

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

MARIANE DE SOUZA PARRA AGOSTINHO

**PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA PARA INCORPORAÇÃO DOS
COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO EXTRATO DO AÇAFRÃO-DA-
TERRA**

APUCARANA

2022

MARIANE DE SOUZA PARRA AGOSTINHO

**PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA PARA INCORPORAÇÃO DOS
COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO EXTRATO DO AÇAFRÃO-DA-
TERRA**

**Production of zein nanoparticles for incorporation of bioactive compounds
present in turmeric extract**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química/Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Apucarana/Linha de pesquisa: Engenharia de Bioprocessos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Caroline Casagrande Sipoli.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Rúbia Michele Suzuki.

APUCARANA

2022



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Apucarana



MARIANE DE SOUZA PARRA AGOSTINHO

**PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA PARA INCORPORAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS
PRESENTES NO EXTRATO DO AÇAFRÃO-DA-TERRA**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Desenvolvimento De Processos.

Data de aprovação: 28 de Julho de 2022

Dra. Caroline Casagrande Sipoli, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Lilian Tatiani Dusman Tonin, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Lucimara Gaziola De La Torre, Doutorado - Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

Dr. Rafael Oliveira Defendi, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 03/08/2022.

AGRADECIMENTO

Agradecimento à Deus, à minha família, aos professores envolvidos e amigos que fiz durante a trajetória e que tanto contribuíram ao desenvolvimento do trabalho. Agradeço também ao Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa da UTFPR – campus Apucarana (LAMAP) e à Sala de Cultura de Células do Laboratório de Bioprocessos, sob responsabilidade da Professora Elisângela Dusman, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – campus Francisco Beltrão.

RESUMO

O açafrão-da-terra (*Curcuma longa*), pertencente à família das *Zingiberaceae* é uma planta rica em compostos bioativos, atua sobre um organismo vivo, tecido ou célula e vem sendo estudado devido aos seus efeitos como antioxidante, auxiliar ao tratamento da doença do câncer, da doença de *Alzheimer*, entre outros. Seu uso *in natura* não é tão eficaz devido à sua característica de hidrofobicidade e pouca absorção promovida pelo organismo, por isso vem sendo pesquisado na forma encapsulada. O presente trabalho teve como objetivo a extração dos compostos bioativos do açafrão-da-terra em sistema de solventes etanol:água 95:5 (v/v) e a incorporação em nanopartículas de zeína pelo método tradicional de precipitação antisolvente com uma estrutura dupla de deposição eletrostática em combinação com caseinato de sódio e quitosana, para possível aplicação em células humanas. O extrato hidroetanólico foi avaliado quanto à atividade antioxidante através dos métodos de habilidade quelante de Fe (II), pelo sequestro de radical livre DPPH e ABTS, com valores de $57,05 \pm 0,19\%$, $94,15 \pm 0,08\%$ e $82,46 \pm 0,17\%$, respectivamente. Além disso, foram quantificados o teor de flavonoides utilizando cloreto de alumínio ($5548,77 \pm 99,51$ mg ERU 100 g^{-1}) e compostos fenólicos pelo método Folin Ciocalteu ($1737,13 \pm 36,57$ mg EAG 100 g^{-1}). As nanopartículas foram analisadas no equipamento DLS para diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersidade e as condições obtidas de acordo com o objetivo do trabalho foram a proporção mássica de 1:0,8 de zeína/caseinato de sódio; 10:1 (10%) de massa de zeína/caseinato de sódio/extrato e a proporção de 0,050% de quitosana. A capacidade máxima de carga e a eficiência de encapsulação das nanopartículas de zeína/caseinato de sódio/extrato de açafrão-da-terra 10% também foram estudados. Os resultados mostraram que a capacidade máxima de carga das nanopartículas foi em torno de 12% e a eficiência de encapsulação em torno de 66%. O extrato hidroetanólico, bem como as nanopartículas que continham o extrato a 10% de massa de zeína/caseinato e zeína/caseinato/quitosana demonstraram citotoxicidade para as células tumorais renais (786-0) e hepáticas (HUH7.5), sugerindo potencial aplicação do extrato de *Curcuma longa* como fonte de efeitos citotóxicos/antiproliferativos para esses tipos de células.

Palavras-chave: antioxidantes; Câncer; caseinato de sódio; nanoencapsulação; quitosana.

ABSTRACT

Turmeric (*Curcuma longa*), belonging to the *Zingiberaceae* family is a plant rich in bioactive compounds, it acts on a living organism, tissue or cell and has been studied due to its effects as an antioxidant, aid in the treatment of cancer, *Alzheimer's* disease, among others. It's *in natura* use is not so effective due to its hydrophobicity and little absorption promoted by the organism; so, it has been researched in the encapsulated form. The present work aimed to extract the bioactive compounds from turmeric in a 95:5 (v/v) ethanol: water solvent system and the incorporation into zein nanoparticles by the traditional method of antisolvent precipitation with a double structure of electrostatic deposition in combination with sodium caseinate and chitosan, for possible application in human cells. The hydroethanolic extract was evaluated for antioxidant activity by Fe (II) chelating ability methods, by DPPH and ABTS free radical scavenging, with values of $57.05 \pm 0.19\%$, $94.15 \pm 0.08\%$ and $82.46 \pm 0.17\%$, respectively. In addition, the flavonoid content was quantified using aluminum chloride (5548.77 ± 99.51 mg ERU 100g^{-1}) and phenolic compounds by the Folin Ciocalteu method (1737.13 ± 36.57 mg EAG 100g^{-1}). The nanoparticles were analyzed in the DLS equipment for hydrodynamic diameter, zeta potential and polydispersity index and the conditions obtained according to the objective of the work were the mass ratio of 1:0.8 of zein/sodium caseinate; 10:1 (10%) mass of zein/sodium caseinate/extract and the ratio of 0.050% chitosan. The maximum loading capacity and encapsulation efficiency of zein/sodium caseinate/10% turmeric extract nanoparticles were also studied. The results showed that the maximum load capacity of the nanoparticles was around 12% and the encapsulation efficiency around 66%. The hydroethanolic extract, as well as the nanoparticles that contained the extract at 10% by mass of zein/caseinate and zein/caseinate/chitosan, demonstrated cytotoxicity for renal (786-0) and hepatic (HUH7.5) tumor cells, suggesting potential application of *Curcuma longa* extract as a source of cytotoxic/antiproliferative effects for these cell types.

Keywords: antioxidants; Cancer; sodium caseinate; nanoencapsulation; chitosan.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Pesquisa mundial em plantas medicinais.....	15
Figura 2: Evolução temporal em publicações de plantas médicas para os 12 principais países.....	15
Figura 3: Açafrão-da-terra (<i>Curcuma longa</i>).....	16
Figura 4: Curcuminóides presentes no açafrão-da-terra: curcumina (a), bisdemetoxicurcumina(b) e demetoxicurcumina (c)	17
Figura 5: Equilíbrio redox entre eliminadores e indutores de ERO. O círculo azul representa indutores ERO. O círculo cinza representa eliminadores de ERO	20
Figura 6: Formação de ERO por meio de várias reações.	21
Figura 7: Fluxograma das classes de compostos fitoquímicos com propriedades antioxidantes	25
Figura 8: Estrutura base de um fenólico.....	26
Figura 9: Estrutura base de flavonoides	27
Figura 10: Estrutura genérica do ácido benzóico (1) e ácido cinâmico (2).....	28
Figura 11: Estruturas química de produtos obtidos da degradação da curcumina em 0,1M tampão fosfato, pH 7,2 a 37°C	29
Figura 12: Biotransformações da curcumina em camundongos.....	31
Figura 13: Possível modelo estrutural da proteína zeína	38
Figura 14: Diagrama esquemático que descreve a via pela qual a curcumina ativa a autofagia. A curcumina ativa a AMPK, que é um ativador de ULK1. ULK1 está diretamente envolvida na ativação da autofagia	45
Figura 15: Princípio do processo de precipitação antisolvente.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de rim (A) e fígado (B) humano tratadas por 24, 48 e 72 h com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato de açafrão-da-terra.....	73
Gráfico 2: Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de rim (A) e fígado (B) humano tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato.....	75
Gráfico 3: Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de rim (A) e fígado (B) humano tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato e o extrato de açafrão.....	78
Gráfico 4: Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de rim (A) e fígado (B) humano tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato:quitosana.....	80
Gráfico 5: Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de rim (A) e fígado (B) humano tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato:quitosana e o extrato de açafrão.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados da capacidade antioxidante e quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides obtidos para o rizoma do açafrão-da-terra	59
Tabela 2: Efeito do caseinato de sódio nas nanopartículas de zeína com relação a diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersidade*	63
Tabela 3: Efeito do método de adição do caseinato de sódio e zeína para formação das partículas com relação a tamanho, potencial zeta e índice de polidispersidade	64
Tabela 4: Efeito da centrifugação para as nanopartículas com relação a diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersidade.....	65
Tabela 5: Efeito da proporção de massa zeína/extrato do açafrão-da-terra para as nanopartículas com relação ao diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta, índice de polidispersidade, eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento	66
Tabela 6: Efeito da adição da quitosana nas nanopartículas de zeína-caseinato/10% (10:1) extrato do açafrão-da-terra com relação ao diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersidade	68
Tabela 7: Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de rim e fígado humano, tratadas com as diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato de açafrão-da-terra, por 24, 48 e 72 h, pelo teste do MTT	71
Tabela 8: Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de rim e fígado humano, tratadas com as diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato, por 24, 48 e 72 h, pelo teste do MTT	74
Tabela 9: Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de rim e fígado humano, tratadas com as diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato e o extrato de açafrão-da-terra, por 24, 48 e 72 h, pelo teste do MTT	77
Tabela 10: Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de rim e fígado humano, tratadas com as diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato:quitosana, por 24, 48 e 72 h, pelo teste do MTT	79
Tabela 11: Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de rim e fígado humano, tratadas com as diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato:quitosana e o extrato de açafrão-da-terra, por 24, 48 e 72 h, pelo teste do MTT	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AFM	Microscópio de força atômica
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERU	Equivalente de rutina
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
GSH	Hormônio do crescimento
NDGA	Ácido nordihidroguaiarético
NNI	National Technology Initiative
OG	Galato de octila
PG	Galato de propila
RES	Sistema retículo endotelial
SPM	Microscópio de sonda de varredura
STM	Microscópio de tunelamento de varredura
TBHQ	<i>terc</i> -butilhidroquinona
ZeCsA	Zeína-caseinato de sódio-açafrão-da-terra
ZeCsQA	Zeína-caseinato de sódio-quitosana-açafrão-da-terra

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Plantas medicinais	14
2.2	Açafrão-da-terra	16
2.3	Compostos bioativos	17
2.4	Antioxidantes	18
2.4.1	Estresse oxidativo e radicais livres	19
2.5	Compostos Fenólicos	24
2.5.1	Flavonoides	27
2.5.2	Ácidos fenólicos	27
2.6	Sistemas nanoparticulados	32
2.6.1	Vesículas lipídicas	34
2.6.2	Nanopartículas poliméricas	35
2.7	Uso clínico dos antioxidantes naturais	43
2.7.1	Anticâncer	43
2.7.2	Neuroprotetivo	44
2.8	Câncer	46
4	OBJETIVOS	48
4.1	Objetivos gerais	48
4.2	Objetivos específicos	48
5	METODOLOGIA	49
5.1	Preparo da amostra - Amostragem	49
5.2	Umidade	49
5.3	Preparação do Extrato	49
5.4	Compostos bioativos	49
5.4.1	Quantificação de compostos fenólicos	49
5.4.2	Quantificação de flavonoides totais	50
5.5	Atividade antioxidante	50
5.5.1	Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH	50
5.5.2	Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS ^{•+}	51
5.5.3	Determinação da Habilidade Quelante do íon Ferro (II)	52
5.6	Produção das nanopartículas de zeína	52

5.6.1	Produção das nanopartículas de zeína estabilizadas com caseinato de sódio	52
5.6.2	Produção das nanopartículas de zeína estabilizadas com caseinato de sódio e carregadas com extrato do açafão-da-terra	53
5.6.3	Produção das nanopartículas de zeína estabilizadas com caseinato de sódio e quitosana e carregadas com extrato do açafão-da-terra.....	54
5.6.4	Caracterização das nanopartículas	54
5.6.5	Eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento	54
5.7	Avaliação da atividade citotóxica/antiproliferativa dos extratos de açafão-da-terra e suas nanopartículas	55
5.7.1	Solução tratamento.....	56
5.7.2	Teste de citotoxicidade do MTT	56
5.8	Análise estatística.....	57
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.1	Umidade.....	58
6.2	Avaliação da capacidade antioxidante.....	58
6.3	Produção das nanopartículas de zeína estabilizadas com caseinato de sódio.....	62
6.4	Produção das nanopartículas de zeína / caseinato de sódio carregadas com extrato de açafão-da-terra, eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento.....	65
6.5	Produção das nanopartículas de zeína estabilizadas com caseinato de sódio e quitosana e carregadas com extrato do açafão-da-terra	68
6.6	Avaliação da atividade citotóxica/antiproliferativa dos extratos de açafão-da-terra e suas nanopartículas	70
7	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

Há séculos o açafrão-da-terra, também conhecido como cúrcuma ou turmerica, (*Curcuma longa*) vem sendo utilizado na medicina tradicional indiana e chinesa para fins culinários e medicinais. É uma planta perene, originária da Índia e do sudeste da Ásia (MARCHI *et al.*, 2016; SHISHODIA, SETHI & AGGARWAL, 2005). Difundiu-se pela América e algumas regiões da Europa (ALONSO, 1998). No Brasil, o açafrão-da-terra foi introduzido na década de 80 (ALMEIDA, 2006), desde então, vem sendo estudado e utilizado.

A parte mais útil da planta são os rizomas. Possuem coloração amarelo-parda a amarelo-acastanhada, superfície lisa, com cicatrizes anulares (BRASIL, 2019), proporcionando às preparações culinárias aroma e coloração intensos e característico.

Estudos mostram que o açafrão-da-terra apresenta propriedades antioxidantes (BARANKEVICZ, 2015; CERVEIRA *et al.*, 2021; JAGETIA *et al.*, 2005; KEBEDE *et al.*, 2021; LING *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2021; QUILES *et al.*, 2002; SARAVANAN & PARI, 2005; SWAIN & RAUTRAY, 2021; YANG *et al.*, 2020) atividade hepatoprotetora (SALAMA *et al.*, 2013), anti-inflamatória (AGGARWAL & HARIKUMAR, 2009; HATCHER *et al.*, 2008; SHARMA, GESCHER & STEWARD, 2005), antibacteriana (CERVEIRA *et al.*, 2021; KEBEDE *et al.*, 2021; PATIL *et al.*, 2019; SWAIN & RAUTRAY, 2021), anticâncer (CERVEIRA *et al.*, 2021; JAGETIA *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2020), antidiabética (PARI & SARAVANAN, 2004), antilipidêmica (LING *et al.*, 2012; SARAVANAN & PARI, 2005), cardioprotetora (AGGARWAL & HARIKUMAR, 2009; JAGETIA *et al.*, 2005) e quimiopreventiva (AGGARWAL & HARIKUMAR, 2009). Esses efeitos benéficos são derivados de compostos bioativos presentes nesta planta, tendo como destaque a curcumina, bisdemetoxicurcumina e demetoxicurcumina (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015). Compostos bioativos são definidos como compostos essenciais e não essenciais que ocorrem na natureza, fazem parte da cadeia alimentar e podem ter efeito sobre a saúde humana (QUEIROZ, 2012).

O açafrão-da-terra apresenta baixa biodisponibilidade e rápida degradação em pH fisiológico devido ao seu caráter hidrofóbico e instabilidade a fatores externos, como altas temperaturas, luz e oxigênio, portanto sua utilização na forma natural em pó não

é tão eficaz. Surge assim a necessidade de incluí-lo em veículos nano/microparticulados para que ele possa exercer seu efeito *in vivo* (SHARMA, GESCHER & STEWARD, 2005).

Desde 1980, as nanopartículas vêm ganhando atenção devido à sua capacidade de controlar a liberação de fármacos e outros componentes, melhorando os parâmetros biofarmacêuticos e farmacocinéticos (KAMALY *et al.*, 2012). Nanopartículas de proteínas têm se destacado por seu transporte inovador de fármacos e por apresentar vantagens devido à baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, alto valor nutricional, estabilidade, capacidade de incorporar vários tipos de compostos e baixo custo (HAWKINS, SOON-SHIONG & DESAI, 2008). Este tipo de nanopartícula permite a modulação de sua composição e carga superficial para obter maior interação com as membranas celulares (DOMINGO-ESPÍN, *et al.*, 2011).

Dentre os tipos de materiais proteicos utilizados para produzir nanopartículas está a zeína. A zeína é uma proteína extraída do endosperma de grãos de milho e pode ser empregada facilmente para produzir partículas em nanoescala adequadas para uso como sistemas de transporte. Pertence à classe das prolamínas e apresenta vantagens, como ser comestível, atóxica e biodegradável. É uma molécula anfifílica e vem sendo largamente utilizada nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e biotecnológicas (IRACHE & GONZÁLES-NAVARRO, 2017; LIANG *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2016).

Estudos na área de encapsulação de compostos bioativos em nanopartículas de zeína vêm sendo realizados na tentativa de obter uma melhor resposta do ativo no organismo e ao mesmo tempo buscando alternativas ambientais verdes, gerando condições para a preservação dos recursos naturais e auxiliando na promoção do desenvolvimento econômico. Esses estudos visam o tratamento de doenças, principalmente relacionadas ao câncer.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo extrair os compostos bioativos presentes nos rizomas do açafreão-da-terra e encapsulá-los em nanopartículas proteicas de zeína a fim de testar sua atividade citotóxica/antitumoral em células tumorais humanas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

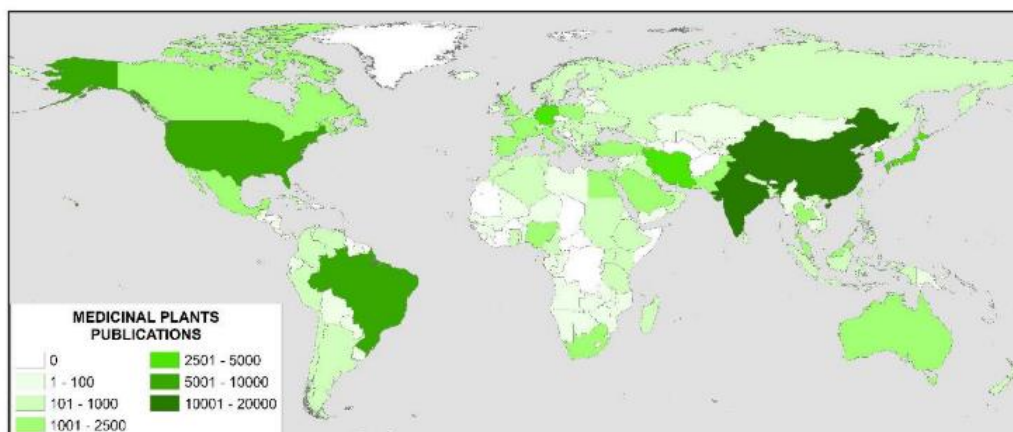
2.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais fazem parte da biodiversidade e, desde o início da civilização, vêm sendo utilizadas para o tratamento, cura e prevenção de doenças (BRAGA & SILVA, 2021). Estudos apontam que cerca de 80% da população as utilizam como ervas medicinais e ritualísticas, sendo bastante disseminado em feiras e estabelecimentos comerciais, nos centros ou periferias de cidades. No entanto, parte do uso tradicional da planta medicinal não é documentado, o que resulta no declínio do conhecimento e torna-o não confiável (CARMO *et al.*, 2015; FIRMO *et al.*, 2011; MICHEL, ABD RANI & HUSAIN, 2020).

Percebe-se um grande aumento no número de pesquisas nessa área, como uma estratégia de seleção de plantas medicinais (ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006), além da necessidade de unificar conhecimento popular e ciência, obter a comprovação da real eficácia da utilização e promover o uso sustentável dos recursos naturais, principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, que possuem uma das maiores biodiversidades (FIRMO *et al.*, 2011).

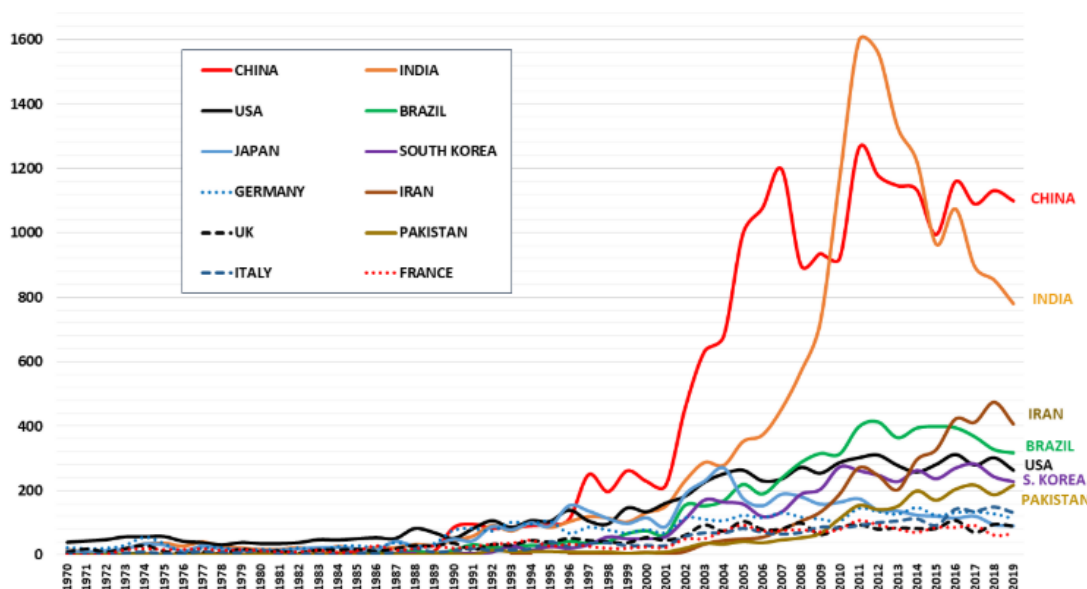
Conforme Figuras 1 e 2, desde os anos 2000, o Brasil tem aumentado consideravelmente o número de publicações sobre plantas medicinais. Pesquisa realizada em 2020 aponta o Brasil como destaque mundial, perdendo apenas para a China, Índia e Irã (SALMERÓN-MANZANO, GARRIDO-CARDENAS & MANZANO-AGUGLIARO, 2020). Não há pesquisas mais recentes que envolvam o número de publicações sobre plantas medicinais, sendo assim os dados continuam vigentes.

Figura 1: Pesquisa mundial em plantas medicinais



Fonte: Salmerón-Manzano, Garrido-Cardenas & Manzano-Agugliaro (2020)

Figura 2: Evolução temporal em publicações de plantas médicas para os 12 principais países



Fonte: Salmerón-Manzano, Garrido-Cardenas & Manzano-Agugliaro (2020)

As plantas medicinais são muito utilizadas na indústria farmacêutica, principalmente para a produção de medicamentos fitoterápicos. De acordo com a Brasil (2022), fitoterápico é a planta medicinal industrializada para se obter um medicamento, “o processo de industrialização evita contaminações por microrganismos e substâncias estranhas, além de padronizar a quantidade e a forma certa que deve ser usada, permitindo uma maior segurança de uso”.

A fitoterapia faz parte do interesse do Ministério da Saúde e do Sistema Único de Saúde (SUS) e, desde 2006, disponibilizam plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos para a população.

A partir de 2009 foi apresentada a Rennisus (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS). Essa lista contém 71 espécies de plantas e tem a finalidade de orientar estudos e pesquisas para que se possa subsidiar a elaboração de uma relação de fitoterápicos para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de doenças (BRASIL, 2009). Nessa lista consta, dentre outras plantas, a *Curcuma longa* que será objeto de nosso estudo.

2.2 Açafrão-da-terra

Existem mais de 80 espécies de turméricas (*Curcuma* spp.) e algumas espécies, como a *Curcuma longa*, apresentam mais de 70 variedades. Entretanto, elas podem ser diferentes com relação às propriedades químicas e biológicas (AKTER *et al.*, 2019).

O açafrão-da-terra (Figura 3) é conhecido no Brasil como cúrcuma, açafrão, açafrão-da-terra ou açafrão-da-índia (MAIA *et al.*, 1995). Ele vem sendo utilizado como um componente da medicina Indiana desde 1900 a.C. Até o século XII-XIII seu uso era restrito ao continente asiático (BAR-SELA, EPELBAUM & SCHAFFER, 2009).

Figura 3: Açafrão-da-terra (*Curcuma longa*)



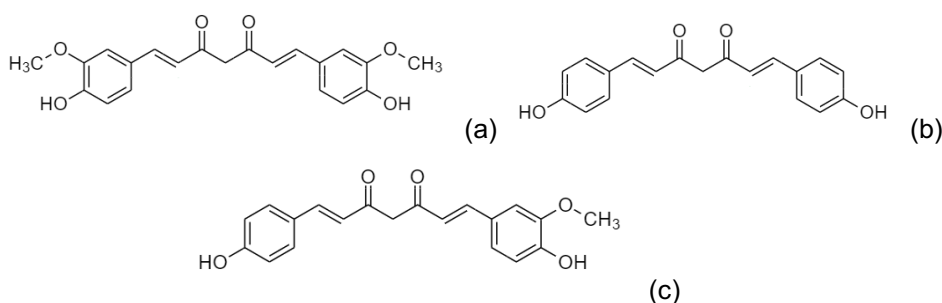
Fonte: Autoria própria (2021)

O açafrão-da-terra é uma especiaria derivada dos rizomas da planta *Curcuma*

longa, membro da família Zingiberaceae. É usualmente empregado na forma em pó, como corante (MAIA *et al.*, 1995) e também é vendido como rizomas frescos. As principais formas farmacêuticas descritas são cápsulas e comprimidos. Também foi descrita a utilização de cremes, pomadas, gel, *patch* muco adesivo e soluções, como enxaguatório bucal e colírio (BRASIL, 2020).

A cor amarelo brilhante do açafrão-da-terra vem principalmente de pigmentos polifenólicos hidrofóbicos conhecidos como curcuminóides. A curcumina é o principal e mais ativo curcuminóide encontrado no açafrão-da-terra e, quimicamente é conhecida como diferuloilmetano ($C_{21}H_{20}O_6$) (Figura 4a). Outros curcuminóides encontrados incluem bisdemetoxicurcumina (Figura 4b) e demetoxicurcumina (Figura 4c) (SHARMA, GESCHER & STEWARD, 2005).

Figura 4: Curcuminóides presentes no açafrão-da-terra: curcumina (a), bisdemetoxicurcumina(b) e demetoxicurcumina (c)



Fonte: Sharma, Gescher & Steward (2005)

A análise fitoquímica do açafrão-da-terra, em estudos realizados por Patil *et al.* (2019), apresentou: alcalóides, flavonoides, terpenóides, esteróides, saponinas, fenóis, glicosídeos, entre outros. Os compostos fenólicos e os flavonoides de modo geral são os principais responsáveis pela atividade antioxidante do açafrão-da-terra.

2.3 Compostos bioativos

Os compostos bioativos podem ser definidos como nutrientes e/ou não nutrientes com ação metabólica ou fisiológica específica. Estas substâncias podem exercer seus efeitos agindo como antioxidantes, ativando enzimas, bloqueando a atividade de toxinas virais ou antibacterianas, inibindo a absorção de colesterol, diminuindo a agregação plaquetária ou destruindo bactérias gastrointestinais nocivas (QUEIROZ,

2012).

O grande interesse e foco nos estudos dos compostos bioativos de alimentos deve-se ao reconhecimento da relação entre nutrição, saúde e doença proveniente de vários estudos nas áreas da bioquímica, da clínica, da epidemiologia e mais recentemente, da genômica. O Brasil é um país com uma grande variedade de frutas e vegetais, o que torna os estudos na área de alimentos funcionais bastante promissores (LAJOLO, 2019).

Os compostos bioativos estão presentes em pequenas quantidades nos alimentos e são compostos extra nutricionais, ou seja, não têm funções estabelecidas como as dos nutrientes e sua falta não acarreta uma deficiência ou uma doença. Há evidências de que exercem diferentes ações biológicas benéficas e podem associar-se à promoção da saúde, aumento do bem estar e menor incidência das doenças crônicas não transmissíveis (ARAÚJO *et al.*, 2021).

Os mecanismos dos compostos bioativos são complexos e pouco conhecidos, no entanto sabe-se que a resposta pode ser influenciada por fatores genéticos e pela microbiota intestinal (LAJOLO, 2019).

Por existirem em grande número na natureza e com variedades de estruturas químicas os compostos bioativos são divididos em diversas classes sendo compreendidos por polifenóis, antocianinas, flavonoides, fosfolipídios, carotenoides, fitoesteróis, organossulfurados, entre outros (ARAÚJO *et al.*, 2021).

2.4 Antioxidantes

De um modo geral, os antioxidantes podem ser definidos como moléculas capazes de diminuir ou prevenir a oxidação de outras moléculas, podendo atuar em alimentos ou em sistemas biológicos. Em alimentos, predominantemente, ocorrem reações de auto oxidação em cadeia. Em organismos vivos os antioxidantes previnem danos celulares e agem como eliminadores de radicais livres e por isso são uma parte importante da nossa dieta (GODIC *et al.*, 2014; DA COSTA SILVA, CERCHIARO & HONÓRIO, 2011).

Na fisiologia normal, enzimas específicas no corpo, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, geralmente controlam os níveis de radicais livres (GULÇIN *et al.*, 2002). Porém quando os níveis de radicais livres são superiores aos

das enzimas endógenas responsáveis por eliminá-los, ocorre o estresse oxidativo (AKTER *et al.*, 2019).

Os radicais livres (radicais superóxido ($O_2^{\bullet -}$)), radicais hidroxila (OH^{\bullet}) e oxigênio singlete (1O_2) estão se produzindo continuamente no corpo humano por reações redox complexas e desempenham um papel crucial no desenvolvimento de muitas doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares, arteriosclerose, diabetes, envelhecimento e doenças neurodegenerativas (PHAM-HUY & PHAM-HUY, 2008).

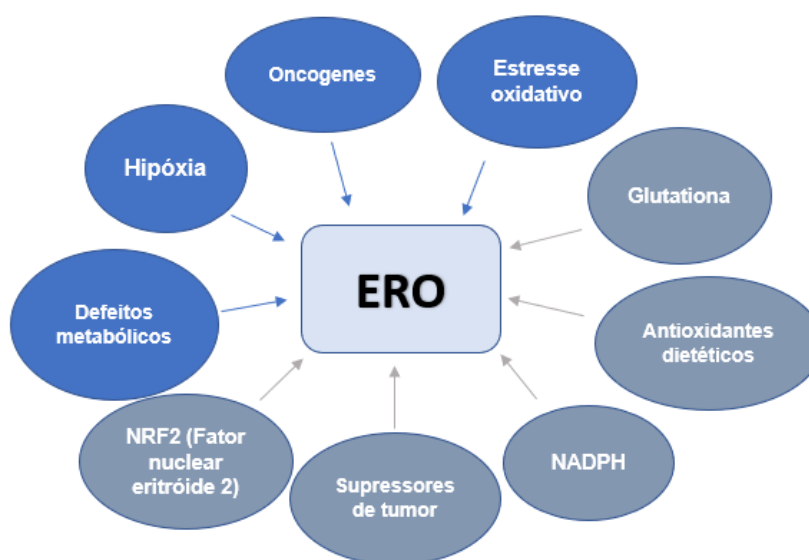
2.4.1 Estresse oxidativo e radicais livres

O estresse oxidativo pode estar ligado ao aumento de radicais livres ou à diminuição da concentração de antioxidantes. Ocorre uma instabilidade entre moléculas pró-oxidantes e antioxidantes (HUSAIN & KUMAR, 2012; PERSSON, POPESCU & CEDAZO-MINGUEZ, 2014). Os pró-oxidantes/radicais livres contêm mais de um elétron desemparelhado que é instável e muito reativo para reação com outras espécies. Em geral, as rotas metabólicas contínuas no sistema humano produzem ERO/ERN/radicais livres que atacam especialmente os amidos, gorduras, proteínas e ácidos nucleicos (LICHTENBERG & PINCHUK, 2015). Poucas fontes destinadas ao desenvolvimento de ERO/ERN compreendem mitocôndrias endógenas, por exemplo, xantina oxidase (SISEIN, 2014), peroxissomos, inflamação, fagocitose, vias do ácido araquidônico, exercícios e lesão de esquiemia/reperfusão (HUSAIN & KUMAR, 2012), íons metálicos livres, explosão respiratória (TAKASHIMA *et al.*, 2012), fumaça de cigarro, solventes industriais e exógenos, como poluentes ambientais e irradiação UV. A redução parcial do dióxigênio não reativo (KUMAR, 2014) também resulta em ERO. Incluem ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\bullet}), oxigênio singlete, óxido nítrico (NO) e outros, causando danos celulares e ao DNA. O ânion superóxido é conhecido como ERO primário, que se misturam a novas moléculas para formar ERO secundários por meio de rotas catalisadas por enzimas e metais (NEHA *et al.*, 2019).

As ERO/ERN desempenham um comportamento duplo, visto que em uma concentração mais elevada são prejudiciais ao sistema biológico, enquanto uma quantidade moderada mostra um efeito valioso, como proteção contra infecções (HUSAIN & KUMAR, 2012). O desvio nos níveis de ERO/ERN é uma parte da função

normal que não ultrapassaria a fronteira entre a biologia redox e os níveis citotóxicos/citostáticos (MITTLER, 2017). É necessário para a homeostase celular a sinalização de várias respostas biológicas, por exemplo: H_2O_2 funciona para diferenciação, migração e proliferação. Os indutores de ERO, além dos eliminadores são apresentados na Figura 5.

Figura 5: Equilíbrio redox entre eliminadores e indutores de ERO. O círculo azul representa indutores ERO. O círculo cinza representa eliminadores de ERO



Fonte: Adaptado de Neha *et al.* (2019)

As ERO/ERN também são usadas para a transdução de sinal que traz citocinas e fator nuclear-kB (NF-kB) (GORRINI, HARRIS & MAK, 2013). No entanto, o acúmulo supérfluo de ERO/ERN prejudica os constituintes celulares, como lipídios, proteínas e DNA. As ERO/ERN transformam o DNA, rompendo sua fita simples ou dupla, degradando as bases nitrogenadas, transformando, translocando e fazendo ligações cruzadas com proteínas. A alteração do DNA leva ao envelhecimento, carcinogênese e doenças neurodegenerativas, autoimunes, cardiovasculares e outras. 8-OH-G (8-hidroxi-guanosina) é o reconhecido superlativo da modificação do DNA seguido por estresse oxidativo e é um marcador promissor para a carcinogênese (BIRBEN *et al.*, 2012). As ERO/ERN podem oxidar a espinha dorsal, bem como as cadeias laterais da proteína, que irão interagir com a cadeia lateral de outros aminoácidos para a geração da função carbonila (PISOSCHI & POP, 2015).

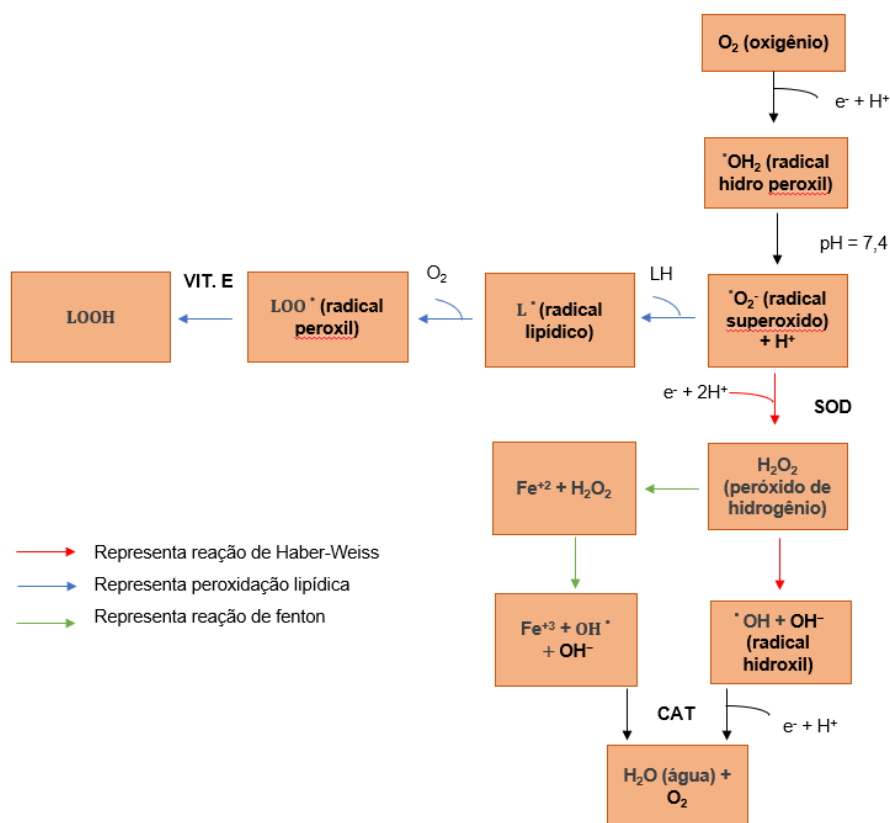
ERO/ERN também pode quebrar as cadeias de peptídeos, oxidar aminoácidos

ácidos e levar à peroxidação lipídica ao perturbar a membrana biológica. No caso da proteína, a oxidação do grupo sulfidríla leva a alterações conformacionais, degradação e desdobramento da proteína, enquanto no caso da peroxidação lipídica, gera aldeídos insaturados, isoprostanos e substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico capazes de levar ao estresse oxidativo e desativar as proteínas celulares (FIRUZI *et al.*, 2011).

2.4.1.1 Mecanismo dos radicais livres

Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é produzido a partir do O_2 via radical hidroperoxil em pH 7,4, enquanto o subproduto respiratório mitocondrial e a NADPH oxidase dão origem ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pode ser transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da superóxido dismutase (SOD) por meio da reação de Haber-Weiss, que é então convertido em várias outras ERO, como radicais hidroxila (OH^{\cdot}) e ânions hidroxila (OH^-) e, por último, à água pela catalase, conforme mostrado na Figura 6.

Figura 6: Formação de ERO por meio de várias reações.

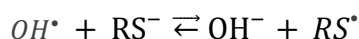


Fonte: Adaptado de Neha *et al.* (2019)

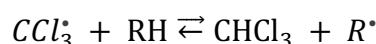
A interação entre o peróxido de hidrogênio com o radical Fe^{2+} (reação de Fenton) forma radical hidroxila OH^{\bullet} . A reação entre LH (lipídio genérico) e L (radical lipídico), leva à peroxidação lipídica (CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Os radicais livres podem reagir com novas moléculas por meio de:

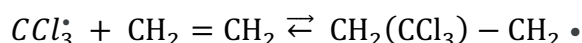
1. Doação de elétrons/aceitação de elétrons



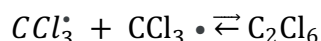
2. Remoção de hidrogênio



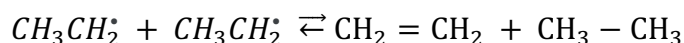
3. Reações de adição



4. Terminação



5. Desproporcionamento



2.4.1.2 Antioxidante e seu sistema de defesa

A reação de oxidação é essencial para a vida já que auxiliam na composição do nosso corpo, mas também pode ser destrutiva. Geralmente, a oxidação é um processo de alteração de uma substância química, que produz radicais livres (altamente reativos), levando a reações em cadeia numérica que podem destruir as células. Uma série de estresse abiótico causa abundância de ERO/ERN e danifica o tecido, o que resulta em várias doenças, incluindo cardíacas, hepáticas, neurodegenerativas, câncer e envelhecimento (KIM *et al.*, 2015).

Os antioxidantes evitam ou auxiliam no tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo neutralizando o efeito de deterioração das ERO/ERN, desempenhando um papel crucial na conservação de funções celulares (KIM *et al.*, 2015).

Muitos antioxidantes naturais e sintéticos foram descobertos. Os antioxidantes

naturais endógenos, produto do metabolismo do organismo, podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (AGUILAR, NAVARRO & PÉREZ, 2016). Os antioxidantes enzimáticos endógenos consistem em glutatona peroxidase, SOD e catalase, enquanto os antioxidantes não enzimáticos são ácido úrico, ácido lipóico, bilirrubina, glutatona e melatonina. Os antioxidantes naturais exógenos são carotenoides, vitamina E, A e C, flavonoides naturais ou diferentes outros compostos. A vitamina C é um antioxidante solúvel em água que atua junto com a vitamina E para proteger os lipídios da peroxidação (AGUILAR, NAVARRO & PÉREZ, 2016).

Já os antioxidantes sintéticos são antioxidantes centrados no petróleo que compreendem butil hidroxitolueno (BHT), galato de octila (OG), butil hidroxianisol (BHA), galato de propila (PG) e *terc*-butilhidroquinona (TBHQ). TBHQ tem importância nutricional e confere sabor e cor ao produto alimentar (BOUAYED, HOFFMANN & BOHN, 2010).

Os antioxidantes sintéticos são usados como aditivos alimentares no processo de prevenção da deterioração oxidativa de óleos e gorduras em alimentos processados (LIU *et al.*, 2016; NANDITHA & PRABHASANKAR, 2009; SHASHA, 2014). Também são descritos como tendo efeitos nocivos sobre os sistemas de enzimas humanas e DNA (LIU *et al.*, 2016). NDGA (ácido nordiidroguaiaretico) é um antioxidante alimentar identificado como a causa raiz da doença cística renal, principalmente no caso de roedores.

Antioxidantes que estão envolvidos na proteção (MUT-SALUD *et al.*, 2016) de sistemas biológicos:

- Inibindo a criação de novos radicais (SOD, catalase, Se, Cu, Zn),
- Capturando os radicais livres para evitar a reação em cadeia (vitaminas E e C, carotenoides),
- Restaurando a deficiência afetada pelos radicais livres (lipases, proteases).

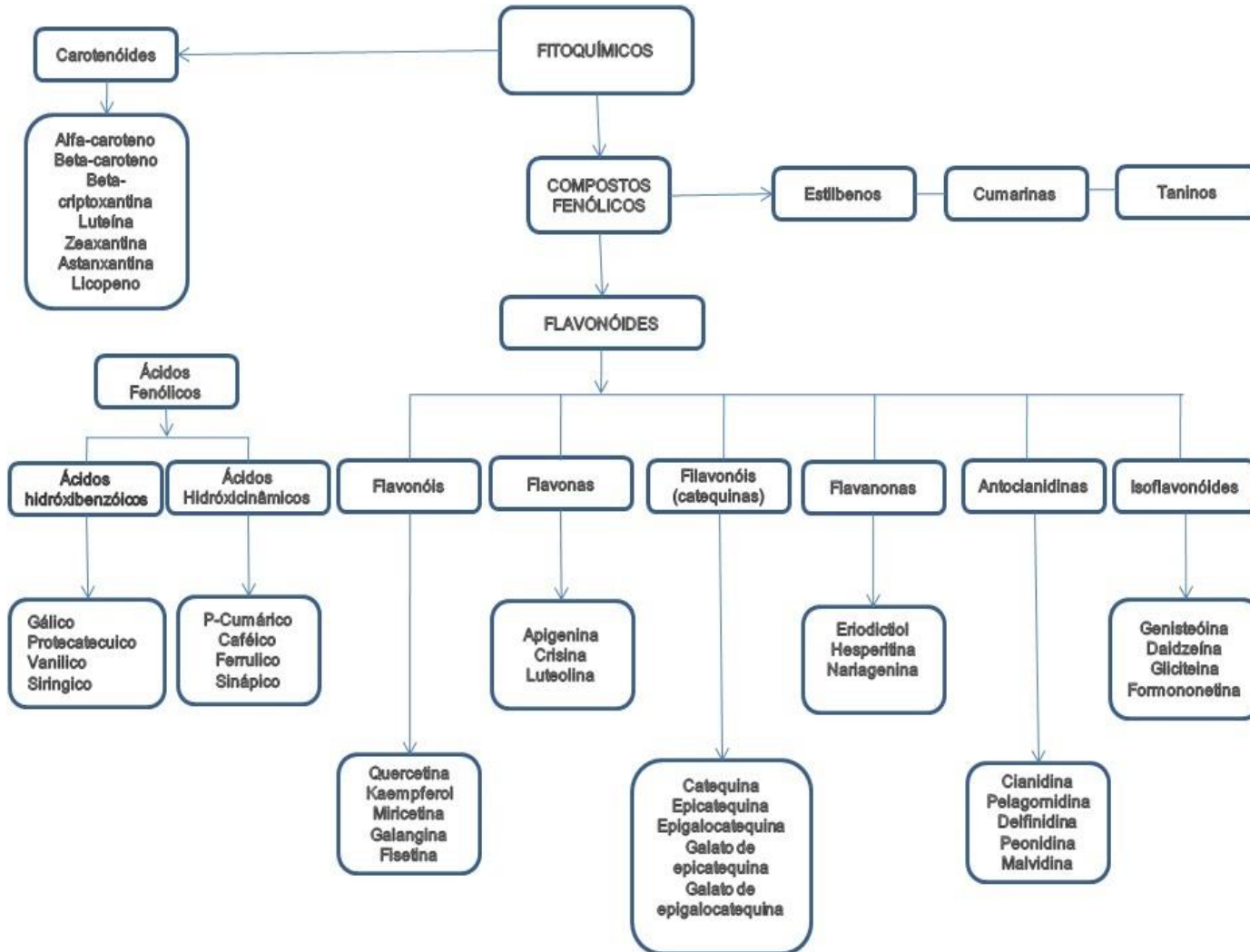
Os antioxidantes naturais são ricos em compostos fenólicos e não causam efeitos tóxicos (YANISHLIEVA, MARINOVA & POKORNÝ, 2006). Sendo assim, considerando todas essas limitações em relação ao uso de antioxidantes sintéticos e a busca por uma maior conscientização do público sobre as questões de saúde, a necessidade de se estudar e também utilizar antioxidantes naturais promotores de saúde aumentou. Desta forma, o reconhecimento de constituintes antioxidantes em material vegetal pode ser uma alternativa para garantir uma boa saúde, além de que

são escolhidos para serem usados como suplemento alimentar, funcionando como alimentos funcionais (AKTER *et al.*, 2019; EMBUSCADO, 2018).

2.5 Compostos Fenólicos

Os compostos bioativos (fitoquímicos) compreendem uma grande variedade de classes de compostos químicos com diferentes propriedades físico-químicas (polaridade, solubilidade, capacidade de formar ligações de hidrogênio, potencial de oxido redução) que irão determinar tanto o tipo como a eficiência de atividade, assim como o meio e a estrutura celular em que podem atuar (OLIVEIRA & BASTOS, 2011). A Figura 7 ilustra os fitoquímicos/antioxidantes naturais e os principais subgrupos de compostos que têm sido investigados por apresentarem propriedades antioxidantes e serem utilizados para uso clínico.

Figura 7: Fluxograma das classes de compostos fitoquímicos com propriedades antioxidantes



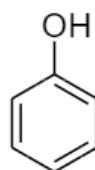
Fonte: Adaptado de Liu (2004)

Os compostos fenólicos estão espalhados pelo reino vegetal, mas os principais alimentos são frutas, cebola, alho e especiarias. São produtos do metabolismo secundário das plantas, desempenhando funções essenciais na reprodução e no crescimento das mesmas; atuam como mecanismo de defesa contra patógenos, parasitas e predadores, além de contribuir para a coloração das plantas (LIU, 2004).

Além de suas funções nas plantas são frequentemente associados à redução no risco de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas (LIU, 2004; SPENCER *et al.*, 2008). Os compostos fenólicos possuem propriedades redutoras e capacidade em sequestrar radicais livres e metais pró-oxidantes. São classificados como interruptores de radicais livres, exibindo uma alta atividade antioxidante, explicando, em parte, esta associação (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007; SHAHIDI, JANITHA & WANASUNDARA, 1992). Estudos sugerem que os compostos fenólicos possam atuar também por outros meios como a modulação da atividade de diferentes enzimas como a telomerase, lipoxigenase e cicloxigenase, interações com receptores e vias de transdução de sinais, regulação do ciclo celular, entre outras, fundamentais para a manutenção da homeostase dos organismos vivos (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos um radical hidroxila e/ou outros substitutos, e podem ser divididos de acordo com o número de anéis fenólicos e com as estruturas as quais estão ligados (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007; LIU, 2004). Podem ser naturais ou sintéticos e podem estar em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas. Os grupos mais abundantes de antioxidantes fenólicos de fonte natural presentes nos alimentos são os flavonoides, os ácidos fenólicos, as lignanas, os taninos e os tocoferóis (ANGELO & JORGE, 2007; D'ARCHIVIO *et al.*, 2007; SPENCER *et al.*, 2008). Estima-se que os flavonoides respondam por aproximadamente dois terços dos fenólicos em nossa dieta e o terço restante provém dos ácidos fenólicos (LIU, 2004). Abaixo (Figura 8), a estrutura base de um composto fenólico.

Figura 8: Estrutura base de um fenólico

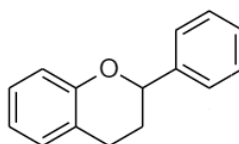


Fonte: Autoria própria (2021)

2.5.1 Flavonoides

Os flavonoides são um grupo de compostos fenólicos com atividade antioxidante que foi identificada em frutas, vegetais e outros alimentos vegetais e que foram vinculados à redução do risco das principais doenças crônicas. Foram identificados mais de 4000 flavonoides distintos. Comumente têm uma estrutura genérica composta por dois anéis aromáticos ligados por 3 carbonos que geralmente estão em um anel heterocíclico oxigenado (Figura 9) (LIU, 2004).

Figura 9: Estrutura base de flavonoides



Fonte: Autoria própria (2021)

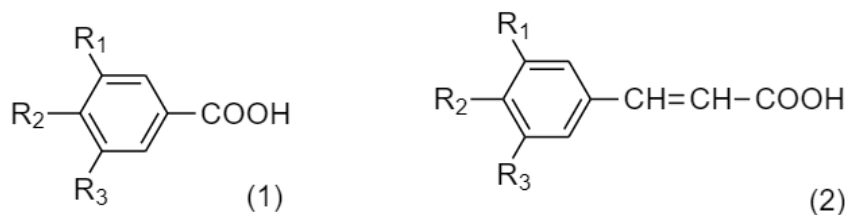
Diferenças na estrutura genérica do anel heterocíclico classifica-os como flavonóis, flavonas, flavanóis (catequinas), flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides. Flavonóis (quercetina, kaempferol e miricetina), flavonas (luteolina e apigenina), flavonóis (catequina, epicatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina e galato de epigallocatequina), flavanonas (naringenina), antocianinas e isoflavonóides (genisteína) são flavonoides comuns da dieta (LIU, 2004). As antocianinas dão as cores vermelha e azul a algumas frutas e legumes (LIU, 2004).

A ingestão humana de todos os flavonoides é estimada em algumas centenas de miligramas (HOLLMAN & KATAN, 1999) a 650 mg dia⁻¹ (KUHNAU, 1976).

2.5.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos podem ser subdivididos em dois grupos principais, ácido hidroxibenzoico e ácidos hidroxicinâmicos, conforme Figura 10.

Figura 10: Estrutura genérica do ácido benzóico (1) e ácido cinâmico (2)



Fonte: Autoria própria (2021)

Derivados do ácido hidroxibenzóico incluem os ácidos *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico, siríngico e gálico. Estão comumente presentes encadeados, sob a forma de polímeros e são normalmente um componente de uma estrutura complexa como ligninas e taninos hidrolisáveis. Também podem ser encontrados na forma de derivados de açúcar e ácidos orgânicos em alimentos vegetais (LIU, 2004).

Derivados do ácido hidroxicinâmico incluem os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico. Estão principalmente presentes na forma ligada a componentes estruturais da parede celular, como celulose, lignina e proteínas por meio de ligações éster. O ácido ferúlico ocorre principalmente nas sementes e folhas das plantas, principalmente covalentemente conjugado os mono- e dissacarídeos, polissacarídeos da parede celular vegetal, glicoproteínas, poliaminas, ligninas e biopolímeros de carboidratos insolúveis (LIU, 2004).

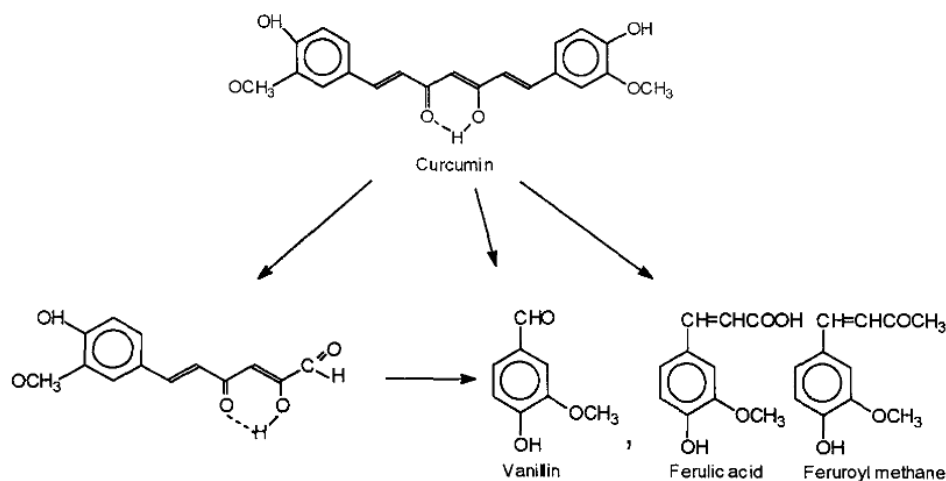
Dentre os ácidos fenólicos, pode-se destacar a curcumina que também é um derivado importante dos ácidos hidroxicinâmicos presentes nas plantas. A curcumina é composta por dois ácidos ferúlicos ligados por um metileno em uma estrutura dicetona, é o principal pigmento amarelo da mostarda (LIU, 2004), além de ser o principal composto ativo presente no açafrão-da-terra.

2.5.2.1 Curcumina

Conforme apresentado anteriormente, a curcumina pertence ao grupo fitoquímico dos ácidos fenólicos e é constituinte predominante do açafrão-da-terra. É relativamente insolúvel em água, mas se dissolve em acetona, dimetilsulfóxido e etanol. É instável em pH básico e degrada dentro de 30 minutos, tendo como principal produto de degradação o *trans*-6-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2,4-dioxo-5-hexenal, além do ácido ferúlico, feruloilmetano e vanilina (LIN, PAN & LIN-SHIAU, 2000) (Figura 11).

Em condições ácidas a degradação da curcumina é muito mais lenta, com menos de 20% do total de curcumina se decompondo em 1h (WANG *et al.*, 1997).

Figura 11: Estruturas química de produtos obtidos da degradação da curcumina em 0,1M tampão fosfato, pH 7,2 a 37°C



Fonte: Wang *et al.* (1997)

As amostras de curcumina devem ser protegidas da luz por apresentarem fotossensibilidade (SHARMA, GESCHER & STEWARD, 2005). Acima de pH 7, a tonalidade da curcumina é menos amarela e mais vermelha. A curcumina tem uma massa molar de $368,37 \text{ g mol}^{-1}$ e um ponto de fusão de $183 \text{ }^\circ\text{C}$. Na investigação espectrofotométrica ultravioleta visível, a absorção máxima de luz da curcumina ocorre a 420 nm (SHARMA, GESCHER & STEWARD, 2005).

Com relação à farmacocinética da curcumina, exibe baixa biodisponibilidade oral em roedores, e pode sofrer metabolismo intestinal; a curcumina absorvida sofre um metabolismo de primeira passagem e excreção na bile (SHARMA, GESCHER & STEWARD, 2005).

Nos últimos 10 - 15 anos a curcumina vem sendo utilizada de maneira intensiva na área científica em ensaios clínicos nos níveis de fase I e II (BAR-SELA, EPELBAUM & SCHAFFER, 2009). Os ensaios clínicos de fase I demonstraram que a curcumina é segura, mesmo em altas doses (12 g dia^{-1}) em humanos, porém exibe baixa biodisponibilidade e sofre rápida degradação em pH fisiológico (ANAND *et al.*, 2007), resultando em baixa biodisponibilidade sistêmica, farmacocinética pobre e eficácia *in vivo* prejudicada (BISHT *et al.*, 2007).

A curcumina é usada na medicina alternativa para o tratamento de doenças

comuns, como dores no estômago, flatulência, icterícia, artrite, feridas e infecções na pele, entre outras (BAR-SELA, EPELBAUM & SCHAFFER, 2009). Além de seus efeitos benéficos para alergia, asma, aterosclerose, doença cardíaca, doença de *Alzheimer*, diabetes (BAR-SELA, EPELBAUM & SCHAFFER, 2009), anti-inflamatória, antioxidante, quimiopreventiva e quimioterápica (HATCHER *et al.*, 2008; YALLAPU, JAGGI & CHAUHAN, 2010), anti vírus da imunodeficiência humana, antimicrobiano, antiparasitário (BAR-SELA, EPELBAUM & SCHAFFER, 2009).

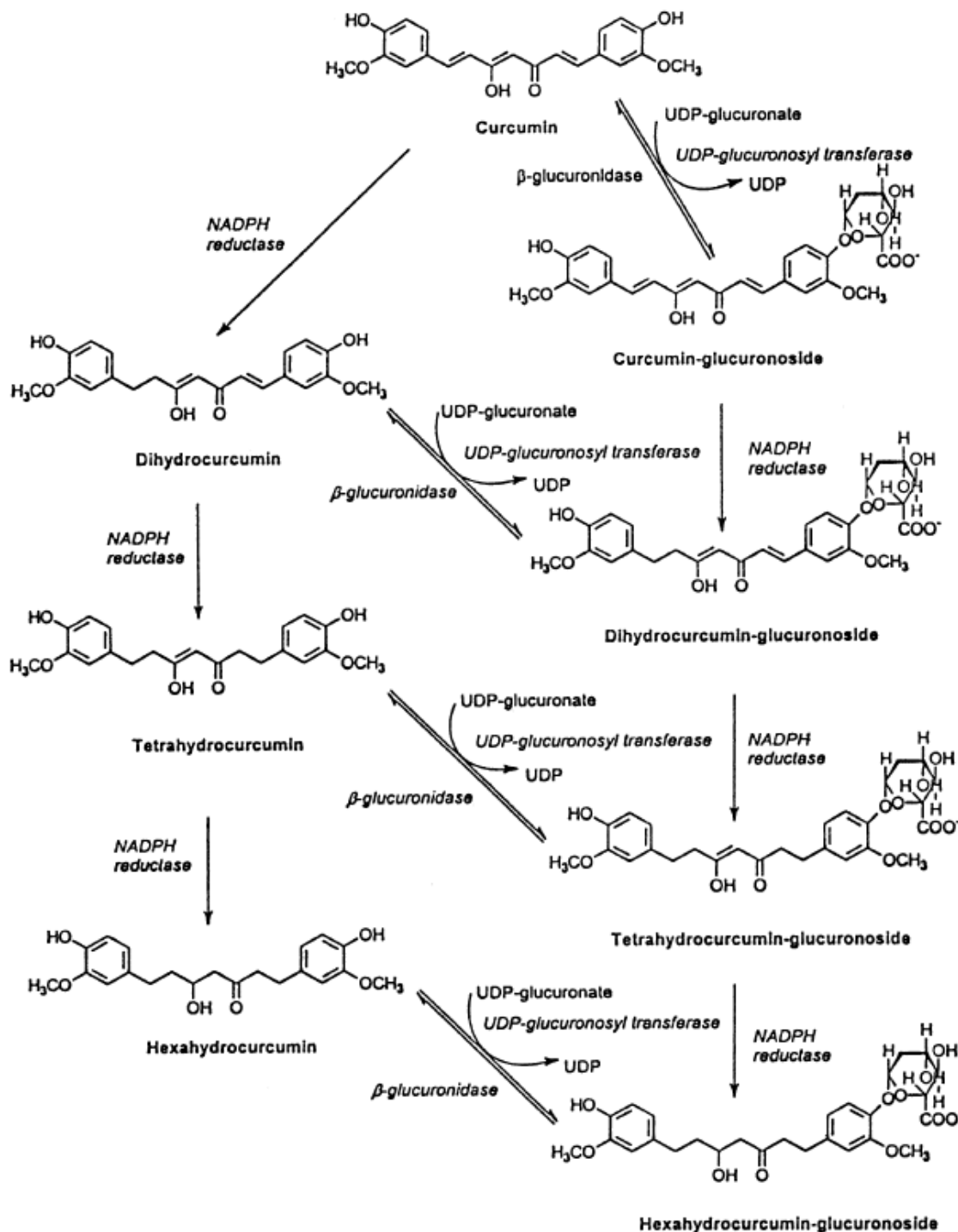
Estudos vêm sendo conduzidos a fim de investigar os efeitos de nano cápsulas lipídicas carregadas com curcumina em doença de *Alzheimer*. Os ratos foram submetidos a injeção de estreptozotocina intracerebroventricular (STZ-icv) e posterior tratamento com curcumina. Após testes comportamentais e retirada do córtex pré-frontal foi observado a capacidade da curcumina em inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e melhorar a memória que havia ficado prejudicada. A injeção de STZ-icv provoca um aumento na atividade da AChE e pode estar envolvido no prejuízo da memória (SAVALL *et al.*, 2020).

Houve estudos também para mieloma múltiplo, artrite reumatoide, fibrose cística, doença inflamatória intestinal, psoríase e outras (CHANG *et al.*, 2017; HARTONO *et al.*, 2016). Este efeito mais generalizado pode ser devido à sua capacidade de modular o sistema imunológico (AGGARWAL & HARIKUMAR, 2009).

Além da potente capacidade antioxidante da curcumina em níveis neutros e pH ácido (SHARMA, GESCHER & STEWARD, 2005), as atividades pleiotrópicas da curcumina derivam de sua química complexa, bem como sua capacidade de influenciar várias vias de sinalização, vias cito protetoras e vias metastáticas e angiogênicas. A curcumina possui atividade antioxidante, elimina radicais livres e doa hidrogênio e também funciona como quelante de ferro, ligando-se a alguns metais como o ferro e o cobre (HATCHER *et al.*, 2008)

A Figura 12 apresenta duas vias de biotransformações principais da curcumina em camundongos: redução e glicuronidação da curcumina. Os resultados preliminares indicam que o NADH é necessário para a reação de redução, enquanto a natureza redutase é desconhecida. Além disso, a maioria dos derivados conjugados são hidrolisados por β -glucosidase e identificados como glucuronídeos no plasma do camundongo.

Figura 12: Biotransformações da curcumina em camundongos



Fonte: Lin, Pan & Lin-Shiau (2000)

A curcumina não é tóxica e exibe biodisponibilidade limitada (HATCHER *et al.*, 2008). Os principais fatores que contribuem para os baixos valores teciduais no plasma, parecem ser devido à má absorção e metabolismo de eliminação rápido (ANAND *et al.*, 2007). A fim de melhorar os desafios que envolvem a sua utilização,

como hidrofobicidade, menor utilização oral (HU *et al.*, 2015) e estabilidade em ambientes específicos, tem-se desenvolvido sistemas de liberação de fármacos, de modo que a curcumina esteja encapsulada.

2.6 Sistemas nanoparticulados

As nanopartículas são utilizadas como uma melhor alternativa de sistemas para administração terapêutica de maneira mais eficaz e controlada *in vivo*, promovendo então uma liberação controlada, direcionada e protegida dos compostos bioativos a nível celular e subcelular (PALIWAL & PALAKURTHI, 2014).

Um dos mais interessantes exemplos de nanotecnologia no mundo antigo foi o uso pelos romanos no século IV d.C.: a taça de Lycurgus, da coleção do Museu Britânico, representa uma das mais destacadas conquistas da antiga indústria do vidro. É o mais antigo exemplo famoso de vidro dicróico. O vidro dicróico descreve dois tipos diferentes de vidro que mudam de cor em determinados condições de iluminação (BAYDA *et al.*, 2020). Houve um progresso na nanotecnologia desde as primeiras ideias de Feynman até 1981, quando os físicos Gerd Binnig e Heinrich Rohrer inventaram um novo tipo de microscópio no Laboratório de Pesquisa da IBM em Zurique, o *Scanning Tunneling Microscope* (STM) (BINNIG & ROHRER, 1985; BINNIG, QUATE & GERBER, 1986). Em 1986, Binnig e Rohrer receberam o prêmio Nobel de Física pelo projeto do STM. Esta invenção levou ao desenvolvimento do microscópio de força atômica (AFM) e microscópio de sonda de varredura (SPM), que são instrumentos importantes para pesquisadores na área de nanotecnologia (BINNIG & ROHRER, 1985; BINNIG, QUATE & GERBER, 1986).

Ao mesmo tempo, em 1985, Robert Curl, Harold Kroto e Richard Smalley descobriram que o carbono também pode existir na forma de esferas muito estáveis, os fulerenos (KROTO *et al.*, 1985). Os nanotubos de carbono são usados como fibras compostas em polímeros e `beton` para melhorar as propriedades mecânicas, térmicas e elétricas do produto. Também tem aplicações potenciais como emissores de campo, materiais de armazenamento de energia, catálise e componentes eletrônicos moleculares (BAYDA *et al.*, 2020).

Em 2004, uma nova classe de nano materiais de carbono chamados pontos de carbono (pontos C) com tamanho abaixo de 10 nm foi descoberta acidentalmente por Xu *et al.* durante a purificação de nanotubos de carbono de parede única (XU *et al.*,

2004). Nesse ínterim, a ciência progrediu em outros campos como na computação, na biologia e na engenharia (BAYDA *et al.*, 2020).

No início do século XXI, houve um aumento do interesse nos campos da nanociência e nanotecnologia. Nos EUA foi criada a Lei de Pesquisa e Desenvolvimento do século XXI o que tornou a pesquisa em nanotecnologia uma prioridade nacional e criou a National Technology Initiative (NNI) (BAYDA *et al.*, 2020). No Brasil, em 2021, foi aprovada a Rede Nacional de Nanobiotecnologia pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCT) (NANOBIOTEC, UNICAMP).

Uma série de estudos destaca o enorme potencial que as nanotecnologias desempenham na biomedicina para o diagnóstico e terapia de muitas doenças humanas (KINNEAR *et al.*, 2017). São utilizadas em muitas áreas relacionadas à biologia, como diagnóstico, imagens moleculares (BAYDA *et al.*, 2020); relacionado à “nano fármacos”, como nano materiais para entrega de drogas; medicina regenerativa; nanopartículas com atividades antibacterianas ou nanoestruturas funcionais para detecção de biomarcadores, oferecendo excelentes resultados (BAYDA *et al.*, 2020; WEISSIG *et al.*, 2014).

Uma das aplicações mais importantes da nanotecnologia na biologia molecular tem sido relacionada à veiculação de ácidos nucleicos (BAYDA *et al.*, 2020). Um exemplo são as vacinas da Pfizer-BioNTech e da Moderna desenvolvidas em resposta à pandemia do Corona vírus. São as primeiras vacinas de plataforma de RNA mensageiro aprovadas para uso humano e que envolvem um ácido nucleico (NISHIOKA, 2021).

Progressos importantes também foram feitos no campo da nano oncologia, melhorando a eficácia das drogas quimioterápicas tradicionais para uma grande quantidade de cânceres humanos agressivos (LEE & WONG, 2011; YUAN *et al.*, 2019). As nanopartículas atingem o local do tumor levando à terapia necessária. Assim, comprova-se que podem ser empregados sozinhos ou para entrega de moléculas terapêuticas para processos biológicos essenciais, como autofagia, metabolismo ou estresse oxidativo, exercendo atividade anticâncer (CORDANI & SOMOZA, 2019), permitindo a melhoria das taxas de resposta do tumor, além de uma significativa redução da toxicidade sistêmica associada aos atuais tratamentos de quimioterapia (BAYDA *et al.*, 2020).

A encapsulação pode isolar o material incorporado do ambiente externo,

efetivamente minimizando ou mitigando a reação entre substâncias bioativas e fatores ambientais, resultando em sustentabilidade na liberação, estabilidade e biodisponibilidade de substâncias bioativas (ZHANG *et al.*, 2020). A estabilidade, permeabilidade e eficiência de incorporação da encapsulação dependem principalmente dos tipos de materiais de parede (NORKAEW *et al.*, 2019).

Um dos fatores que limita a expansão dos medicamentos produzidos em escala nanométrica tem sido o alto custo dos materiais e processos para sua produção (WEISSMUELLER *et al.*, 2016).

O desenvolvimento da nanotecnologia rendeu uma variedade de novos materiais em nano escala, incluindo metal, óxido de metal, semicondutor e nano materiais poliméricos com uma ampla gama de aplicações em áreas como medicina, catálise, eletrônica e conversão de energia e armazenamento (BHANA, WANG & HUANG, 2015). São amplamente divididos em várias categorias, dependendo de sua morfologia, tamanho e propriedade químicas (KHAN, SAEED & KHAN, 2019). O interesse pelos nano materiais/nanopartículas é baseado em suas propriedades estruturais e funcionais excepcionais que são tipicamente diferentes dos materiais a granel ou das moléculas discretas devido aos efeitos da nano escala (ZHANG & KING, 2017).

Abaixo uma breve descrição das vesículas lipídicas e das nanopartículas poliméricas que são uma das mais utilizadas.

2.6.1 Vesículas lipídicas

Os lipossomas são vesículas esféricas que foram descobertas na década de 60 por Bangham; desde então foram extensivamente estudados como potenciais portadores de drogas. São compostas principalmente de fosfolipídios, que formam pelo menos uma bicamada lipídica concêntrica e um núcleo aquoso dentro das bicamadas que encapsulam substâncias hidrofílicas. A membrana dos lipossomas é composta por lipídios naturais e/ou sintéticos que, devido às suas propriedades únicas de estrutura em bicamada são usados como transportadores para moléculas lipofílicas e solúveis em água. Os fosfolipídios se agrupam em conchas polares em soluções aquosas devido à hidrofobicidade das cadeias de acila quando cercadas por um meio aquoso (LAOUINI *et al.*, 2012).

Seu tamanho subcelular permite uma captação intracelular relativamente maior do que outros sistemas particulados; melhorando a biodisponibilidade do medicamento *in vivo*. Outras vantagens dos lipossomas incluem alta eficiência de encapsulação apesar da solubilidade do medicamento, baixa toxicidade devido ao teor de fosfolipídios, proteção de drogas contra degradação de fatores como pH e luz e a redução da irritação do tecido (LAOUINI *et al.*, 2012).

Os lipossomas têm atrativas propriedades biológicas ativas, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade e não imunogenicidade. Eles se mostram promissores como vetores ativos devido à sua capacidade de melhorar o desempenho do encapsulante, aumentando a solubilidade e a estabilidade do fármaco, entrega de drogas encapsuladas a locais-alvo específicos e fornece liberação sustentada de drogas (LIAN & HO, 2001). Devido à sua variabilidade de composição e propriedades estruturais, os lipossomas são extremamente versáteis levando a um grande número de aplicações desde a entrega de medicamentos e genes até o diagnóstico, cosméticos, anticoncepcionais imunológicos de longa duração, indústria alimentar e química (BANERJEE, 2001; KELLER, 2001; KULKARNI, PRABHAKAR & SHENDE, 2022; LAOUINI *et al.*, 2012; LIAN & HO, 2001).

As nanopartículas lipídicas representam um dos sistemas de entrega de fármacos mais otimizados e caracterizados que têm mostrado perfis de circulação sanguínea estendidos (WANG *et al.*, 2015). Foram aprovados por autoridades regulatórias e muitos medicamentos lipossomais estão em desenvolvimento pré-clínico ou em ensaios clínicos (MAURER, FENSKE & CULLIS, 2001).

2.6.2 Nanopartículas poliméricas

Os polímeros constituíram os primeiros sistemas de liberação de fármacos introduzidos na década de 1970 (PEPPAS, 2013). Têm sido usados com frequência como veículos de liberação de fármacos devido à sua grande biodisponibilidade, sem causar quaisquer efeitos colaterais graves, melhor encapsulação, controle de liberação e propriedades menos tóxicas (KUMARI, YADAV & YADAV, 2010), além de serem biocompatíveis, biodegradáveis, possuem alto valor nutricional, fontes renováveis abundantes e capacidade de ligação extraordinária a vários medicamentos (ELZOGHBY, SAMY & ELGINDY, 2012b).

As proteínas apresentam menor possibilidade de opsonização pelo sistema

retículo endotelial (RES) através de uma barreira estérica aquosa, ou seja, menor possibilidade de serem ativadas e causarem a ruptura da membrana de organismos invasores, além de suas excelentes propriedades funcionais incluindo emulsificação, gelificação, formação de espuma e capacidade de ligação com a água (CHEN, REMONDETTO & SUBIRADE, 2006; ELZOGHBY, SAMY & ELGINDY, 2012a). Além disso, as nanopartículas de proteínas podem ser facilmente preparadas (ELZOGHBY, SAMY & ELGINDY, 2012a).

Devido a vários grupos funcionais nas sequências primárias de polipeptídios, as nanopartículas de proteínas podem ser exploradas para criar diferentes interações com compostos terapêuticos e, posteriormente, formar redes tridimensionais que oferecem uma variedade de possibilidades reversíveis de ligação de moléculas ativas, protegendo-as em uma matriz bem como dando um direcionamento específico para o local de ação (ELZOGHBY, ABO EL-FOTOH & ELGINDY, 2011; ELZOGHBY, SAMY & ELGINDY, 2012a). As nanopartículas de proteína são naturalmente metabolizáveis. Elas são hidrolisadas por enzimas digestivas e geram peptídeos bioativos que podem exercer uma série de efeitos *in vivo* (CHEN, REMONDETTO & SUBIRADE, 2006).

As proteínas utilizadas podem ser tanto de origem animal, como: gelatina, colágeno, albumina, proteínas do leite (caseína), elastina, quanto de origem vegetal, como: gliadina, proteínas da soja e zeína. A proteína de origem vegetal zeína será nosso objeto de estudo.

2.6.2.1 Nanopartículas de zeína

Proteínas de origem vegetal representam uma nova abordagem no desenvolvimento de sistemas de entrega de drogas (GALI *et al.*, 2021). Entre essas proteínas, a zeína, proveniente do milho, tem sido amplamente utilizada para preparar nanopartículas para entrega de compostos bioativos em alimentos e preparações farmacêuticas (CHEN *et al.*, 2019).

O cereal milho tem sua origem nas Américas, entre o sudoeste dos Estados Unidos e América Central e é consumido em todas as regiões do mundo. Sua produção está estimada (safra 2019/2020) em 1,102 bilhão de toneladas (CROPLIFE BRASIL, 2020).

No entanto, ele é considerado de baixa qualidade por ser deficiente em dois aminoácidos - lisina e triptofano, essenciais na alimentação humana, pois tanto o

homem quanto outros monogástricos – suínos, aves e camundongos – não conseguem sintetizá-los, tendo que obtê-los diretamente pela alimentação (SILVA *et al.*, 2007). Por isso, cerca de 70% de sua produção mundial é utilizado na alimentação animal; no Brasil, essa porcentagem varia entre 60 e 80%, dependendo do ano e apenas 15% destina-se ao consumo humano (PAES, 2006).

A zeína (CAS Reg. Nº. 9010-66-6) é um dos polímeros naturais mais amplamente usados e é responsável por 45-50% da proteína do milho (LUO & WANG, 2014). Presente predominantemente no endosperma dos grãos de milho e pertencente ao grupo das prolaminas, tem sido o foco da pesquisa atual sobre o encapsulamento de compostos bioativos (LIU *et al.*, 2019).

De acordo com o FDA (Food and Drug Administration) a pureza da zeína deve ser adequada ao uso a que se destina e como ingrediente, em alimentos, não tem nenhuma limitação além das atuais boas práticas de fabricação. É considerada “GRAS” (geralmente reconhecido como seguro) e ingrediente de qualidade alimentar pelo FDA (ELZOGHBY, SAMY & ELGINDY, 2012b; PALIWAL & PALAKURTHI, 2014).

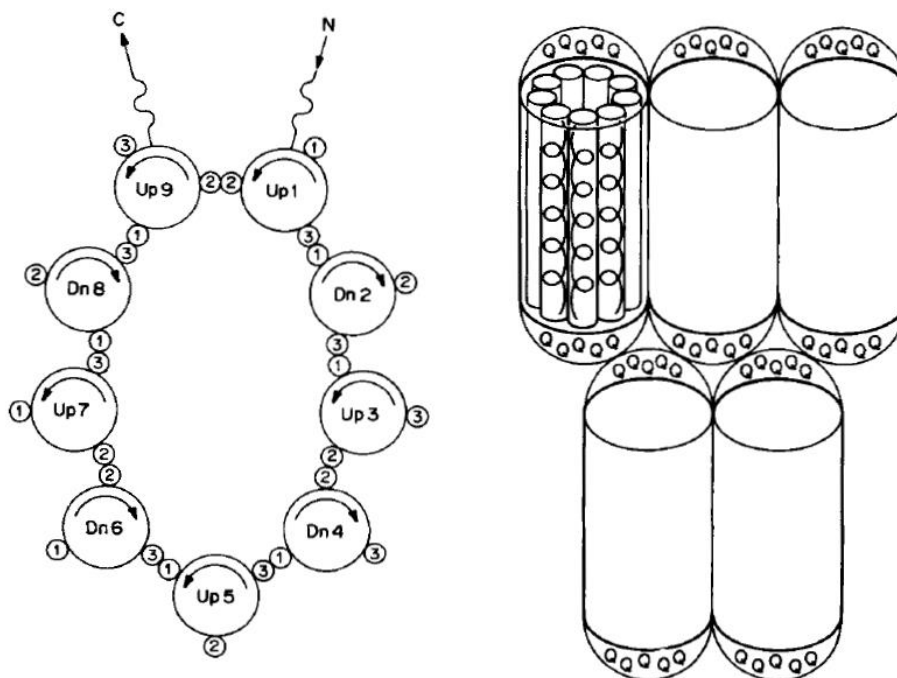
A zeína é constituída por 17 aminoácidos e apresenta um peso molecular de cerca de 40 kDa. Devido ao grande número de resíduos de aminoácidos sem carga, a zeína é insolúvel em água e solúvel em álcool, acetona e acetil acetona (LAI & GUO, 2011). A zeína contém 75% de resíduos aminoácidos lipofílicos e 25% de aminoácidos hidrofílicos (PRASANNA *et al.*, 2015).

A zeína é uma mistura de pelo menos quatro tipos de proteínas: alfa, beta, gama e delta zeína, cada uma com uma sequência de aminoácidos, peso molecular e solubilidade diferentes (ZHONG & JIN, 2009). A alfa zeína (19 kDa e 22 kDa) é rica em aminoácidos hidrofóbicos (alanina, leucina e prolina); a beta zeína (16 kDa e 14 kDa) e a delta zeína (10 kDa) possui alta quantidade de aminoácidos sulfurados, portanto com perfil de solubilidade semelhante e a gama zeína (27 kDa) contém resíduos de prolina (LARKINS, CRAIG & WALLACE, 1993). A tipo alfa hélices é responsável por aproximadamente 35-60% da estrutura secundária da zeína e é o tipo disponível comercialmente (CABRA *et al.*, 2006; PALIWAL & PALAKURTHI, 2014).

A Figura 13 mostra um possível modelo da proteína zeína. (a) Os pequenos círculos são segmentos de resíduo polar de ligação de hidrogênio. As nove hélices unidas em figura plana, sendo “up” a direção do término NH₂ para COOH da cadeia dos aminoácidos, enquanto “Dn” indica a direção oposta. (b) Arranjo das proteínas através do empilhamento dos planos por interações de resíduos de glutamina

(ARGOS *et al.*, 1982).

Figura 13: Possível modelo estrutural da proteína zeína



Fonte: Argos *et al.* (1982)

O processo de produção da zeína comercialmente disponível é feito da seguinte maneira: separação da farinha de glúten de milho, um coproduto da moagem úmida de milho (ZHONG & JIN, 2009), com álcool isopropílico aquoso alcalino contendo hidróxido de sódio. O extrato é então resfriado, fazendo com que a zeína precipite (CFR - Code of Federal Regulations Title 21).

Para a produção das nanopartículas de zeína, existem muitas metodologias descritas na literatura usadas para carregamento com diferentes compostos bioativos incluindo nano precipitação, dispersão líquido-líquido, separação de fases e eletro pulverização (PASCOLI, LIMA & FRACETO, 2018).

A técnica de nano precipitação antissolvente para a síntese de nanopartículas tem sido amplamente descrita na literatura e baseia-se nas diferenças de solubilidade de uma proteína em diferentes solventes, em função do pH, força iônica e eletrólitos. O método envolve a adição de um não solvente a uma solução para induzir a supersaturação, levando à precipitação do soluto e à formação de nanopartículas. É importante selecionar um solvente e um antissolvente adequados, considerando sua miscibilidade na faixa de concentração em que serão utilizados (LI *et al.*, 2013).

Nesta metodologia, as nanopartículas formadas são dependentes da taxa de injeção da fase orgânica na fase aquosa, da velocidade de agitação e da razão de volume. Não há necessidade de um emulsificante para a formação de partículas, embora sua natureza e concentração possam influenciar o tamanho das nanopartículas (RAO & GECKELER, 2011).

Luis *et al.* (2020), utilizou o método de precipitação antissolvente para preparar os sistemas e encontrou resultados de alta eficiência de encapsulação (>90%) para agentes ativos, indicando boa interação com a matriz de proteína (LUIS *et al.*, 2020).

Mais da metade dos aminoácidos hidrofóbicos estão presentes na zeína, permitindo que menos proteínas presentes na natureza sejam dissolvidas em uma fração de volume específico da solução de etanol (60-90%), no entanto eles são insolúveis em água (DONG, PADUA & WANG, 2013). Devido a essa característica de hidrofobicidade, associada com uma alta proporção de aminoácidos catiônicos, ele é solúvel em solventes binários contendo álcool que podem ser explorados para a preparação de nanopartículas (HU & MCCLEMENTS, 2015).

O interesse científico na zeína deve-se, entre outros, à sua capacidade para formar filmes biodegradáveis, flexíveis, de baixo custo e resistentes revestimentos hidrofóbicos, que fornecem proteção contra ataques microbianos, indicando sua eficácia para a produção de micro/nanopartículas usadas como sistemas de entrega de nutrientes e drogas (LUO & WANG, 2014; SHUKLA & CHERYAN, 2001).

É um biomaterial utilizado em aplicações industriais, como na agricultura, na cosmética, na de embalagens e na indústria farmacêutica (PALIWAL & PALAKURTHI, 2014). Por ser uma proteína natural, natureza hidrofílica e lipofílica, biocompatível (SONG *et al.*, 2022) e biodegradável, além de ser econômica, atua como um agente encapsulante eficaz e está sendo de grande interesse para uso humano (PALIWAL & PALAKURTHI, 2014). A zeína apresenta baixos valores de absorção de água, alta resistência térmica e boas propriedades mecânicas (ZHONG & JIN, 2009).

Os nano carreadores de zeína são produzidos por um processo instantâneo de encapsulamento; este processo é contínuo, escalonável e de baixo custo, permitindo a encapsulação de composto muito hidrofóbicos e a produção de nano carreadores com uma distribuição de tamanho estreita (WEISSMUELLER *et al.*, 2016).

A estrutura de polímero anfifílico da zeína permite que ela apresente pequenos glóbulos com diâmetros entre 150 e 550 nm em solução aquosa de etanol. A molécula tem forma de um tijolo e, assim, permite que ela transporte outras moléculas dentro

dela (ELZOGHBY, SAMY & ELGINDY, 2012b; LAI & GUO, 2011). Um exemplo é o medicamento digitálico “gitoxina”, em que a zeína promoveu o encapsulamento e liberação sustentada do ativo (ZHONG & JIN, 2009).

A zeína tem um alto ponto isoelétrico ($pI = 6$) o que resulta em uma tendência a agregar cadeias de proteínas em formulações com pH neutro/ básico (PATEL *et al.*, 2012). Por esse motivo são utilizados comumente agentes estabilizadores nas nanopartículas de zeína.

Estudos demonstram que nanopartículas de zeína estabilizadas com caseinato de sódio e alginato de sódio apresentam uma melhora na solubilidade em água, estabilidade fotoquímica e atividade antioxidante (LIU *et al.*, 2019). Os estabilizadores levam a um aumento gradual no tamanho da nanopartícula e uma diminuição na hidrofobicidade da superfície (LIU *et al.*, 2020). Os testes reológicos mostram que os materiais de revestimento levam a um aumento na viscosidade aparente das nanopartículas. E a análise de estabilidade indica que os revestimentos apresentam ótima estabilidade de pH, solução de sal e armazenamento e ótimas características de digestão de fluidos antigastrointestinais, prevenindo a desintegração da nanopartícula devido à forte repulsão eletrostática e estérica, quando comparados com nanopartículas de proteína pura (LIU *et al.*, 2020).

Estudos realizados por Luis *et al.* (2020), mostraram estabilidade variável para as formulações das nanopartículas ao longo do tempo analisado (90 dias). Formulações contendo compostos botânicos apresentaram maior estabilidade em relação às nanopartículas controle. As nanopartículas protegeram os compostos ativos da degradação durante o armazenamento. Concluíram também que a utilização da tecnologia em nanopartículas reduz a quantidade dos agentes ativos e melhora a estabilidade dos compostos naturais (LUIS *et al.*, 2020).

Apesar de apresentar características de muco adesividade e capacidade de se sustentar no ambiente gástrico, a zeína é muito sensível à degradação enzimática no aparelho digestivo devido à rápida liberação de compostos bioativos hidrofóbicos no estômago (ELZOGHBY, SAMY & ELGINDY, 2012b). Pesquisas recentes tem acrescentado um revestimento de biopolímero nas nanopartículas de zeína, como quitosana, a fim de melhorar a resistência ao pH ácido, além da carga positiva da quitosana que permite interação eletrostática com a carga negativa do ácido siálico presente na mucina, componente do muco intestinal (PAULUK *et al.*, 2019).

Lai & Guo (2011), demonstraram um direcionamento eficiente de nanopartículas

de zeína, carregadas com 5-fluorouracil para o fígado, quando injetadas intravenosa, permanecendo na corrente sanguínea por pelo menos 24 horas (LAI & GUO, 2011). Outro estudo, com nanopartículas de zeína carregadas com doxorubicina, mostrou a liberação do fármaco por 4 dias em células de mama resistentes à doxorubicina. Assim, o nano encapsulamento em partículas de zeína pode ser considerado um sistema eficaz de entrega para a quimioterapia do câncer (DONG *et al.*, 2016).

A nano encapsulação melhora a solubilidade em água da curcumina, fazendo com que sua estrutura cristalina mude para um estado amorfo. Existe relatos na literatura que indica que a curcumina se liga à zeína por meio de ligações de hidrogênio (LIU *et al.*, 2020).

2.6.2.2 Caseinato de sódio

O caseinato de sódio, uma mistura de várias caseínas diferentes (α_1 , α_2 , β e κ) é uma proteína do leite solúvel em água (50 mg mL^{-1}). As caseínas tensoativas contêm substâncias hidrofílicas e grupos hidrofóbicos em várias sequências e proporções. Atua como um emulsificante e estabilizador natural devido à combinação de estabilização eletrostática e estérica para preparar nanopartículas de zeína redispersíveis em água na faixa de 100 a 200 nm (DICKINSON, 1997; LUO, TENG & WANG, 2012; PATEL, BOUWENS & VELIKOV, 2010). O caseinato de sódio é natural, não é tóxico, tem sabor suave e amplamente disponível (MCCLEMENTS, 2012).

É GRAS e classificado como ingrediente de grau alimentício pela FDA (LI *et al.*, 2013).

Como um surfactante altamente eficaz, o caseinato de sódio não só pode melhorar a solubilidade em água das nanopartículas de zeína, mas também pode impedir que as nanopartículas de zeína se agreguem e precipitem em solução de pH quase neutro e em ambientes de alta força iônica. Em muitos trabalhos vem sendo realizado um duplo revestimento em nanopartículas de zeína, devido ao fato de que a zeína e o caseinato de sódio são muito sensíveis à pepsina e pancreatina nos fluidos digestivos e com isso a curcumina é rapidamente liberada das nanopartículas desintegradas no trato digestivo (LIU *et al.*, 2019; PATEL, BOUWENS & VELIKOV, 2010; PATEL *et al.*, 2012).

Li *et al.* (2013) fabricaram filmes antimicrobianos à base de nanopartículas de zeína revestidas com caseinato de sódio como estabilizador. Os resultados mostraram

que o caseinato foi capaz de melhorar a estabilidade do sistema coloidal e evitar a floculação durante a formação do filme (LI *et al.*, 2013).

2.6.2.3 Quitosana

A quitosana é um mucopolissacarídeo derivado da natureza, intimamente relacionado à celulose com grupo anacetilamino no lugar de um grupo hidroxila na posição C-2. É obtida por desacetilação da quitina, um dos principais componentes dos exoesqueletos de insetos, crustáceos (como camarões) e paredes celulares de fungos. A quitina é um polímero de β -(1,4) -N-acetil-D-glucosamina que a partir da desacetilação, em um ambiente alcalino, produz a quitosana, um polímero com unidades de N-acetilglucosamina e D-glucosamina (GARG *et al.*, 2019).

A presença do grupo amino na posição C-2 da unidade de glucosamina fortalece as propriedades funcionais e estruturais da quitosana. Este grupo amino representa sua natureza catiônica em meio ácido e confere propriedades inerentes de cicatrização de feridas, atividade antimicrobiana e, mais importante, mucoadesividade, tornando-o um bom material carreador em sistemas de liberação de fármacos. Tem um pKa de 6,5, é insolúvel em água, mas solúvel em soluções ácidas. É de natureza protonada e policatiônica e forma complexos com diversos ânions como lipídeos, proteínas, DNA, alginato, pectina e poli (ácido acrílico), sendo degradada por enzimas como lisozimas, algumas lipases e proteases (GARG *et al.*, 2019).

As propriedades físico-mecânicas (solubilidade, toxicidade, hidrofobicidade) da quitosana dependem do grau de desacetilação e do peso molecular da quitosana, dependendo da fonte de quitina (BELLICH *et al.*, 2016; ROY *et al.*, 2018). A atratividade da quitosana está no fato de ser biodegradável, biocompatível, simples, estável, não tóxica e um polímero intensamente pesquisado considerando a magnitude dos papéis disponíveis na funcionalização e aplicações da quitosana em diversos setores. Derivados seletivos de quitosana O-modificados são obtidos usando ácidos como H_2SO_4 ou $MeSO_3H$. O ácido protona o grupo amina deixando o grupo hidroxila livre para sofrer a reação e derivados N-modificados são obtidos protegendo o grupo funcional hidroxila (RIZEQ *et al.*, 2019).

A quitosana pode interagir eletrostaticamente com o muco ou superfícies celulares carregadas negativamente. Esta qualidade proporciona um maior tempo de

contato dos ativos através da membrana da célula e beneficia a absorção celular, prolongando o tempo de residência dos sistemas de entrega nos locais de absorção e tem a capacidade de abrir as junções herméticas das membranas celulares (MA *et al.*, 2018; ROLDO *et al.*, 2004).

A deposição eletrostática camada por camada de polieletrólitos em superfícies de cargas opostas foi relatado para efetivamente gerar emulsões de óleo em água com revestimentos multicomponentes interfaciais (CALERO *et al.*, 2013; MUN, DECKER & MCCLEMENTS, 2006). As interfaces de dupla camada formadas relativamente espessas e altamente carregadas podem aumentar a repulsão eletrostática e estérica entre as gotículas da emulsão, o que pode aumentar a estabilidade das partículas contra as tensões ambientais (ZHANG *et al.*, 2014).

De posse das informações obtidas, no presente trabalho foi realizada a dupla deposição eletrostática das nanopartículas de zeínas com caseinato de sódio e quitosana a fim de se obter uma melhor funcionalidade e estabilidade das nanopartículas.

2.7 Uso clínico dos antioxidantes naturais

Atualmente, o uso de antioxidantes tem sido proposto para diversas aplicações na área da saúde, principalmente como anticâncer, para prevenção de doenças crônico-degenerativas e prevenção do envelhecimento prematuro.

2.7.1 Anticâncer

Uma área de interesse para o tratamento do câncer ou neoplasias hematológicas são os compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são capazes de reduzir diversas doenças comprovadas por estudos clínicos e pré-clínicos e atuam em vários alvos que agem de forma protetora diferente e mais útil que a terapia anticâncer (KELKEL *et al.*, 2010; NEHA *et al.*, 2019).

Resveratrol e curcumina têm alto potencial para leucemia como agentes quimio preventivos. Kelkel *et al.* (2010) sugeriram que o estresse oxidativo está relacionado com a patogênese da leucemia, especialmente em caso de leucemia recorrente após quimioterapia. Por causa da pobre biodisponibilidade, os pesquisadores sintetizaram

novos derivados de ambos os antioxidantes eficazes em baixa concentração (KELKEL *et al.*, 2010; KON *et al.*, 2020). A curcumina é um importante antioxidante porque atua como potencializador imunológico e bloqueia o estroma para evitar o câncer. Estroma é um tecido conjuntivo vascularizado que forma o tecido nutritivo e de sustentação de um órgão, glândula ou de estruturas patológicas, como um tumor maligno. No entanto, a baixa biodisponibilidade da curcumina devido ao metabolismo e absorção após a administração limita seu uso como agente anticâncer (NEHA *et al.*, 2019).

Asensi *et al.* (2011), discutiram sobre as formulações, sistemas de entrega, combinações de fármacos e alterações estruturais gerais de polifenóis para melhorar a biodisponibilidade e compararam a atividade *in vivo* com a biodisponibilidade e a toxicidade dos compostos. A administração intravenosa de polifenóis é preferível à administração oral para evitar seu metabolismo. Quando tomados por via oral, os polifenóis sofrem conjugação no trato intestinal e se tornam menos absorvíveis. No entanto, o sangue contém enzimas hidrolíticas que liberam polifenóis livres, mas é inadequado para atingir o efeito desejado. A combinação de dois polifenóis e sistema de entrega apropriado aumentaram sua biodisponibilidade (ASENSI *et al.*, 2011).

Gorrini, Harris & Mak (2013) discutiram a cadência do estresse oxidativo como um aspecto central para o desenvolvimento do tumor. ERO promovem a formação de tumor por mutação de DNA, irregularidade no sinal e processo metabólico. Os pesquisadores forneceram um relatório sobre a influência das ERO e do desenvolvimento do tumor de acordo com as terapias anticâncer. O metabolismo do GSH protege as células tumorais e, para isso, os inibidores de GSH são administrados com radioterapia para matar as células anticâncer (GORRINI, HARRIS & MAK, 2013). Uma adaptação comum de estresse oxidativo é mostrada pelos oncogenes e se uma molécula pode alterar tais adaptações, então é o próximo alvo para a descoberta de fármacos (NEHA *et al.*, 2019).

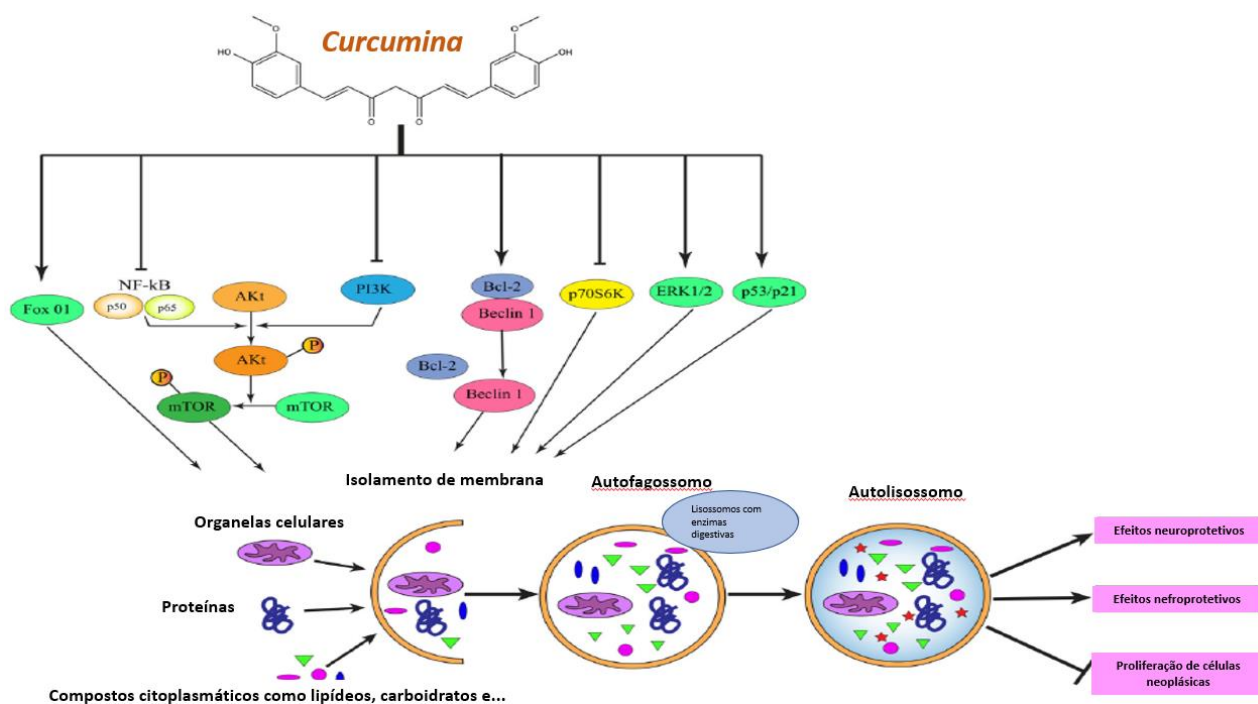
2.7.2 Neuroprotetivo

A autofagia é um processo de degradação celular altamente conservado que envolve a degradação lisossomal para a renovação de proteínas, complexos de proteínas e organelas. Defeitos na autofagia produzem comunicação intercelular prejudicada e, subsequentemente foi demonstrado que estão associados às condições patológicas, incluindo doenças neurodegenerativas, como doença de *Parkinson*,

doença de *Alzheimer* e esclerose lateral amiotrófica (FOROUZANFAR *et al.*, 2020; NEHA *et al.*, 2019).

Há evidências crescentes na literatura de que a curcumina, polifenol encontrado na *Curcuma longa*, apresenta benefícios à saúde e pode modular a autofagia e fornecer efeitos neuroprotetores. Pesquisas demonstraram que a curcumina tem como alvo vários estágios da via de sinalização da autofagia (Figura 15), incluindo LC3-II, mTOR e Beclin-1, para restaurar a função normal autofagia. Foi demonstrado que a curcumina aumenta os níveis de proteínas de Beclin-1 e LC3-II em TCE e lesão de nervo periférico. Por outro lado, a curcumina diminuiu os níveis das proteínas LC3-II e p62 no *diabetes mellitus*. A curcumina melhora a patologia neurodegenerativa da doença de *Parkinson* por meio da regulação negativa da sinalização de mTOR/p10S6K. Por outro lado, aumenta p-Akt e p-mTOR, enquanto diminui os níveis de LC3-II/LC3-I, p-38 e p-p38 no acidente vascular cerebral isquêmico (FOROUZANFAR *et al.*, 2020).

Figura 14: Diagrama esquemático que descreve a via pela qual a curcumina ativa a autofagia. A curcumina ativa a AMPK, que é um ativador de ULK1. ULK1 está diretamente envolvida na ativação da autofagia



Fonte: Adaptado de Forouzanfar *et al.* (2020)

2.8 Câncer

O câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Outros termos usados são tumores malignos e neoplasias. Uma característica definidora do câncer é a rápida criação de células anormais que crescem além de seus limites usuais e que podem então invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos; o último processo é referido como metástase. Metástases generalizadas são a principal causa de morte por câncer (WHO, 2022).

Um diagnóstico correto do câncer é essencial para um tratamento adequado e eficaz, pois cada tipo de câncer requer um regime de tratamento específico. O tratamento geralmente inclui cirurgia, radioterapia e/ou terapia sistêmica (quimioterapia, tratamentos hormonais, terapias biológicas direcionadas). A seleção adequada de um regime de tratamento leva em consideração tanto o câncer quanto o indivíduo que está sendo tratado. A conclusão do protocolo de tratamento em um período de tempo definido é importante para alcançar o resultado terapêutico previsto (WHO, 2020; WHO, 2022).

Alguns dos tipos de câncer mais comuns, como câncer de mama, câncer de colo do útero, câncer oral e câncer colorretal, têm altas probabilidades de cura quando detectados precocemente e tratados de acordo com as melhores práticas. Alguns tipos de câncer, como seminoma testicular e diferentes tipos de leucemia e linfoma em crianças, também apresentam altas taxas de cura se o tratamento adequado for realizado, mesmo quando células cancerígenas estão presentes em outras áreas do corpo (WHO, 2020; WHO, 2022).

O câncer renal é caracterizado pelo desenvolvimento desordenado e acelerado de células tumorais em um dos rins. É o terceiro mais frequente do aparelho genitourinário e representa aproximadamente 3% das doenças malignas do adulto. De acordo com as estatísticas da Organização Mundial da Saúde, um a cada dois casos da doença resultam em óbito. O câncer de rim é também conhecido como hipernefoma ou adenocarcinoma renal. O mais frequente é o câncer renal de células claras, sendo responsável por 85% dos tumores diagnosticados. Geralmente acomete indivíduos entre os 50 e 70 anos de idade, sendo duas vezes mais frequente nos homens que nas mulheres (SBCO, 2022; SÍRIO LIBANÊS, 2022).

Aproximadamente 54% dos tumores renais diagnosticados hoje estão confinados ao rim, 20% são localmente avançados (acometendo gânglios regionais

próximos ao rim) e 25% já apresentam metástases da doença, principalmente os pulmões, fígado e ossos. São conhecidos alguns fatores de risco para o câncer renal, dentre eles: tabagismo, obesidade, hipertensão, histórico familiar da doença, doença de Von Hippel-Lindau e diálise (SÍRIO LIBANÊS, 2022).

A cirurgia/ nefrectomia radical é o único tratamento curativo definitivo para o câncer de rim e consiste na retirada em bloco do rim com seus revestimentos (fascia de gerota), glândula adrenal (somente em grandes tumores ou no polo superior do rim) e linfonodos regionais. Em alguns casos, achados de pequenas massas renais, a nefrectomia parcial é indicada e consiste na retirada do tumor com pequena margem de segurança, preservando-se desta forma o restante do parênquima renal. Um método novo que pode ser aplicado com os mesmos índices de cura da cirurgia aberta é a nefrectomia radical laparoscópica, que apresenta como vantagem o fato de ser menos invasiva, com menor morbidade, menor tempo de internação e vantagem estética, por realizar apenas pequenos furos. Há ainda tratamento que leva à destruição tumoral por meio do congelamento (crioterapia) ou do calor (radiofrequência). Em casos de doença avançada, com metástases à distância, existem formas de tratamento sistêmico com imunoterapia (interferon ou interleucina) ou com o uso de drogas inibidoras da angiogênese. O tumor de rim não responde bem aos tratamentos quimioterápicos e à radioterapia (SBCO, 2022; SÍRIO LIBANÊS, 2022).

Os tumores malignos de fígado podem ser de dois tipos: primário (que começa no próprio órgão) e secundário ou metastático (tem origem em outro órgão e, com a evolução da doença, atinge também o fígado). O tipo secundário é mais frequentemente decorrente de um tumor maligno no intestino grosso ou no reto. Dentre os tumores iniciados no fígado, o mais comum é o hepatocarcinoma ou carcinoma hepatocelular. Agressivo, ocorre em mais de 80% dos casos. Existem também o colangiocarcinoma (originado nos dutos biliares do fígado), o angiossarcoma (câncer raro que se origina nos vasos sanguíneos do fígado) e o hepatoblastoma, tumor maligno raro que atinge recém-nascidos e crianças nos primeiros anos de vida (EINSTEIN, 2022; BRASIL, 2022).

A remoção cirúrgica (ressecção) do câncer é o tratamento mais indicado quando o tumor está restrito a uma parte do fígado (tumor primário) e também nos tumores hepáticos metastáticos em que a lesão primária foi ressecada ou é passível de ser ressecada de maneira curativa (EINSTEIN, 2022; BRASIL, 2022).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Encapsular os compostos bioativos presentes no extrato do açafão-da-terra em nanopartículas de zeína pelo método tradicional de precipitação antissolvente, a fim de uma possível aplicação como agente citotóxico/antiproliferativo em células tumorais humanas de rim e fígado.

4.2 Objetivos específicos

- Extrair os compostos bioativos do açafão-da-terra com solvente etanol: água (95:5, v/v) pela técnica da maceração dinâmica;
- Determinar a capacidade antioxidante do extrato, em termos de sequestro dos radicais DPPH e ABTS e habilidade quelante de Ferro (II);
- Quantificar os compostos fenólicos e flavonoides do extrato;
- Incorporar o extrato em nanopartículas de zeína pelo método tradicional de precipitação antissolvente e analisar a melhor condição de produção;
- Caracterizar as nanopartículas sintetizadas e avaliar a eficiência de encapsulação;
- Avaliar o potencial citotóxico/antiproliferativo em células tumorais humanas de rim e fígado do extrato incorporado nas nanopartículas e comparar com o extrato livre.

5 METODOLOGIA

5.1 Preparo da amostra - Amostragem

Os rizomas do açafão-da-terra foram obtidos *in natura* no comércio local, “Feira do Produtor”, na cidade de Apucarana - PR. Foram lavados, cortados em fatias finas e secos em estufa com circulação e renovação de ar (Solab SL-102) na temperatura de 40 °C, por cerca de 24 h. Após a secagem, os rizomas foram triturados em um mini processador (Black & Decker) para formação de pó, embalado e mantido sob refrigeração (2 – 8 °C) e isolado da interferência de luz para análises posteriores.

5.2 Umidade

O teor de umidade das amostras *in natura* de açafão-da-terra foi determinado por aquecimento em estufa a 105 °C por 3 h até peso constante, conforme a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Os ensaios de umidade foram realizados em seis replicatas.

5.3 Preparação do Extrato

O extrato foi preparado com etanol:água (95:5, v/v) utilizando-se 100 mL do solvente extrator com 1,0000 g do pó do rizoma em agitação magnética ao abrigo da luz. Após 4 h de agitação, o extrato foi filtrado com papel filtro qualitativo (gramatura 80 g m⁻²), transferido para um balão volumétrico de 100 mL e armazenado sob refrigeração em frasco âmbar. O extrato foi preparado em duplicata.

5.4 Compostos bioativos

5.4.1 Quantificação de compostos fenólicos

O conteúdo de fenóis totais dos extratos foi determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteu de acordo com a metodologia descrita por Minussi *et al.* (2003). A um tudo de ensaio com tampa rosqueável foram adicionados 250 µL do extrato diluído 2:3

(v/v) em etanol, 250 μL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:1 (v/v) em água destilada, 500 μL de uma solução saturada de carbonato de sódio ($0,35 \text{ g mL}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$) e 4,0 mL de água destilada.

Os tubos foram agitados e mantidos em temperatura ambiente, sob proteção da luz, por 25 min. Após este tempo foram centrifugados por 10 min a 3000 rpm. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS) na absorvância de 725 nm. Foi conduzido um branco nas mesmas condições, substituindo a amostra por 250 μL do solvente extrator. As análises foram realizadas em triplicata.

Para a quantificação dos fenóis totais foi construída uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 mg L^{-1} ($y=0,0052x+0,0047$, $R^2=0,9993$) e os resultados foram expressos em $\text{mg EAG } 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra, sendo EAG representa o equivalente em ácido gálico.

5.4.2 Quantificação de flavonoides totais

Os flavonoides totais foram determinados segundo a adaptação da metodologia descrita por Funari & Ferro (2006). A um tudo de ensaio foram adicionados 500 μL do extrato de concentração 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$), 250 μL de solução metanólica de cloreto de alumínio 5% e 3,2 mL de metanol. A mistura foi agitada e permaneceu em temperatura ambiente por 30 min. Após esse tempo foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS) no comprimento de onda de 425 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

Para a quantificação dos flavonoides totais foi construída uma curva padrão de rutina em metanol nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 100 e 200 mg L^{-1} ($y=0,0054x-0,0151$, $R^2=0,9960$). Os resultados foram expressos em mg de rutina 100 g^{-1} de amostra.

5.5 Atividade antioxidante

5.5.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH

O método envolvendo a captura do radical livre DPPH foi realizado de acordo com

Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995), com modificações (BOROSKI *et al.*, 2015), no qual a atividade antioxidante é determinada através do consumo de DPPH livre nas amostras pelo decaimento da absorbância.

O radical livre DPPH (0,1192 mmol L⁻¹) foi preparado a partir da dissolução de 4,7 mg de DPPH em 100 mL de metanol HPLC sob proteção da luz. Para cada extrato fez-se um branco contendo 1,0 mL da amostra e 2,0 mL de etanol. As replicatas foram preparadas a partir da mistura de 1,0 mL da amostra, diluída 1:1 (v/v) em etanol e 2,0 mL da solução DPPH e como controle 1,0 mL de etanol e 2,0 mL de DPPH. Após 30 min foram realizadas as leituras em um espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-Vis), a 517 nm. As análises foram realizadas em triplicata. A atividade antioxidante foi expressa em porcentagem de inibição do controle, conforme a Equação 1, sendo A_c = absorbância do controle, A_a = absorbância da amostra, A_b = absorbância do branco:

$$\%AA = \frac{A_c - (A_a - A_b)}{A_c} * 100 \quad (1)$$

5.5.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+}

A metodologia abordada para a realização do teste de sequestro do radical ABTS foi descrita por Rufino *et al.* (2007), com modificações (BOROSKI *et al.*, 2015). O princípio desta técnica está em avaliar a capacidade antioxidante da amostra em estabilizar o cátion radicalar ABTS^{•+} presente na solução, retornando ao seu estado mais estável.

Inicialmente formou-se o cátion radicalar ABTS^{•+} a partir da reação de 5,0 mL da solução estoque de ABTS (7,0 mmol L⁻¹) com 88 µL da solução de persulfato de potássio (140 mmol L⁻¹), essa mistura foi mantida em frasco âmbar em temperatura ambiente por 16 h antes do uso. Após esse período, 1,0 mL do cátion formado foi diluído em etanol (aproximadamente 55,0 mL), até obter-se uma solução com absorbância de 0,700 ± 0,050, em 734 nm.

Para as análises, foram realizadas as seguintes composições: 33,0 µL de etanol em 3,0 mL da solução estoque de ABTS^{•+} (controle), para cada branco 33,0 µL da amostra e 3,0 mL de etanol e as replicatas foram preparadas adicionado 33,0 µL da amostra e 3,0 mL da solução estoque de ABTS^{•+}, em seguida as misturas foram

homogeneizadas e após 15 min de repouso determinou-se a absorvância em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-Vis) a 734 nm. A atividade antioxidante foi expressa em porcentagem de inibição do controle, conforme Equação 01.

5.5.3 Determinação da Habilidade Quelante do íon Ferro (II)

A atividade antioxidante pelo método de habilidade quelante de Ferro (II), foi determinada através da metodologia desenvolvida por Stookey (1970), com modificações (BOROSKI *et al.*, 2015).

Para esta análise, foram preparadas soluções de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e ferrozina ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$), dissolvendo, respectivamente, 0,0040 g e 0,0250 g em 10,0 mL de água para cada reagente.

A análise foi realizada com a adição de 3,7 mL do extrato e 0,1 mL de FeCl_2 a um tubo de ensaio, o mesmo procedimento foi realizado para o branco, com 3,7 mL do solvente (A_b) em substituição das amostras. A leitura (A_0) foi realizada em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-Vis) em 562 nm. Foi adicionado a esta solução 0,2 mL de ferrozina e depois de 10 min a leitura foi realizada no mesmo comprimento de onda (A_1). O cálculo da porcentagem da habilidade quelante de ferro (II) do extrato foi obtido a partir da Equação 2 (BOROSKI *et al.*, 2015).

$$\% \text{habilidade quelante} = \frac{A_b - (A_1 - A_0)}{A_b} * 100 \quad (2)$$

5.6 Produção das nanopartículas de zeína

As nanopartículas de zeína foram produzidas pelo método tradicional de precipitação antisolvente, baseado em Liu *et al.* (2019), Liu *et al.* (2020) e Zhang & Han (2018), com modificações.

5.6.1 Produção das nanopartículas de zeína estabilizadas com caseinato de sódio

A zeína foi dissolvida em etanol:água (85:15, v/v) na concentração de 20 mg mL^{-1} , mantida em agitação magnética por cerca de 1 h e posteriormente filtrada.

Foi preparada separadamente uma solução aquosa de caseinato de sódio de concentração $0,0053 \text{ g mL}^{-1}$, mantida em agitação por cerca de 45 min para uma boa solubilidade.

Retirou-se uma alíquota da solução de zeína e foi realizado o gotejamento (aproximadamente 1 mL min^{-1}) em frações da solução aquosa de caseinato de sódio, obtendo-se assim as proporções de zeína/caseinato de sódio de 1:0, 1:0,6, 1:0,8 e 1:1 (m/m). Após gotejamento, a solução foi mantida em agitação magnética, afim de obter as nanopartículas de zeína estabilizadas com caseinato de sódio. Após 2 h de agitação, foi realizada a rotaevaporação do etanol residual, em seguida a centrifugação por 20 min.

Para a concentração de zeína:caseinato de sódio 1:1 (m/m), foi realizado também, concomitante a essas análises, o teste para verificar o melhor método para produção das nanopartículas: adição gota a gota ou adição rápida da zeína no caseinato de sódio e vice-versa. Também foi realizado o teste para o melhor tempo de centrifugação: leitura do material sem centrifugação, com 10 min e com 20 min de centrifugação.

5.6.2 Produção das nanopartículas de zeína estabilizadas com caseinato de sódio e carregadas com extrato do açafrao-da-terra

A zeína foi dissolvida em etanol:água (85:15, v/v) na concentração de 20 mg mL^{-1} , juntamente com o extrato do açafrao-da-terra, mantidos em agitação magnética por cerca de 1 h e posteriormente filtrados para retirar os grumos de zeína que não se solubilizaram.

Como no item anterior, preparou-se uma solução de caseinato de sódio para coacervar as nanopartículas.

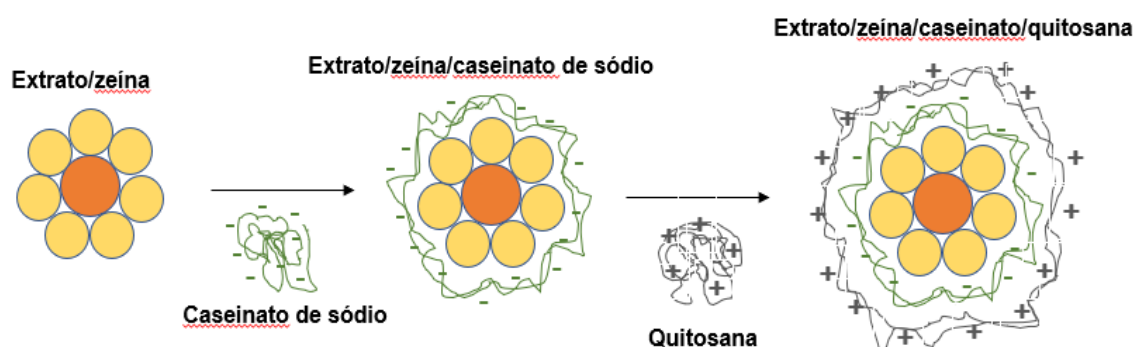
Retirou-se uma alíquota da solução de zeína-açafrao-da-terra e foi realizado o gotejamento (aproximadamente 1 mL min^{-1}) na fração da solução aquosa de caseinato de sódio, obtendo-se assim a proporção de 1:0,8 (m/m) de zeína:caseinato de sódio e as proporções de 40:1 (2,5%), 20:1 (5,0%), 10:1 (10,0%) e 5:1 (20,0%) para zeína-caseinato de sódio/extrato do açafrao-da-terra. Após gotejamento, a solução foi mantida em agitação magnética, com o objetivo de obter as nanopartículas ZeCsA. Após 2 h de agitação, foi realizada a rotaevaporação do etanol residual e centrifugação por 20 min para que precipitasse os reagentes que não formaram as nanopartículas.

5.6.3 Produção das nanopartículas de zeína estabilizadas com caseinato de sódio e quitosana e carregadas com extrato do açafrão-da-terra

A partir das nanopartículas preparadas no item anterior foi realizado o procedimento de revestimento com quitosana (Figura 15).

Soluções de quitosana diluídas em 1% de ácido acético, nas concentrações de 0,1%, 0,25% e 0,50%, foram deixadas em agitação por cerca de 6 h para melhor solubilização e incorporação. Uma alíquota das nanopartículas preparadas previamente, contendo mesmo volume da solução de quitosana foi gotejada (aproximadamente $1,0 \text{ mL min}^{-1}$) na solução de quitosana e posteriormente mantidos em agitação por cerca de 1 h.

Figura 15: Princípio do processo de precipitação antissolvente



Fonte: Autoria própria (2022)

5.6.4 Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas quanto ao potencial zeta, o diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersidade através do equipamento DLS (Dynamic Light Scattering) Litesizer 500 (Anton Paar), na temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras foram preparadas em triplicata.

5.6.5 Eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento

A eficiência de encapsulação foi realizada com as amostras das nanopartículas de zeína-caseinato de sódio carregadas com extrato recentemente preparadas, conforme a metodologia Liu *et al.* (2019), com modificações.

Devido à intensa coloração do extrato do açafrão-da-terra e também para que as

nanopartículas de zeína-caseinato de sódio se abrissem e liberassem o extrato foi realizada diluição de uma alíquota em etanol das concentrações de extrato de 2,50%, 5,00%, 10,00% e 20,00%, utilizando fator de diluição de 5, 10, 20 e 40, respectivamente. Posteriormente foi realizada agitação vigorosa em vórtex por cerca de 2 min.

Na sequência, as amostras foram centrifugadas por cerca de 10 min para que houvesse a precipitação dos reagentes. Então, foi medida a absorbância a 428 nm utilizando um espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS). Este comprimento de onda foi definido baseado na curcumina que apresenta uma banda de absorção em 428nm.

O teor de extrato do açafão-da-terra foi expresso em $\mu\text{g mL}^{-1}$ através de uma curva de calibração com concentrações de 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($y=0,0565x+0,1122$, $R^2=0,9965$). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS), em comprimento de onda de 428 nm em duplicata. A eficiência de encapsulação (EE) e a capacidade de carregamento (LC) foi calculada utilizando-se a Equação 3 e 4.

$$EE (\%) = \frac{\text{massa extrato nas nanopartículas}}{\text{massa total de extrato adicionado}} * 100\% \quad (3)$$

$$LC (\%) = \frac{\text{massa extrato nas nanopartículas}}{\text{massa total de zeína nas nanopartículas}} * 100\% \quad (4)$$

5.7 Avaliação da atividade citotóxica/antiproliferativa dos extratos de açafão-da-terra e suas nanopartículas

O extrato puro, as nanopartículas incorporadas com o extrato (zeína/caseinato e zeína/caseinato/quitosana) e as nanopartículas sem o extrato (zeína/caseinato e zeína/caseinato/quitosana), foram enviados liofilizados (SL-404, Solab) para avaliação da atividade citotóxica/antitumoral frente à linhagem de células tumorais renais (786-0) e hepáticas (HUH7.5), o qual foi realizado pela Sala de Cultura de Células do Laboratório de Bioprocessos, sob responsabilidade da Professora Elisângela Dusman, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – campus Francisco Beltrão.

5.7.1 Solução tratamento

As amostras foram diluídas em 1000 μL de meio de cultura. Após, foram realizadas as diluições com meio de cultura suplementado com soro bovino fetal nas seguintes concentrações: 5; 10; 50; 100; 200; 300; 400; 500 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

5.7.2 Teste de citotoxicidade do MTT

As células tumorais renais (786-0) e hepáticas (HUH7.5) foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm^2 contendo 10 mL de meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA) e incubadas em estufa tipo BOD com 5% de CO_2 , 95% de umidade e controle de temperatura à 37 $^\circ\text{C}$.

A realização do ensaio de citotoxicidade do MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] foi realizado como descrito por Mosmann (1983), com modificações. Foram utilizadas placas de cultura de 96 poços, onde foram semeadas $1,0 \times 10^4$ células 786-0 ou HUH7.5, com exceção do poço de controle sem célula (branco). Após 24 h, para permitir a estabilização, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 100 μL de meio completo para os grupos: controle negativo (CO^-) (meio de cultura), controle positivo (CO^+) com o agente citotóxico metil metanossulfanato (MMS – 500 μM) e os tratamentos com as diferentes concentrações das soluções tratamento.

As células foram incubadas por 24, 48 e 72 h e, após esse tempo, o meio de cultura foi substituído por 100 μL de meio de cultura não suplementado, acrescido de MTT (0,167 mg mL^{-1}). A placa foi incubada novamente por mais 4 horas e, na sequência, foi descartado o meio contendo MTT e aos poços foram adicionados 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em uma leitora de microplaca (Thermo Plate) a 560 nm utilizando a espectrofotômetro UV-Vis.

Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) (%) foram estimados pela razão entre a absorbância do tratamento (ABS_T) e a absorbância do controle negativo (ABS_{co}), como mostrado na Equação 5.

$$VC = \frac{\text{ABS}_T}{\text{ABS}_{\text{co}}} \cdot 100 \quad (5)$$

5.8 Análise estatística

As análises estatísticas das nanopartículas foram realizadas utilizando-se o sistema computacional de análise estatística SISVAR®. Os resultados foram avaliados através do teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados para atividade citotóxica/antiproliferativa foram apresentados como média e desvio padrão das absorbâncias e submetidos à análise de variância (one way ANOVA), seguido do teste de Dunnet, com o uso do programa Action Stat. As diferenças foram consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente é importante destacar a inovação do presente trabalho. Não há estudos, até o momento, para aplicação em células tumorais humanas utilizando o extrato do açafrão-da-terra. Os estudos encontrados são principalmente voltados para a utilização da curcumina isolada, principal composto ativo extraído do açafrão-da-terra. Destaca-se aqui a hipótese de sinergia entre todos os compostos ativos presentes no açafrão-da-terra, possivelmente potencializando as ações *in vivo*.

6.1 Umidade

O teor de umidade obtido dos rizomas frescos do açafrão-da-terra foi elevado, de $95,0650 \pm 0,1153\%$. Este resultado está de acordo com dados da literatura encontrados por Sabião *et al.* (2019) de 88,65%. De acordo com as determinações de umidade do Brasil (2003), o alimento pode ter até no máximo 13% de umidade para armazenamento. Fontes (2018) estudando amostras comerciais de rizomas-filhos de açafrão-da-terra, encontrou valores de umidade variando de 3,1 a 10,0% (em base seca). Já Maia *et al.* (1995) ao avaliar os rizomas secos por radiação observaram valor de 13,1% de umidade. As possíveis diferenças se dão em função do cultivo, local de plantio, práticas agrícolas, uso de fertilizantes, maturidade dos rizomas, além do processamento final usado para a sua comercialização (FONTES, 2018).

6.2 Avaliação da capacidade antioxidante

Neste trabalho a condição escolhida para a secagem do açafrão-da-terra foi de 40 °C e etanol:água (95:5, v/v) como solvente extrator. Estas condições foram devido a experimentos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa e revisões bibliográficas consultadas. Além do intuito do grupo em utilizar solventes com alternativa verde e que sejam menos tóxicos para uso humano e ambiental. Tonin *et al.* (2021), encontraram melhores respostas de atividade antioxidante para essa condição (TONIN *et al.*, 2021).

Os resultados da capacidade antioxidante e a quantificação dos compostos

fenólicos e flavonoides obtidos para o rizoma do açafrão-da-terra estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados da capacidade antioxidante e quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides obtidos para o rizoma do açafrão-da-terra

Análise	DPPH %	ABTS %	HQ Fe (II) %	Fenólicos Totais (mg EAG 100 g ⁻¹)	Flavonoides Totais (mg rutina 100 g ⁻¹)
Resultados	94,15 ± 0,08	82,46 ± 0,17	57,05 ± 0,19	1737,13 ± 36,57	5548,77 ± 99,51

HQ Fe (II): Habilidade Quelante de Fe (II)

Fonte: Autoria própria (2022)

Analisando os resultados é possível observar uma melhor resposta para o DPPH (94,15%), em uma concentração de amostra de 5 mg mL⁻¹. Esse resultado apresenta similaridade ao encontrado por Tonin *et al.* (2021), de 96,06±0,11% para uma concentração de amostra de 10 mg mL⁻¹, mantendo as mesmas condições de secagem e solvente extrator.

Nahak & Sahu (2011) avaliaram o ensaio antirradical DPPH do extrato hidroetanólico de *Curcuma longa* e as pesquisas mostraram que entre os extratos e frações avaliadas, a fração etanólica apresentou maior atividade sequestrante de radicais livres contabilizando 74,61±0,02% devido à presença de grande quantidade de curcumina. Trabalhos anteriores realizados por Tonin *et al.* (2021), também obtiveram extrato hidroetanólico como um dos mais promissores.

A atividade antioxidante pelo método DPPH também foi testada por Sabir *et al.* (2021). A solução etanólica do radical livre DPPH é reduzida no tratamento com antioxidantes presentes no extrato. No ensaio DPPH, a *Curcuma longa* apresentou atividade de sequestro contra o radical. Os antioxidantes atuam em diferentes estágios (prevenção, interceptação e reparo) e por diferentes mecanismos como agentes redutores, doando hidrogênio, extinguindo o oxigênio singlete e agindo como quelantes e capturando radicais livres (DEVASAGAYAM *et al.*, 2004). A alta atividade de eliminação de radicais DPPH da *Curcuma longa* sugere o uso contra doenças decorrentes do ataque de radicais livres (SABIR *et al.*, 2021).

Os resultados para ABTS concordam com trabalhos anteriores encontrados por Tonin *et al.* (2021), na mesma condição de concentração da amostra, temperatura e solvente extrator (64,24±1,85%).

Martinez-Correa *et al.* (2017), demonstraram que o uso do etanol proporcionou ao extrato maior atividade antioxidante para ABTS, quando comparado ao extrato aquoso. Também relataram a influência do solvente na extração de compostos antioxidantes bioativos do açafrão-da-terra. O solvente hidroetanólico propicia uma melhor extração dos compostos bioativos do açafrão-da-terra, devido à sua estrutura que apresenta ponte de hidrogênio – polar e ligações dipolo-dipolo – apolares.

A resposta para o teste de habilidade quelante foi de 57,05% para uma concentração de amostra de 1,9 mg mL⁻¹, demonstrando uma capacidade dos compostos bioativos do açafrão-da-terra em se quelar a íons metálicos.

A habilidade quelante do açafrão-da-terra se dá principalmente devido à curcumina, como demonstra trabalhos anteriores realizados por Mary, Vijayakumar & Shankar (2018), que estudaram a capacidade quelante de metal da curcumina para os íons Mn⁺², Fe⁺² e Zn⁺² e suas propriedades antioxidantes usando a teoria da densidade funcional e fases do solvente DMSO (dimetilsulfóxido), um solvente aprótico altamente polar. O estudo confirma que a interação entre os íons metálicos e a curcumina deve ser eletrostática dominante e que o mecanismo antioxidante é mais reativo para complexos metálicos do que a curcumina isolada. Assim, Mary, Vijayakumar & Shankar (2018), concluíram que a curcumina possui propriedade quelante e antioxidante de metais e pode ser usada em terapia de quelação para a cura da doença de Alzheimer.

Os principais constituintes do açafrão-da-terra são compostos polifenólicos hidrofóbicos, com baixa polaridade e solubilidade em água, portanto a eficiência de extração dos curcuminóides aumenta com a solubilidade desses compostos no solvente de extração, o que enfatiza a importância da polaridade do solvente e suas interações adicionais, como ligações de hidrogênio com solutos (BENER *et al.*, 2016). Portanto, o efeito do solvente e a temperatura de secagem influenciam na quantidade de extração dos compostos fenólicos.

O teor de fenóis totais baseado no poder redutor do extrato do açafrão-da-terra foi de 1737,13 ± 36,57 mg EAG 100 g⁻¹, para uma concentração de amostra de 4 mg mL⁻¹.

Estes resultados se apresentam superiores a trabalhos anteriores obtidos por Tonin *et al.* (2021) de 906,56±44,12 mg EAG 100 g⁻¹ e concentração de 10 mg mL⁻¹, mantendo as mesmas condições de secagem e extração do açafrão-da-terra. Esta diferença pode ser devido ao fato de que diferentes épocas de colheita do açafrão-da-

terra influenciam na quantidade de compostos fenólicos.

Chumroenphat *et al.* (2021), identificaram três principais curcuminóides no açafrão-da-terra: bisdemetoxicurcumina, demetoxicurcumina e curcumina e os estudos indicaram que o conteúdo total de curcuminóides foi afetado por diferentes métodos de secagem. A curcumina é o curcuminóide predominante e mais sensível ao calor, seguido pela demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina, respectivamente.

Outro destaque no trabalho é para o teor de flavonoides totais obtido do extrato do açafrão-da-terra de $5548,77 \pm 99,51$ mg ERU 100 g^{-1} , para uma concentração de amostra de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$.

Tonin *et al.* (2021) encontraram valores de teor de flavonoides totais bastante inferiores aos obtidos, mantendo as mesmas condições de extração e secagem ($688,33 \pm 66,04$ mg ERU 100 g^{-1}).

Akter *et al.* (2019) secaram a *Curcuma longa*, variedade *Ryudai gold*, em estufa a 50°C por 72 h, extraíram com metanol e também encontraram resultados inferiores para o teor de flavonoides (1089,50 mg ERU g^{-1} do extrato) e de fenóis totais (157,40 mg GAE g^{-1} do extrato). Os fenólicos, incluindo flavonoides são os metabólitos secundários que contribuem para a cor e sabor e têm papéis significativos como captadores de radicais livres, doadores de hidrogênio, agentes redutores e inibidores de oxigênio singlete. Portanto, para combater os riscos potenciais de danos oxidativos, o consumo dietético de antioxidantes fenólicos e flavonoides pode ser considerado primeira linha de defesa contra tóxicos altamente reativos (DENRE, 2014).

Além dos já discutidos compostos fenólicos e flavonoides, Santos *et al.* (2017), também encontraram outros constituintes químicos majoritários no açafrão-da-terra, como taninos, cumarinas, esteróides, triterpenos, óleos essenciais e açúcares redutores.

Majolo *et al.*, (2014) fizeram a determinação dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de *Curcuma longa* e encontraram como predominantes o sesquiterpeno Ar-tumerona (17,9%), α -Tumerona (14,6%) e 1,8-Cineol (14,2%). Outros compostos químicos encontrados pelos pesquisadores foram o α -Pinoeno, Mirceno, α -Felandreno, δ -3-Careno, p -Cimeno, Limoneno+Silvestreno, γ -Terpineno, Terpinoleno, Terpinen-4-ol, α -Terpineol, Ar-Curcumeno, α -Zingibereno, β -Sesquifelandreno, Ar-Tumerol, β -Atlantol e 6S,7R-Bisaboleno.

Sendo assim, de acordo com os resultados todas as análises se mostraram

coerentes com a literatura e pode-se confirmar a presença de compostos bioativos no açafão-da-terra, principalmente flavonoides e compostos fenólicos, sugerindo a presença dos constituintes curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina, compostos majoritários presentes no açafão-da-terra descritos na literatura, os quais são bem conhecidos por suas propriedades antioxidantes.

6.3 Produção das nanopartículas de zeína estabilizadas com caseinato de sódio

A escolha inicial da concentração de zeína (20 mg mL^{-1}) e do solvente etanol:água (85:15, v/v) foi baseada em análise literária (LIU *et al.*, 2019, LIU *et al.*, 2020 e ZHANG & HAN, 2018). No entanto, as nanopartículas de zeína, produzidas pelo método antissolvente, possuem característica hidrofóbica de modo que partículas maiores precipitam facilmente após serem dispersas em uma solução aquosa ou redispersas em uma fase aquosa (ELZOGHBY, SAMY & ELGINDY, 2012b). O parâmetro foi observado no trabalho, portanto a zeína se não manipulada com o solvente corretamente e sem filtração antes dos próximos passos favorece a precipitação, conforme observado também por Luis *et al.* (2020).

Ademais, a zeína é uma proteína, portanto muito sensível à degradação enzimática no sistema digestivo devido à rápida liberação de compostos bioativos hidrofóbicos encapsulados no estômago (ELZOGHBY, SAMY & ELGINDY, 2012b).

Pesquisas confirmam que a adição de um revestimento de biopolímero em nanopartículas de zeína, via deposição eletrostática, podem melhorar eficazmente a solubilidade e estabilidade em água em simulação de sucos gástricos (CHANG *et al.*, 2017; ZOU *et al.*, 2016).

Com isso, neste estudo, foi realizada uma deposição da zeína com caseinato de sódio, um reticulante altamente eficaz, que pode não só melhorar a solubilidade em água das nanopartículas de zeína, mas também pode impedir que as nanopartículas se agreguem e precipitem em solução de pH de aproximadamente 7 e em ambientes de alta força iônica (LIU *et al.*, 2019).

Baseado nos resultados, apresentados na Tabela 2, foi possível observar que após a adição de caseinato de sódio o diâmetro hidrodinâmico aumentou consideravelmente em comparação com as nanopartículas não revestidas.

Tabela 2: Efeito do caseinato de sódio nas nanopartículas de zeína com relação a diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersidade*

zeína/ caseinato (m m ⁻¹)	Dh (nm)	ζ (mV)	PDI (%)
1:0,0	90,50 ± 0,91 ^d	23,83 ± 0,31 ^a	18,17 ± 1,22 ^a
1:0,6	221,53 ± 3,07 ^b	-26,03 ± 0,46 ^b	15,00 ± 5,10 ^c
1:0,8	183,53 ± 3,48 ^c	-27,70 ± 0,44 ^c	15,27 ± 6,30 ^b
1:1,0	285,30 ± 15,00 ^a	-32,13 ± 0,90 ^d	14,17 ± 1,56 ^d

Dh: diâmetro hidrodinâmico, ζ: potencial Zeta. Os dados representam a média das amostras (n=3). *Zeína (20 mg mL⁻¹) diluída em etanol:água (85:15, v v⁻¹) e caseinato de sódio (6,67 mg mL⁻¹) em solução aquosa.

Fonte: Autoria própria (2022)

Diâmetro hidrodinâmico (Dh), índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta (ζ) são características físico-químicas que dão informações sobre a estabilidade de um sistema coloidal. O Dh além de apresentar um impacto direto sobre a estabilidade física das dispersões coloidais é também um parâmetro muito importante durante a otimização das formulações (SILVA *et al.*, 2011; MEHNERT & MADER, 2001).

De modo geral, o PDI apresenta a distribuição de tamanho das nanopartículas e, frequentemente, suspensões coloidais com valores de até 20% são consideradas como bons indicadores de homogeneidade (CHANG *et al.*, 2017; LEMARCHAND *et al.*, 2004). O PDI pode ser apresentado em escala de 0 – 1 ou em porcentagem de 0 – 100%.

Já o potencial zeta (ζ) é um parâmetro que indica a carga superficial das partículas e, geralmente, valores (em módulo) acima de 30 mV evidenciam estabilidade em suspensão, já que a carga superficial impede a agregação de partículas (CHEN, MOHANRAJ & PARKIN, 2003).

É possível verificar ainda que houve inversão do potencial zeta de positivo para negativo, mesmo que a zeína esteja presente em maior quantidade que o caseinato de sódio na solução. De acordo com a literatura, a zeína em solução possui potencial zeta positivo e o caseinato negativo, a interação eletrostática que pode ocorrer entre as cargas destes dois polímeros, pode levar à conversão de potencial zeta das nanopartículas e aumento do diâmetro hidrodinâmico, ou seja, o caseinato de sódio carregado negativamente em solução aquosa pode ser adsorvido na superfície de partículas coloidais carregadas positivamente (PATEL *et al.*, 2012).

Em concordância com o encontrado por Silva *et al.*, (2018), embora fossem obtidas partículas em ordem nanométrica em todos os casos avaliados, as formulações com menores concentrações de caseinato de sódio (reticulante) levaram

a maiores valores de PDI, reafirmando a questão de que a zeína não revestida favorece a agregação e precipitação das partículas. Sendo assim, combinando os resultados encontrados na Tabela 2, foi escolhido a proporção 1:0,8 como a melhor proporção de zeína/caseinato de sódio (m/m), considerando o diâmetro reduzido das nanopartículas e o objetivo do trabalho de possível aplicação em células humanas.

Considerando a produção de nanopartículas pelo método escolhido: adição lenta/gota a gota, da zeína no caseinato de sódio, adicionalmente avaliou-se o método de adição da zeína no caseinato vertido rápido e vice-versa (Tabela 3).

A zeína e o caseinato de sódio são polieletrólitos complexos, portanto a velocidade de adição das soluções influencia nos resultados de tamanho obtidos. A Tabela 3 mostra um aumento no diâmetro hidrodinâmico. As soluções contendo as cadeias poliméricas precisam de um certo tempo para que ocorra a auto-organização do sistema coloidal e pode-se sugerir que a rápida adição de uma solução na outra provocou uma formação mais desorganizada do sistema coloidal.

Por esse motivo, consideramos o melhor método como sendo a adição gota a gota, por homogeneizar melhor e quase por completo os constituintes, bem como a adição da zeína sobre o caseinato de sódio. Sendo assim, as considerações deste trabalho estão de acordo com trabalhos da literatura realizados por Silva *et al.* (2018), em que também prepararam as nanopartículas sob agitação, executando um gotejamento lento da fase orgânica sobre a fase aquosa.

Tabela 3: Efeito do método de adição do caseinato de sódio e zeína para formação das partículas com relação a tamanho, potencial zeta e índice de polidispersidade

Ordem de adição	Dh (nm)	ζ (mV)	PDI (%)
vertido rápido/zeína no caseinato	311,07 ± 17,17 ^b	-30,77 ± 0,40 ^b	10,77 ± 2,87 ^a
vertido rápido/caseinato na zeína	353,25 ± 11,75 ^a	-27,87 ± 0,42 ^a	5,20 ± 5,67 ^b

*Proporção de massa zeína:caseinato de sódio ($m\ m^{-1}$) 1:1,0. Dh: diâmetro hidrodinâmico; ζ : potencial Zeta. Os dados representam a média das amostras (n=3).

Fonte: Autoria própria (2022)

Por fim, foi avaliado o tempo de centrifugação que, além de apresentar diferença significativa, ainda se notou deposição de corpo de fundo e precipitação de material (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito da centrifugação para as nanopartículas com relação a diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersidade

Proporção zeína/caseinato (m m ⁻¹) 1:1,0	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	Potencial Zeta (mV)	PDI (%)
Sem centrifugar	220,30 ± 0,75 ^b	-25,63 ± 0,55 ^a	15,23 ± 4,76 ^a
Com 10 min de centrifugação	216,90 ± 2,33 ^c	-26,53 ± 0,29 ^b	11,20 ± 5,17 ^c
Com 20 min de centrifugação	285,30 ± 15,00 ^a	-32,13 ± 0,90 ^c	14,17 ± 1,56 ^b

Dh: diâmetro hidrodinâmico; ζ: potencial Zeta. Os dados representam a média das amostras (n=3).

Fonte: Autoria própria (2022)

Apesar do maior diâmetro hidrodinâmico obtido para as nanopartículas com 20 min de centrifugação, possivelmente devido à redução na estabilidade das nanopartículas, consideramos este tempo, ao final do processo, como o mais vantajoso para o trabalho. Na prática, observamos homogeneidade nas repetições da leitura no DLS e no espectrofotômetro para o teste da eficiência de encapsulação, dois equipamentos extremamente sensíveis. Na literatura há divergências na elaboração do método com relação ao processo de centrifugação; os autores adotam diferentes tempos de centrifugação e, por vezes, não o realizam (Liu *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020; Luis *et al.*, 2020). Baseado nessas observações, conclui-se que novas análises devem ser realizadas para maior precisão dos resultados.

6.4 Produção das nanopartículas de zeína / caseinato de sódio carregadas com extrato de açafão-da-terra, eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento

As proporções de massa do extrato do açafão-da-terra encapsulado em nanopartículas de zeína revestidas por caseinato de sódio com relação ao diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta, PDI, eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento influenciam as propriedades físico químicas das nanopartículas (LIU *et al.*, 2019) e são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Efeito da proporção de massa zeína/extrato do açafração-da-terra para as nanopartículas com relação ao diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta, índice de polidispersidade, eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento

Proporção zeína/extrato (m m ⁻¹)	Dh (nm)	ζ (mV)	PDI (%)	EF (%)	LC (%)
0	207,95 ± 9,99 ^c	-24,05 ± 1,36 ^a	18,14 ± 5,50 ^a	-	-
2,50% (40:1)	215,83 ± 6,40 ^{b,c}	-24,52 ± 0,77 ^a	13,00 ± 2,59 ^a	33,23 ± 1,19 ^d	0,84 ± 0,02 ^d
5,00% (20:1)	292,88 ± 20,18 ^a	-26,01 ± 2,56 ^a	15,84 ± 9,61 ^a	55,45 ± 0,85 ^c	2,90 ± 0,06 ^c
10,00% (10:1)	229,32 ± 19,08 ^{b,c}	-27,14 ± 3,90 ^a	15,07 ± 1,73 ^a	66,15 ± 1,94 ^a	6,63 ± 0,03 ^b
20,00% (5:1)	250,85 ± 13,60 ^b	-25,68 ± 1,56 ^a	16,46 ± 4,51 ^a	60,39 ± 1,72 ^b	12,34 ± 0,13 ^a

Dh: diâmetro hidrodinâmico; ζ: potencial Zeta; EF: Eficiência de encapsulação; LC: Capacidade de carregamento. Análise em triplicata (n=3).

Fonte: Autoria própria (2022)

Após a adição do extrato do açafração-da-terra, o diâmetro hidrodinâmico teve uma alteração significativa. As concentrações de 2,50% e 10,00% não apresentaram diferença significativa. Uma possível justificativa para isso é que o extrato do açafração-da-terra é encapsulado pela nanopartícula que tem uma influência limitada na formação e nas propriedades superficiais das partículas (LIU *et al.*, 2019).

No trabalho, as nanopartículas obtidas sem o extrato apresentaram diâmetro hidrodinâmico de 207,95 nm. Chang *et al.* (2017) também encontraram dados similares, em torno de 250 nm, em que estudou a pectina como revestimento.

O tamanho de partícula de zeína sem o extrato foi anteriormente atribuído por Hu *et al.* (2016) e Xu *et al.* (2011) ao efeito de cristais de carbonato de sódio pré formados atuando como sítios de nucleação heterogêneos, o que impediu a formação de grandes partículas durante o processo de dispersão.

De acordo com trabalhos anteriores, todos os PDIs das nanopartículas foram menores que 20 e não foram significativamente afetados pela proporção de massa do extrato, indicando uma distribuição homogênea e estreita (LIU *et al.*, 2019). De acordo com Chang *et al.* (2017), como não foi observada diferença no potencial zeta entre nanopartículas com e sem extrato, deduz-se que o impacto da força iônica foi insignificante, o que foi em parte devido à pequena quantidade adicionada à formulação. Os dados obtidos apontam que o extrato do açafração-da-terra foi encapsulado sem desvantagem às características das nanopartículas.

A adição do extrato do açafração-da-terra causou um aumento no potencial negativo das nanopartículas, passando de -24,05 mV nas partículas sem o extrato até o mínimo de -27,14 mV para partículas com 10,00% de extrato do açafração-da-terra. O dado está condizente ao encontrado por Liu *et al.* (2019), que obteve um potencial zeta de -23,23

mV para partículas sem extrato e -27,03 mV para partículas carregadas.

Para verificar a quantidade de extrato de açafração-da-terra efetivamente incorporado nas nanopartículas em função da concentração de extrato adicionado à solução, a eficiência de encapsulação (EE) e a capacidade de carregamento (LC) dos sistemas foram calculados (Gómez-Mascaraque *et al.*, 2017). A eficiência de encapsulação determina o grau de proteção do ativo, no caso o extrato do açafração-da-terra no interior das partículas e pode ser influenciado por vários fatores, como material encapsulante, relação núcleo:material de parede e teor de sólidos totais (TOSONI & RODRIGUES, 2013).

No trabalho, a eficiência de encapsulação das nanopartículas foi baixa para a proporção de 2,50% e aumentou consideravelmente para a proporção de 10,00% (66,15% do ativo incorporado ao polímero). Além disso, os resultados mostram que a eficiência de encapsulação diminuiu com a quantidade de extrato de açafração-da-terra adicionado às nanopartículas.

Os dados estão de acordo com Liu *et al.* (2019), que obtiveram eficiência de encapsulação de nanopartículas em curcumina significativamente reduzida conforme houve um aumento nas razões de massa de curcumina para zeína (de 76,06% em 1:200 para 36,10% em 1:10) quando estudaram a encapsulação da curcumina em nanopartículas de zeína, caseinato de sódio e alginato de sódio. Outros trabalhos encontraram fenômenos semelhantes ao estudar encapsulamento, como com retinol (PARK, PARK & KIM, 2015), α -tocoferol (LUO *et al.*, 2011) e vitamina E (LIU & PARK, 2009).

Foram observadas diferenças significativas na capacidade de carregamento das amostras e concluiu-se que uma carga máxima de cerca de 12% (m/m) em relação à massa de zeína pode ser efetivamente incorporada às nanopartículas. O excesso de extrato seria então excluído da estrutura das nanopartículas e, portanto, diminuindo a eficiência de encapsulação acima da capacidade de carga mencionada. Gómez-Mascaraque *et al.* (2017), encontraram uma carga máxima de curcumina de cerca de 1,5% (p/p) quando estudaram o carregamento da curcumina incorporada em vesículas lipídicas.

Tendo em vista as observações consideradas, a proporção de massa ZeCsA escolhida para os objetivos do trabalho foi a 10,00% (10:1).

6.5 Produção das nanopartículas de zeína estabilizadas com caseinato de sódio e quitosana e carregadas com extrato do açafão-da-terra

O caseinato de sódio atua como um revestimento e estabilizante em nanopartículas de zeína proporcionando maior solubilidade em meio aquoso. No entanto, em pH estomacal ácido, quando utilizados por via oral, podem ser degradados por enzimas digestivas. O caseinato de sódio e a zeína são muito sensíveis à pepsina e pancreatina nos fluidos digestivos e o extrato de açafão-da-terra é rapidamente liberado das nanopartículas desintegradas no trato digestivo (LIU *et al.*, 2019). Por este motivo neste trabalho foi feito a adição de mais um revestimento, a quitosana.

Os efeitos da adição da quitosana nas nanopartículas de zeína/caseinato/extrato do açafão-da-terra com relação a diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersidade são apresentados na Tabela 6.

A quitosana é um polímero policatiônico atóxico e biocompatível com mucoadesividade favorável, podendo interagir eletrostaticamente com muco ou superfícies celulares carregadas negativamente. Essa qualidade proporciona um maior tempo de contato para o transporte de ativos através da membrana celular e potencialmente beneficia a absorção celular (MA *et al.*, 2018). Observações anteriores apoiam que interações eletrostáticas entre quitosana e proteínas melhoraram as propriedades físico-químicas e a estabilidade dos sistemas de emulsão (YUAN *et al.*, 2013).

Tabela 6: Efeito da adição da quitosana nas nanopartículas de zeína-caseinato/10% (10:1) extrato do açafão-da-terra com relação ao diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersidade

Quitosana (m v ⁻¹)	Dh (nm)	ζ (mV)	PDI (%)	Condutividade (mS cm ⁻¹)
0,000 %	229,32 ± 19,08 ^c	-27,14 ± 3,90 ^d	15,07 ± 1,73 ^d	0,02 ± 0,01 ^b
0,025 %	273,77 ± 20,00 ^b	40,12 ± 1,35 ^b	18,20 ± 0,81 ^c	0,05 ± 0,01 ^a
0,050%	226,51 ± 1,19 ^d	40,26 ± 1,58 ^a	22,03 ± 1,30 ^a	0,05 ± 0,01 ^a
0,100 %	308,44 ± 22,51 ^a	9,46 ± 0,55 ^c	18,73 ± 3,17 ^b	0,02 ± 6,10 ^b

Dh: diâmetro hidrodinâmico; ζ: potencial Zeta. Os dados representam a média das amostras (n=2).

Fonte: Autoria própria (2022)

Um fato observado também por Zhang *et al.* (2014) é que sem adição de quitosana, a dispersão de nanopartículas apresentou-se homogênea e branca leitosa.

Após, foram observados agregados durante o experimento os quais eram claramente visíveis, o que pode ser explicado pelo fato de que a carga total da superfície das nanopartículas caiu drasticamente com o revestimento de quitosana e não houve forças repulsivas suficientes para estabilizar as nanopartículas (ZHANG *et al.*, 2014).

O tamanho de partícula é uma característica chave para veículos de entrega biopoliméricos (MA *et al.*, 2018). De acordo com análise estatística e estudos anteriores (HIDALGO *et al.*, 2017; PAULUK *et al.*, 2019), neste trabalho as partículas também tiveram um aumento significativo no diâmetro após a adição da quitosana. Este aumento ocorre desde que a quitosana seja aplicada após a formação das nanopartículas (HIDALGO *et al.*, 2017) e conforme se aumenta a concentração de quitosana utilizada há a deposição de camadas mais espessas das partículas catiônicas, conferindo maior estabilidade ao sistema.

O PDI para todas as formulações foi inferior a 22%, indicando uma distribuição estreita do tamanho das partículas. Os dados estão condizentes com os pesquisados por MA *et al.* (2018), em que obtiveram valores de PDI menores que 35%, quando encapsularam a quercetina.

A quitosana se dissolve em soluções aquosa ácidas e carrega uma forte carga positiva (ZHANG *et al.*, 2014). Neste trabalho, sem o revestimento de quitosana, o potencial zeta das nanopartículas estabilizadas com caseinato de sódio foi de -27,14 mV e, após a adição da quitosana, ocorreu a reversão do potencial zeta negativo para positivo, uma vez que a quitosana de carga positiva foi atraída para a superfície negativa das nanopartículas por meio de interações eletrostáticas (LI *et al.*, 2016). Essa mudança de negativo para positivo ocorre devido aos grupos amino da quitosana. Isso pode resultar em vantagens farmacocinéticas porque as nanopartículas carregadas positivamente interagem melhor com a carga negativa geral das membranas celulares (KAMEL *et al.*, 2017).

Portanto, conforme encontrado também por MA *et al.* (2018), as cargas positivas do potencial zeta quando revestido com quitosana, combinadas com a mucoadesividade da quitosana potencialmente dotaram a partícula composta com a adesividade efetiva na superfície celular, facilitando a captação celular.

De acordo com Pauluk *et al.* (2019), o potencial zeta também está relacionado com a estabilidade da suspensão das nanopartículas. Valores acima de ± 30 mV, para nanopartículas de quitosana, indicam maior estabilidade, devido à maior repulsão entre as partículas, consequentemente reduzindo a agregação entre elas. Neste

trabalho, as concentrações de quitosana que possivelmente se apresentam mais estáveis são as de 0,025 % e 0,050 %.

Apesar de os trabalhos não fazerem associação entre a caracterização de nanopartículas e a condutividade, observa-se a possível influência da condutividade no potencial zeta. Maiores valores de condutividade, conferem maiores valores de potencial zeta. Um destaque aqui ao tratamento com 0,1% de quitosana, em que foi obtido menor valor de potencial zeta (aproximadamente 9,5 mV) e menor condutividade (0,02 mS cm⁻¹). Baseado nessas observações experimentais são necessárias mais pesquisas a fim de se obter resultados precisos.

Com base na literatura e pesquisas realizadas, adotou-se para este trabalho como concentração ótima de quitosana a 0,050%. Assim, a quitosana proporciona uma maior estabilidade ao sistema e mantém o diâmetro das partículas em escala nanométrica atendendo ao objetivo proposto.

6.6 Avaliação da atividade citotóxica/antiproliferativa dos extratos de açafão-da-terra e suas nanopartículas

Após testadas as condições desenvolvidas para a produção de nanopartículas, as amostras (extrato do açafão da terra, nanopartículas de zeína/caseinato com e sem extrato e nanopartículas de zeína/caseinato/quitosana com e sem extrato) foram enviadas para o Laboratório de Bioprocessos da UTFPR - Francisco Beltrão, para serem testadas quanto a atividade citotóxica/antiproliferativa. As amostras foram previamente liofilizadas e uma alíquota foi retirada para serem ressuspensas e analisadas novamente no DLS. As amostras ressuspensas se mantiveram com as características de nanopartículas.

Plantas medicinais sempre chamaram a atenção de pesquisadores como uma fonte atraente de compostos naturais para a terapia do câncer, como é o caso da *Curcuma longa*, uma planta que pode possuir ação contra angiogênese e metástase de câncer. Os compostos anticancerígenos destas plantas desempenham um papel fundamental como um eliminador de radicais livres e indutor de espécies reativas de oxigênio, inibidor de quinase do fuso mitótico, antimitótico, inibidor de angiogênese, inibidor de topoisomerase, indutor de apoptose e, eventualmente, verificando a invasão, migração e proliferação do câncer (VARGHESE & DALVI, 2021).

A curcumina demonstrou induzir múltiplos efeitos citotóxicos em células tumorais, incluindo parada do ciclo celular, apoptose, autofagia, alterações na expressão gênica e interrupção da sinalização molecular (WALKER & MITTAL, 2021). Além disso, demonstrou potencializar o efeito da radiação nas células cancerígenas, exibindo um efeito protetor no tecido normal (WALKER & MITTAL, 2021).

De acordo com Sultana *et al.* (2021), os fármacos anticâncer são classificadas em diferentes subgrupos com base em seu mecanismo de ação como agentes antiproliferativos, agentes bloqueadores de carcinógenos ou antioxidantes.

Os dados do Gráfico 1 apresentam os resultados das absorvâncias médias dos tratamentos das células tumorais de rim (A) e fígado (B) humano com o extrato de açafão-da-terra. A análise estatística mostra que a concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou potencial citotóxico/antiproliferativo nos três tempos de exposição (24, 48 e 72 h) para as duas linhagens celulares estudadas. Inclusive, as viabilidades celulares atingiram 66,54% para as células tumorais renais (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 24 h) e 33,96% para as células tumorais hepáticas (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 72 h) (Tabela 7). Para as células tumorais hepáticas o efeito antiproliferativo foi mais evidente e foi maior quanto maior o tempo de exposição para a concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 7).

Tabela 7: Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de rim e fígado humano, tratadas com as diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato de açafão-da-terra, por 24, 48 e 72 h, pelo teste do MTT

Grupos	Carcinoma Renal			Hepatocarcinoma		
	VC [%]			VC [%]		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
CO+	24,41	11,90	9,97	35,42	18,96	14,07
5	86,99	104,10	98,81	93,23	99,62	111,06
10	96,32	101,10	105,49	91,93	96,59	110,27
50	95,88	103,00	104,10	111,20	112,42	117,88
100	92,28	88,73	99,38	99,61	97,63	110,77
200	94,34	95,96	107,40	95,83	88,15	113,28
300	91,40	104,97	101,57	89,32	88,34	131,08
400	84,19	113,34	106,92	100,78	87,39	88,37
500	87,21	105,95	96,18	97,92	95,64	121,18
1000	66,54	75,85	70,99	77,73	44,17	33,96

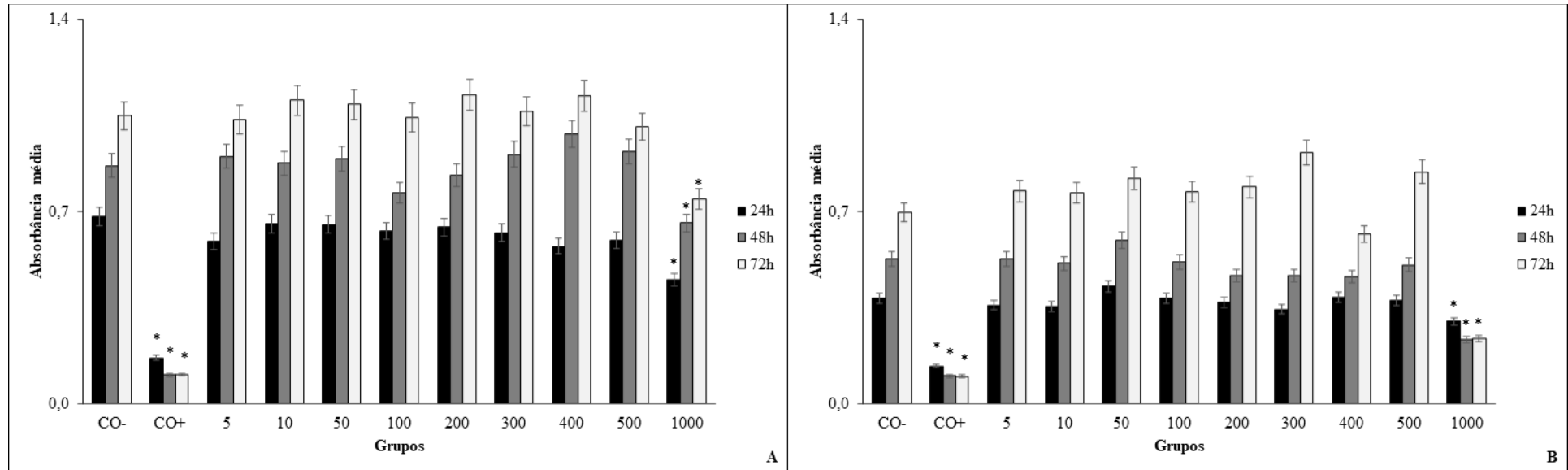
CO-: controle negativo. CO+: controle positivo

Fonte: Autoria própria (2022)

Os dados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os encontrados na

literatura, ou seja, o extrato do açafrão-da-terra apresenta um efeito citotóxico frente a células tumorais. Khuda-Bukshs *et al.* (2008), quando pesquisaram modelos de ratos induzidos por p-DAN e fenobarbital, encontraram que o extrato etanólico dos rizomas de *Curcuma longa* inibiu a carcinogênese hepática suprimindo a expressão hepática de p53 e Bcl-2 e preveniu a metástase do câncer por perturbar a atividade hepática de MMP. Abdel-Lateef *et al.*, (2016), também observaram a inibição da proliferação de células hepáticas HepG2, pela *Curcuma longa*, induzindo alterações apoptóticas.

Gráfico 1: Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de rim (A) e fígado (B) humano tratadas por 24, 48 e 72 h com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato de açafão-da-terra



* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).
Fonte: Autoria própria (2022)

O gráfico 2 apresenta os resultados das absorvâncias médias dos tratamentos com as partículas de zeína/caseinato sem o extrato de açafreão-da-terra.

Neste caso, para as partículas de zeína/caseinato (Tabela 8) as concentrações de 50 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, no tempo de 72 h, foram citotóxicas para as células tumorais renais e hepáticas, com viabilidades celulares mínimas de 46,80% (célula tumoral renal) e 41,13% (célula tumoral hepática) (Tabela 8). Ademais, as concentrações de 10 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (24 h), 5, 10, 50, 200 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (48 h) e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (72 h), para as células tumorais renais, e 100 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (24 h), 5 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (48 h) e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (72 h), para as células tumorais hepáticas, resultaram em absorvâncias médias estatisticamente maiores que as dos controles negativos, resultando em estímulo da proliferação celular, com viabilidades celulares (Tabela 8) maiores que 100%.

De posse dos dados pode-se observar que as partículas de zeína/caseinato sem extrato apresentam, em algumas concentrações e tempos, atividade citotóxica para as células tumorais renais e hepáticas. Essa citotoxicidade pode ser atribuída ao fato de que foi utilizado DMSO para solubilização dos cristais de formazan. O DMSO apresenta toxicidade sistêmica questionável e, de acordo com Brayton (1986), o composto atua na eliminação de radicais livres. Os questionamentos levantados não são conclusivos e novos estudos se fazem necessários acerca do assunto.

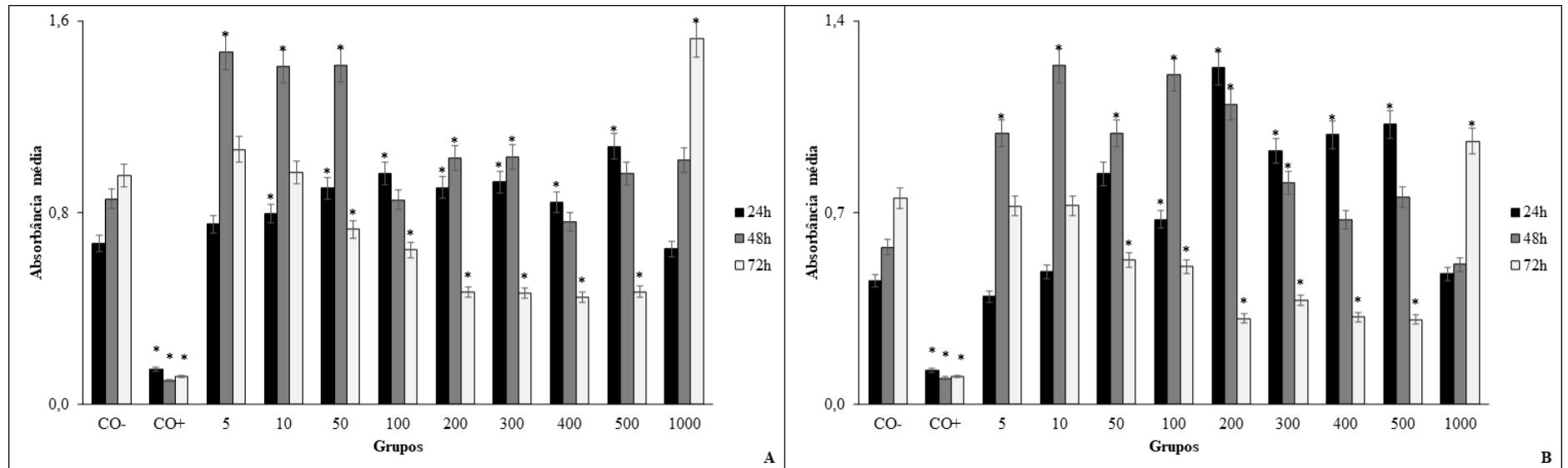
Tabela 8: Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de rim e fígado humano, tratadas com as diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato, por 24, 48 e 72 h, pelo teste do MTT

Grupos	Carcinoma Renal			Hepatocarcinoma		
	VC [%]			VC [%]		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
CO+	21,59	11,25	12,07	27,33	16,49	13,42
5	111,84	171,78	111,65	87,33	172,51	96,08
10	118,32	164,49	101,47	107,56	215,97	96,28
50	134,33	165,25	76,50	186,89	172,60	69,77
100	143,56	99,48	67,52	150,00	209,95	66,78
200	134,62	120,00	49,11	273,11	191,10	41,59
300	138,05	120,52	48,69	205,78	141,01	50,63
400	125,47	88,75	46,80	218,67	117,63	42,19
500	160,24	112,19	49,16	227,33	131,76	41,13
1000	96,43	118,83	160,18	105,78	88,92	127,71

CO-: controle negativo. CO+: controle positivo

Fonte: Autoria própria (2022)

Gráfico 2: Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de rim (A) e fígado (B) humano tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato



* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).
 Fonte: Autoria própria (2022)

Os dados do Gráfico 3 apresentam os resultados das absorvâncias médias dos tratamentos das células tumorais de rim (A) e fígado (B) humano com as partículas de zeína/caseinato e o extrato de açafreão-da-terra. A análise estatística mostra que novamente a concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou potencial citotóxico/antiproliferativo nos três tempos de exposição (24, 48 e 72 h) para as duas linhagens celulares. Entretanto, neste caso, ainda foram citotóxicas as concentrações de 400 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (24 e 72 h), 100 e $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ (48 h), para a linhagem tumoral renal, e $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ (24 e 48 h), $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ (48 e 72 h) e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (24, 48 e 72 h) para a linhagem tumoral de fígado. Neste caso, as viabilidades celulares atingiram $60,03\%$ para as células tumorais renais ($[1000 \mu\text{g mL}^{-1}]$ 72 h) e $31,24\%$ para as células tumorais hepáticas ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, 72 h) (Tabela 9). Para as células tumorais hepáticas novamente o efeito antiproliferativo foi mais evidente e foi maior quanto maior o tempo de exposição (Tabela 9) (concentrações $> 400 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Fazendo um comparativo entre os dados obtidos das nanopartículas de zeína/caseinato sem e com extrato, pode-se inferir que na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, 72 h para as células tumorais renais e hepáticas que apresentaram viabilidades celulares superiores a 100% para as nanopartículas sem extrato, quando adicionou-se o extrato houve uma redução significativa na viabilidade celular, principalmente para as células tumorais hepáticas ($31,24\%$). Com isso, pode-se concluir que o tratamento com o extrato apresentou efeito em células tumorais hepáticas.

Ademais pode-se observar uma redução na viabilidade celular, em comparação ao tratamento sem extrato, para as concentrações de 400 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, 24h e $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, 48 h para a linhagem tumoral renal e $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, 24 e 48h e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, 24 h, para a linhagem hepática.

Tabela 9: Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de rim e fígado humano, tratadas com as diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato e o extrato de açafraão-da-terra, por 24, 48 e 72 h, pelo teste do MTT

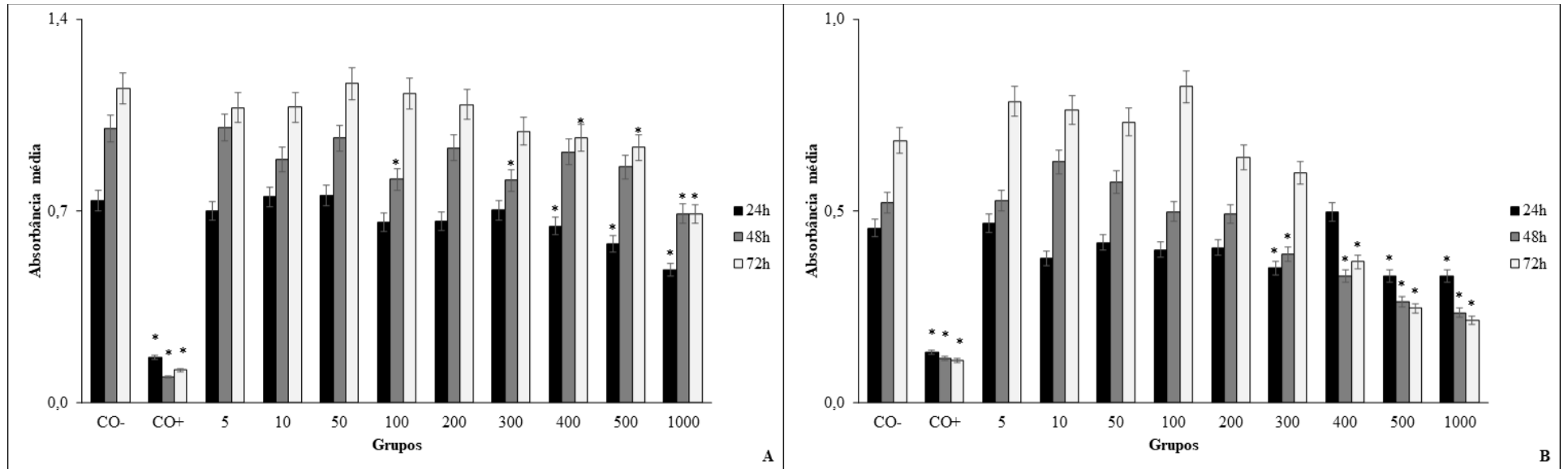
Grupos	Carcinoma Renal			Hepatocarcinoma		
	VC [%]			VC [%]		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
CO+	22,25	9,34	10,29	28,82	21,96	16,02
5	94,84	100,35	93,94	102,75	101,05	115,00
10	101,83	88,72	94,03	82,73	120,33	111,70
50	102,71	96,41	101,70	91,75	110,26	107,02
100	89,42	81,38	98,30	87,57	95,49	120,56
200	89,96	92,96	94,86	88,89	94,34	93,71
300	95,18	81,03	86,40	77,12	74,30	87,64
400	87,31	91,46	84,22	109,35	63,37	53,69
500	78,49	85,87	81,21	72,83	50,62	35,99
1000	65,81	68,90	60,03	72,72	44,97	31,24

CO-: controle negativo. CO+: controle positivo

Fonte: Autoria própria (2022)

Luiz *et al.* (2022) estudaram o desenvolvimento e caracterização de lipossomas carregados de curcumina modificados com ácido fólico para o tratamento do câncer de mama utilizando células MCF-7 e observaram que a curcumina nanoencapsulada mostrou um efeito de toxicidade significativamente maior quando comparado com curcumina livre. Portanto, os dados do trabalho estão condizentes com os encontrados na literatura, indicando que o processo de encapsulação de ativos melhora a eficácia do produto.

Gráfico 3: Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de rim (A) e fígado (B) humano tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato e o extrato de acafrão



* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).
 Fonte: Autoria própria (2022)

O gráfico 4 apresenta os resultados das absorvâncias médias dos tratamentos com as partículas de zeína/caseinato/quitosana sem o extrato de açafreão-da-terra.

Para as partículas de zeína/caseinato/quitosana (Tabela 10) as concentrações de 200 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (24 e 48 h), 300 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (24, 48 e 72 h) e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (48 h), para as células tumorais hepáticas (B), resultaram em absorvâncias médias estatisticamente maiores que as dos controles negativos, resultando em estímulo da proliferação celular, com viabilidades celulares (Tabela 10) maiores que 100%.

Com isso, pode-se inferir que o tratamento com as nanopartículas de zeína/caseinato/quitosana sem o extrato do açafreão-da-terra não surtiram efeito para células tumorais renais e hepáticas e houve estímulo à proliferação celular

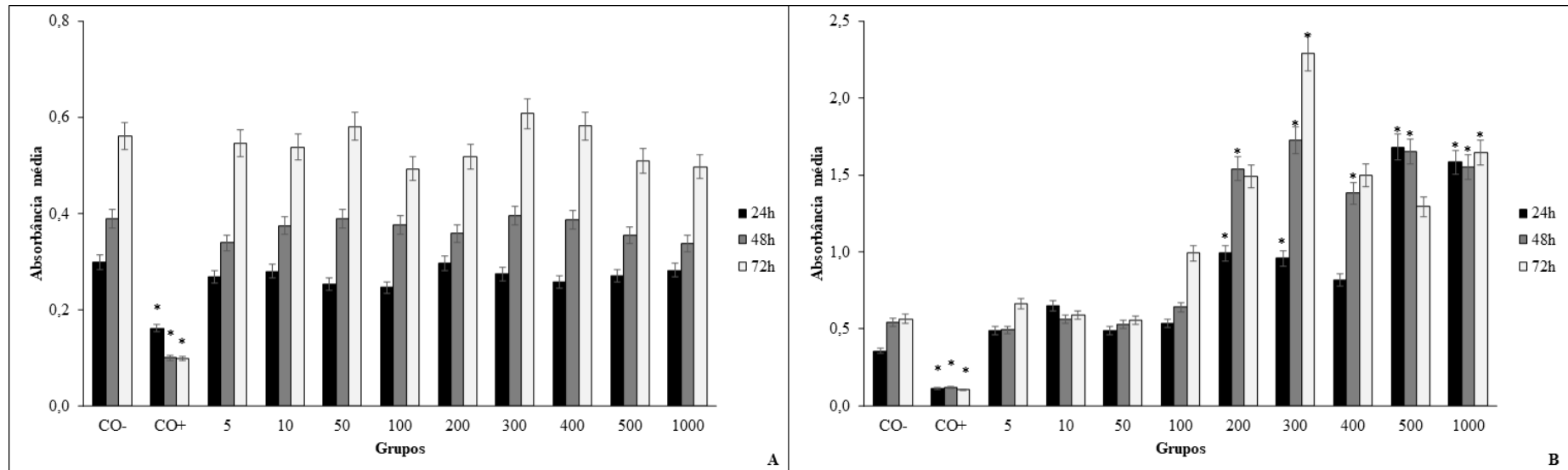
Tabela 10: Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de rim e fígado humano, tratadas com as diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato:quitosana, por 24, 48 e 72 h, pelo teste do MTT

Grupos	Carcinoma Renal			Hepatocarcinoma		
	VC [%]			VC [%]		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
CO+	54,10	25,67	17,45	31,01	21,69	18,27
5	89,95	86,91	97,33	136,87	90,90	116,77
10	93,63	96,28	95,90	181,42	103,31	104,06
50	84,92	100,00	103,47	136,87	97,06	98,50
100	82,41	96,53	87,71	150,28	118,01	175,11
200	99,33	92,04	92,16	276,68	282,90	262,84
300	91,96	101,67	108,19	267,32	317,10	405,12
400	86,60	99,09	103,74	228,49	254,04	264,43
500	90,62	91,14	90,83	469,69	303,95	228,60
1000	94,47	86,65	88,60	442,18	285,29	290,82

CO-: controle negativo. CO+: controle positivo

Fonte: Autoria própria (2022)

Gráfico 4: Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de rim (A) e fígado (B) humano tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato:quitosana



* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2022)

Os dados do Gráfico 5 apresentam os resultados das absorvâncias médias dos tratamentos das células tumorais de rim (A) e fígado (B) humano com as partículas de zeína/caseinato/quitosana e o extrato de açafração-da-terra. Neste caso, a concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou potencial citotóxico/antiproliferativo nos três tempos de exposição (24, 48 e 72 h) somente para a linhagem celular tumoral renal. Para esta linhagem, as concentrações de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (48 h), $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ (72 h) e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (24, 48 e 72 h) também foram citotóxicas. Já para a linhagem tumoral hepática humana, somente as concentrações de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (24 e 48 h) e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (24 h) foram citotóxicas.

As viabilidades celulares (Tabela 11) atingiram 44,80% para as células tumorais renais ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$, 72 h) e 64,21% para as células tumorais hepáticas ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$, 24 h) (Tabela 11).

Analisando-se os dados e fazendo um comparativo entre os tratamentos com nanopartículas de zeína/caseinato/quitosana sem e com extrato, pode-se inferir que nanopartículas com extrato apresentaram uma redução significativa das viabilidades celulares, principalmente em células tumorais hepáticas. Índices superiores a 460 % de viabilidade celular foi reduzido para 64,21% ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$, 24 h), após tratamento.

No entanto, a menor viabilidade celular obtida para as nanopartículas de zeína/caseinato/quitosana com extrato foi em células tumorais renais (44,80 % - $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, 72 h). E, fazendo mais um comparativo com o extrato livre para a concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, 72 h em células tumorais renais, pode-se observar que o extrato livre apresentou uma viabilidade celular de 96,18 %.

Um ponto que pode ser sugerido aqui é o fato de o revestimento com quitosana proporcionar um processo mais lento fazendo com que seja necessário as células necessitem de um tempo maior que 72 h em tratamento com as nanopartículas revestidas com quitosana para observarmos menores respostas, ou seja, menor viabilidade celular.

Com isso, pode-se concluir que o tratamento com extrato do açafração-da-terra revestido em nanopartículas de zeína/caseinato/quitosana é efetivo principalmente para células tumorais renais, além de que o processo de encapsulação em nanopartículas reduz a viabilidade e o estímulo à proliferação celular.

Tabela 11: Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de rim e fígado humano, tratadas com as diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato:quitosana e o extrato de açafão-da-terra, por 24, 48 e 72 h, pelo teste do MTT

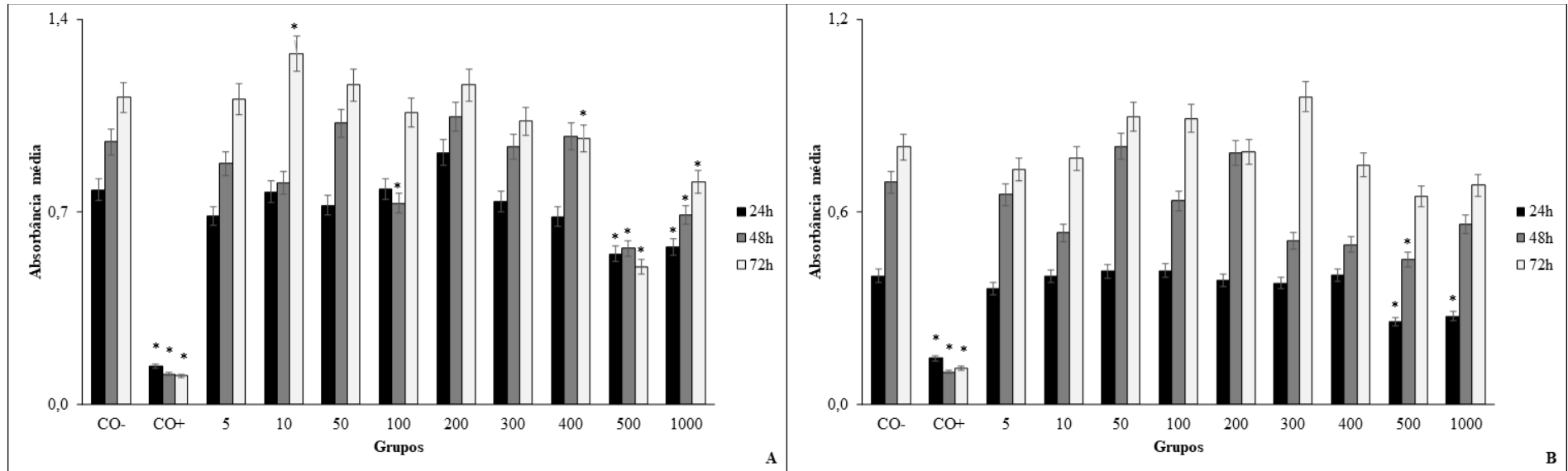
Grupos	Carcinoma Renal			Hepatocarcinoma		
	VC [%]			VC [%]		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
CO+	17,63	11,43	9,23	35,66	14,51	13,91
5	87,76	91,82	99,46	89,90	94,30	91,33
10	99,04	84,33	114,34	99,75	77,04	95,57
50	92,76	107,23	104,12	103,49	116,10	111,79
100	100,32	76,62	94,98	103,87	91,55	111,23
200	117,44	109,54	104,12	96,51	113,29	98,07
300	94,62	98,22	92,29	94,39	73,65	119,71
400	87,50	102,31	86,74	100,50	71,77	93,01
500	70,13	59,43	44,80	64,21	65,27	80,91
1000	73,27	72,01	72,49	68,58	81,01	85,15

CO-: controle negativo. CO+: controle positivo

Fonte: Autoria própria (2022)

Baspinar *et al.* (2018) prepararam nanopartículas de zeína/quitosana carregadas com curcumina e piperina com um tamanho médio de partícula de aproximadamente 500 nm e, o uso de uma concentração de curcumina de 10-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, resultou na redução de aproximadamente 50% das células de neuroblastoma. Assim, infere-se o poder do açafão-da-terra, principalmente da curcumina, em células tumorais.

Gráfico 5: Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de rim (A) e fígado (B) humano tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) das partículas de zeína:caseinato:quitosana e o extrato de acafrão



* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2022)

Sendo assim, pode-se concluir da análise de atividade citotóxica/antiproliferativa que as nanopartículas de zeína contendo o extrato do açafrão-da-terra e revestidas com caseinato de sódio e/ou quitosana, de uma maneira geral, apresentam melhores resultados para tratamentos em células tumorais renais (786-0) e hepáticas (HUH7.5) quando comparados ao extrato livre do açafrão-da-terra.

7 CONCLUSÃO

No trabalho, o extrato do açafão-da-terra preparado utilizando a temperatura de secagem de 40 °C e solvente extrator etanol:água (95:5, v/v) foi utilizado para a quantificação de compostos fenólicos e flavonoides e na atividade antioxidante do açafão-da-terra. Níveis elevados de compostos fenólicos e flavonoides foram quantificados. A condição analisada apresentou respostas para a eliminação dos radicais DPPH, ABTS e habilidade quelante do Fe (II), podendo ser indicados como fontes de efeitos antioxidantes.

As nanopartículas de ZeCsA e ZeCsQA foram desenvolvidas pelo método de precipitação antisolvente para encapsular o extrato do açafão-da-terra com o objetivo de superar sua menor solubilidade e estabilidade em água e aumentar sua absorção celular. ZeCsA e ZeCsQA foram obtidas com diâmetro hidrodinâmico abaixo de 230 nm. As nanopartículas de ZeCsA alcançaram uma eficiência de encapsulação superior a 66%, que diminuiu com o aumento da concentração do extrato, sugerindo que sua capacidade máxima de carregamento é em torno de 6,6%.

O extrato da *Curcuma longa* encapsulado em partículas de ZeCsA e ZeCsQA apresentaram atividade citotóxica/antiproliferativa para as células tumorais renais (786-0) e hepáticas (HUH7.5), podendo ser indicados como fontes de efeitos citotóxicos/antiproliferativos para esses tipos de células tumorais e para aplicação em indústria farmacêutica.

Os objetivos propostos ao trabalho foram atingidos. É de grande valia ressaltar a importância de novos estudos sobre essa planta medicinal dado os inúmeros relatos dos seus benefícios na literatura e no presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-LATEEF E. *et al.* Bioactive chemical constituents of *Curcuma longa* L. rhizomes extract inhibit the growth of human hepatoma cell line (HepG2), **Acta Pharmaceutica**, vol. 66, no. 3, pp. 387–398, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/acph-2016-0028>. Acesso em: 17 ago. 2022.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, p. 21-22, 1985.
- AGUILAR, T.A.F.; NAVARRO, B.C.H., PÉREZ, J.A.M. Endogenous antioxidants: a review of their role in oxidative stress. *In: A MASTER REGULATOR OF OXIDATIVE STRESS-THE TRANSCRIPTION FACTOR NRF2*, **InTech**, pp. 3e19, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/65715>. Acesso em: 17 ago 2022.
- AGGARWAL, B. B., & HARIKUMAR, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 41(1), 40–59, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.06.010>. Acesso em: 10 mar. 2021.
- AKTER, J. Antioxidant activity of different species and varieties of turmeric (*Curcuma* spp): Isolation of active compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 215, 9–17, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.09.002>. Acesso em 10 mar. 2021.
- ALBUQUERQUE, U. P. de; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16, 678–689, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2006000500015>. Acesso em: 10 mar. 2021.
- ALMEIDA, L. P. **Caracterização de pigmentos da *Curcuma longa*, L., avaliação da atividade antimicrobiana, morfogênese in vitro na produção de curcuminóides e óleos essenciais**. Dissertação de Doutorado. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 120, 2006. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/MBSA-6X4M39/1/tese_lucia.pdf. Acesso em: 17 ago. 2022.
- ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina**: bases clínicas y farmacológicas. Argentina: Isis, p. 439 - 444, 1998. ID: biblio-1211698. Acesso em: 17 ago. 2022.
- ANAND, P. *et al.* Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. **Molecular Pharmaceutics**, 4, 807–818, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/mp700113r>. Acesso em: 10 mar. 2021.
- ÂNGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 66, 01-09, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.53393/rial.2007.v66.32841>. Acesso em: 10 jul 2022.
- ARAÚJO, L.; *et al.* **Compostos bioativos em alimentos**. Setor de Alimentação e Nutrição/Pró-Reitoria de Assuntos Estudantis/UNIRIO, 2021. Disponível em:

<http://www.unirio.br/pro-reitorias-1/prae/nutricao-prae-1/quarentena/carregamento-boletins-setan-2021/boletim-no-12-2021#:~:text=Os CBA são compostos extra,uma deficiência ou do- ença. Acesso em: 10 jan. 2022.>

ARGOS, P. A Structural Model for Maize Zein Proteins. **The Journal Of Biological Chemistry**. 257(17), 9984–9990, 1982. PMID: 7107620. Acesso em: 17 ago 2022.

ASENSI, M.; *et al.* Natural polyphenols in cancer therapy, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 48 197e216, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10408363.2011.631268>. Acesso em: 17 ago 2022.

Assessing national capacity for the prevention and control of noncommunicable diseases: report of the 2019 global survey. Geneva: **World Health Organization**; 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240002319>. Acesso em: 17 ago. 2022.

BANERJEE, R., **J. Biomater.** Appl. 16, 14, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1106/RA7U-1V9C-RV7C-8QXL>. Acesso em: 17 ago. 2022.

BAR-SELA, G., EPELBAUM, R., SCHAFFER, M. Curcumin as an Anti-Cancer Agent: Review of the Gap Between Basic and Clinical Applications. **Current Medicinal Chemistry**, 17(3), 190–197, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/092986710790149738>. Acesso em: 10 jul. 2021.

BARANKEVICZ, B. **Poder antioxidante da cúrcuma (*Curcuma longa L.*) nos parâmetros neuroquímicos em ratos induzidos a depressão**. Dissertação, 54, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.11.2015.tde-12032015-152200>. Acesso em: 17 ago. 2022.

BASPINAR Y. Curcumin and piperine loaded zein-chitosan nanoparticles: Development and in-vitro characterisation. **Saudi Pharm J.** 2018 Mar;26(3):323-334. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.01.010>. Acesso em: 9 jul 2022.

BAYDA, S. *et al.* The History of Nanoscience and Nanotechnology: From **Chemical-Physical Applications to Nanomedicine**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>. Acesso em: 11 jul. 2021.

BELLICH, B.; *et al.* A. The Good, the Bad and the Ugly of Chitosans. **Mar. Drugs**, 14, 99, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md14050099>. Acesso em: 17 ago 2022.

BENER, M.; *et al.* Optimization of microwave-assisted extraction of curcumin from *Curcuma longa L.* (Turmeric) and evaluation of antioxidant Activity in Multi-Test systems. **Records of Natural Products**, v. 10, n. 5, p. 542– 554, 2016. Disponível em: <https://www.acgpubs.org/doc/2018080807041366-RNP-1506-122.pdf>. Acesso em: 17 ago 2022.

BHANA, S., WANG, Y., HUANG, X. Nanotechnology for enrichment and detection of circulating tumor cells. **Nanomedicine**, 10(12), 1973–1990, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/nnm.15.32>. Acesso em: 12 jun. 2022.

BINNIG, G.; QUATE, C.F.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Phys Rev Lett** 56:930–3, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>. Acesso em: 17 ago 2022.

BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning tunneling microscope. *Sci Am* 1985;253:50–6. Eigler DM, Schweizer EK. Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope. **Nature** 344:524–6, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1147/rd.441.0279>. Acesso em: 17 ago 2022.

BIRBEN, E. Oxidative stress and antioxidant defense, **W. Alle. Org. J.** 5, 9, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>. Acesso em: 17 ago 2022.

BISHT, S.; *et al.* Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (“nanocurcumin”): A novel strategy for human cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, 5, 1–18, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1477-3155-5-3>. Acesso em: 14 ago. 2021.

BOROSKI, M. *et al.* **ANTIOXIDANTES** - Princípios e Métodos Analíticos. 1. ed. Curitiba: [s.n.], 2015.

BOUAYED, J., HOFFMANN, L., BOHN, T. Exogenous antioxidants double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses, **Oxid. Med. Cell. Longev.** 3, 228e237, 2010. Disponível em: doi: 10.4161/oxim.3.4.12858. Acesso em: 17 ago 2022.

BRAGA, J. C. B.; SILVA, L. R. da. Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil de consumidores e sua relação com a pandemia de COVID-19 / Consumption of medicinal plants and herbal medicines in Brazil: consumer profile and its relationship with the COVID-19 pandemic. **Brazilian Journal of Health Review**, 4(1), 3831–3839, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.34119/bjhrv4n1-303>. Acesso em: 5 jan. 2022.

BRAYTON CF. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Vet.** 1986 Jan;76(1):61-90. PMID: 3510103. Acesso em: 17 ago 2022.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, **LWT-Food Sci. Technol.**, 22, 25-30, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5). Acesso em 17 ago 2022.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes**. Brasília - DF, 2013. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5355698/Guia+Seguran%C3%A7a+de+Alimentos.pdf/dae93caa-7418-4b9a-97f2-2ec9ebc139e2>. Acesso em: 17 ago. 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopéia Brasileira**, 6ª ed., 2019.

BRASIL Instituto Nacional de Câncer (INCA) / Ministério da Saúde (MS) **Tipo De Câncer: Câncer De Fígado**, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-figado>. Acesso em: 20 de junho de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS** 06/03/2009. Disponível em: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf. Acesso em: 23 set. 2020.

CABRA, V.; *et al.* Effect of temperature and pH on the secondary structure and

processes of oligomerization of 19 kDa alpha-zein. **Biochim. Biophys. Acta** 1764, 1110–1118, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.04.002>. Acesso em: 10 jun 2022.

CAI, D.; *et al.* A comprehensive review on innovative and advanced stabilization approaches of anthocyanin by modifying structure and controlling environmental factors. **Food Chemistry**, 366 (April 2021), 130611, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130611>. Acesso em: 20 mai. 2022.

CALERO, N.; *et al.* Influence of chitosan concentration on the stability, microstructure and rheological properties of O/W emulsions formulated with high-oleic sunflower oil and potato protein. **Food Hydrocolloids**, 30(1), 152–162, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.004>. Acesso em: 17 ago 2022.

CÂNCER DE RIM. **Sírio Libanês**, 2022. Disponível em: <https://hospitalsiriolibanes.org.br/blog/urologia/cancer-de-rim-saiba-mais>. Acesso em 20 de junho de 2022.

CÂNCER DE RIM TEM CURA? **Sociedade Brasileira de Cirurgia Oncológica**, 2022. Disponível em: <https://sbco.org.br/cancer-de-rim-tem-cura/>. Acesso em 20 de junho de 2022.

CÂNCER DE FÍGADO. **Einstein**, 2022. Disponível em: <https://www.einstein.br/especialidades/oncologia/tipos-cancer/cancer-figado>. Acesso em: 20 de junho de 2022.

CARMO, T. N. do.; *et al.* Plantas Mediciniais E Ritualísticas Comercializadas Na Feira Da 25 De Setembro, Belém, Pará. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, 11(21), 3440–3467, 2015. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2015b/saude/plantas%20mediciniais.pdf>. Acesso em: 17 ago 2022.

CAROCHO, M., FERREIRA, I.C., A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, **Food Chem. Toxicol.** 51, 15e25, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>. Acesso em: 17 ago 2022.

CERVEIRA, M. M.; *et al.* Bioprospection of novel synthetic monocurcuminoids: Antioxidant, antimicrobial, and in vitro cytotoxic activities. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 133. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111052>, 2021. Acesso em: 17 ago 2022.

CFR - Code of Federal Regulations Title 21. (n.d.). Retrieved October 14, 2020, Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1984&SearchTerm=gras>. Acesso em: 12 mai. 2021.

CHANG, C.; *et al.* Pectin coating improves physicochemical properties of caseinate/zein nanoparticles as oral delivery vehicles for curcumin. **Food Hydrocolloids**, 70, 143–151, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.033>. Acesso em: 13 jan. 2022.

CHEN, L., REMONDETTO, G. E., & SUBIRADE, M. Food protein-based materials as

nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 17(5), 272–283, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.011>. Acesso em: 23 jul. 2021.

CHEN, Z., *et al.* Interaction characterization of preheated soy protein isolate with cyanidin- 3-O-glucoside and their effects on the stability of black soybean seed coat anthocyanins extracts. *Food Chemistry*, 271, 266–273, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.170>. Acesso em: 17 ago. 2022.

CHEN, Y., MOHANRAJ, V.J., PARKIN, J.E., Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an anti-angiogenesis peptide, *Lett. Peptide Sci.* 10, 627, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10989-004-2433-4>. Acesso em: 17 ago. 2022.

CHUMROENPHAT, T.; *et al.* Changes in curcuminoids and chemical components of turmeric (*Curcuma longa L.*) under freeze-drying and low-temperature drying methods. *Food Chemistry*, 339 (August 2020), 128121, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128121>. Acesso em: 15 abr. 2021.

CORDANI, M.; SOMOZA, Á. Targeting autophagy using metallic nanoparticles: A promising strategy for cancer treatment. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 1215–1242, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2973-y>. Acesso em: 17 ago 2022.

CULTURA DO MILHO: melhoramento genético supera os desafios da lavoura. *Crop Life Brasil*, 2020. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/noticias/cultura-do-milho/#:~:text=Al%C3%A9m%20da%20utiliza%C3%A7%C3%A3o%20como%20alimento,para%20a%20de%202020%2F2021>. Acesso em: 18 de maio de 2022.

DA COSTA SILVA, D., CERCHIARO, G., & HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. *Química Nova*, 34(2), 300–305, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000200024>. Acesso em: 24 mai. 2021.

D'ARCHIVIO, M.; *et al.* Ist. *Super Sanità* 2007, 43, 348. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Claudio-Giovannini/publication/5642981_Polyphenols_dietary_sources_and_bioavailability/links/0912f507fae67626a5000000/Polyphenols-dietary-sources-and-bioavailability.pdf. Acesso em: 17 ago 2022.

DELGADO-VARGAS, F., JIMENEZ, A. R., & PAREDES-LOPEZ, O. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *In Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40:3 (Issue October), 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>. Acesso em: 17 ago. 2022.

DENRE, M. The determination of vitamin C, total phenol and antioxidant activity of some commonly cooking spices crops used in West Bengal. *Int. J. Plant Physiol. Biochem.* 6, 66–70, 2014. Disponível em: https://academicjournals.org/article/article1407933391_Denre.pdf. Acesso em: 17 ago. 2022.

DEVASAGAYAM, T.P.A.; *et al.* Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *J. Assoc. Physicians India*, 52, 4, 2004. PMID: 15909857. Acesso em: 17 ago. 2022.

DICKINSON, E. Properties of emulsions stabilized with milk proteins: Overview of some recent developments. **Journal of Dairy Science**, 80(10), 2607–2619, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76218-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76218-0). Acesso em: 17 ago. 2022.

DOMINGO-ESPÍN, J.; *et al.* Engineered biological entities for drug delivery and gene therapy: Protein nanoparticles. In **Progress in Molecular Biology and Translational Science** (Vol. 104), 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416020-0.00006-1>. Acesso em: 02 fev. 2022.

DONG, F.; *et al.* Doxorubicin-loaded biodegradable self-assembly zein nanoparticle and its anti-cancer effect: Preparation, in vitro evaluation, and cellular uptake. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 140, 324–331, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.048>. Acesso em: 10 nov. 2020.

DONG, PADUA & WANG. Controlled formation of hydrophobic surfaces by self-assembly of an amphiphilic natural protein from aqueous solutions. **Soft Matter** 9(25), 5933–5941, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3sm50667c>. Acesso em: 10 nov. 2020.

ELZOGHBY, A. O., ABO EL-FOTOH, W. S., & ELGINDY, N. A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, 153(3), 206–216, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.02.010>. Acesso em: 05 abr. 2021.

ELZOGHBY, A. O., SAMY, W. M., & ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, 157(2), 168–182, 2012a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.031>. Acesso em: 25 abr. 2021.

ELZOGHBY, A. O., SAMY, W. M., & ELGINDY, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**, 161(1), 38–49, 2012b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.036>. Acesso em: 25 abr. 2021.

EMBUSCADO, M.E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**, 18(Part B), 811–819, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.005>. Acesso em: 24 abr. 2021.

FERREIRA, Daniel Furtado. **SISVAR**: A COMPUTER ANALYSIS SYSTEM TO FIXED EFFECTS SPLIT PLOT TYPE DESIGNS.

FIRMO, W.; *et al.* Contexto Histórico, Uso Popular E Concepção Científica Sobre Plantas Medicinais. **Cad. Pesq.**, 18, 2011. Disponível em: <http://periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/cadernosdepesquisa/article/view/746/2578>. Acesso em: 17 ago. 2022.

FIRUZI, O.; *et al.* Antioxidant therapy: current status and future prospects, **Curr. Med. Chem.** 18, 3871e3888, 2011. Disponível em: <http://doi.org/10.2174/092986711803414368>. Acesso em: 17 ago. 2022.

FONTES, S. **Curcuma longa L.: Caracterização química e estudo da capacidade antioxidante.** Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas -

SP, 2018.

FOROUZANFAR, F.; *et al.* Neuroprotective effects of curcumin through autophagy modulation. **IUBMB Life**, 72, 652–664, 2020. Disponível em: <http://doi.org/10.1002/iub.2209>. Acesso em: 17 ago. 2022.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de própolis, **Ciê. Tecnol. Aliment.**, 26, 171–178, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000100028>. Acesso em: 17 ago. 2022.

GALI, L.; *et al.* Formulation and characterization of zein/gum arabic nanoparticles for the encapsulation of a rutin-rich extract from *Ruta chalepensis* L. **Food Chemistry**, 367, 129982, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129982>. Acesso em: 05 nov. 2020.

GARG, U.; *et al.* Current Advances in Chitosan Nanoparticles Based Drug Delivery and Targeting. **Adv. Pharm. Bull.** 2019, 9, 195–204. Disponível em: <https://doi.org/10.15171/apb.2019.023>. Acesso em: 17 ago. 2022.

GODIC, A.; *et al.* The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/860479>. Acesso em: 23 fev. 2022.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; CASAGRANDE SIPOLI, C.; DE LA TORRE, L. G., & LÓPEZ-RUBIO, A. Microencapsulation structures based on protein-coated liposomes obtained through electrospraying for the stabilization and improved bioaccessibility of curcumin. **Food Chemistry**, 233, 343–350, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.133>. Acesso em: 02 ago. 2022.

GORRINI, C., HARRIS, I.S., MAK, T.W., Modulation of oxidative stress as an anti-cancer strategy, **Nat. Rev. Drug Discov.** 12, 931. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd4002>. Acesso em: 17 ago. 2022.

GÜLÇİN, I.; *et al.* Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. In **Journal of Ethnopharmacology** (Vol. 79), 2002. Disponível em: www.elsevier.com/locate/jethpharm. Acesso em: 23 mai. 2022.

HARTONO, S. B.; *et al.* Amine functionalized cubic mesoporous silica nanoparticles as an oral delivery system for curcumin bioavailability enhancement. **Nanotechnology**, 27(50), 1–7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/50/505605>. Acesso em: 23 mai. 2022.

HATCHER, H. *et al.* Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 65(11), 1631–1652, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7452-4>. Acesso em: 20 fev. 2021.

HAWKINS, M. J., SOON-SHIONG, P., & DESAI, N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 60(8), 876–885, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.044>. Acesso em: 02 fev. 2022.

HIDALGO, T.; *et al.* Chitosan-coated mesoporous MIL-100(Fe) nanoparticles as improved bio-compatible oral nanocarriers. **Scientific Reports**, 7(January), 1–14, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep43099>. Acesso em: 10 jan. 2022.

HOLLMAN, P.C.H. & KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food Chem. Toxicol.** 37: 937–942, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(99\)00079-4](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(99)00079-4). Acesso em: 17 ago. 2022.

HU, K.; *et al.* Core-shell biopolymer nanoparticle delivery systems: Synthesis and characterization of curcumin fortified zein-pectin nanoparticles. **Food Chemistry**, 182, 275–281, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.009>. Acesso em: 10 mai. 2021.

HU, K., & MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of biopolymer nanoparticles by antisolvent precipitation and electrostatic deposition: Zein-alginate core/shell nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, 44, 101–108, 2015.

HU, S.; *et al.* Development of tannic acid cross-linked hollow zein nanoparticles as potential oral delivery vehicles for curcumin. **Food Hydrocolloids**, 61, 821-831, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.006>. Acesso em: 17 ago. 2022.

HUSAIN, N. & KUMAR, A. Reactive oxygen species and natural antioxidants: a review, **Adv. Bio. Res.** 3. 164e175, 2012.

IRACHE, J. M., & GONZÁLEZ-NAVARRO, C. J. Zein nanoparticles as vehicles for oral delivery purposes. **Nanomedicine**, 12(11), 1209–1211, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0075>. Acesso em: 11 nov. 2020.

JAGETIA, G. C.; *et al.* Antarth, a polyherbal preparation protects against the doxorubicin-induced toxicity without compromising its antineoplastic activity. **Phytotherapy Research**, 19(9), 772–778, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.1713>. Acesso em: 10 nov. 2020.

KAMALY, N.; *et al.* Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. **Chemical Society Reviews**, 41, 2971–3010, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c2cs15344k>. Acesso em: 12 dez. 2020.

KAMEL, K. M.; *et al.* Chitosan- coated cinnamon/oregano-loaded solid lipid nanoparticles to augment 5-fluorouracil cytotoxicity for colorectal cancer: Extract standardization, nanoparticle optimization, and cytotoxicity evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 65(36), 7966–7981, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03093>. Acesso em: 17 ago. 2022.

KEBEDE, B. H.; *et al.* Free radical scavenging capacity, antibacterial activity and essential oil composition of turmeric (*Curcuma domestica*) varieties grown in Ethiopia. In **Heliyon** (Vol. 7, Issue 2), 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e062392:28:57>. Acesso em: 10 jan. 2021.

KELLER, B., **Trends Food Sci. Technol.** 12, 25, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00044-9). Acesso em: 17 ago. 2022.

KELKEL, M.; *et al.* Potential of the dietary antioxidants resveratrol and curcumin in prevention and treatment of hematologic malignancies, **Mol** 7035e7074, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules15107035>. Acesso em: 17 ago. 2022.

KHAN, I., SAEED, K., & KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities.

Arabian Journal of Chemistry, 12(7), 908–931, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>. Acesso em: 23 fev. 2021.

KHUDA-BUKHSH A.R.; *et al.* Crude extract of turmeric reduces hepato-toxicity and oxidative stress in rats chronically fed carcinogens, **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, vol. 5, no. 1, pp. 1–38, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2202/1553-3840.1185>. Acesso em: 17 ago. 2022.

KIM, G.H.; *et al.* The role of oxidative stress in neurode- generative diseases, **Exp. Neurobiol.** 24, 325e340, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>. Acesso em: 17 ago. 2022.

KINNEAR, C.; *et al.* Form FollowsFunction: Nanoparticle Shape and Its Implications for Nanomedicine.**Chem. Rev.** 117, 11476–11521, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00194>. Acesso em: 17 ago. 2022.

KON E.; *et al.* Resveratrol Enhances mRNA and siRNA Lipid Nanoparticles Primary CLL Cell Transfection. **Pharmaceutics**. 2020 Jun 7;12(6):520. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060520>. Acesso em: 17 ago. 2022.

KROTO H.W.; *et al.* C60: buckminsterfullerene. **Nature** 318:162–3, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/318162a0>. Acesso em: 17 ago. 2022.

KULKARNI, S., PRABHAKAR, B., & SHENDE, P. Stabilization of lipid vesicles: Upcoming strategic insights for product development. **Journal of Molecular Liquids**, 348, 118430, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118430>. Acesso em: 10 jun. 2022.

KUMAR, S. The importance of antioxidant and their role in pharmaceutical science science e a review, **Asian. J. Med. Chem. Pharm. Sci.** 1 27e44, 2014.

KUMARI, A., YADAV, S. K., & YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 75(1), 1–18, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>. Acesso em: 15 mar. 2021.

KUHNAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World Rev. Nutr. Diet.** 24: 117–191, 1976. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000399407>. Acesso em: 17 ago. 2022.

LAI, L. F., & GUO, H. X. Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, 404(1–2), 317–323, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.11.025>. Acesso em: 10 out. 2020.

LAJOLO, F. **Perspectivas dos alimentos funcionais, bioativos e saúde. In: Alimentos funcionais e compostos bioativos: ciência, avaliação e consumo.** São Paulo: ILSI Brasil - International Life Sciences Institute do Brasil, 2019. Disponível em: <https://ilsibrasil.org/wp-content/uploads/sites/9/2021/02/Alimentos-Funcionais-e-Compostos-Bioativos-correcao.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2022.

LAOUIINI, A.; *et al.* Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, 1(2), 147–168, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1166/jcsb.2012.1020>. Acesso em: 23 jan. 2021.

LARKINS, B., CRAIG, L., & WALLACE, J. Modification of maize-seed-protein quality. **American Society for Clinical Nutrition**, 58, 264S-9S, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/58.2.264S>. Acesso em: 17 ago. 2022.

LEE, P.Y.; WONG, K.K.Y. Nanomedicine: A new frontier in cancer therapeutics. **Curr. Drug Deliv.** 8,245–253, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/156720111795256110>. Acesso em: 17 ago. 2022.

LEMARCHAND, C., *et al.* Physico-chemical characterization of polysaccharide-coated nanoparticles, **J. Control. Release** 108 (1) 97–111, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.07.014>. Acesso em: 17 ago. 2022.

LI, J.; *et al.* Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. **Food Hydrocolloids**, 60, 138–147, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.016>. Acesso em: 25 nov. 2021.

LI, K.-K.; *et al.* Preparation of water-soluble antimicrobial zein nanoparticles by a modified antisolvent approach and their characterization. **J. Food Eng.** 119, 343–352, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.038>. Acesso em: 8 jun. 2022.

LIAN, T. & HO, R. J., **J. Pharm. Sci.** 90, 667, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps.1023>. Acesso em: 17 ago. 2022.

LIN, J. K., PAN, M. H., & LIN-SHIAU, S. Y. Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. **BioFactors**, 13(1–4), 153–158, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/biof.5520130125>. Acesso em: 15 set. 2020.

LIANG, H.; *et al.* Supramolecular design of coordination bonding architecture on zein nanoparticles for pH-responsive anticancer drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 136, 1224–1233, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.09.037>. Acesso em: 11 nov. 2020.

LICHTENBERG, D. & PINCHUK, I. Mini review Oxidative stress, the term and the concept. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 461(3), 441–444, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.062>. Acesso em: 03 mar. 2021.

LIN, J. K., PAN, M. H., & LIN-SHIAU, S. Y. Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. **BioFactors**, 13(1–4), 153–158, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/biof.5520130125>. Acesso em: 02 fev. 2021.

LING, J.; *et al.* Anti-hyperlipidaemic and antioxidant effects of turmeric oil in hyperlipidaemic rats. **Food Chemistry**, 130(2), 229–235, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.039>. Acesso em: 15 nov. 2021.

LIU, F.; *et al.* Polyphenols intervention is an effective strategy to ameliorate inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 72(1), 14–25, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09637486.2020.1760220>. Acesso em: 20 set. 2021.

LIU, N., & PARK, H. J. Chitosan-coated nanoliposome as vitamin E carrier. **Journal of Microencapsulation**, 26, 235–242, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02652040802273469>. Acesso em: 17 ago. 2022.

LIU, Q.; *et al.* Fabrication of curcumin-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate/sodium alginate: Curcumin solubility, thermal properties, rheology, and stability. **Process Biochemistry**, 94(February), 30–38, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.017>. Acesso em: 19 out. 2020.

LIU, Q.; *et al.* Encapsulation of curcumin in zein/ caseinate/sodium alginate nanoparticles with improved physicochemical and controlled release properties. **Food Hydrocolloids**, 93(February), 432–442, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.003>. Acesso em: 10 set. 2020.

LIU, R. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. **Journal of Nutrition**, 134(12 SUPPL.), 3479–3485, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3479s>. Acesso em: 10 set. 2020.

LIU, R.; *et al.* A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products, **Antioxidants** 5, 32, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox5030032>. Acesso em: 17 ago. 2022.

LUIS, A. I. S.; *et al.* Zein Nanoparticles Impregnated with Eugenol and Garlic Essential Oils for Treating Fish Pathogens. **ACS Omega**, 5(25), 15557–15566, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01716>. Acesso em: 25 mai. 2021.

LUIZ M. T.; *et al.* Folic acid-modified curcumin-loaded liposomes for breast cancer therapy, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Volume 645, 128935, ISSN 0927-7757, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.128935>. Acesso em: 30 mar. 2021.

LUO, Y., & WANG, Q. Zein-based micro-and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review. **Journal of Applied Polymer Science**, 131(16), 40696, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.40696>. Acesso em: 17 ago. 2022.

LUO, Y. C., TENG, Z., & WANG, Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 60(3), 836–843, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf204194z>. Acesso em: 17 ago. 2022.

LUO, Y.; *et al.* Preparation and characterization of Zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro Controlled release study. **Colloids and Surfaces B**, 85, 145–152, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.020>. Acesso em: 17 ago. 2022.

MA, J. J.; *et al.* Cellular Uptake and Intracellular Antioxidant Activity of Zein/Chitosan Nanoparticles Incorporated with Quercetin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 66(48), 12783–12793, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04571>. Acesso em: 27 out. 2021.

MAIA, N. B.; *et al.* Influência de tipos de rizomas de multiplicação no crescimento de curcuma. In **Bragantia** (Vol. 54, Issue 1, pp. 33–37), 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0006-87051995000100004>. Acesso em: 10 set. 2020.

MAJOLO, C. *et al.* Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

[online]. 2014, v. 16, n. 3, pp. 505-512. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_109. Epub 11 Set 2014. ISSN 1983-084X. https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_109. Acesso em: 2 ago. 2022.

MARCHI, J. P.; *et al.* *Curcuma Longa L.*, O Açafrão Da Terra, E Seus Benefícios Medicinais. **Arquivos de Ciências Da Saúde Da UNIPAR**, 20(3), 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v20i3.2016.5871>. Acesso em: 10 set. 2020.

MARTINEZ-CORREA, H.A.; *et al.* **Supercrit. Fluids** 119, 122–129, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.08.017>. Acesso em: 17 ago. 2022.

MARY, C. P. V., VIJAYAKUMAR, S., & SHANKAR, R. Metal chelating ability and antioxidant properties of Curcumin-metal complexes – A DFT approach. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 79, 1–14, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.10.022>. Acesso em: 28 out. 2021.

MAURER, N., FENSKE, D. B., & CULLIS, P. R., **Expert Opin. Biol. Ther.** 1, 923, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/14712598.1.6.923>. Acesso em: 17 ago. 2022.

MCCLEMENTS, D. J. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 17(5), 235-245, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.06.002>. Acesso em: 17 ago. 2022.

MEHNERT, W; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 4/25/;47(2–3):165-96, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00105-3). Acesso em: 17 ago. 2022.

MICHEL, J., ABD RANI, N. Z., & HUSAIN, K. A Review on the Potential Use of Medicinal Plants From Asteraceae and Lamiaceae Plant Family in Cardiovascular Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, 11(June), 1–26, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00852>. Acesso em: 11 mai. 2021.

MINUSSI, R.C; *et al.* Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines, **Food Chem.**, 82, 409-416, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00590-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00590-3). Acesso em: 17 ago. 2022.

MITTLER, R., ROS are good, Trends, in: **Plant Sci** vol. 22, pp. 11e19, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>. Acesso em: 17 ago. 2022.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods** 65(1-2):55-63, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4). Acesso em: 17 ago. 2022.

MUN, S., DECKER, E. A., & MCCLEMENTS, D. J. Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant-chitosan membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, 296(2), 581–590, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.09.023>. Acesso em: 17 ago. 2022.

MUT-SALUD, N.; *et al.* Antioxidant intake and antitumor therapy: toward nutritional recommendations for optimal results, **Oxid. Med. Cell. Longev.** 6719534, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/6719534>. Acesso em: 17 ago. 2022.

NAHAK, G. & SAHU, R.K. Evaluation of antioxidant activity in ethanolic extracts of five curcuma species. **IRJP** 2, 243–248, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/285223372>. Acesso em: 17 ago. 2022.

NANDITHA, B., & PRABHASANKAR, P. Antioxidants in bakery products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(1), 1–27, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408390701764104>. Acesso em: 22 set. 2020.

NEHA, K.; *et al.* Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 178, 687–704, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>. Acesso em: 30 out. 2020.

NISHIOKA, S. A. **Existe algum perigo de vacinas contra a COVID-19 de plataforma de RNA mensageiro alterar o DNA de quem foi vacinado?** UNA-SUS, 2021. Disponível em: <https://www.unasus.gov.br/especial/covid19/markdown/489>. Acesso em: 24 de maio de 2022.

NORKAEW, O.; *et al.* Effect of wall materials on some physicochemical properties and release characteristics of encapsulated black rice anthocyanin microcapsules. **Food Chemistry**, 294, 493–502, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.086>. Acesso em: 17 ago. 2022.

OLIVEIRA, D., & BASTOS, D. Biodisponibilidade de Ácidos Fenólicos. **Química Nova**, 34, 1051–1056, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600023>. Acesso em: 17 ago. 2022.

PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho.** Embrapa - Circular Técnica, 1679–1150, 1–6, 2006. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMS/19619/1/Circ_75.pdf. Acesso em: 17 ago. 2022.

PALIWAL, R., & PALAKURTHI, S. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, 189, 108–122, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.036>. Acesso em: 29 nov. 2020.

PARI, L., & SARAVANAN, R. Antidiabetic effect of diasulin, a herbal drug, on blood glucose, plasma insulin and hepatic enzymes of glucose metabolism hyperglycaemic rats. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, 6(4), 286–292, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-8902.2004.0349.x>. Acesso em: 16 fev. 2021.

PARK, C. E., PARK, D. J., & KIM, B. K. Effects of a chitosan coating on properties of retinol-encapsulated zein nanoparticles. **Food Sci. Biotechnol**, 24(5), 1725–1733, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0224-7>. Acesso em: 17 ago. 2022.

PASCOLI, M., DE LIMA, R., & FRACETO, L. F. Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: A mini-review. **Frontiers in Chemistry**, 6(JAN), 1–5, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00006>. Acesso em: 30 mai. 2021.

PATEL, A. R. *et al.* Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 423-429, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.054>. Acesso em: 17 ago. 2022.

PATEL, A. R., BOUWENS, E. C., & VELIKOV, K. P. Sodium caseinate stabilized zein colloidal particles. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 58(23), 12497–12503, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf102959b>. Acesso em: 17 ago. 2022.

PATEL, A. R.; *et al.* Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. **Food Chemistry**, 133(2), 423–429, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.054>. Acesso em: 08 abr. 2021.

PATIL, V.; *et al.* Phytochemical Analysis and Antibacterial Evaluation of Curcuma. 10(April), 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(4\).2000-03](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).2000-03). Acesso em: 11 set. 2020.

PAULUK, D.; *et al.* Chitosan-coated zein nanoparticles for oral delivery of resveratrol: Formation, characterization, stability, mucoadhesive properties and antioxidant activity. **Food Hydrocolloids**, 94(December 2018), 411–417, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.042>. Acesso em: 13 out. 2021.

PEPPAS, N. A. Historical perspective on advanced drug delivery: How engineering design and mathematical modeling helped the field mature. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 65(1), 5–9, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.040>. Acesso em: 17 jun. 2021.

PERSSON, T., POPESCU, B.O. and CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail. **Oxidative Medicine and Cell Longevity**, 1-11, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/427318>. Acesso em: 10 mar. 2021.

PHAM-HUY, L., HE, H. & PHAM-HUY, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. In www.ijbs.org **Int J Biomed Sci** (Vol. 4, Issue 2), 2008. Disponível em: www.ijbs.org. Acesso em: 13 mar. 2021.

PISOSCHI, A.M. & POP, A., The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review, **Eur. J. Med. Chem.** 97, 55e74, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>. Acesso em: 17 ago. 2022.

PRASANNA, B. M.; *et al.* **Maize: Quality Protein Maize**. Encyclopedia of Food Grains: Second Edition, 4–4(July), 420–424, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00223-0>. Acesso em: 18 out. 2020.

QUEIROZ, E. R. **Frações de lichia: caracterização química e avaliação de compostos bioativos**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012. Disponível em: http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/810/1/DISSERTACAO_Fra%C3%A7%C3%B5es%20de%20lichia%3A%20caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20qu%C3%ADmica%20e%20avalia%C3%A7%C3%A3o%20de%20compostos%20bioativos.pdf. Acesso em: 17 ago. 2022.

QUILES, J. L.; *et al.* *Curcuma longa* extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 22(7), 1225–1231, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000020676.11586.F2>. Acesso em: 17 set. 2021.

RAO J. P. & GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Prog. Polym. Sci.** 36, 887–913, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>. Acesso em: 17 ago. 2022.

REDE NACIONAL DE NANOBIOTECNOLOGIA - Histórico. **Nanobiotec.** Disponível em: <https://nanobiotec.iqm.unicamp.br/>. Acesso em: 24 de maio de 2022.

RIZEQ, B.R.; *et al.* Synthesis, Bioapplications, and Toxicity Evaluation of Chitosan-Based Nanoparticles. **Int. J. Mol. Sci.**, 20, 5776, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20225776>. Acesso em: 17 ago. 2022.

ROLDO, M.; *et al.* Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery: Synthesis and in vitro evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 57(1), 115–121, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00157-7](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00157-7). Acesso em: 12 nov. 2020.

ROY, S.G.; *et al.* A review on chitosan nanoparticles applications in drug delivery. **J Pharm. Phytochem.**, 7, 1–4, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.22271/phyto.2018.v7.isp6.1.01>. Acesso em: 17 ago. 2022

RUFINO, M.S.M; *et al.* **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**, Comunicado Técnico Embrapa, 127, 1-4, 2007. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10224/1/Cot_127.pdf. Acesso em: 17 ago. 2022.

SABIÃO, T. S.; *et al.* Caracterização Centesimal e Mineral da Cúrcuma (*Curcuma Longa L.*). In: **Anais do Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição**. Anais Ouro Preto (MG) Centro de Artes e Convenções da UFOP, 2019. Disponível em: [https://www.even3.com.br/anais/CONAN/142145-CARACTERIZACAO-CENTESIMAL-E-MINERAL-DA-CURCUMA-\(CURCUMA-LONGA-L\)](https://www.even3.com.br/anais/CONAN/142145-CARACTERIZACAO-CENTESIMAL-E-MINERAL-DA-CURCUMA-(CURCUMA-LONGA-L)). Acesso em: 08/06/2022.

SABIR, S. M.; *et al.* Phytochemical Analysis and Biological Activities of Ethanolic Extract of *Curcuma longa* Rhizome. **Brazilian Journal of Biology**, 81(3), 737–740, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.230628>. Acesso em: 12 mai. 2021.

SALAMA, S. M.; *et al.* Hepatoprotective effect of ethanolic extract of *Curcuma longa* on thioacetamide induced liver cirrhosis in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 13, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-56>. Acesso em: 20 jun. 2022.

SALMERÓN-MANZANO, E., GARRIDO-CARDENAS, J. A., & MANZANO-AGUGLIARO, F. Worldwide research trends on medicinal plants. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 17(10), 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph17103376>. Acesso em: 15 mai. 2021.

SANTOS-SÁNCHEZ, Norma F.; SALAS-CORONADO, Raúl; VALADEZ-BLANCO, Rogelio; HERNÁNDEZ-CARLOS, Beatriz; GUADARRAMA-MENDOZA, Paula C. Natural antioxidant extracts as food preservatives. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 16, n. 4, p. 361-370, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.17306/J.AFS.0530>. Acesso em: 17 ago. 2022.

SARAVANAN, R., & PARI, L. Antihyperlipidemic and antiperoxidative effect of Diasulin, a polyherbal formulation in alloxan induced hyperglycemic rats. **BMC Complementary and Alt**, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-5-14>. Acesso em: 20 jun. 2021.

SAVALL, S. P., A.; *et al.* **Efeitos da Nanocápsulas de Curcumina Contra Prejuízos na Memória Induzida por STZ-ICV em Ratos**. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 12, n. 2, 4 dez. 2020. Disponível em: https://ei.unipampa.edu.br/uploads/evt/arq_trabalhos/21713/etp1_resumo_expandido_21713.pdf. Acesso em: 17 ago. 2022.

SHAHIDI, F., JANITHA, P. K., & WANASUNDARA, P. D. Phenolic Antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 32(1), 67–103, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408399209527581>. Acesso em: 20 nov. 2020.

SHARMA, R. A., GESCHER, A. J., & STEWARD, W. P. Curcumin: The story so far. **European Journal of Cancer**, 41(13), 1955–1968, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009>. Acesso em: 19 mar. 2021.

SHASHA, D. Reversed Phase HPLC-UV Quantitation of BHA, BHT and TBHQ in Food Items Sold in Bindura Supermarkets, Zimbabwe. **International Research Journal of Pure and Applied Chemistry**, 4(5), 578–584, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.9734/irjpac/2014/10419>. Acesso em: 24 out. 2021.

SHISHODIA, S., SETHI, G., & AGGARWAL, B. B. Curcumin: Getting back to the roots. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1056, 206–217, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1196/annals.1352.010>. Acesso em: 11 jan. 2021.

SHUKLA, R. & CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 3, p. 171-192, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(00\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00064-9). Acesso em: 17 ago. 2022.

SILVA, A. C., Efeito da adição dietética de milho de alta qualidade protéica em camundongos. **Revista de Nutrição**, 20(3), 249–255, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1415-52732007000300003>. Acesso em: 13 set. 2020.

SILVA, AC; GONZÁLEZ-MIRA, E; GARCÍA, ML; EGEEA, MA; FONSECA, J; SILVA, R. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 8/1;/86(1):158-65, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.03.035>. Acesso em: 17 ago. 2022.

SILVA, J. L. F. & Guerra, G. G. O. **Caracterização de nanopartículas de zeína contendo luteína obtidas pela técnica de nanoprecipitação**. Simpósio de Engenharia e Ciência de Alimentos, December, 2018.

SISEIN, E.A. Biochemistry of free radicals and antioxidants, **Scholars Acad. J.**

Biosci. 2, 110e118, 2014.

SONG, T. Effect of glutamic acid on the preparation and characterization of Pickering emulsions stabilized by zein. **Food Chemistry**, 366(July 2021), 130598, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130598>. Acesso em: 12 mar. 2021.

SOUSA, F. F. O. *et al.* Use of ¹H NMR STD, WaterLOGSY, and Langmuir monolayer techniques for characterization of drug-zein protein complexes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 85(3 PART A), 790–798, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.07.008>. Acesso em: 30 jan. 2022.

SPENCER, J. P.; *et al.* Br. J. Nutr. 99, 12, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007114507798938>. Acesso em: 17 ago. 2022.

STOOKEY, L.L. Ferrozine - A New Spectrophotometric Reagent for Iron. **Analytical Chemistry**, v. 42, n.7, p.779-781, 1970. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac60289a016>. Acesso em: 17 ago. 2022.

SUETH-SANTIAGO, V.; *et al.* Curcumina, o pó dourado do açafão-da-terra: Introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, 38(4), 538–552, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150035>. Acesso em: 23 out. 2020.

SULTANA, S.; *et al.* **Biomed. Pharmacother.** 135, 111078, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111078>. Acesso em: 17 ago. 2022.

SUN, C.; *et al.* Simultaneous treatment of heat and high pressure homogenization of zein in ethanol-water solution: Physical, structural, thermal and morphological characteristics. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 34, 161–170, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.01.016>. Acesso em: 23 jan. 2022.

SWAIN, S., & RAUTRAY, T. R. Estimation of Trace Elements, Antioxidants, and Antibacterial Agents of Regularly Consumed Indian Medicinal Plants. In **Biological Trace Element Research** (Vol. 199, Issue 3, pp. 1185–1193), 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02228-2>. Acesso em: 22 nov. 2021.

TAKASHIMA, M.; *et al.* Assessment of antioxidant capacity for scavenging free radicals in vitro: a rational basis and practical application, **Free Radic. Biol. Med.** 52, 1242e1252, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.010>. Acesso em: 17 ago. 2022.

TONIN, L. T. D.; *et al.* Bioactive compounds and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of extracts of *Curcuma longa*. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 15(4), 3752–3760, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00950-6>. Acesso em: 28 dez. 2021.

TOSONI, S. F. & RODRIGUES, V. C. 2013. **Características físico-químicas e antioxidantes de própolis microencapsulada com diferentes tipos de materiais de parede**. 2013. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão.

VARGHESE R, & DALVI YB. Natural Products as Anticancer Agents. **Curr Drug**

Targets, 22(11):1272-1287, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389450121999201230204526>. Acesso em: 17 ago. 2022.

WALKER BC & MITTAL S. Antitumor Activity of Curcumin in Glioblastoma. **Int J Mol Sci**. Dec 11;21(24):9435, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21249435>. Acesso em: 17 ago. 2022.

WANG, L.-S. & STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer Letters**, 269(2), 281–290, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.020>. Acesso em: 20 set. 2020.

WANG, Y. J.; *et al.* Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 15(12), 1867–1876, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(96\)02024-9](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(96)02024-9). Acesso em: 23 out. 2020.

WANG, Y., *et al.* Delivery of oligonucleotides with lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 87, 68–80, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.007>. Acesso em: 14 out. 2021.

WEISSIG, V.; PETTINGER, T.K.; MURDOCK, N. Nanopharmaceuticals (part 1): Products on the market. **Int. J. Nanomed.** 9, 4357–437, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S46900>. Acesso em: 17 ago. 2022.

WEISSMUELLER, N. T.; *et al.* Nanocarriers from GRAS Zein Proteins to Encapsulate Hydrophobic Actives. **Biomacromolecules**, 17(11), 3828–3837, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01440>. Acesso em: 03 mar. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); Cancer, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 20 de junho de 2022.

XU, H.; *et al.* Hollow nanoparticles from zein for potential medical applications. **Journal of Materials Chemistry**, 21(45), 18227-18235, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C1JM11163A>. Acesso em: 17 ago. 2022.

XU, X.; *et al.* Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments. **J. Am. Chem. Soc.** 126, 12736–12737, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja040082h>. Acesso em: 17 ago. 2022.

YALLAPU, M. M., JAGGI, M., & CHAUHAN, S. C. β -Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 79(1), 113–125, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.039>. Acesso em: 11 set. 2021.

YANG, Q. Q.; *et al.* Phenolic profiles, antioxidant, and antiproliferative activities of turmeric (*Curcuma longa*). **Industrial Crops and Products**, 152(May), 112561, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112561>. Acesso em: 13 abr. 2021.

YANISHLIEVA, N. V., MARINOVA, E., & POKORNÝ, J. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 108(9), 776–793, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600127>. Acesso em: 11 set. 2020.

YUAN, F.; *et al.* Modulation of physicochemical properties of emulsified lipids by chitosan addition. **Journal of Food Engineering**, 114(1), 1–7, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.07.027>. Acesso em: 17 ago. 2022.

YUAN, Y.; *et al.* Nucleic Acid–Based Functional Nanomaterials as Advanced Cancer Therapeutics. **Small**, 15, 1900172, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/smll.201900172>. Acesso em: 17 ago. 2022.

ZHANG, R.; *et al.* Microencapsulation of anthocyanins extracted from grape skin by emulsification/ internal gelation followed by spray/freeze-drying techniques: Characterization, stability and bioaccessibility. **LWT**, 123, 109097, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109097>. Acesso em: 18 out. 2020.

ZHANG, S., & HAN, Y. Preparation, characterisation and antioxidant activities of rutin-loaded zein-sodium caseinate nanoparticles. **PLoS ONE**, 13(3), 1–13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194951>. Acesso em: 11 out. 2020.

ZHANG, Y.; *et al.* Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate-chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry**, 142, 269–275, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.058>. Acesso em: 23 ago. 2020.

ZHANG, Z., & KING, M. R. Nanomaterials for the Capture and Therapeutic Targeting of Circulating Tumor Cells. **Cellular and Molecular Bioengineering**, 10(4), 275–294, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12195-017-0497-4>. Acesso em: 24 set. 2020.

ZHONG, Q., & JIN, M. Zein nanoparticles produced by liquid-liquid dispersion. **Food Hydrocolloids**, 23(8), 2380–2387, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.06.015>. Acesso em: 28 out. 2020.

ZHONG, Q., TIAN, H., & ZIVANOVIC, S. Encapsulation of fish oil in solid zein particles by liquid-liquid dispersion. **Journal of Food Processing and Preservation**, 33(2), 255–270, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2009.00390.x>. Acesso em: 23 out. 2020.

ZOU, L. *et al.* Enhancing the bioaccessibility of hydrophobic bioactive agents using mixed colloidal dispersions: Curcumin-loaded zein nanoparticles plus digestible lipid nanoparticles. **Food Research International**, 81, 74–82, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.035>. Acesso em: 19 set. 2020.