VRHOVSEK, U.; GRIS, E. F. Phenolic Compound Profile by UPLC-MS/MS and Encapsulation with Chitosan of *Spondias mombin* L. Fruit Peel Extract from Cerrado Hotspot-Brazil. **Molecules**, Basel, v. 27, n. 8, p. e2382, 2022. DOI: 10.3390/molecules27082382.

CABRAL, B. R. P.; OLIVEIRA, P. M. de; GELFUSO, G. M.; QUINTÃO, T. de S. C.; CHAKER, J. A.; KARNIKOWSKI, M. G. de O.; GRIS, E. F. Improving stability of antioxidant compounds from *Plinia cauliflora* (jabuticaba) fruit peel extract by encapsulation in chitosan microparticles. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 238, p. 195-201, 2018. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2018.06.024.

CANGUSSU, L. B.; COSTA, A. L. R.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. de. Chemical characterization and the bioaccessibility of bioactive compounds from seriguela (*Spondias purpurea* L.) pulp and by-products flours. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, [S. l.], v. 31, p. e100404, 2024. DOI: 10.1016/j.bcdf.2024.100404.

CANNAVACCIUOLO, C.; PAGLIARI, S.; FRIGERIO, J.; GIUSTRA, C. M.; LABRA, M.; CAMPONE, L. Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs) Combined with Sustainable Extraction Techniques: A Review of the Green Chemistry Approach in Food Analysis. **Foods**, Basel, v. 12, n. 1, p. e56, 2023. DOI: 10.3390/foods12010056.

CANNAVÒ, S. P.; TONACCI, A.; BERTINO, L.; CASCIARO, M.; BORGIA, F.; GANGEMI, S. The role of oxidative stress in the biology of melanoma: A systematic review. **Pathology - Research and Practice**, [S. l.], v. 215, p. 21-28, 2019. DOI: 10.1016/j.prp.2018.11.020.

CARRILLO-RODRÍGUEZ, L. A.; CAJIGAS ROMERO, M.; GALINDO LARRAHONDO, J. A. The use of agro-industrial waste towards a sustainable circular economy: a systematic review. **Detritus**, [S. l.], v. 31, p. 45-61, 2025. DOI: 10.31025/2611-4135/2025.19491.

CHAI, J.; JIANG, P.; WANG, P.; JIANG, Y.; LI, D.; BAO, W.; LIU, B.; LIU, B.; ZHAO, L.; NORDE, W.; YUAN, Q.; REN, F.; LI, Y. The intelligent delivery systems for bioactive compounds in foods: physicochemical and physiological conditions, absorption mechanisms, obstacles and responsive strategies. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 78, p. 144-154, 2018. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.06.003.

CHANG, L. F. A.; SANTOS, B. M.; FERREIRA, L. M.; FARIAS, G. R.; RADICCHI, M. A.; GRIS, E. F.; MELLO, V. C.; BÁO, S. N. Pulp Fiction Peels Reality: A New Sustainable Platform from Taperebá Coproducts and Green Solvents Modulating Inflammation and Combating Oxidative Stress. ACS Omega, Washington, v. 11, n. 23, p. 33763-33774, 2026. DOI: 10.1021/acsomega.6c00198.

CHEN, Y.; YANG, L.; FENG, C.; WEN, L. P. Nano Neodymium Oxide Induces Massive Vacuolization and Autophagic Cell Death in Non-Small Cell Lung Cancer NCI-H460 Cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, Amsterdam, v. 337, n. 1, p. 52-60, 2005. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.09.018.

CHEOK, C. Y.; ADZAHAN, N. M.; RAHMAN, R. A.; ABEDIN, N. H. Z.; HUSSAIN, N.; SULAIMAN, R.; CHONG, G. H. Current trends of tropical fruit waste utilization. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 58, n. 3, p. 335-361, 2018. DOI: 10.1080/10408398.2016.1176009.

CHEVÉ-KOOLS, E.; CHOI, Y. H.; RUPRICH-ROBERT, G.; ROULLIER, C.; GROUGNET, R.; CHAPELAND-LECLERC, F.; HOLLMANN, F. Natural deep eutectic solvents (NaDES): green solvents for pharmaceutical applications and beyond. **Green Chemistry**, [S. l.], v. 27, p. 8360-8385, 2025. DOI: 10.1039/d4gc06386d.

COSTA, R.; NUNES, C.; LIMA, S. A. C.; GAMEIRO, P.; REIS, S. Nanostructured lipid carrier-embedded hydrogels for enhanced skin delivery of quercetin: Optimized formulation with pomegranate oil for UVB protection. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 681, p. e125894, 2025. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2025.125894.

CULP, W. D.; NEAL, R.; MASSEY, R.; EGEVAD, L.; PISA, P.; GARLAND, D. Proteomic Analysis of Tumor Establishment and Growth in the B16-F10 Mouse Melanoma Model.

**Journal of Proteome Research**, Washington, v. 5, n. 6, p. 1332-1343, 2006. DOI: 10.1021/pr060059q.

DABULICI, C. M.; SÂRBU, I.; VAMANU, E. The bioactive potential of functional products and bioavailability of phenolic compounds. **Foods**, Basel, v. 9, n. 7, p. e953, 2020. DOI: 10.3390/foods9070953.

DONAHUE, N. D.; ACAR, H.; WILHELM, S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 143, p. 68-96, 2019. DOI: 10.1016/j.addr.2019.04.008.

DURIC, K.; LIU, Y.; CHEN, S.-N.; LANKIN, D. C.; NIKOLIC, D.; MCALPINE, J. B.; FRIESEN, J. B.; PAULI, G. F. Studying mass balance and the stability of (Z)-ligustilide from *Angelica sinensis* helps to bridge a botanical instability-bioactivity chasm. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 82, n. 9, p. 2400-2408, 2019. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00962.

DŁUGOSZ, O. Natural deep eutectic solvents in the synthesis of inorganic nanoparticles. **Materials**, Basel, v. 16, n. 2, p. e627, 2023. DOI: 10.3390/ma16020627.

ELGAMAL, R.; SONG, C.; RAYAN, A. M.; LIU, C.; AL-REJAIE, S.; ELMASRY, G. Thermal degradation of bioactive compounds during drying process of horticultural and agronomic products: a comprehensive overview. **Agronomy**, Basel, v. 13, n. 6, p. e1580, 2023. DOI: 10.3390/agronomy13061580.

ELMOWAFY, M.; SHALABY, K.; ELKOMY, M. H.; ALSAIDAN, O. A.; GOMAA, H. A. M.; ABDELGAWAD, M. A.; MOSTAFA, E. M. Polymeric nanoparticles for delivery of natural bioactive agents: recent advances and challenges. **Polymers**, Basel, v. 15, n. 5, p. e1123, 2023. DOI: 10.3390/polym15051123.

EMANUELLI, M.; SARTINI, D.; MOLINELLI, E.; CAMPAGNA, R.; POZZI, V.; SALVOLINI, E.; SIMONETTI, O.; CAMPANATI, A.; OFFIDANI, A. The double-edged sword of oxidative stress in skin damage and melanoma: from physiopathology to therapeutical approaches. **Antioxidants**, Basel, v. 11, n. 4, p. e612, 2022. DOI: 10.3390/antiox11040612.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Agro em dados: frutas. Brasília, DF: Embrapa, 2025. Disponível em: https://www.embrapa.br/en/agropensa/agro-em-dados/agricultura/frutas. Acesso em: 31 jul. 2026.

FAVAS, R.; ALMEIDA, H.; PEIXOTO, A. F.; FERREIRA, D.; SILVA, A. C. Advances in encapsulating marine bioactive compounds using nanostructured lipid carriers (NLCs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for health applications. **Pharmaceutics**, Basel, v. 16, n. 12, p. e1517, 2024. DOI: 10.3390/pharmaceutics16121517.

FONTES, S. S.; NOGUEIRA, M. L.; DIAS, R. B.; GURGEL ROCHA, C. A.; SOARES, M. B. P.; VANNIER-SANTOS, M. A.; BEZERRA, D. P. Combination therapy of curcumin and disulfiram synergistically inhibits the growth of B16-F10 melanoma cells by inducing oxidative stress. **Biomolecules**, Basel, v. 12, n. 11, p. e1600, 2022. DOI: 10.3390/biom12111600.

FREITAS, D. S.; RIBEIRO, A.; CAVACO-PAULO, A.; SILVA, C. The versatility of NADES across applications. Molecules, Basel, v. 30, n. 19, p. e3862, 2025. DOI: 10.3390/molecules30193862.

FREITAS, J. S. de; NOVO, A. A. de; KUNIGAMI, C. N.; MOREIRA, D. L. de; FREITAS, S. P.; MATTA, V. M. da; JUNG, E. P.; RIBEIRO, L. O. de. *Spondias tuberosa* and *Spondias mombin*: nutritional composition, bioactive compounds, biological activity and technological applications. **Resources**, Basel, v. 13, n. 5, p. e68, 2024. DOI: 10.3390/resources13050068.

GARCÍA-MAHECHA, M.; SOTO-VALDEZ, H.; CARVAJAL-MILLAN, E.; MADERA-SANTANA, T. J.; LOMELÍ-RAMÍREZ, M. G.; COLÍN-CHÁVEZ, C. Bioactive compounds in extracts from the agro-industrial waste of mango. **Molecules**, Basel, v. 28, n. 1, p. e458, 2023. DOI: 10.3390/molecules28010458.

GHASEMI, M.; TURNBULL, T.; SEBASTIAN, S.; KEMPSON, I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. International Journal of Molecular Sciences, Basel, v. 22, n. 23, p. e12827, 2021. DOI: 10.3390/ijms222312827.

GIENIUSZ, E.; SKRZYDLEWSKA, E.; ŁUCZAJ, W. Current insights into the role of UV radiation-induced oxidative stress in melanoma pathogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 25, n. 21, p. e11651, 2024. DOI: 10.3390/ijms252111651.

HIKMAWANTI, N. P. E.; RAMADON, D.; JANTAN, I.; MUN'IM, A. Natural deep eutectic solvents (NADES): phytochemical extraction performance enhancer for pharmaceutical and nutraceutical product development. **Plants**, Basel, v. 10, n. 10, p. e2091, 2021. DOI: 10.3390/plants10102091.

HO, L. W. C.; LIU, Y.; HAN, R.; BAI, Q.; CHOI, C. H. J. Nano–cell interactions of non-cationic bionanomaterials. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 52, n. 6, p. 1519-1530, 2019. DOI: 10.1021/acs.accounts.9b00103.

HUANG, L.; HUANG, X.-H.; YANG, X.; HU, J.-Q.; ZHU, Y.-Z.; YAN, P.-Y.; XIE, Y. Novel nano-drug delivery system for natural products and their application. **Pharmacological Research**, v. 201, p. e107100, 2024. DOI: 10.1016/j.phrs.2024.107100.

JAIDEE, W.; RUJANAPUN, N.; MALEE, K.; CHAISAWADI, S.; PUTTARAK, P.; HIRANSAI, P.; CORDELL, G. A.; SARKER, S. D.; NAHAR, L.; CHAROENSUP, R. Degradation kinetics of andrographolide in aqueous solution, product identification and

biological activity evaluation. **Scientific Reports**, London, v. 15, n. 1, p. e28856, 2025. DOI: 10.1038/s41598-025-13652-6.

JAUREGI, P.; ESNAL-YEREGI, L.; LABIDI, J. Natural deep eutectic solvents (NADES) for the extraction of bioactives: emerging opportunities in biorefinery applications. **PeerJ Analytical Chemistry**, v. 6, p. e32, 2024. DOI: 10.7717/peerj-achem.32.

JOYCE, K.; FABRA, G. T.; BOZKURT, Y.; PANDIT, A. Bioactive potential of natural biomaterials: identification, retention and assessment of biological properties. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, London, v. 6, p. e122, 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00512-8.

KAMINSKI, K.; KAZIMIERCZAK, U.; KOLENDA, T. Oxidative stress in melanogenesis and melanoma development. **Contemporary Oncology**, v. 26, p. 1-7, 2022. DOI: 10.5114/wo.2021.112447.

KANDEMIR, K.; PISKIN, E.; XIAO, J.; TOMAS, M.; ÇAPANOĞLU, E. Fruit juice industry wastes as a source of bioactives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 70, p. 6805-6832, 2022. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c00756.

KAOUI, S.; CHEBLI, B.; ZAIDOUNI, S.; BASAID, K.; MIR, Y. Deep eutectic solvents as sustainable extraction media for plants and food samples: a review. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 31, p. e100937, 2023. DOI: 10.1016/j.scp.2022.100937.

KHOSA, A.; REDDI, S.; SAHA, R. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 598-613, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.04.055.

KOH, Q. Q.; KUA, Y. L.; GAN, S.; TAN, K. W.; LEE, T. Z. E.; CHENG, W. K.; LAU, H. L. N. Sugar-based natural deep eutectic solvent (NADES): physicochemical properties, antimicrobial activity, toxicity, biodegradability and potential use as green extraction media for phytonutrients. Sustainable Chemistry and Pharmacy, v. 35, p. e101218, 2023. DOI: 10.1016/j.scp.2023.101218.

KOUL, B.; YAKOOB, M.; SHAH, M. P. Agricultural waste management strategies for environmental sustainability. Environmental Research, v. 206, p. e112285, 2022. DOI: 10.1016/j.envres.2021.112285.

KROLL, A.; FANG, R.; ZHANG, L. Biointerfacing and applications of cell membrane-coated nanoparticles. **Bioconjugate Chemistry**, Washington, v. 28, n. 1, p. 23-32, 2017. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00569.

KROLL, A.; PILLUKAT, M. H.; HAHN, D.; SCHNEKENBURGER, J. Interference of Engineered Nanoparticles with *In Vitro* Toxicity Assays. Archives of Toxicology, Berlin, v. 86, n. 7, p. 1123-1136, 2012. DOI: 10.1007/s00204-012-0837-z.

KUMAR, H. *et al*. Fisetin-Loaded Nanostructured Lipid Carriers: Formulation and Evaluations against Advanced and Metastatic Melanoma. Molecular Pharmaceutics, Washington, v. 20, n. 12, p. 6035-6055, 2023. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.3c00309.

KYRIAKOUDI, A.; SPANIDI, E.; MOURTZINOS, I.; GARDIKIS, K. Innovative delivery systems loaded with plant bioactive ingredients: formulation approaches and applications. **Plants**, Basel, v. 10, n. 6, p. e1238, 2021. DOI: 10.3390/plants10061238.

LEONG, Y. K.; CHANG, J. S. Valorization of fruit wastes for circular bioeconomy: current advances, challenges, and opportunities. Bioresource Technology, Amsterdam, v. 359, art. 127459, 2022. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127459.

LI, D. Natural deep eutectic solvents in phytonutrient extraction and other applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. e1004332, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.1004332.

LI, J.; MAO, H.; KAWAZOE, N.; CHEN, G. Insight into the interactions between nanoparticles and cells. **Biomaterials Science**, v. 5, n. 2, p. 173-189, 2017. DOI: 10.1039/c6bm00714g.

LI, L.; REN, F.; QI, C.; XU, L.; FANG, Y.; LIANG, M.; FENG, J.; CHEN, B.; NING, W.; CAO, J. Intermittent hypoxia promotes melanoma lung metastasis via oxidative stress and inflammation responses in a mouse model of obstructive sleep apnea. **Respiratory Research**, v. 19, p. e28, 2018. DOI: 10.1186/s12931-018-0727-x.

LIU, J.; KANG, L.; SMITH, S.; WANG, C. Transmembrane MUC18 Targeted Polydopamine Nanoparticles and a Mild Photothermal Effect Synergistically Disrupt Actin Cytoskeleton and Migration of Cancer Cells. Nano Letters, Washington, v. 21, n. 22, p. 9609-9618, 2021. DOI: 10.1021/acs.nanolett.1c03377.

LIU, Y.; FRIESEN, J. B.; MCALPINE, J. B.; LANKIN, D. C.; CHEN, S.-N.; PAULI, G. F. Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 3, p. 679-690, 2018. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00945.

LIU, Y.; ZHUANG, J.; ZHANG, X.; YUE, C.; ZHU, N.; YANG, L.; WANG, Y.; CHEN, T.; WANG, Y.; ZHANG, L. W. Autophagy Associated Cytotoxicity and Cellular Uptake Mechanisms of Bismuth Nanoparticles in Human Kidney Cells. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 275, p. 39-48, 2017. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.04.014.

LV, Y.; LI, W.; LIAO, W.; JIANG, H.; LIU, Y.; CAO, J.; LU, W.; FENG, Y. Nano-drug delivery systems based on natural products. **International Journal of Nanomedicine**, v. 19, p. 541-569, 2024. DOI: 10.2147/ijn.s443692.

MAQSOOD, S.; KHALID, W.; KUMAR, P.; BENMEBAREK, I. E.; RASOOL, I. F. U.; TRIF, M.; MORENO, A.; ESATBEYOGLU, T. Valorization of plant-based agro-industrial waste and by-product for the production of polysaccharide: towards a more circular economy. **Applied Food Research**, v. 5, p. e100954, 2025. DOI: 10.1016/j.afres.2025.100954.

MELLO, Victor Carlos; BRITO, Giovanna Oliveira de; RADICCHI, Marina Arantes; FLORÊNCIO, Isadora; PIAU, Tathyana Benetis; FERREIRA, Eduardo Antonio; CHANG, Leonardo Fróes de Azevedo; SILVEIRA, Ariane Pandolfo; SIMÕES, Marina Mesquita; PAIVA, Karen Letycia Rodrigues de; SANTOS, Mac-Kedson Medeiros Salviano; ALVES, Nicole Santana; GRISOLIA, Cesar Koppe; BÁO, Sônia Nair; GRIS, Eliana Fortes. Advanced Solubilization of Brazilian Cerrado Byproduct Extracts Using Green Nanostructured Lipid Carriers and NaDESs for Enhanced Antioxidant Potentials. **Antioxidants**, v. 14, n. 3, art. 290, 2025. DOI: 10.3390/antiox14030290.

MÎNDRILĂ, I.; OSMAN, A.; MÎNDRILĂ, B.; PREDOI, M. C.; MIHAIESCU, D. E.; BUTEICĂ, S. A. Phenotypic Switching of B16F10 Melanoma Cells as a Stress Adaptation Response to Fe3O4/Salicylic Acid Nanoparticle Therapy. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 14, n. 10, p. e1007, 2021. DOI: 10.3390/ph14101007.

MIŠAN, A.; NAĐPAL, J.; STUPAR, A.; POJIĆ, M.; MANDIĆ, A.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, p. 2564-2592, 2019. DOI: 10.1080/10408398.2019.1650717.

MORAIS, I. S. S. S.; PINHEIRO, L. M. B.; SANTOS, F. P.; LIMA, M. S.; SANTOS, K. M. O.; ALBUQUERQUE, C. L. C. de; CARDARELLI, H. R. Extraction processes, bioaccessibility, antioxidant capacity, and potential prebiotic effect of co-product extracts from fruits of the *Spondias* genus. **Journal of Food Science**, v. 90, n. 5, p. e70260, 2025. DOI: 10.1111/1750-3841.70260.

NANDA, S. S.; YI, D. K. Recent advances in synergistic effect of nanoparticles and its biomedical application. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 25, n. 6, p. e3266, 2024. DOI: 10.3390/ijms25063266.

NESTEROV, D.; BARRERA-MARTÍNEZ, I.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, C.; SANDOVAL-GONZÁLEZ, A.; BUSTOS, E. Approaching the circular economy: biological, physicochemical, and electrochemical methods to valorize agro-industrial residues, wastewater, and industrial wastes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 12, n. 5, p. e113335, 2024. DOI: 10.1016/j.jece.2024.113335.

NIRMAL, N. P.; KHANASHYAM, A. C.; MUNDANAT, A. S.; SHAH, K.; BABU, K. S.; THORAKKATTU, P.; AL-ASMARI, F.; PANDISELVAM, R. Valorization of fruit waste for bioactive compounds and their applications in the food industry. **Foods**, Basel, v. 12, n. 3, p. e556, 2023. DOI: 10.3390/foods12030556.

NUNES, R.; LONGO, B.; WILLRICH, C.; DA SILVA, L.; SANTIAGO, L.; DE QUEIROZ SILVA, T.; DE OLINDA, L.; PEREIRA, L.; EISENDECKER, H.; SANTIN, J.; BENVENUTTI, L.; CORSI, L.; MIRANDA, B.; CÓTA, H.; VENZON, L.; FRANÇA, T.; VIDAL-GUTIÉRREZ, M.; IGNÁCIO, Z.; ROMAN-JUNIOR, W.; DA SILVA, L. The hydroalcoholic extract of the leaves of red mombin (*Spondias purpurea* L.) is more effective in accelerating ulcer healing than preventing them in rodents. **Inflammopharmacology**, v. 33, p. 6119-6137, 2025. DOI: 10.1007/s10787-025-01915-7.

OTERO-GUZMÁN, N. C.; ANDRADE-PIZARRO, R. D. Bioactive compounds from tropical fruit by-products: extraction, characterization and therapeutic potential. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 21, p. e101983, 2025. DOI: 10.1016/j.jafr.2025.101983.

PATEL, P.; GARALA, K.; SINGH, S.; PRAJAPATI, B. G.; CHITTASUPHO, C. Lipid-based nanoparticles in delivering bioactive compounds for improving therapeutic efficacy. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 17, n. 3, p. e329, 2024. DOI: 10.3390/ph17030329.

POPOVIĆ, B. M. *et al*. Cytotoxicity Profiling of Choline Chloride-Based Natural Deep Eutectic Solvents. RSC Advances, Cambridge, v. 13, n. 6, p. 3520-3527, 2023. DOI: 10.1039/d2ra07488e.

POTEZ, M.; TRAPPETTI, V.; BOUCHET, A.; FERNANDEZ-PALOMO, C.; GÜÇ, E.; KILARSKI, W. W.; HLUSHCHUK, R.; LAISSUE, J.; DJONOV, V. Characterization of a B16-F10 melanoma model locally implanted into the ear pinnae of C57BL/6 mice. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0206693, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0206693.

QI, C.; CAO, J.; LIU, X.; CHEN, Q.; LIANG, M.; CHEN, Z.; FENG, J.; CHEN, B.; NING, W.; LI, L. Follistatin-like 1 mitigates intermittent hypoxia-induced melanoma lung metastasis in mice. **Sleep and Breathing**, v. 27, p. 1165-1173, 2022. DOI: 10.1007/s11325-022-02680-5.

RADOŠEVIĆ, K. *et al*. Evaluation of Toxicity and Biodegradability of Choline Chloride Based Deep Eutectic Solvents. Ecotoxicology and Environmental Safety, Amsterdam, v. 112, p. 46-53, 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.034.

REMIGANTE, A.; SPINELLI, S.; MARINO, A.; PUSCH, M.; MORABITO, R.; DOSSENA, S. Oxidative stress and immune response in melanoma: ion channels as targets of therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 24, n. 1, p. e887, 2023. DOI: 10.3390/ijms24010887.

RICCIARDI, P.; CILLARI, G.; MIINO, C.; COLLIVIGNARELLI, M. Valorization of agro-industry residues in the building and environmental sector: a review. **Waste Management & Research**, v. 38, p. 487-513, 2020. DOI: 10.1177/0734242x20904426.

RODRIGUES, F. A. M.; SANTOS, S. B. F. dos; LOPES, M. M. de A.; GUIMARÃES, D. J. S.; SILVA, E. de O.; SOUZA FILHO, M. de S. M. de; MATTOS, A. L. A.; SILVA, L. M. R. da; AZEREDO, H. M. C. de; RICARDO, N. M. P. S. Antioxidant films and coatings based on starch and phenolics from *Spondias purpurea* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 354-365, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.012.

ROMERO-MARTÍNEZ, M.; ANDRADE-PIZARRO, R.; DE PAULA, C. Functional compounds in tropical fruit processing by-products and intrinsic factors affecting their composition: a review. **Current Research in Food Science**, v. 10, p. e101028, 2025. DOI: 10.1016/j.crfs.2025.101028.

RUGINĂ, D.; SOCACIU, M. A.; NISTOR, M.; DIACONEASA, Z.; CENARIU, M.; TABARAN, F. A.; SOCACIU, C. Liposomal and Nanostructured Lipid Nanoformulations of a Pentacyclic Triterpenoid Birch Bark Extract: Structural Characterization and *In Vitro* Effects on Melanoma B16-F10 and Walker 256 Tumor Cells Apoptosis. Pharmaceuticals, Basel, v. 17, n. 12, p. e1630, 2024. DOI: 10.3390/ph17121630.

SANTANA NETO, D. C. de; FERREIRA, V. C. da S.; ARAÚJO, I. B. da S.; MEIRELES, B. R. L. de A.; CORDEIRO, A. M. T. de M.; SILVA, F. A. P. da. Solid-liquid extraction of bioactive compounds from *Spondias mombin* L. by-products: optimization and identification of phenolic profile. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [S. l.], v. 39, p. 511-525, 2022. DOI: 10.1007/s43153-021-00209-z.

SCHUH, L.; SALGADO, L. A.; PIAU, T. B.; SILVEIRA, A. P.; LEAL, C.; ROMERA, L. F.; RADICCHI, M. A.; SANTOS, M. M. S.; FALCAO, L.; GRISOLIA, C. K.; GRIS, E. F.; MUEHLMANN, L. A.; BÁO, S. N.; MELLO, V. Integrating Natural Deep Eutectic Solvents into Nanostructured Lipid Carriers: An Industrial Look. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 17, n. 7, p. e855, 2024. DOI: 10.3390/ph17070855.

SCROB, T.; VARODI, S.; VINTILĂ, G.; CASONI, D.; CIMPOIU, C. Estimation of Degradation Kinetics of Bioactive Compounds in Several Lingonberry Jams as Affected by Different Sweeteners and Storage Conditions. **Food Chemistry: X**, [S. l.], v. 16, p. e100471, 2022. DOI: 10.1016/j.fochx.2022.100471.

SHAMSUDDIN, N. A. M.; ZULFAKAR, M. H. Nanostructured Lipid Carriers for the Delivery of Natural Bioactive Compounds. **Current Drug Delivery**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 127-143, 2023. DOI: 10.2174/1567201819666220324094234.

SHARMA, V.; SHARMA, D.; TSAI, M.-L.; ORTIZO, R. G. G.; YADAV, A.; NARGOTRA, P.; CHEN, C.-W.; SUN, P.-P.; DONG, C.-D. Insights into the Recent Advances of Agro-Industrial Waste Valorization for Sustainable Biogas Production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 390, p. e129829, 2023. DOI: 10.1016/j.biortech.2023.129829.

SIKORSKI, H.; ŻMIJEWSKI, M. A.; PIOTROWSKA, A. Tumor Microenvironment in Melanoma: Characteristic and Clinical Implications. International Journal of Molecular Sciences, Basel, v. 26, n. 14, p. e6778, 2025. DOI: 10.3390/ijms26146778.

SILVA, Franciéle de Matos da. Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados verdes para aplicações cosmecêuticas: uma plataforma sustentável com potencial antioxidante. 2025. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) — Universidade de Brasília, Brasília, 2025.

SILVA, M. de O.; CASTRO, R. J. S. de. First-Order Degradation Kinetics of Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of Fresh and Enzymatically Hydrolyzed Seriguela Pulp (*Spondias purpurea* L.). **ACS Food Science & Technology**, Washington, v. 5, p. 3520-3529, 2025. DOI: 10.1021/acsfoodscitech.5c00554.

SINAN, K. I.; ZENGIN, G.; ZHELEVA-DIMITROVA, D.; GEVRENOVA, R.; PICOT-ALLAIN, M. C. N.; DALL'ACQUA, S.; BEHL, T.; GOH, B. H.; YING, P. T. S.; MAHOMOODALLY, M. F. Exploring the Chemical Profiles and Biological Values of Two *Spondias* Species (*S. dulcis* and *S. mombin*): Valuable Sources of Bioactive Natural Products. **Antioxidants**, Basel, v. 10, n. 11, p. 1771, 2021. DOI: 10.3390/antiox10111771.

TENG, H.; CHEN, L. Polyphenols and bioavailability: an update. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 59, n. 13, p. 2040-2051, 2019. DOI: 10.1080/10408398.2018.1437023.

TRZECIAK, E. R.; ZIMMER, N.; GEHRINGER, I.; STEIN, L.; GRAEFEN, B.; SCHUPP, J.; STEPHAN, A.; RIETZ, S.; PRANTNER, M.; TUETTENBERG, A. Oxidative Stress Differentially Influences the Survival and Metabolism of Cells in the Melanoma Microenvironment. **Cells**, Basel, v. 11, n. 6, p. 930, 2022. DOI: 10.3390/cells11060930.

USMANI, Z.; SHARMA, M.; TRIPATHI, M.; LUKK, T.; KARPICHEV, Y.; GATHERGOOD, N.; SINGH, B. N.; THAKUR, V. K.; TABATABAEI, M.; GUPTA, V. K. Biobased natural deep eutectic system as versatile solvents: Structure, interaction and advanced applications. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 881, p. 163002, 2023. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.163002.

VAROL, M.; SUBAŞI, B.; KOLDEMIR-GÜNDÜZ, M.; YERLIKAYA, A. Boron's Role in B16-F10 Melanoma: Cytotoxic, Antioxidant, Apoptotic, and Anti-inflammatory Effects.

**Biological Trace Element Research**, New York, v. 204, n. 3, p. 1319-1328, 2026. DOI: 10.1007/s12011-025-04750-7.

VILLA, C.; CAVIGLIA, D.; ROBUSTELLI DELLA CUNA, F. S.; ZUCCARI, G.; RUSSO, E. NaDES Application in Cosmetic and Pharmaceutical Fields: An Overview. **Gels**, Basel, v. 10, n. 2, p. 107, 2024. DOI: 10.3390/gels10020107.

VILLACÍS-CHIRIBOGA, J.; ELST, K.; VAN CAMP, J.; VERA, E.; RUALES, J. Valorization of Byproducts from Tropical Fruits: Extraction Methodologies, Applications, Environmental, and Economic Assessment: A Review. Part 1: General Overview of the Byproducts, Traditional Biorefinery Practices, and Possible Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Hoboken, v. 19, n. 2, p. 405-447, 2020. DOI: 10.1111/1541-4337.12542.

WAGH, M. S.; S., S.; NATH, P. C.; CHAKRABORTY, A.; AMRIT, R.; MISHRA, B.; MISHRA, A. K.; MOHANTA, Y. K. Valorisation of Agro-Industrial Wastes: Circular Bioeconomy and Biorefinery Process – A Sustainable Symphony. **Process Safety and Environmental Protection**, Amsterdam, v. 183, p. 708-725, 2024. DOI: 10.1016/j.psep.2024.01.055.

WANG, M.; XIAO, Y.; MIAO, J.; ZHANG, X.; LIU, M.; ZHU, L.; LIU, H.; SHEN, X.; WANG, J.; XIE, B.; WANG, D. Oxidative Stress and Inflammation: Drivers of Tumorigenesis and Therapeutic Opportunities. **Antioxidants**, Basel, v. 14, n. 6, p. 735, 2025. DOI: 10.3390/antiox14060735.

WU, J. L. Y. *et al*. The Pathways for Nanoparticle Transport across Tumour Endothelium. Nature Nanotechnology, London, v. 20, n. 5, p. 672-682, 2025. DOI: 10.1038/s41565-025-01877-5.

YAASHIKAA, P. R.; KUMAR, P. S.; VARJANI, S. Valorization of Agro-Industrial Wastes for Biorefinery Process and Circular Bioeconomy: A Critical Review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 343, p. 126126, 2022. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.126126.

ZHANG, X.; MA, G.; WEI, W. Simulation of Nanoparticles Interacting with a Cell Membrane: Probing the Structural Basis and Potential Biomedical Application. **NPG Asia Materials**, London, v. 13, p. 52, 2021. DOI: 10.1038/s41427-021-00320-0.