

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA BARROSO PEIXOTO

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO GOJIBERRY E
INCORPORAÇÃO EM NANOLIPOSSOMAS PARA APLICAÇÃO EM CÉLULAS
TUMORAIS**

APUCARANA

2023

FERNANDA BARROSO PEIXOTO

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO GOJIBERRY E
INCORPORAÇÃO EM NANOLIPOSSOMAS PARA APLICAÇÃO EM CÉLULAS
TUMORAIS**

**OPTIMIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS EXTRACTION FROM GOJIBERRY
AND INCORPORATION INTO NANOLIPOSOME FOR APPLICATION IN TUMOR
CELLS**

Trabalho de Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química do Programa de Pós-Graduação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Dra. Rúbia Michele Suzuki.

Coorientador: Dr. Rafael Oliveira Defendi.

APUCARANA

2023



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.



FERNANDA BARROSO PEIXOTO

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO GOJIBERRY E INCORPORAÇÃO EM NANOLIPOSSOMAS PARA APLICAÇÃO EM CÉLULAS TUMORAIS

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

Data de aprovação: 23 de Fevereiro de 2023

Dra. Rubia Michele Suzuki, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

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

Elisangela Dusman, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

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

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 16/03/2023.

Dedico este trabalho aos meus pais, Luís Fernando
e Eliane, e aos meus irmãos, Eloisa e Luís Felipe
Pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar e dar força para superar os obstáculos.

Aos meus pais, irmãos e amigos, por todo apoio e incentivo durante o mestrado.

Aos professores do Programa, por todo conhecimento passado, principalmente as professoras Lilian Tatiani Dusman Tonin e Caroline Casagrande Sipoli, por todo apoio e dedicação.

Em especial, agradeço a minha orientadora, professora Dra. Rúbia Michele Suzuki e o coorientador, professor Dr. Rafael Oliveira Defendi, pelos ensinamentos, orientações e paciência.

Ao Laboratório Multiusuário do Campus Apucarana (LAMAP), pela estrutura fornecida para realização das análises.

Aos colegas de mestrado que ajudaram e compartilharam seus conhecimentos.

A UNICAMP e ao grupo de pesquisa da professora Lucimara Gaziola de la Torre, pelos conhecimentos compartilhados, pelo acolhimento e por todo suporte oferecido.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

O gojiberry (*Lycium barbarum*) é uma fruta que apresenta altos teores de compostos bioativos, tais substâncias são derivadas de metabólitos secundários produzidos pelas plantas e, podem estar relacionadas à proteção contra condições de estresse oxidativo. Devido à ação antioxidante, atuam prevenindo e inibindo a ação de radicais livres no organismo humano, resultando em diversos benefícios para a saúde. A elevada capacidade antioxidante desses compostos desperta grande interesse na indústria, de forma que a extração dessas substâncias é essencial para sua aplicação em alimentos, fármacos e suplementos. A eficiência da extração de compostos antioxidantes é influenciada por diversos fatores, como a técnica de extração, tipo de solventes, tempo, temperatura, entre outros. Métodos de encapsulação são estudados para melhorar a estabilidade dos compostos extraídos e proteger contra agentes externos. Assim, o presente trabalho tem como objetivo otimizar a extração de compostos bioativos de *Lycium barbarum* e encapsulá-los para aplicação em células tumorais, avaliando a influência da proporção de solvente, método de extração, tempo e temperatura através dos métodos DPPH, ABTS e Habilidade quelante de Fe (II). Foi realizada a extração da amostra de gojiberry com os solventes etanol/água nas proporções 50:50 (v/v), 60:40 (v/v), 70:30 (v/v), 80:20 (v/v) e 90:10 (v/v). Os três testes de atividade antioxidante indicaram altas atividades antioxidantes para a proporção 60:40 (v/v) etanol/água. Com essa proporção, realizou-se as extrações e foram determinadas as condições que apresentaram as maiores atividades antioxidantes para o *Shaker* (45°C por 24 h) e para o ultrassom (45°C por 6 min). A quantificação de fenólicos totais e flavonoides indicaram diferença significativa entre os métodos, sendo que os maiores teores de compostos foram obtidos na extração assistida por ultrassom (503,96 mg EAG 100g⁻¹ de amostra e 314,64 mg EQ 100g⁻¹ de amostra). Além disso, o presente estudo também objetivou avaliar a cinética de extração dos extratos obtidos, os resultados mostraram altos rendimentos para o Ultrassom e, os modelos So e Mac Donald e Pseudo Segunda Ordem apresentaram os melhores ajustes para os dois métodos. A caracterização do extrato por meio das análises térmicas indicou a presença de grupos funcionais presentes em compostos fenólicos e polissacarídeos e comportamento endotérmico. Os compostos bioativos do melhor extrato foram encapsulados em lipossomas por injeção de etanol com maior eficiência de encapsulação para a fosfatidilcolina do ovo apresentando valores de 52,55%. A nanopartícula foi produzida utilizando microfluídica e a taxa de vazão 10 apresentou baixos índices de polidispersidade (10,4%). O sistema de advecção caótica proporcionou o aumento da produtividade, apresentando baixos diâmetros para o extrato encapsulado com vazão total 5 mL min⁻¹. A ação citotóxica do extrato livre produzidas pelo *Shaker* e ultrassom foram avaliadas e indicaram atividade antiproliferativa para as células tumorais hepáticas e apresentou menores viabilidade celulares para o ultrassom. A encapsulação do extrato se mostrou eficiente na entrega de ativos apresentando baixas viabilidades celulares quando comparada com o extrato livre, com valores de 48,19%.

Palavra-chave: Metabólitos secundários, antioxidantes, extração por solvente, nanopartículas, antitumoral.

ABSTRACT

Gojiberry (*Lycium barbarum*) is a fruit that has high levels of bioactive compounds, such substances are derived from secondary metabolites produced by plants and may be related to protection against oxidative stress conditions. Due to antioxidant action, they act by preventing and inhibiting the action of free radicals in the human body, resulting in several health benefits. The high antioxidant capacity of these compounds arouses great interest in the industry, so that the extraction of these substances is essential for their application in foods, drugs and supplements. The extraction efficiency of antioxidant compounds is influenced by several factors, such as extraction technique, type of solvents, time, temperature, among others. Encapsulation methods are studied to improve the stability of extracted compounds and protect against external agents. Thus, the present work aims to optimize the extraction of bioactive compounds of *Lycium barbarum* and encapsulate them for application in tumor cells, evaluating the influence of solvent proportion, extraction method, time and temperature through DPPH, ABTS and Chelating ability Fe (II) methods. The gojiberry sample was extracted with ethanol/water solvents in the proportions 50:50 (v/v), 60:40 (v/v), 70:30 (v/v), 80:20 (v/v) and 90:10 (v/v). The three antioxidant activity tests indicated high antioxidant activities for the ratio of 60:40 (v/v) ethanol/water. With this proportion, the extractions were performed and the condition that presented the highest antioxidant activity for *Shaker* (45°C for 24 h) and ultrasound (45°C for 6 min) were determined. The quantification of total phenolics and flavonoids indicated a significant difference between the methods, and the highest levels of compounds were obtained in ultrasound-assisted extraction (503.96 mg EAG 100g⁻¹ sample and 314.64 mg EQ 100g⁻¹ sample). In addition, the present study also aimed to evaluate the extraction kinetics of the extracts obtained, the results showed high yields for ultrasound and the Models So and Mac Donald and Pseudo Second Order presented the best adjustments for both methods. The characterization of the extract indicated the presence of functional groups present in phenolic compounds and polysaccharides and endothermic behavior. The bioactive compounds of the best extract were encapsulated in liposomes by ethanol injection with higher encapsulation efficiency for egg phosphatidylcholine, with values of 52.55%. The nanoparticle was produced using microfluidic and flow rate ratio 10 showed low polydispersity indexes (10.4%). The chaotic advection system provided increased productivity, presenting low diameters for the extract encapsulated with total flow rate 5 mL min⁻¹. The cytotoxic action of the free extract produced by *Shaker* and ultrasound were evaluated and indicated antiproliferative activity for liver tumor cells and presented lower cellular viability for ultrasound. The encapsulation of the extract proved to be efficient in the delivery of assets presenting low cellular viability when compared to the free extract, with values of 48.19%.

Keyword: Secondary metabolites, antioxidants, solvent extraction, nanoparticles, antitumor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Imagens do gojiberry (A) Seco e (B) em pó	16
Figura 2 - Principais monossacarídeos presentes nos LBPs	17
Figura 3 - Carotenoides presentes no gojiberry	18
Figura 4 - Principais compostos fenólicos presentes no gojiberry	19
Figura 5 - Mortes por câncer entre homens e mulheres no mundo (em milhares)	19
Figura 6 - Classificação compostos bioativos.....	21
Figura 7 - Estrutura base dos flavonoides	22
Figura 8 - Estrutura base dos Ácidos fenólicos	23
Figura 9 - Reação entre radical livre e antioxidante	24
Figura 10 - Estrutura BHA e BHT	24
Figura 11 - Estabilização do radical livre DPPH	27
Figura 12 - Estabilização do radical ABTS por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio	27
Figura 13 - Reação de complexação da ferrozina com Fe^{2+}	28
Figura 14 - Redução do FCR	31
Figura 15 - Reação entre cloreto de alumínio e flavonoides	32
Figura 16 - (A) Nanoemulsões, (B) Nanolipossomas, (C) Nanossuspensões, (D) Nanopartículas de lípidos sólidos (SLNs); (E) Transportador lipídico nanoestruturado (NLCs); e (F) Nanopartículas poliméricas	36
Figura 17 - Lipossomas unilamelar e multilamelar	37
Figura 18 – Estrutura da fosfatidilcolina	38
Figura 19 - Representação produção de lipossoma por injeção de etanol.....	39
Figura 20 - Representação esquemática da produção de lipossomas por advecção caótica, indicando as linhas de fluxo etanol+lípido (vermelho) e água (azul)	41
Figura 21 - Diagrama de pareto DPPH	59
Figura 22 - Comparação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo DPPH	60
Figura 23 - Superfície de resposta para o teste DPPH em relação a temperatura e tempo. (A) Gráfico 3D e (B) Gráfico de contorno	61
Figura 24 - Diagrama de pareto ABTS	62
Figura 25 - Comparação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo – ABTS	63
Figura 26 - Superfície de resposta para o teste ABTS em relação a temperatura e tempo. (A) Gráfico 3D e (B) Gráfico de contorno	64
Figura 27 - Diagrama de pareto HQ	65
Figura 28 - Comparação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo - HQ	66
Figura 29 - Superfície de resposta para o teste Habilidade quelante de Fe (II) em relação a temperatura e tempo. (A) Gráfico 3D e (B) Gráfico de contorno	66
Figura 30 - Diagrama de pareto DPPH	68

Figura 31 - Comparação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo – DPPH	69
Figura 32 - Superfície de resposta para o teste DPPH em relação a temperatura e tempo. (A) Gráfico 3D e (B) Gráfico de contorno	69
Figura 33 - Diagrama de pareto ABTS	70
Figura 34 - Comparação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo – ABTS	71
Figura 35 - Superfície de resposta para o teste ABTS em relação a temperatura e tempo. (A) Gráfico 3D e (B) Gráfico de contorno	72
Figura 36 - Diagrama de pareto HQ	73
Figura 37 - Comparação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo – HQ	74
Figura 38 - Superfície de resposta para o teste Habilidade quelante de Fe (II) em relação a temperatura e tempo. (A) Gráfico 3D e (B) Gráfico de contorno	74
Figura 39 - Ajustes matemáticos dos modelos cinéticos de extração para o Ultrassom. (A) Modelo Difusão parabólica; (B) Modelo Lei de potência; (C) Modelo Hiperbólico; (D) Modelo Primeira Ordem; (E) Modelo Pseudo Segunda Ordem; (F) Modelo So and MacDonald; (G) Modelo Segunda Ordem	82
Figura 40 - Ajustes matemáticos para os modelos cinéticos da extração para o <i>Shaker</i> . (A) Modelo Difusão parabólica; (B) Modelo Lei de potência; (C) Modelo Hiperbólico; (D) Modelo Primeira Ordem; (E) Modelo Pseudo Segunda Ordem; (F) Modelo So and MacDonald; (G) Modelo Segunda Ordem	83
Figura 41 - Espectrômetro FTIR do extrato seco de gojiberry	85
Figura 42 - Curvas TGA/DTA do extrato seco	87
Figura 43 – Curva de DSC do extrato de gojiberry seco	88
Figura 44 – Representação dispositivo T longo	92
Figura 45 - Fluxos FRR 5 (A) e 10 (B).....	93
Figura 46 – (A) Dispositivo utilizado de advecção caótica (B) Representação esquemática do dispositivo com ampliação do microcanal	95
Figura 47 – Viabilidades celulares para os tempos 24, 48, 72 h com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato de goji berry produzido utilizando (A) <i>Shaker</i> e (B) ultrassom para a linhagem celular de hepatocarcinoma humano	99
Figura 48 – Viabilidade celulares apresentadas para os lipossomas e extrato livre para a linhagem celular de câncer colorretal	101
Quadro 1 - Compostos presentes no gojiberry, tipo de câncer e ação.....	20
Quadro 2 - Equações dos modelos matemáticos	34
Quadro 3 - Amostras utilizadas para análise.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Extração de gojiberry para diferentes condições e métodos de extração	29
Tabela 2 - Planejamento fatorial 2 ² com delineamento composto central rotacional	44
Tabela 3 – Tempos de extração para análise de cinética de extração	49
Tabela 4 - Resultados atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e Habilidade quelante de Fe (II)	56
Tabela 5 - Tabela ANOVA DPPH	58
Tabela 6 - Tabela ANOVA ABTS	61
Tabela 7 - Tabela ANOVA Habilidade quelante de Fe (II)	64
Tabela 8 - Tabela ANOVA DPPH	67
Tabela 9 - Tabela ANOVA ABTS	70
Tabela 10 - Tabela ANOVA Habilidade quelante de Fe (II)	72
Tabela 11 - Resultados atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e Habilidade quelante de Fe (II) para os extratos obtidos através da extração assistida por ultrassom	75
Tabela 12 - Resultados atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e Habilidade quelante de Fe (II) para os extratos obtidos com agitação em <i>Shaker</i>	76
Tabela 13 - Resultados de atividade antioxidante e compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas e carotenoides para os extratos obtidos por ultrassom e <i>Shaker</i>	78
Tabela 14 - Coeficientes dos modelos cinéticos de extração	80
Tabela 15 - Análise estatística dos modelos cinéticos de extração	81
Tabela 16 - Caracterização dos lipossomas produzidos pelo método de injeção de etanol para as diferentes proporções de extrato (m/m)	89
Tabela 17 - Caracterização dos lipossomas por microfluídica produzidas no T longo	92
Tabela 18 - Caracterização dos lipossomas por microfluídica produzidas por advecção caótica	96
Tabela 19 - Resultados caracterização dos lipossomas para as melhores condições de cada método de produção	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
ABTS	2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de Variância
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CC	Capacidade de carregamento
CUPRAC	Íons cúpricos Cu^{2+} reduzindo o poder antioxidante
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DLS	Dynamic Light Scattering
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	Solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTA	Derivada termogravimétrica
DW	Base seca
EAE	Extração assistida por enzimas
EAG	Equivalente Ácido Gálico
EAM	Extração assistida por microondas
EAU	Extração assistida por ultrassom
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Eficiência de encapsulação
EFS	Extração por fluido supercrítico
ELP	Extração líquida pressurizada
EQ	Equivalente Quercetina

FCR	Reagente Folin-Ciocalteu
FD	Fator de diluição
Fe	Ferro
FRAP	Capacidade de redução de ferro
FRR	Taxa de vazão (Flow rate ratio)
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HAT	Transferência de átomos de hidrogênio
HQ	Habilidade quelante de ferro (II)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KCl	Cloreto de potássio
LBP	<i>Lycium barbarum</i> Polissacarídeos
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MMS	Metil-metanossulfonato
MSE	Quadrático médio
MTT	[3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio de brometo]
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₃	Fosfato de sódio dibásico
NBR	Normas Brasileiras
NLCs	Transportador lipídico nanoestruturado
NRMSE	Raiz do erro quadrático médio normalizado
ORAC	Capacidade oxidante do radical oxigênio
PDI	Índice de polidispersidade
PM	Peso molecular
RMSE	Raiz do erro quadrático médio

SET	Transferência de elétrons
SLNs	Nanopartículas de lípidos sólidos
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente de Trolox
TF	Flavonoides totais
TFR	Vazão total (Total flow rate)
TGA	Termogravimetria
TP	Fenólicos totais
TRAP	Radical total –Parâmetro antioxidante de captura
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	15
2.1	Objetivos Específicos	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	Gojiberry (<i>Lycium barbarum</i>)	16
3.1.1	Ação anticâncer do gojiberry	19
3.2	Compostos Bioativos	21
3.2.1	Compostos Fenólicos	22
3.3	Estresse oxidativo e ação antioxidante	23
3.3.1	Antioxidantes	24
3.3.2	Métodos de determinação de atividade antioxidante	26
3.4	Extração de compostos	28
3.5	Ensaio de quantificação de compostos bioativos	30
3.5.1	Fenólicos Totais	31
3.5.2	Flavonoides Totais	31
3.5.3	Antocianinas	32
3.5.4	Carotenoides	32
3.6	Estudo cinético da extração de compostos bioativos	33
3.7	Encapsulação de Compostos Bioativos em Sistemas Nanoparticulados	35
3.7.1	Lipossomas	37
3.7.2	Técnicas de formação e encapsulação de lipossomas	39
3.7.3	Produção e encapsulação de bioativos via rota microfluídica	40
4	JUSTIFICATIVA	42
5	METODOLOGIA	43
5.1	Preparo da fruta	43
5.2	Preparação dos extratos	43
5.2.1	Estudo da Proporção de Solvente	43
5.2.2	Extração em Incubadora <i>Shaker</i> e Extração Assistida por Ultrassom	43
5.3	Avaliação da capacidade antioxidante do gojiberry	44
5.3.1	Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH	44
5.3.2	Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método ABTS ^{•+}	45

5.3.3	Determinação da Habilidade quelante de Fe (II)	46
5.4	Caracterização do extrato.....	46
5.4.1	FTIR	46
5.4.2	Análises Térmicas – TGA e DSC	47
5.5	Quantificação de compostos do gojiberry	47
5.5.1	Fenólicos totais.....	47
5.5.2	Flavonoides totais.....	48
5.5.3	Antocianinas	48
5.5.4	Carotenoides	48
5.6	Modelagem da Cinética de extração pelo método de Fenólicos Totais	49
5.7	Encapsulação do extrato em lipossomas	51
5.7.1	Produção de lipossomas por injeção de etanol	51
5.7.2	Produção de lipossomas por microfluídica	51
5.7.3	Caracterização Físico-química dos Lipossomas	52
5.7.4	Eficiência de Encapsulação (EE) e Capacidade de Carregamento (CC) dos Lipossomas	52
5.8	Avaliações Biológicas.....	53
5.8.1	Teste de citotoxicidade/atividade antiproliferativa para os extratos obtidos pelos métodos de extração em <i>Shaker</i> e Ultrassom	53
5.8.2	Teste de citotoxicidade/atividade antiproliferativa para os lipossomas carregadas com extrato de gojiberry	54
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
6.1	Determinação da proporção de solvente na extração de gojiberry	56
6.2	Planejamento experimental 2² com delineamento composto central rotacional	57
6.2.1	Ultrassom	58
6.2.2	Shaker	67
6.3	Determinação das condições de extração e método de extração ...	75
6.4	Cinética de extração pelo método de Fenólicos Totais	79
6.5	Caracterização do extrato.....	85
6.5.1	FTIR	85
6.5.2	Análises Térmicas - TGA/DTA e DSC	86
6.6	Encapsulação do extrato em lipossomas	88
6.6.1	Caracterização dos lipossomas produzidos pelo método de injeção de etanol a partir de diferentes lipídios.....	89
6.6.2	Caracterização dos lipossomas produzidos por microfluídica	91

6.6.3	Caracterização dos lipossomas produzidos por microfluídica – Advecção Caótica	94
6.7	Atividade Antitumoral	98
6.7.1	Avaliação da atividade antitumoral do extrato livre pelos métodos de extração <i>Shaker</i> e Ultrassom	98
6.7.2	Avaliação da atividade antitumoral dos sistemas nanoagregados comparados ao extrato livre	101
7	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

As frutas são fontes de vitaminas, minerais, fibras e compostos bioativos e, portanto, apresentam um papel indispensável na saúde, de forma que o seu consumo está ligado a prevenção de inúmeras doenças (ANGELINO et al., 2019; SILVA; CLARO, 2019). Existe uma infinidade de frutas com diferentes cores, odores e sabores, essas características indicam a variedade de compostos presentes. Além disso, esses compostos desempenham funções antioxidantes, anticâncer e anti-inflamatória (BANWO et al., 2021; SHARMA et al., 2021b).

A cor das frutas é usada como principal indicador de sua qualidade. Essa variedade de colorações está ligada a presença de carotenoides (cores laranja e amarela), de clorofilas (cor verde), e de compostos fenólicos (cores azul, vermelho e branco) (ALASALVAR; SALVADÓ; ROS, 2020; SHARMA et al., 2021b). O gojiberry é uma fruta vermelho-alaranjado rica em compostos fenólicos. Comumente encontrada na China, vem sendo usada a muitos anos para fins medicinais devido à potencialidade desses compostos, que desempenham funções anticâncer (BO et al., 2017; GONG et al., 2020; QI et al., 2022; WAWRUSZAK; HALASA; OKLA, 2021), antienvhecimento (HUANG et al., 2022; QI et al., 2022) e antioxidante (FENG et al., 2021a; POVOLO; FOSCHINI; RIBAUDO, 2019; SKENDERIDIS et al., 2019).

A ação antioxidante desses compostos desperta o interesse das indústrias, já que os antioxidantes atuam inibindo e reduzindo a ação dos radicais livres, auxiliando no tratamento de diversas doenças. Vários métodos são empregados na determinação da atividade antioxidante, abrangendo os diferentes mecanismos de ação. Os métodos mais usados são o FRAP (capacidade de redução de ferro), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), ORAC (capacidade oxidante do radical oxigênio), ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e fenólicos totais (AKAR; KÜÇÜK; DOĞAN, 2017; GULCIN, 2020; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Com o objetivo de isolar e concentrar esses compostos, vários métodos de extração são estudados, de forma a obter maiores rendimentos e melhor qualidade do extrato. Dentre os métodos convencionais que se destacam pode-se citar a extração sob agitação, usado para extração de compostos termolábeis, porém é demorada e necessita de grandes quantidades de solvente (OROIAN; DRANCA; URSACHI, 2020; PEIXOTO et al., 2022). Novas tecnologias como a extração assistida

por ultrassom é uma alternativa mais rápida e apresenta altos rendimentos (HERRERA-POOL et al., 2021; WANG et al., 2020; WEN et al., 2019).

Além disso, o tipo de solventes, tempo e temperatura são fatores que influenciam diretamente na extração, assim, se faz necessário determinar os melhores parâmetros conforme as propriedades físico-químicas dos compostos a serem extraídos (HERRERA-POOL et al., 2021; OROIAN; DRANCA; URSACHI, 2020; PEIXOTO et al., 2022; SAGAR et al., 2018).

Apesar da potencialidade dos fitoquímicos extraídos, a extração promove maior exposição dos compostos bioativos a agentes externos, aumentando a instabilidade e, conseqüentemente, podendo causar sua degradação (MARCILLO-PARRA et al., 2021). Com isso, a nanoencapsulação surge como uma técnica muito importante para a estabilidade dos compostos, despertando o interesse dos estudiosos em razão de sua variedade de aplicações. O objetivo é diminuir a interação entre os ativos e fatores ambientais, retardando possíveis alterações e impedir que reações indesejadas aconteçam, entre outros (KIRTANE et al., 2021; MARCILLO-PARRA et al., 2021; REQUE; BRANDELLI, 2021; SHARMA et al., 2021a).

Dentre os tipos de nanopartículas, os lipossomas se destacam na produção de nutracêuticos, pois são capazes de encapsular compostos hidrofílicos e hidrofóbicos. A escolha do tipo e concentração de lipídio, do método de produção e dos parâmetros de operação influenciam diretamente na estabilidade e propriedades desejada (CHEN; HU, 2019; GONZALEZ GOMEZ; HOSSEINIDOUST, 2020; MARITIM; BOULAS; LIN, 2021). A microfluídica é uma alternativa para as técnicas convencionais de produção e tem sido muito utilizada para a encapsulação de compostos em lipossomas. O nanoagregado é formado a partir de processos difusivos que acontecem pelo contato entre as correntes, permitindo maior controle do fluxo (CARVALHO et al., 2022; FIRMINO et al., 2021; ISMAIL et al., 2020).

Diante do que foi exposto, o trabalho tem como objetivo otimizar a extração de compostos bioativos do gojiberry para aplicação em células tumorais, variando a proporção de solvente, temperatura, tempo e método de extração. Adicionalmente, foram ajustados modelos cinéticos que descrevem o comportamento da extração, realizadas a encapsulação para melhorar a estabilidade dos compostos e, subseqüentemente, foi determinada a atividade antitumoral do extrato livre e dos lipossomas.

2 OBJETIVO

Otimizar a extração de compostos bioativos de *Lycium barbarum* e encapsulação em lipossomas para aplicação em células tumorais.

2.1 Objetivos Específicos

- Determinar a influência das proporções entre os solventes etanol e água na extração do gojiberry buscando a melhor resposta em termos de sequestro do radical DPPH, captura do radical ABTS e Habilidade quelante de Fe (II);
- Avaliar a eficiência de extração para os diferentes métodos de extração (ultrassom e *Shaker*) em função do tempo e temperatura, por meio da capacidade antioxidante dos extratos;
- Quantificar os compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides, antocianinas e polissacarídeos do melhor extrato;
- Ajustar modelos matemáticos que descrevam a cinética de extração dos compostos bioativos do gojiberry;
- Otimizar a encapsulação do extrato em lipossomas utilizando diferentes lipídios e técnicas de encapsulação;
- Caracterizar as propriedades físico-química dos sistemas nanoparticulados obtidos;
- Comparar a atividade antiproliferativa do extrato livre, produzido pelos diferentes métodos de extração;
- Avaliar o potencial biológico, em células tumorais, do extrato incorporado nos lipossomas e comparar com a atividade biológica do extrato livre.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Gojiberry (*Lycium barbarum*)

A espécie *Lycium barbarum*, da família Solanaceae é comumente conhecida como gojiberry ou wolfberry (Figura 1). Foram catalogadas em média 80 espécies do gênero *Lycium* (JIANG et al., 2021; MA et al., 2022). Existem poucas informações relacionados a produção da fruta, o último relato indica a alta produção do Leste asiático, principalmente da China, com índices superiores a 5 mil toneladas ao ano. A espécie se desenvolve em climas temperados e subtropicais e não há relatos da produção do gojiberry no Brasil (AJAP - ASSOCIAÇÃO DOS JOVENS AGRICULTORES DE PORTUGAL, 2017; GAO et al., 2017). A fruta possui coloração vermelho-alaranjado e sabor amargo e doce. Pode ser consumida fresca, desidratada ou na produção de bebidas como sucos e vinhos (GAO et al., 2017; QIAN et al., 2017).

Figura 1 – Imagens do gojiberry (A) Seco e (B) em pó



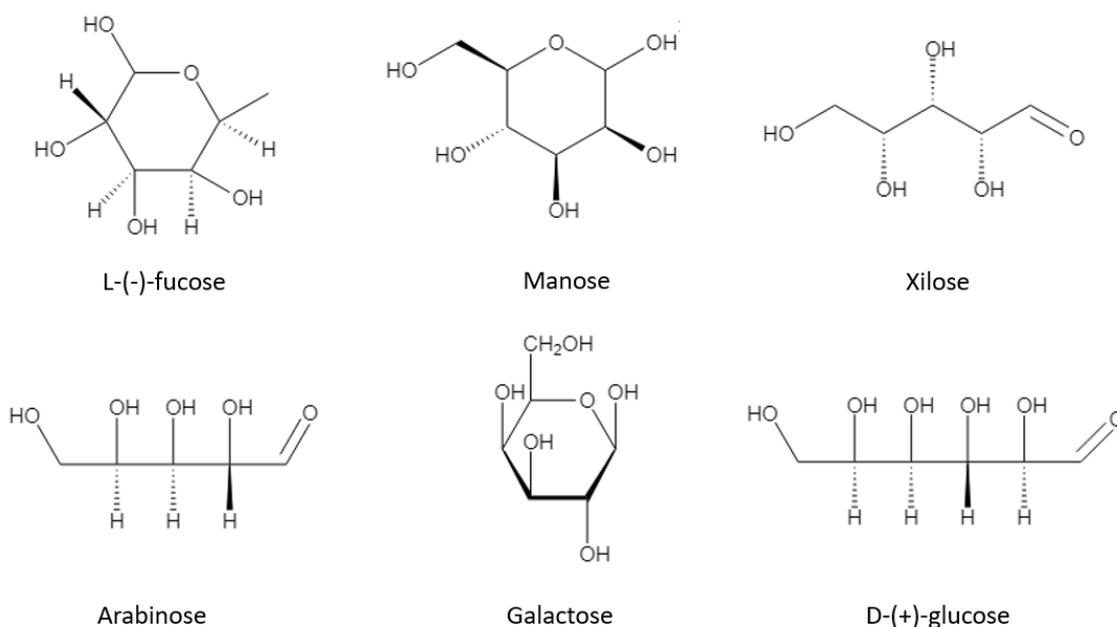
Fonte: Autoria própria (2023)

Há muitos anos a fruta já vem sendo usada como planta medicinal na China. Estudos mostraram os efeitos terapêuticos em algumas doenças crônicas, apresentando funções como antiglaucoma, imunorreguladora, antitumoral, antioxidante, antienvhecimento, neuroprotetora e atividades hipoglicêmicas (BENCHENNOUF et al., 2017; BO et al., 2017; FENG et al., 2021a; GONG et al., 2020; HUANG et al., 2022; POVOLO; FOSCHINI; RIBAUDO, 2019; QI et al., 2022; QIAN et al., 2017). Esses benefícios se dão devido a ação dos compostos bioativos presentes na fruta. O gojiberry é composto principalmente por polissacarídeos, carotenoides e

compostos fenólicos (GAO et al., 2017; MA et al., 2022; PIRES et al., 2018; QIAN et al., 2017).

Dentre os compostos, o grupo mais importante é o dos polissacarídeos (LBPs) que constituem de 5 a 8% da fruta seca e desempenham funções relacionadas a atividade biológica (CHENG et al., 2015; GAO et al., 2017). Na literatura, foram catalogados mais de 40 polissacarídeos compostos por 100 ou mais monossacarídeos. Dentre os principais monossacarídeos presentes na composição dos polissacarídeos do gojiberry, tem-se a xilose, a arabinose, a fucose, a ribose, a glucose, a galactose e a manose (Figura 2) (CHENG et al., 2015; GONG et al., 2016; LIU et al., 2021; QIAN et al., 2017; WANG et al., 2010; WU et al., 2018). Apresentam funções como hipoglicêmicos, hipolipidêmicos, antifadiga, antioxidantes e atividade imunológica (BO et al., 2017; QI et al., 2022; ZHAO et al., 2016).

Figura 2 - Principais monossacarídeos presentes nos LBPs

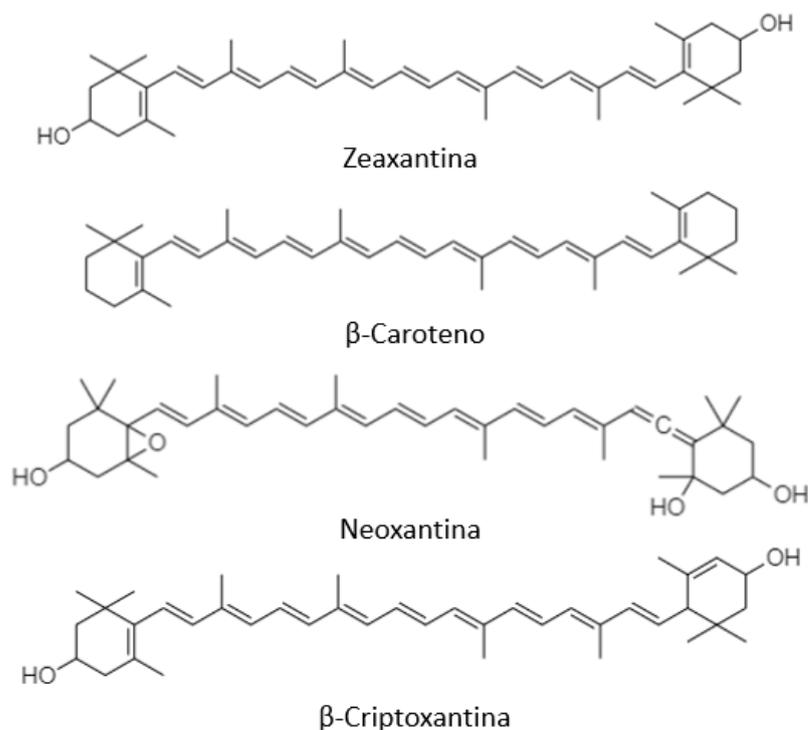


Fonte: Autoria própria (2023)

Os carotenoides são o segundo grupo de compostos bioativos significativos presentes no gojiberry. São eles os responsáveis pela coloração da fruta. Zeaxantina é o carotenoide mais comum, porém também é possível encontrar em baixas concentrações β -caroteno, neoxantina, criptoxantina (Figura 3) (GONG et al., 2021; JUAN-GARCÍA et al., 2022; KULCZYŃSKI; GRAMZA-MICHAŁOWSKA, 2016; WANG

et al., 2010). São lipossolúveis e atuam contra o câncer e doenças cardíacas (MONTESANO et al., 2020; WANG et al., 2010).

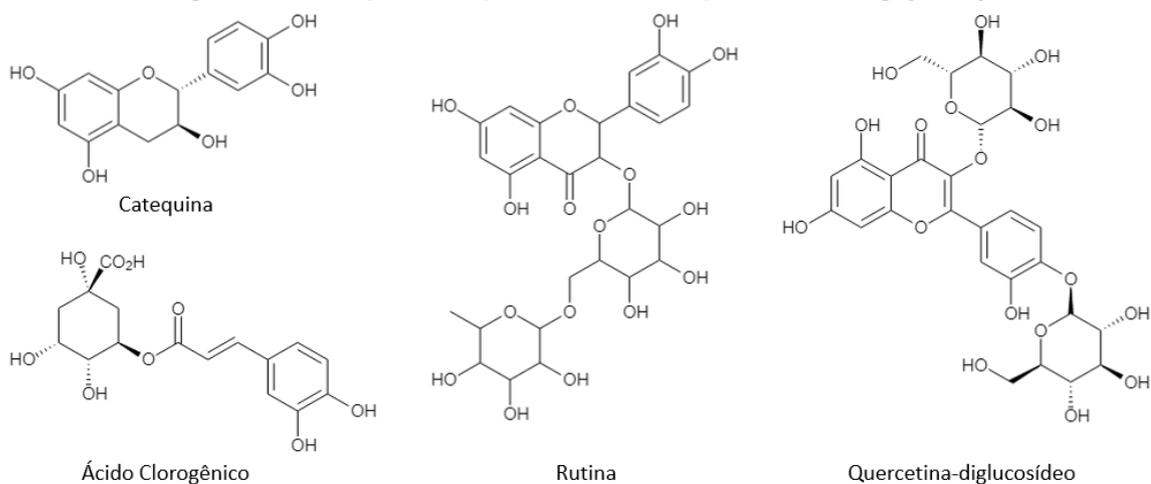
Figura 3 - Carotenoides presentes no gojiberry



Fonte: Autoria própria (2023)

Outra classe importante é a dos compostos fenólicos. Os flavonoides representam a maior parte dos compostos fenólicos presentes no gojiberry e são subdivididos de acordo com a localização da benzopirona no anel heterocíclico. Os compostos fenólicos que se destacam na composição da fruta são a catequina, o ácido clorogênico, a rutina e a quercetina-diglicosídeo (Figura 4). Tais compostos possuem funções anticâncer e anti-inflamatória (BANWO et al., 2021; JIANG et al., 2021; PEDRO et al., 2018; PIRES et al., 2018; TRIPODO et al., 2018; WANG et al., 2010).

Figura 4 - Principais compostos fenólicos presentes no gojiberry

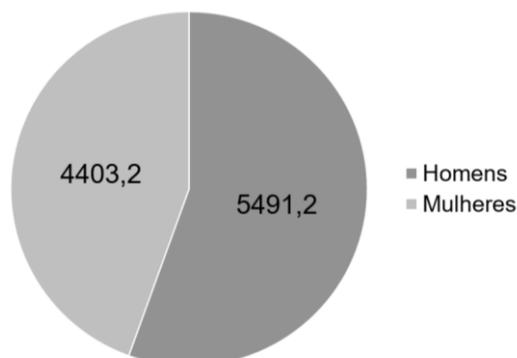


Fonte: Autoria própria (2023)

3.1.1 Ação anticâncer do gojiberry

O câncer resulta de uma ou mais mutações nos genes que dão origem a uma divisão celular descontrolada. O termo engloba mais de 100 diferentes tipos de doenças e são classificados conforme o local de origem (INCA, 2022). Ferlay et al. (2021) observaram que cerca de uma em cada cinco pessoas terá a doença ao longo da vida, podendo se manifestar em qualquer idade, em homens e mulheres. A pesquisa feita pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer indica um risco de 10% de mortes pelo câncer no mundo, com maior incidência entre as homens, como mostrado na Figura 5 (FERLAY et al., 2021).

Figura 5 - Mortes por câncer entre homens e mulheres no mundo (em milhares)



Fonte: Autoria própria (2023)

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o controle do câncer compreende a prevenção, diagnóstico precoce e triagem, tratamento, cuidados paliativos e

cuidados de sobrevivência. A prevenção recebe destaque devido a sua efetividade no controle da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Dessa forma, observa-se a ação dos fitoquímicos como importantes aliados na prevenção desta doença (PATRA et al., 2021).

Inúmeros estudos analisaram a ação anticâncer de compostos presentes no gojiberry. Esses compostos atuam inibindo a proliferação das células cancerígenas, diminuindo o crescimento de tumores e levando a apoptose celular, sendo eficazes no combate de diversos tipos de câncer (Quadro 1) (JIANG et al., 2021; KULCZYŃSKI; GRAMZA-MICHAŁOWSKA, 2016).

Quadro 1 - Compostos presentes no gojiberry, tipo de câncer e ação

Composto	Tipo de Câncer	Ação	Referência
Ácido <i>p</i>-cumárico	Câncer do cólon	Indução de apoptose celular	(SHARMA; RAJAMANICKAM; NAGARAJAN, 2018)
Ácido salicílico	Câncer do cólon	Inibição do crescimento celular	(AI et al., 2015)
Apigenina	Câncer de ovário	Inibição do crescimento celular	(LI et al., 2009)
Arabinogalactano	Câncer de mama	Indução de apoptose celular	(GONG et al., 2020)
Arctigenina	Câncer de fígado	Inibição do crescimento celular	(SUN et al., 2018)
Catequina	Câncer cerebral	Indução de autofagia e apoptose celular	(SHENG, 2020)
Derrone	Câncer de pulmão e próstata	Indução do crescimento celular e apoptose das células	(KANG et al., 2019)
Kaempferol	Câncer no pâncreas	Indução de apoptose celular	(LEE; KIM, 2016)
Neoxantina	Câncer de fígado	Indução de apoptose celular	(UDAYAWARA RUDRESH et al., 2021)
Quercetina	Câncer de mama	Indução de apoptose celular	(NGUYEN et al., 2017)
Zeaxantina	Câncer de estômago	Indução de apoptose celular	(SHENG et al., 2020)
β-caroteno	Câncer de mama	Indução de apoptose celular	(METIBEMU et al., 2020)

Fonte: Autoria própria (2023)

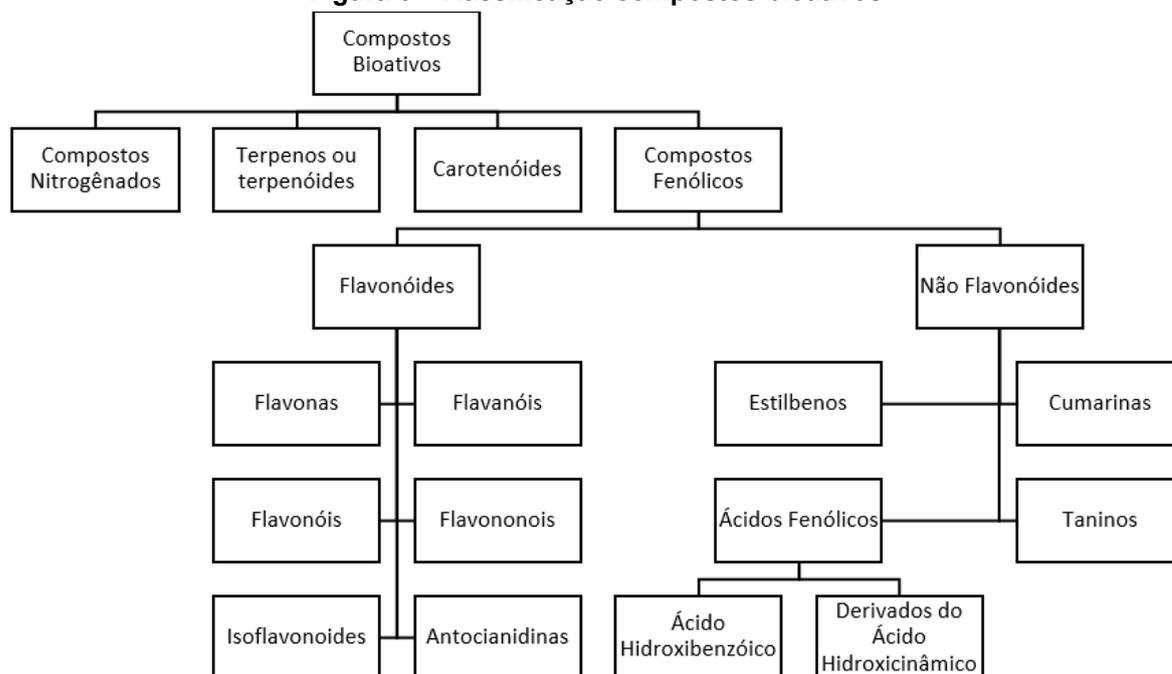
O gojiberry possui em sua constituição uma combinação de diversos compostos, por essa razão é essencial estudar os efeitos individuais e em conjunto dessas substâncias (JIANG et al., 2021).

3.2 Compostos Bioativos

Os compostos bioativos são metabólitos secundários formados nos vegetais por meio de rotas metabólicas a partir dos metabólitos primários e atuam na defesa das plantas (DELBONE; LANDO, 2010; PATRA et al., 2021; SAGAR et al., 2018). A ingestão de frutas e hortaliças tem mostrado benefícios para a saúde devido à presença dessas substâncias que possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, antibacteriana, anticâncer, imunorreguladora, neuroprotetora, anti-idade, anticoagulante e atividade hipoglicêmica (ABDUL MUDALIP et al., 2021; KALYNIUKOVA et al., 2021; PATRA et al., 2021).

Os compostos bioativos são classificados pela sua importância, sua fonte ou sua estrutura. Conforme a estrutura, os fitoquímicos são divididos em compostos nitrogenados (alcaloides), terpenos, carotenoides e compostos fenólicos (Figura 6) (PATRA et al., 2021; VÁSQUEZ-REYES et al., 2021).

Figura 6 - Classificação compostos bioativos



Fonte: Autoria própria (2023)

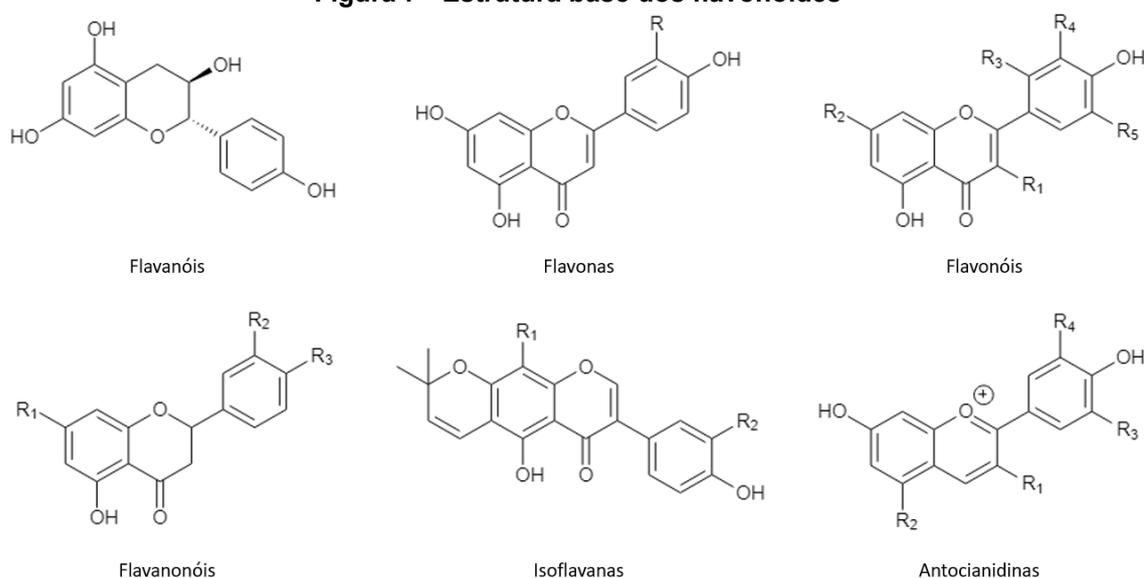
Devido a potencialidade desses compostos, eles são de grande interesse para as indústrias alimentícias e farmacológicas. Porém, é necessário identificar os compostos presentes na matriz, isolar e concentrar esses compostos para posterior aplicação (KALYNIUKOVA et al., 2021).

3.2.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos atraem a atenção dos estudiosos pois são os principais metabólitos secundários das plantas e possuem um alto potencial antioxidante, apresentando vários benefícios à saúde, relacionados a doenças crônicas como Alzheimer, câncer e diabetes (ABDUL MUDALIP et al., 2021; BANWO et al., 2021; PATRA et al., 2021; SAGAR et al., 2018; VÁSQUEZ-REYES et al., 2021). Eles são constituídos por uma hidroxila ligada a um anel aromático e podem ser classificados como flavonoides e não flavonoides (PATRA et al., 2021; VÁSQUEZ-REYES et al., 2021).

Os flavonoides representam o maior grupo de compostos fenólicos e possuem um papel essencial nas plantas sendo responsáveis pelos aromas, cores e sabores. Eles são formados pela ligação entre um anel heterocíclico e dois anéis aromáticos. De acordo com grupamentos presentes em suas estruturas são subdivididos em flavonas, flavonóis, flavanóis, flavanonóis, isoflavonoides e antocianidinas (Figura 7) (BANWO et al., 2021; JIANG et al., 2021).

Figura 7 - Estrutura base dos flavonoides

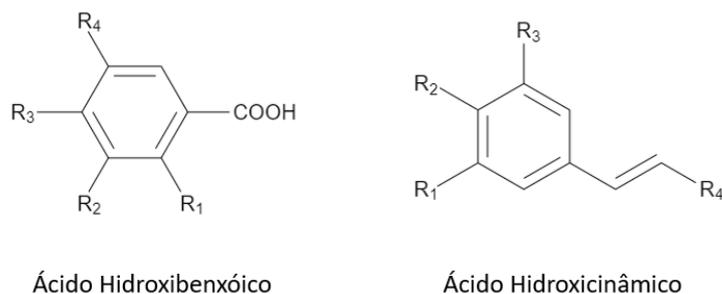


Fonte: Autoria própria (2023)

Os não flavonoides são os ácidos fenólicos, cumarinas, estilbenos e taninos (BANWO et al., 2021; PATRA et al., 2021; VÁSQUEZ-REYES et al., 2021). Os ácidos

fenólicos são subdivididos em ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 8), eles geralmente se apresentam ligados a outras substâncias e possuem estruturas complexas (BANWO et al., 2021; PATRA et al., 2021).

Figura 8 - Estrutura base dos Ácidos fenólicos



Fonte: Autoria própria (2023)

3.3 Estresse oxidativo e ação antioxidante

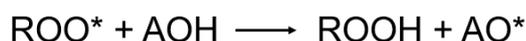
O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre antioxidantes e radicais livres. Os radicais livres são moléculas altamente instáveis e reativas devido à presença de elétrons desemparelhados. Dessa forma, esses radicais tendem a reagir para que se tornem estáveis (GULCIN, 2020).

Os radicais são formados naturalmente durante o metabolismo celular ou por fatores externos, como a poluição, radiação, drogas e solventes industriais (GULCIN, 2020; YARIBEYGI; ATKIN, 2018). Em quantidades aceitáveis, eles são importantes na manutenção celular atuando contra infecções e como mensageiros em vias metabólicas (GULCIN, 2020; YARIBEYGI; ATKIN, 2018). Porém, em excesso esses radicais livres são prejudiciais ao sistema de defesa antioxidante, causando danos oxidativos (GULCIN, 2020). Esses danos estão associados a inúmeras doenças como câncer, Alzheimer, doenças cardíacas e diabetes (GULCIN, 2020; WEN et al., 2020; YARIBEYGI; ATKIN, 2018).

3.3.1 Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que atuam inibindo e reduzindo a ação dos radicais livres, diminuindo os processos oxidativos (Figura 9). São mecanismos de defesa contra a ação dos radicais livre (ANTOLOVICH et al., 2001; BOROSKI et al., 2015; GULCIN, 2020; MOHARRAM; YOUSSEF, 2014). Dessa forma, desempenham um papel importante em alimentos, evitando a degradação e ajudando a conservar sabor, aroma e cor, e no corpo humano, auxiliando no tratamento de doenças degenerativas, cardiovasculares e câncer (GULCIN, 2020; LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019; SHAHIDI; ZHONG, 2015; WEN et al., 2020).

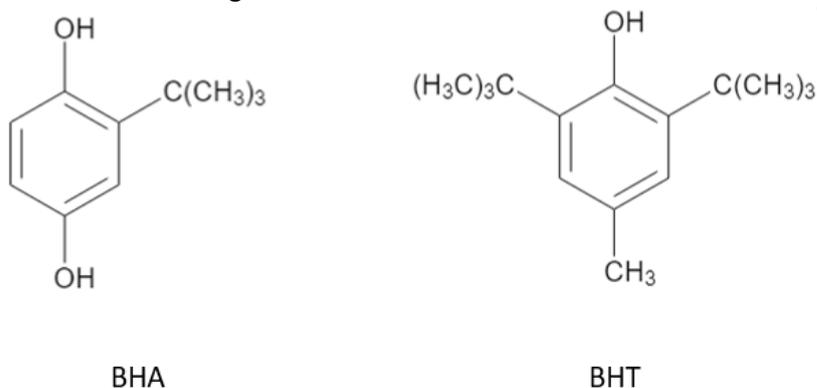
Figura 9 - Reação entre radical livre e antioxidante



Fonte: Autoria própria (2023)

Os antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais. Os sintéticos atuam na redução da propagação na reação de oxidação e são utilizados principalmente para incorporação em alimentos, conferindo resistência ao alimento e aumento no tempo de vida útil. Os principais antioxidantes sintéticos são o BHA e BHT (Figura 10) (GULCIN, 2020; LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Figura 10 - Estrutura BHA e BHT



Fonte: Autoria própria (2023)

Os naturais, podem ser encontrados em frutas, vegetais, sementes, nozes, folhas, raízes e cascas, possuem função de conservante natural e proteção da planta (GULCIN, 2020; SHAHIDI; ZHONG, 2015). Dentre os antioxidantes naturais podemos citar os tocoferóis, a vitamina C (ácido ascórbico), os carotenoides e os compostos fenólicos (GULCIN, 2020; LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019; SUCUPIRA et al., 2014).

Os tocoferóis ou vitamina E são os antioxidantes mais conhecidos e usados. Se apresentam de estruturas diferentes, dentre elas a α -tocoferol é a mais frequente. A vitamina E é solúvel em gordura e atua contra a peroxidação lipídica (BALSANO; ALISI, 2009; GULCIN, 2020). Encontrados em vegetais verdes e alimentos gordurosos como óleos, sementes, nozes e gema de ovo (GULCIN, 2020).

A vitamina C, dentre os antioxidantes naturais, é a mais potente e menos tóxica, sendo uma ótima sequestradora de radicais. Ela atua em conjunto com a vitamina E, os carotenoides e com enzimas antioxidantes. A vitamina C previne o desenvolvimento de compostos nitrosos, o que sugere seu efeito positivo sob o câncer gástrico (BALSANO; ALISI, 2009; GULCIN, 2020; SUCUPIRA et al., 2014). É encontrada principalmente em frutas cítricas, vegetais e folhas verdes (GULCIN, 2020).

Os carotenoides estão associados a cor dos vegetais e participam da fotossíntese. São ótimos inativadores do oxigênio singlete e sequestradores de radicais peroxila (GULCIN, 2020; PATRA et al., 2021; SUCUPIRA et al., 2014). Existem mais de 700 tipos de carotenoides catalogados. A parte central de sua molécula é formada por uma série de duplas conjugadas (Figura 3), conferindo sua reatividade e facilidade de absorção de luz (MENDES-SILVA et al., 2021; SAINI; NILE; PARK, 2015).

Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides recebem destaque devido seu alto potencial antioxidante. Foram catalogados mais de 4000 compostos (BALSANO; ALISI, 2009; PATRA et al., 2021). A ingestão desses compostos reflete na prevenção de inúmeras doenças. Eles são encontrados principalmente em frutas, vegetais, chá, chocolate, vinho tinto, café, e também em grãos, como sorgo, arroz, trigo e milho (BANWO et al., 2021; VÁSQUEZ-REYES et al., 2021).

3.3.2 Métodos de determinação de atividade antioxidante

Na literatura existem vários métodos que podem ser usadas para a determinação da capacidade antioxidante de diferentes matrizes as quais contemplam diferentes características dos compostos antioxidantes, Entre eles, estão: ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), ORAC (Capacidade de absorção do radical de oxigênio), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), FRAP (Capacidade de redução de ferro), TRAP (Radical total –Parâmetro antioxidante de captura), CUPRAC (Íons cúpricos Cu^{2+} reduzindo o poder antioxidante) e métodos de peroxidação lipídica (AKAR; BURNAZ, 2019; AKAR; KÜÇÜK; DOĞAN, 2017; GULCIN, 2020; OLIVEIRA, 2015; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Como nos organismos vivos existe uma diversidade de radicais livres, dificilmente existirá um ensaio que abranja todos os mecanismos reacionais entre os radicais e os antioxidantes (ALVES et al., 2010). Assim, devido à complexidade relacionada a determinação da ação antioxidante, comumente são empregadas várias metodologias para avaliar a capacidade antioxidante. Os métodos podem ser realizados *in vivo* e *in vitro*. Os ensaios *in vivo* são realizados em animais, por tempo e dose determinados, utilizando o sangue ou tecidos para análises, já os ensaios *in vitro* são os realizados com espécies químicas que utilizam técnicas laboratoriais (EL ABED et al., 2017; FENG et al., 2021b).

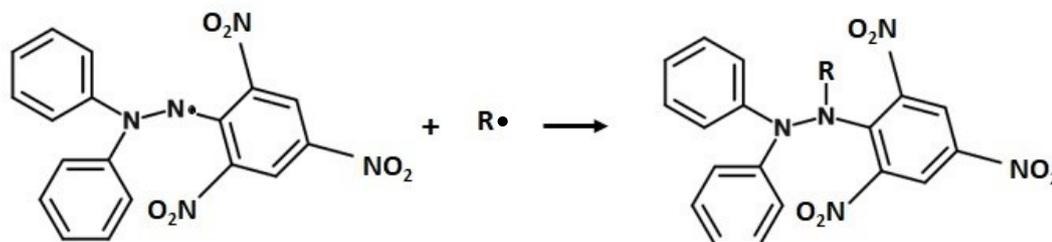
De acordo com Rufino et al. (2010), os ensaios mais empregados na determinação da atividade antioxidante são: DPPH*, ABTS*+, FRAP e ORAC. Esses ensaios podem acontecer por pela transferência de átomos de hidrogênio (HAT) ou transferência de elétrons (SET) e vão medir o grau de inibição da oxidação ou a habilidade em sequestrar os radicais, não existindo um ensaio padrão (GULCIN, 2020; LI et al., 2018).

3.3.2.1 Método de sequestro do radical livre DPPH

O método DPPH utiliza o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila que é reduzido por agentes antioxidantes (Figura 11). A molécula é estável e apresenta absorção entre 515-517nm. Quando reduzido, a solução apresenta alteração da cor de violeta para

amarelo. Considera-se uma metodologia fácil, precisa, econômica e rápida (AKAR; KÜÇÜK; DOĞAN, 2017; GULCIN, 2020).

Figura 11 - Estabilização do radical livre DPPH

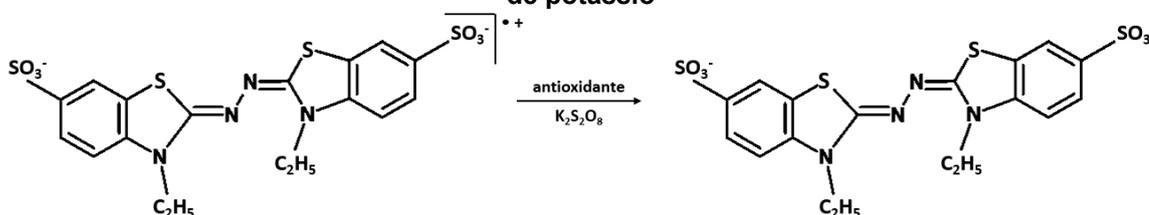


Fonte: Autoria própria (2023)

3.3.2.2 Método de captura do cátion radical ABTS

Outro método é a captura do radical $ABTS^{•+}$ [2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)] por compostos de antioxidantes (Figura 12). Dependendo do antioxidante presente e do pH do meio, o radical pode ser reduzido por meio da doação de elétron ou pela doação de hidrogênio. Pelo grau de descoloração determina-se a atividade antioxidante da amostra. O percentual de inibição desse radical é função da concentração e do tempo. Em casos em que se utiliza o trolox como padrão para expressar os resultados, o teste é chamado de TEAC (Capacidade antioxidante equivalente de Trolox). O método é simples, fácil, rápido além de reagir com compostos lipofílicos e hidrofílicos (GULCIN, 2020; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Figura 12 - Estabilização do radical ABTS por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio

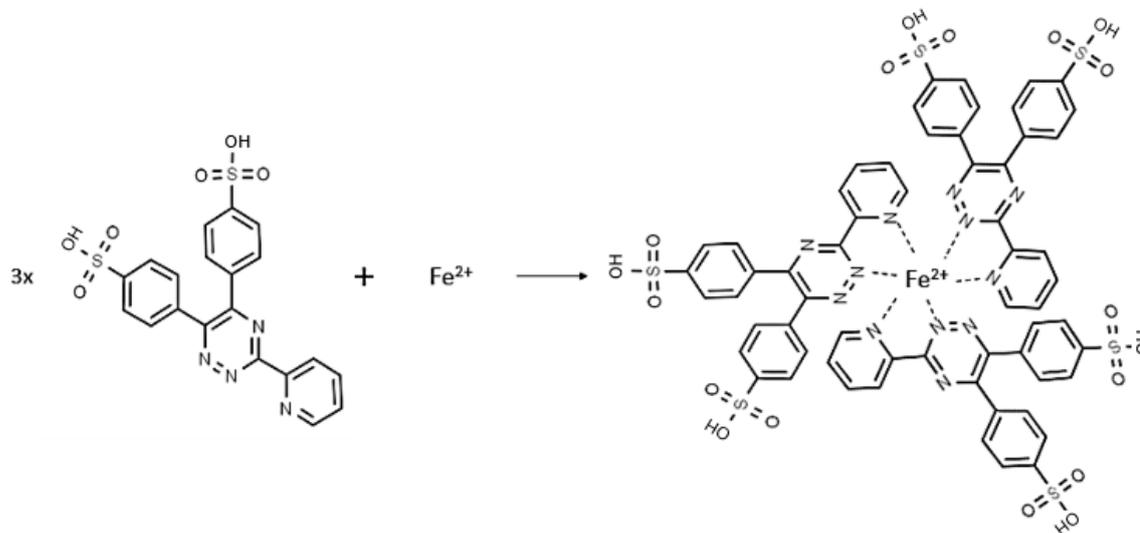


Fonte: Autoria própria (2023)

3.3.2.3 Método da Habilidade quelante de Fe (II)

A Habilidade quelante de Fe (II) também pode ser usada como método para determinar a capacidade antioxidante dos compostos. Nesse caso, a ferrozina forma um complexo vermelho após formação de quelatos com o íon ferroso (Figura 13). Por meio da leitura da absorvância a 562 nm determina-se a atividade antioxidante de acordo com a redução da cor (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

Figura 13 - Reação de complexação da ferrozina com Fe²⁺



Fonte: Autoria própria (2023)

3.4 Extração de compostos

Os compostos bioativos encontram-se distribuídos na casca, folhas, flores, raízes, frutos e sementes, possuindo cada parte uma concentração e composição diferente desses compostos (TIWARI et al., 2011). Devido as propriedades antioxidantes, a extração é fundamental para aplicação desses compostos em alimentos, suplementos e medicamentos (PATRA et al., 2021; SAGAR et al., 2018; WEN et al., 2020). Porém, cada composto possui sua particularidade, variando sua estrutura e polaridade, além de estarem presentes em diferentes combinações nas matrizes vegetais. Dessa forma, não há um método de extração padrão capaz de extrair todos os compostos presentes na planta (MONTEIRO et al., 2020; WEN et al., 2019).

Fatores como o método de extração, o tipo, proporção e a polaridade do solvente, a temperatura e o tempo de extração, o tamanho da partícula e o grau de processamento influenciam na quantidade e composição dos compostos bioativos a serem extraídos. Contudo, é necessário avaliar os compostos presentes na matriz para que se determine os melhores métodos e parâmetros de obtenção (OROIAN; DRANCA; URSACHI, 2020; PEIXOTO et al., 2022; SAGAR et al., 2018). Diversos autores avaliaram a influência desses fatores na extração dos compostos bioativos presentes no gojiberry (Tabela 1).

Tabela 1 - Extração de gojiberry para diferentes condições e métodos de extração

Método	Solvente	Condições	Fenólicos Totais	Referência
Ultrassom	Etanol (75%)	T=65°C; t=1h	14,118 mg EAG g ⁻¹ DW	(FENG et al., 2021a)
Líquido pressurizado	Etanol (100%)	T= 180°C; t=20 min	65,98 mg EAG g ⁻¹	(TRIPODO et al., 2018)
Extração sólido-líquido	Metanol (50%)	T= 45 min	40,82 mg EAG g ⁻¹	(TRIPODO et al., 2018)
Ultrassom	Água	T= 57°C; t= 23 min	371,3 mg EAG L ⁻¹	(SKENDERIDIS et al., 2018)
Maceração	Metanol (70%) Etanol (70%)	T=25°C; t=60 min	1736,38 mg EAG 100g ⁻¹ 1351,45 mg EAG 100g ⁻¹	(PEDRO et al., 2018)
Maceração	Metanol (80%)	t= 1 h	26,969 mg EAG 100g ⁻¹	(RODRIGUES et al., 2021)

T = temperatura, t = tempo, EAG = equivalente ácido gálico

Fonte: Aatoria própria (2023)

Os métodos convencionais consistem na extração com solvente sob aquecimento, sendo eles a maceração, extração Soxhlet e a hidrodestilação. Porém, apresentam alto consumo de solvente, baixa seletividade, tempo de extração elevado, degradação dos compostos sensíveis a temperatura e utilização de solventes caros e de alta pureza. Por essa razão, desenvolveu-se tecnologias alternativas, dentre as quais pode se citar a extração assistida por ultrassom (EAU), a extração assistida por microondas (EAM), extração assistida por enzimas (EAE), extração por fluido supercrítico (EFS) e extração líquida pressurizada (ELP) (FERREIRA et al., 2019; OROIAN; DRANCA; URSACHI, 2020; PEIXOTO et al., 2022; SAGAR et al., 2018; WEN et al., 2019).

A extração sob agitação é um método convencional, cujo processo se baseia na amostra em contato com o solvente sob agitação constante, sendo mais indicada

para isolar compostos sensíveis a temperatura. Esse método vem sendo usado há muitos anos e, apesar de possuir baixo custo, é demorado e utiliza muito solvente (ADADI; BARAKOVA; KRIVOSHAPKINA, 2018; ALI et al., 2019; MUNEKATA et al., 2020; OROIAN; DRANCA; URSACHI, 2020; ZANNOU et al., 2022).

A extração assistida por ultrassom é uma tecnologia muito usada recentemente devido as vantagens que ela apresenta, como rapidez, menor consumo de energia, diminuição da proporção de solvente, produto com maior pureza e altos rendimentos. Além disso, é considerada sustentável na extração de compostos fenólicos. O método consiste na emissão de ondas sonoras, o fenômeno denominado cavitação acústica gera o rompimento das paredes celulares, de forma que melhore o contato entre o solvente e o material a ser extraído (DENG et al., 2017; HERRERA-POOL et al., 2021; WANG et al., 2020; WEN et al., 2019; YUSOFF et al., 2022).

A escolha do solvente é determinante, influenciando diretamente no rendimento e na atividade antioxidante. Ele deve ser selecionado conforme a polaridade e estrutura dos compostos a serem extraídos. Dentre os solventes orgânicos são utilizados o etanol, metanol, acetona, hexano, éter e clorofórmio, sendo diluídos em água em diversas proporções (GIL-CHÁVEZ et al., 2013; MONTEIRO et al., 2020; WEN et al., 2019). O etanol se destaca na extração de compostos fenólicos de inúmeras plantas e vegetais, devido à alta eficiência apresentada por ele, além de ser uma alternativa para solventes tóxicos (MONTEIRO et al., 2020; OKIYAMA et al., 2018; SHUKLA; GOUD; DAS, 2019).

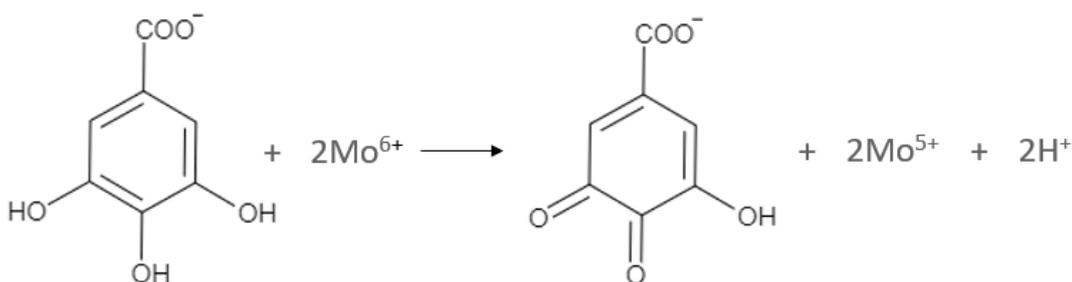
3.5 Ensaios de quantificação de compostos bioativos

Ensaios de quantificação de compostos bioativos são utilizados para caracterização da matriz em estudo. Existem diversos ensaios e diferentes métodos que são aplicados com uma finalidade específica. Dentre os métodos utilizados para quantificação de compostos tem-se a análise de fenólicos totais, utilizando o método Folin-Ciocalteu, a análise de flavonoides totais, a análise de antocianinas e a análise de carotenoides (GIUSTI; WROLSTAD, 2001; GULCIN, 2020; MARCUCCI et al., 2021; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

3.5.1 Fenólicos Totais

Os métodos espectrofotométricos são utilizados para analisar compostos fenólicos totais, no qual o método Folin-Ciocalteu (FCR) é um dos mais usados (ANGELO; JORGE, 2007; SINGLETON; ROSSI, 1965). O método se dá pela redução do reagente quando em contato com os compostos fenólicos em meio básico (Figura 14) (GULCIN, 2020; SHAHIDI; ZHONG, 2015). O reagente apresenta-se de cor amarelada (TOMEI; SALVADOR, 2007) e torna-se azul após reduzir, possuindo absorvância máxima em 725 nm. O padrão de referência mais usado é o ácido gálico. Esse método é simples e de fácil reprodução. Porém, apresenta sensibilidade em relação ao pH, temperatura e tempo de reação. Além disso, outras substâncias podem reduzir o FCR, mesmo não sendo compostos fenólicos, como açúcares e alguns aminoácidos (GULCIN, 2020; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Figura 14 - Redução do FCR

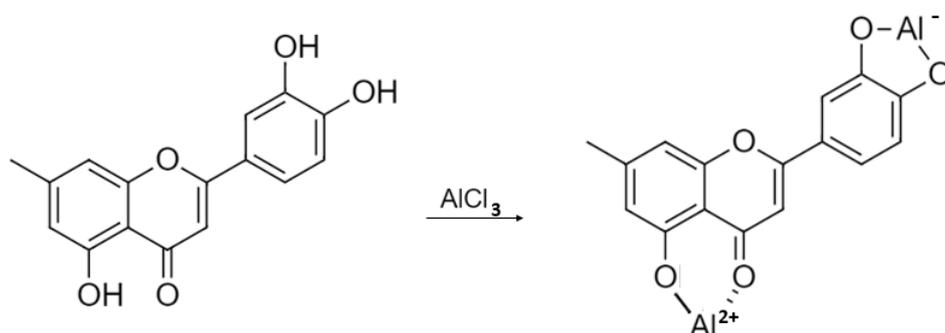


Fonte: A autoria própria (2023)

3.5.2 Flavonoides Totais

A determinação de flavonoides totais acontece devido a formação de complexos estáveis entre o cloreto de alumínio com o grupo hidroxila de flavonóis e flavonas, com absorvância máxima entre 415 e 440 nm (Figura 15) (CHANG et al., 2002). Mesmo que outros compostos fenólicos formem complexos com o cloreto de alumínio, esses não influenciam na leitura, já que absorvem comprimentos de onda menores. É possível utilizar tanto a quercetina e a rutina como curva padrão (MARCUCCI et al., 2021). Para determinar a presença de flavanonas, utiliza-se o reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina, já que o mesmo não reage com flavonóis e flavonas. Nesse caso a absorvância máxima ocorre com 295 nm (CHANG et al., 2002).

Figura 15 - Reação entre cloreto de alumínio e flavonoides



Fonte: Autoria própria (2023)

3.5.3 Antocianinas

As antocianinas possuem caráter anfótero e portanto respondem em meio ácido e básico, apresentando diferentes cores de acordo com o pH (JACKMAN et al., 1987). As antocianinas absorvem luz fortemente nos comprimentos de onda na faixa de 496 a 557 nm permitindo a quantificação por métodos espectrofotométricos, podendo expressar os resultados em mg de antocianina por 100 gramas de amostra (FULEKI; FRANCIS, 1968; GIUSTI; WROLSTAD, 2001).

3.5.4 Carotenoides

Vários métodos foram propostos para quantificação de carotenoides (ARVAYO-ENRÍQUEZ et al., 2013). A espectrometria UV-Vis foi a pioneira na identificação de carotenoides. O método relaciona o comportamento de um carotenoide conhecido com os carotenoides presentes na amostra. O valor da absorbância máxima varia de acordo com o carotenoide e também com o solvente utilizado (hexano, etanol, éter de petróleo) (ARVAYO-ENRÍQUEZ et al., 2013; BUTNARIU, 2016). Para o β -caroteno a absorbância máxima é aproximadamente de 450 nm (BUTNARIU, 2016).

3.6 Estudo cinético da extração de compostos bioativos

O estudo de modelos matemáticos tem se tornado muito importante principalmente para descrever o comportamento cinético dos processos de extração. A partir dos modelos matemáticos é possível determinar curvas cinéticas e então definir parâmetros para otimização de processos e aplicação em escala industrial (KIM et al., 2022; SIMEONOV; YANEVA; CHILEV, 2017; TODA; SAWADA; RODRIGUES, 2015). A natureza da amostra e do solvente, a temperatura do processo, o tamanho da partícula, o tempo de reação e a proporção sólido/solvente influenciam diretamente no estudo cinético (SULAIMAN; AZIZ; KHEIREDDINE, 2013; TODA; SAWADA; RODRIGUES, 2015).

Vários modelos são usados para descrever os perfis de extração, dentre eles os mais recorrentes são os apresentados no Quadro 2 (KASHANINEJAD et al., 2020; KIM et al., 2022; NATOLINO; PORTO, 2020; PATIL; AKAMANCHI, 2017; PEIXOTO et al., 2022; PHAT et al., 2022; RAKSHIT; SRIVASTAV; BHUNIA, 2020; XIE et al., 2020).

Milićević et al. (2021) investigaram a modelagem cinética da extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos de farelos de aveia e trigo e constataram que os resultados se ajustaram ao modelo hiperbólico com valores de R^2 variando de 0,930 a 0,998.

Natolino e Porto (2020) estudaram os modelos cinéticos como difusão parabólica, lei de potência e modelo So e MacDonald para extração convencional e por ultrassom de compostos fenólicos do bagaço de uva fresco e destilado. Segundo os autores, o melhor ajuste obtido foi a partir do modelo So e MacDonald com R^2 entre 0,9965 e 1,0000.

Quadro 2 - Equações dos modelos matemáticos

Modelo	Equação	Descrição	Referências
Modelo Lei do potência	$Y = Bt^n$ (1) $\ln \ln Y = \ln B + n \ln t$ (2)	Y=rendimento da extração, B=constante de taxa da extração, t=tempo de extração e n= expoente difusional. Para matriz vegetal, n<1	(KASHANINEJAD et al., 2020)
Modelo Difusão Parabólica	$C_t = A_0 + A_1 t^{1/2}$ (3)	A ₀ =rendimento da extração instantaneamente, e a constante A ₁ = taxa de difusão	(NATOLINO; PORTO, 2020)
Modelo Hiperbólico	$Y = \frac{C_1 t}{1 + C_2 t}$ (4)	C ₁ =taxa de extração inicialmente (min ⁻¹) e a razão C ₁ /C ₂ =constante de Peleg e Y=rendimento máximo de extração	(AGU et al., 2018)
Modelo de Primeira Ordem	$\frac{dC_t}{dt} = k_1(C_s - C_t)$ (5) $\ln \left(\frac{C_s}{C_s - C_t} \right) = k_1 t$ (6)	k ₁ =taxa de extração de primeira ordem (min ⁻¹), C _t =concentração ao longo do tempo e C _s =concentração obtida na saturação.	(KUSUMA; MAHFUD, 2017)
Modelo de Segunda Ordem	$\frac{dC_t}{dt} = k(C_s - C_t)^2$ (7) $C_t = \frac{C_s^2 kt}{(1 + k C_s t)}$ (8)	k=taxa de extração de primeira ordem (min ⁻¹), C _t =concentração ao longo do tempo e C _s =concentração obtida na saturação.	(XIE et al., 2020)
Modelo So e MacDonald	$C_t = C_e^w [1 - \exp(-k_w t)] + C_e^d [1 - \exp(-k_d t)]$ (9)	C _t =concentração do solvente em qualquer instante, C _e ^w =concentração final de solvente, C _e ^d =concentração final devido à difusão, k _w =coeficiente cinético da fase de lavagem (min ⁻¹) e k _d =coeficiente cinético de difusão (min ⁻¹)	(PATIL; AKAMANCHI, 2017)
Modelo Pseudo Segunda Ordem	$\frac{dq_t}{dt} = k(q_s - q_t)^2$ (10)	k= constante da taxa de extração de segunda ordem, q _s = rendimento de extração na saturação e q _t = rendimento de compostos bioativos do extrato em um determinado tempo de extração	(QU; PAN; MA, 2010)

Fonte: Autoria própria (2023)

Os autores avaliam diferentes modelos, observando o que obteve o melhor ajuste em comparação aos resultados, de acordo com os parâmetros escolhidos, a matriz e o método de extração (AGU et al., 2018; ALI et al., 2018; KADERIDES et al., 2019; KASHANINEJAD et al., 2020; KIM et al., 2022; MENKITI; AGU; UDEIGWE, 2016; NATOLINO; PORTO, 2020; PATIL; AKAMANCHI, 2017; RAKSHIT; SRIVASTAV; BHUNIA, 2020; SIMEONOV; YANEVA; CHILEV, 2017; XIE et al., 2020). Portanto, os modelos expostos serão ajustados com base em dados experimentais para avaliar a cinética de extração de compostos bioativos do extrato de gojiberry.

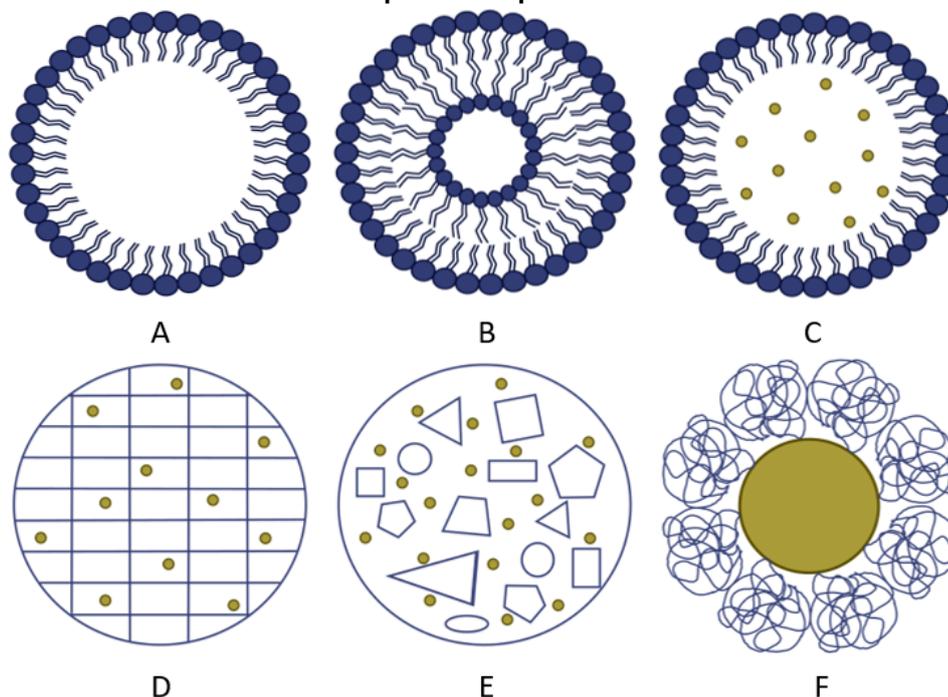
3.7 Encapsulação de Compostos Bioativos em Sistemas Nanoparticulados

A nanotecnologia tem recebido destaque entre os estudiosos devido a sua diversidade de aplicações, sendo elas nas áreas farmacêuticas, física, química, engenharias elétrica e mecânica (KIRTANE et al., 2021; SHARMA et al., 2021a). A encapsulação em nanopartículas é caracterizada pelo tamanho entre 10 e 1000 nm e vem sendo muito usada com o intuito de melhorar a estabilidade de compostos bioativos em seu processamento e armazenamento (ASSUNÇÃO et al., 2015; MARCILLO-PARRA et al., 2021; REQUE; BRANDELLI, 2021; TAVARES, 2021).

A técnica possui objetivos como diminuir a interação entre o material encapsulado e fatores ambientais, conservando características como aroma, cor e valor nutricional, separar componentes que possam reagir entre si ou que não sejam compatíveis, limitar a dispersão do material para o ambiente, impedir que reações indesejadas aconteçam, disfarçar sabor desagradável de algum composto, melhorar a solubilidade do material, ajudar na incorporação dos compostos em sistemas secos e promover a liberação controlada do material do núcleo (CORDEIRO, 2005; MARCILLO-PARRA et al., 2021; TAVARES, 2021; TIRADO-KULIEVA, 2021).

Alguns fatores como morfologia, tamanho, superfície e propriedades físico-químicas são importantes em sistemas nanoparticulados, para que se obtenham partículas com a estabilidade e propriedades desejadas. A nanoencapsulação pode ser dividida de acordo com os nanocarregadores em seis tipos, nanoemulsões, nanossuspensões, nanolipossomas, nanopartículas de lípidios sólidos (SLNs); transportador lipídico nanoestruturado (NLCs) e nanopartículas poliméricas (Figura 16) (CHEN; HU, 2019; REQUE; BRANDELLI, 2021).

Figura 16 - (A) Nanoemulsões, (B) Nanolipossomas, (C) Nanossuspensões, (D) Nanopartículas de lípidos sólidos (SLNs); (E) Transportador lipídico nanoestruturado (NLCs); e (F) Nanopartículas poliméricas



Fonte: Autoria própria (2023)

Diversos autores realizaram a encapsulação de compostos bioativos utilizando sistemas nanoparticulados. Ahmed, Fernández-González e García (2020) analisaram a nanoemulsão do extrato fenólico de uva e maçã em quitosana e proteína de soja e obtiveram eficiências de encapsulação de 75% e 95%, respectivamente. Roshanpour et al. (2021) investigaram a nanoemulsão do extrato fenólico da hortelã em quitosana e obtiveram partículas de diâmetros entre 65,18 e 108,66 nm. Liu et al. (2019a) avaliaram a encapsulação em nanopartículas poliméricas da curcumina com zeína, caseinato e alginato de sódio e comprovaram a melhora da estabilidade e atividade antioxidante do composto.

A encapsulação dos compostos do gojiberry foi estudada por Bo et al. (2017), que encapsularam os polissacarídeos da fruta em lipossomas e obtiveram uma eficiência de encapsulação de 86% e resultados significativos em relação a imunidade celular. Liu et al. (2022) estudaram as nanoemulsões como carregamento dos carotenoides presentes no gojiberry aumentando sua biodisponibilidade em 80%. O extrato fenólico foi encapsulado por Păvăloiu et al., (2021), a partir de sistemas de lipossomas e, obtiveram partículas com tamanhos inferiores a 200 nm e eficiência de encapsulação entre 75 e 85%.

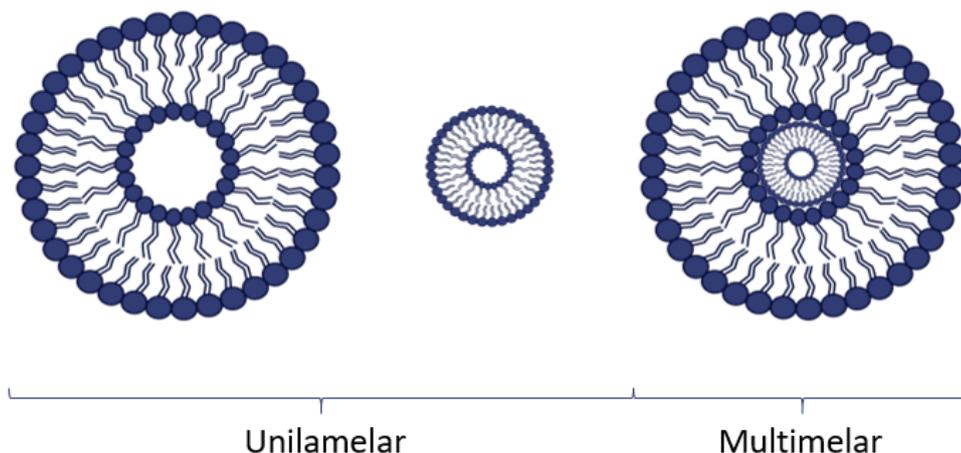
Apesar dos estudos apresentados, os trabalhos em relação a encapsulação do extrato do gojiberry são escassos, existem poucos relatos da encapsulação de compostos da fruta e não é possível encontrar pesquisas completas que avaliam o material encapsulante, os parâmetros e as técnicas de encapsulação.

3.7.1 Lipossomas

Os lipossomas são vesículas constituídas por uma bicamada de lipídios ou fosfolipídios e núcleo aquoso. Se destacam devido as suas vantagens como biodegradabilidade, não toxicidade, não imunogenicidade e biocompatibilidade (GONZALEZ GOMEZ; HOSSEINIDOUST, 2020; MARITIM; BOULAS; LIN, 2021; SUBRAMANI; GANAPATHYSWAMY, 2020; TRAN et al., 2020).

Os sistemas de lipossomas são classificados conforme a quantidade de lamelas, o tamanho da partícula e o método de preparo (GONZALEZ GOMEZ; HOSSEINIDOUST, 2020; SUBRAMANI; GANAPATHYSWAMY, 2020). Em relação a quantidade de lamelas tem-se as unilamelares e as multilamelares (Figura 17). As unilamelares podem ser pequenas (diâmetros entre 25 e 100 nm), grandes (diâmetros entre 100 e 400 nm) e gigantes (diâmetros superiores a 1 μm) (GONZALEZ GOMEZ; HOSSEINIDOUST, 2020).

Figura 17 - Lipossomas unilamelar e multilamelar



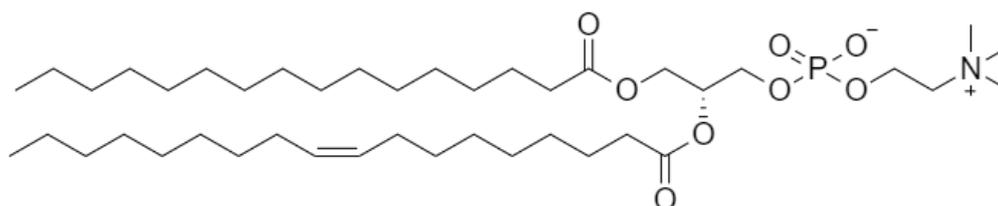
Fonte: Autoria própria (2023)

Os fosfolipídios são moléculas anfifílicas, formadas por uma extremidade polar e uma longa cadeia hidrofóbica (FIGUEROA-ROBLES; ANTUNES-RICARDO;

GUAJARDO-FLORES, 2021; HOU et al., 2021; SUBRAMANI; GANAPATHYSWAMY, 2020). Dessa forma, os nanoagregados são capazes de encapsular compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, podendo ser utilizadas para diversas aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica (CHEN; HU, 2019; GONZALEZ GOMEZ; HOSSEINIDOUST, 2020; JUSTO; MORAES, 2010).

Existe uma diversidade de fosfolipídios que se diferenciam pelo grupamento ligado ao grupo fosfato. Eles podem ser classificados como naturais e sintéticos, sendo os naturais provenientes de fontes como o ovo e a soja (HOOGEVEST; FAHR, 2019; SEDIGHI et al., 2019; SINGH; GANGADHARAPPA; MRUTHUNJAYA, 2017; SONG et al., 2022). Dentre os fosfolipídios, um dos mais utilizados para a formação dos lipossomas é a fosfatidilcolina (Figura 18).

Figura 18 – Estrutura da fosfatidilcolina



Fonte: Autoria própria (2023)

Para melhorar a estabilidade e pureza da molécula, os fosfolipídios naturais podem ser hidrolisados, ocorrendo uma quebra da instauração e eliminando as duplas ligações (SINGH; GANGADHARAPPA; MRUTHUNJAYA, 2017; SONG et al., 2022). A saturação do lipídio está diretamente relacionada a temperatura de transição de fases dos lipossomas. Dessa forma, lipídios insaturados tendem a formar sistemas com menores temperaturas de transição de fases (SAINAGA JYOTHI et al., 2022; SONG et al., 2022).

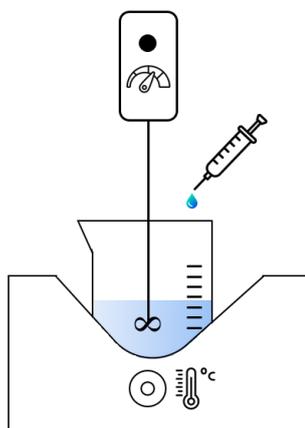
A escolha do tipo de lipossoma, bem como a característica e a concentração do fosfolipídio influenciam diretamente na estabilidade e permeabilidade dos compostos, e estes devem ser determinados de acordo com aplicação final das partículas (GONZALEZ GOMEZ; HOSSEINIDOUST, 2020; MARITIM; BOULAS; LIN, 2021).

3.7.2 Técnicas de formação e encapsulação de lipossomas

A formação dos lipossomas pode ocorrer por vários mecanismos que diferem pela secagem e redispersão do lipídio em meio aquoso. Os métodos são classificados em dispersão mecânica (sonificação, congelar e descongelar), dispersão de solvente (injeção de etanol, evaporação de fase reversa) e remoção de detergente (dialise, cromatógrafo de permeação em gel), além de métodos microfluídicos (CHEN; HU, 2019; GONZALEZ GOMEZ; HOSSEINIDOUST, 2020).

Dentre os métodos, a injeção de etanol se destaca sendo muito utilizado em larga escala por ser rápido, simples, escalonável e seguro. A técnica consiste na injeção da solução etanólica de lipídio em uma fase aquosa (Figura 19), acontecendo a formação das partículas em apenas uma etapa (GOUDA et al., 2021; JUSTO; MORAES, 2010).

Figura 19 - Representação produção de lipossoma por injeção de etanol



Fonte: Autoria Própria (2023)

A velocidade de injeção, velocidade de agitação, pH, temperatura, concentração e tipo de lipídio são parâmetros que influenciam na produção dos lipossomas. A determinação desses parâmetros deve ser definida de acordo com as características de tamanho e polidispersidade desejadas (GOUDA et al., 2021; JUSTO; MORAES, 2010; MARITIM; BOULAS; LIN, 2021; ZÔMPERO et al., 2015).

3.7.3 Produção e encapsulação de bioativos via rota microfluídica

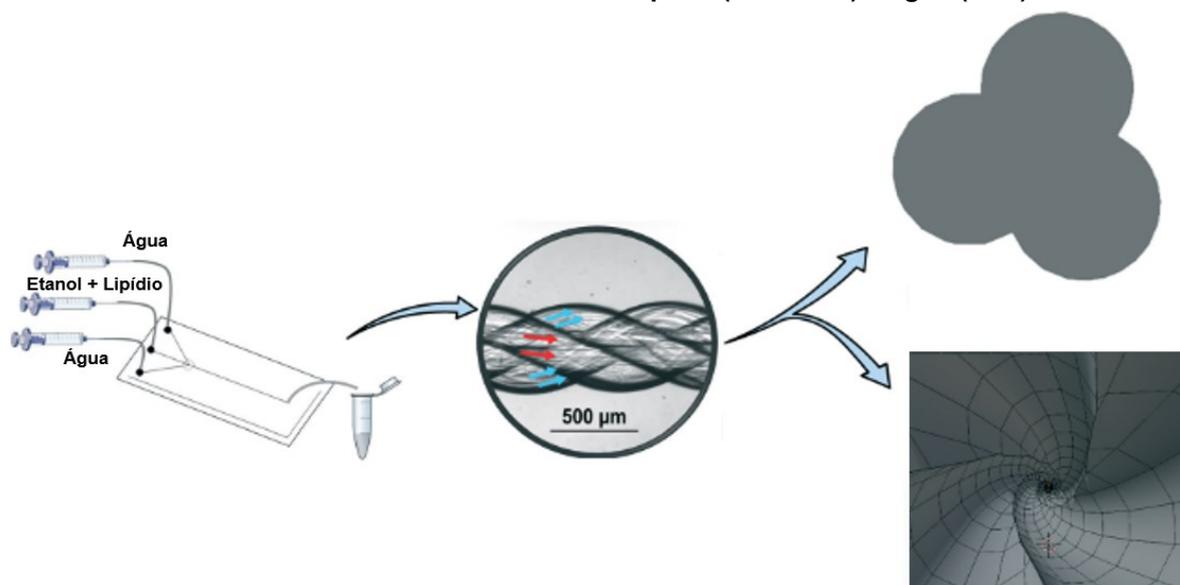
A microfluídica é uma tecnologia que aborda o estudo do escoamento de fluidos em microcanais (ordem de micrômetros), permitindo a manipulação de pequenos volumes. Em uma de suas aplicações é possível reproduzir as funções de um laboratório em um sistema miniaturizados tendo assim o que se chama de o *Lab on a Chip* (BALBINO et al., 2013; FIRMINO et al., 2021; GOMEZ-MASCARAQUE et al., 2017; HECKERT BASTOS et al., 2020; ISMAIL et al., 2020).

Apesar das vantagens apresentadas pelos métodos convencionais de produção de lipossomas, estes sistemas apresentam baixa estabilidade, e utilizam altas concentrações de solvente (MAJA; ŽELJKO; MATEJA, 2020). Portanto, a microfluídica é uma alternativa para a produção de nanoagregados devido a vantagens como baixo consumo de energia, controle do fluxo e redução dos custos e tempos de produção (GOMEZ-MASCARAQUE et al., 2017; HECKERT BASTOS et al., 2020; SEDIGHI et al., 2019).

Embora a técnica proporcione maior controle da produção das nanopartículas, os microcanais restringem o sistema ao regime laminar, desfavorecendo a transferência de massa do sistema e nesse caso, limitando o processo de mistura, além do emprego de baixas vazões limitando a produtividade mássica (GOMEZ-MASCARAQUE et al., 2017; ISMAIL et al., 2020).

Dessa forma, são feitas alterações nos microcanais para solucionar as limitações da técnica. Assim, barreiras podem ser criadas a fim de proporcionar o entrelaçamento das linhas de corrente do escoamento (Figura 20), ocorrendo a formação de vórtices transversais entre os fluxos. Porém, o escoamento continua em regime laminar, com baixos números de Reynolds, tornando esses percursos dos fluidos reproduzíveis. Como não se trata de regime turbulento, a literatura denomina como advecção caótica (CARVALHO et al., 2022; FIRMINO et al., 2021; ISMAIL et al., 2020).

Figura 20 - Representação esquemática da produção de lipossomas por advecção caótica, indicando as linhas de fluxo etanol+lipídio (vermelho) e água (azul)



Fonte: Adaptado de Firmino et al. (2021)

Fatores como a razão da vazão, a vazão total, a concentração de lipídio, remoção de etanol e a geometria do canal estão diretamente relacionadas as características dos nanoagregados e influenciam na produção dos lipossomas. Dessa forma, diversos autores estudaram a otimização desses parâmetros de acordo com a aplicação final do lipossoma (BALBINO et al., 2013; FIRMINO et al., 2021; GOMEZ-MASCARAQUE et al., 2017; ISMAIL et al., 2020; SEDIGHI et al., 2019).

4 JUSTIFICATIVA

O excesso de radicais livres no organismo são prejudiciais à saúde, podendo causar enfraquecimento no sistema imunológico, câncer, arteriosclerose, doenças cardiocoronarianas e doenças neurodegenerativas (GULCIN, 2020; SALES; ROCHA; BRESSAN, 2015; WEN et al., 2020; YARIBEYGI; ATKIN, 2018). Por essa razão, tornou-se de extrema relevância o estudo de alimentos com propriedades funcionais. Os compostos bioativos presentes nesses alimentos podem atuar como agentes antioxidantes inibindo a ação dos radicais livres (GULCIN, 2020).

O gojiberry é considerado uma fruta rica em compostos bioativos, como polissacarídeos, carotenoides e compostos fenólicos. Por isso, tem sido muito usado em benefício da saúde, devido as suas funções antioxidantes, anticâncer, atividades hipoglicêmicas, entre outras (MA et al., 2022). Apesar de sua grande potencialidade a análise cienciométrica mostrou poucos estudos relacionados a extração de compostos bioativos do *Lycium barbarum* (561 resultados), bem como a sua encapsulação (113 resultados) (ELSEVIER, 2022).

Além disso, os compostos bioativos são muito instáveis, dificultando sua aplicação (MARCILLO-PARRA et al., 2021; REQUE; BRANDELLI, 2021; TAVARES, 2021). Dessa forma, devido à dificuldade de obtenção e instabilidade dos compostos bioativos, estuda-se métodos para otimizar a extração desses compostos, de forma que se obtenha um extrato de melhor qualidade e com maior rendimento. Adicionalmente, investiga-se a encapsulação desses compostos para obter melhor estabilidade para aplicação biológica.

5 METODOLOGIA

5.1 Preparo da fruta

O gojiberry foi adquirido, de forma desidratada, em loja de produto natural da cidade de Apucarana-Paraná, Brasil. Previamente liofilizado, triturado e peneirado (Mesh 60), para obtenção de amostra homogênea. As amostras foram armazenadas e refrigeradas para análises posteriores.

5.2 Preparação dos extratos

Em um primeiro momento foi realizada a extração para determinação da proporção de solvente. Em seguida, foi feita a extração pelos diferentes métodos de extração, convencional utilizando *Shaker* e pelo ultrassom.

5.2.1 Estudo da Proporção de Solvente

As extrações foram realizadas através da extração com agitação, usando *Shaker* (Marconi modelo MA-420) em 140 rpm de agitação. Foram adicionados 1,0000 g de amostra em 10,0 mL dos solventes etanol:água nas proporções (v/v) de 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 e 90:10. O sistema ficou em agitação por 4 h, a 30°C. Todas as extrações foram realizadas em duplicata.

Em seguida, realizou-se uma filtração em funil analítico (papel filtro qualitativo, 80 g m⁻²), os volumes foram ajustados com etanol em balão volumétrico de 10 mL. Os extratos foram armazenados sob refrigeração em frascos âmbar.

5.2.2 Extração em Incubadora *Shaker* e Extração Assistida por Ultrassom

Com a melhor proporção de solvente, adicionou-se a solução de etanol:água à amostra na proporção 1:10 (m/v) e realizou-se a extração com agitação em incubadora *Shaker* e banho ultrassônico (Lavadora Ultrassônica L-200, 36000 Hz)

variando tempo e temperatura. Foi utilizado um planejamento experimental 2^2 com delineamento composto central rotacional (Tabela 2).

Tabela 2 - Planejamento fatorial 2^2 com delineamento composto central rotacional

	Temperatura (°C)	Shaker	Ultrassom
		Tempo (h)	Tempo (min)
-1,41	23,8	0,68	6,72
-1	30,0	4,00	15,00
0	45,0	12,00	35,00
1	60,0	20,00	55,00
1,41	66,3	23,30	63,30

Fonte: Autoria própria (2023)

Todas as extrações foram executadas em duplicata. As amostras foram filtradas em funil analítico (papel filtro qualitativo, 80 g m^{-2}), os volumes foram ajudados com etanol e armazenados em ambiente refrigerado sob proteção da luz para posterior análise.

5.3 Avaliação da capacidade antioxidante do gojiberry

Para a avaliação da capacidade antioxidante do gojiberry, os extratos obtidos foram submetidos aos métodos DPPH, ABTS^{•+} e Habilidade quelante de Fe (II). Os resultados foram analisados por meio da tabela ANOVA, teste Tukey ($p < 0,05$) e superfície de resposta utilizando software R (RSTUDIO, 2020).

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

A metodologia adotada para determinação de atividade antioxidante pelo DPPH foi de Rufino et al. (2007a), com modificações. Para preparar o radical DPPH ($0,12 \text{ mmol L}^{-1}$) este foi diluído ($0,0047 \text{ g}$) em 100 mL de metanol. A solução foi preparada sob proteção de luz.

Preparou-se o branco para cada extrato utilizando $100 \text{ }\mu\text{L}$ de extrato ($0,02 \text{ g mL}^{-1}$) e $2,9 \text{ mL}$ de etanol. A solução controle foi preparada misturando $100 \text{ }\mu\text{L}$ de etanol e $2,9 \text{ mL}$ de radical DPPH. Para as replicatas, adicionou-se em uma cubeta $100 \text{ }\mu\text{L}$ de

extrato e 2,9 mL de solução do radical DPPH. Após 30 min foram lidas as absorbâncias a 517 nm em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-Vis). A atividade antioxidante foi calculada, de acordo com a Equação 11.

$$\%AA = \frac{[A_c - (A_a - A_b)]}{A_c} * 100 \quad (11)$$

(A_a) corresponde a absorbância da amostra, (A_b) corresponde a absorbância do branco da amostra e (A_c) corresponde a absorbância do controle.

5.3.2 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método ABTS^{•+}

A atividade antioxidante pelo método ABTS foi feita de acordo com Rufino et al. (2007b), com modificações. Preparou-se a solução de ABTS (7,0 mmol L⁻¹) dissolvendo 192 mg do sal em água destilada (50 mL). A solução de persulfato de potássio 140 mmol L⁻¹ foi preparada adicionando 378,4 mg do sal em água destilada (10 mL). As soluções foram armazenadas em ambiente refrigerado sob proteção da luz.

Para o preparo do cátion ABTS^{•+}, 5,0 mL da solução de ABTS foi misturada com 88 µL da solução de persulfato de potássio e deixada em repouso ao abrigo da luz por 16 h. Posteriormente, 1,0 mL da solução foi diluída em etanol (aproximadamente 70 mL) até absorbância próxima de 0,900 ± 0,050 em 734 nm.

Em seguida, preparou-se as replicatas em uma cubeta adicionando 30 µL do extrato (0,02 g mL⁻¹) e 3,0 mL de solução do cátion radical ABTS^{•+}. Foi realizada a leitura da absorbância após 6 min a 734 nm em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-Vis). O branco foi preparado utilizando 30 µL do extrato e 3,0 mL de etanol e o controle adicionando 30 µL do etanol e 3,0 mL do radical. A atividade antioxidante foi calculada, conforme equação 12.

$$\%AA = \frac{[A_c - (A_a - A_b)]}{A_c} * 100 \quad (12)$$

(A_a) corresponde a absorbância da amostra, (A_b) corresponde a absorbância do branco da amostra e (A_c) corresponde a absorbância do controle.

5.3.3 Determinação da Habilidade quelante de Fe (II)

As soluções de cloreto de ferro (II) ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-bis(ácido4-fenilsulfônico)-1,2,4-triazina) foram preparadas e utilizadas no mesmo dia da análise e sob proteção da luz. Para a solução de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2 mmol L^{-1}), diluiu-se em 10 ml de água deionizada 0,0040 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. A ferrozina (5 mmol L^{-1}), foi preparada com 10 mL de água deionizada e 0,0250 g de ferrozina.

As replicadas foram preparadas em um tubo de ensaio. O extrato foi diluído adicionando-se 150 μL em 3,55 mL de etanol. A amostra foi centrifugada por 15 min. Em seguida, transferiu-se os 3,7 mL do extrato para uma cubeta e adicionou-se 0,1 mL de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. A leitura da absorbância foi feita a 562 nm em espectrofotômetro (A_0). A mistura adicionou-se 0,2 mL de ferrozina, seguida de agitação vigorosa por um minuto, e depois de 10 min de repouso foi realizada uma nova leitura de absorbância em 562 nm (A_1). Para o controle utilizou-se 3,7 mL de etanol em substituição da amostra (HABEYCH et al., 2016). O cálculo foi realizado a partir da Equação 13.

$$\% \text{Habilidade quelante} = \frac{[A_{cont} - (A_1 - A_0)]}{A_{cont}} * 100 \quad (13)$$

5.4 Caracterização do extrato

A caracterização do extrato foi realizada utilizando as técnicas espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análises termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

5.4.1 FTIR

Os espectros FTIR do extrato foram realizados em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Thermo Scientific, modelo Nicolet 6700) de 750 a 4000 cm^{-1} . Os resultados foram coletados com uma média de 60 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} .

5.4.2 Análises Térmicas – TGA e DSC

A análise termogravimétrica (Shimadzu TGA-50) foi realizada para avaliar a estabilidade térmica do extrato de gojiberry. Uma amostra de 6 mg de extrato foi analisada em atmosfera inerte de gás argônio à um fluxo de 50 mL min⁻¹ e aquecida de 20 a 800 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. A calorimetria exploratória diferencial foi realizada até a temperatura de 350°C.

5.5 Quantificação de compostos do gojiberry

Para quantificação dos compostos bioativos do extrato do gojiberry foram utilizadas as análises de fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas e carotenoides.

5.5.1 Fenólicos totais

A determinação dos fenólicos totais foi realizada usando o reagente Folin-Ciocalteu segundo a metodologia de Minussi, Rossi e Bologna (2003). O reagente Folin-Ciocalteu foi diluído em água destilada 1:1 (v/v). Em seguida foram adicionados, em triplicata, a um tubo de ensaio 250 µL do reagente, 250 µL de extrato, 500 µL de uma solução de carbonato de sódio (35,0 g Na₂CO₃ em 100 mL de água destilada), o volume foi completado com água destilada até 5,0 mL. A solução foi deixada em repouso por 25 min sob proteção de luz. Logo após, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min e foram realizadas as leituras das absorbâncias a 725 nm em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-Vis). Para o branco o extrato foi substituído por etanol. Foi construída uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 mg L⁻¹ ($y=0,006x+0,127$, $R^2=0,999$) e os resultados foram expressos em mg EAG 100 g⁻¹ de amostra, em que EAG corresponde ao equivalente em ácido gálico.

5.5.2 Flavonoides totais

Os flavonoides totais foram quantificados de acordo com Funari e Ferro (2006), com modificações. Foram misturados, em triplicata, 500 µL do extrato, 250 µL de solução de cloreto de alumínio 5%, o volume foi completado a 5,00 mL com metanol e deixado em repouso por 30 min. Em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-Vis) no comprimento de onda de 425 nm. Construiu-se uma curva padrão de quercetina ($y=0,007x+0,145$, $R^2=0,999$) nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mg L⁻¹ e os resultados foram expressos em mg EQ 100 g⁻¹ de amostra.

5.5.3 Antocianinas

Para a quantificação de antocianinas utilizou-se o método de Fuleki e Francis (1968), com modificações. A um balão volumétrico de 10 mL adicionou-se 0,2 g de extrato liofilizado e 6,0 mL de uma solução de etanol e ácido clorídrico 1,5 M (85:15, v/v) para homogeneização, em seguida completou-se o volume com o solvente extrator e a solução foi armazenada sob refrigeração por 24 h ao abrigo da luz. Após filtração, a leitura foi feita em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-Vis) a 535 nm. Os resultados foram obtidos em mg de antocianinas 100 g⁻¹ de extrato pela Equação 14.

$$\text{Antocianina (mg 100g}^{-1}) = \frac{A * 100000}{E_{1cm}^{1\%} * L * C_{amostra}} \quad (14)$$

Em que, A é o valor da absorbância, $E_{1cm}^{1\%}$ é o coeficiente de extinção (98,2 L g⁻¹ cm⁻¹), L a largura da célula (1 cm) e $C_{amostra}$ é a concentração da amostra (g L⁻¹).

5.5.4 Carotenoides

Os carotenoides foram extraídos a partir de 0,2 g de extrato liofilizado com 10 mL de solvente hexano/acetona (6:4, v/v). A mistura foi deixada em banho ultrassônico por 10 min. Os tubos foram incubados durante 9 min e centrifugados (QUIMIS –

AAKER, 3000 rpm). Após a centrifugação foi realizada imediatamente a leitura em um espectrofotômetro num comprimento de onda de 450 nm. Construiu-se uma curva de calibração com o padrão β -caroteno ($y=0,264x+0,040$, $R^2=0,997$). Os resultados foram expressos em mg β -caroteno 100 g^{-1} de extrato (NEVES et al., 2015).

5.6 Modelagem da Cinética de extração pelo método de Fenólicos Totais

Foram realizadas as extrações em diferentes tempos, conforme a Tabela 3, para a temperatura que apresentou maior atividade antioxidante para os dois métodos de extração. Os tempos foram determinados de acordo com a particularidade do método, apresentando tempos de extração inferiores para o Ultrassom, devido ao fenômeno de cavitação acústica, que permite obter altos rendimentos em baixos tempos.

Tabela 3 – Tempos de extração para análise de cinética de extração

<i>Shaker</i>	Ultrassom
0	0
5 min	2 min
15 min	4 min
30 min	6 min
45 min	8 min
1 h	10 min
4 h	15 min
12 h	30 min
24 h	60 min

Fonte: Autoria própria (2023)

Para quantificar os fenólicos totais dos extratos ao longo do tempo de extração, utilizou-se a metodologia segundo o item 5.5.1.

Pela Lei de Beer, foi calculado o valor da concentração de ácido gálico para cada tempo de acordo com as absorvâncias, utilizando a curva padrão de ácido gálico construída em diferentes concentrações ($y=0,006x+0,127$, $R^2=0,999$).

Os dados experimentais de compostos bioativos extraídos, foram ajustados utilizando cinco modelos matemáticos: Difusão parabólica, Lei de potência,

Hiperbólico, Primeira ordem, Segunda ordem, Pseudo Segunda Ordem e So e MacDonald de acordo com as equações 1 a 10.

O ajuste dos modelos cinéticos de extração dos compostos antioxidantes presentes no gojiberry foi feito a partir da função objetivo minimizada, a qual representa o somatório dos resíduos ao quadrado (Equação 15).

$$\Phi = \sum (y_{cal} - y_{exp})^2 \quad (15)$$

Em que o y_{cal} representa o rendimento do extrato obtido pelo modelo, o y_{exp} o rendimento do extrato calculado de acordo com a Equação 16 e o resultado é expresso em g de ácido gálico por gramas de extrato de gojiberry.

$$y = \frac{m_{\text{ácido gálico}}}{m_{\text{extrato}}} \cdot 100 \quad (16)$$

Para análise dos ajustes dos modelos cinéticos de extração utilizou-se qui-quadrado reduzido (X^2), erro quadrático médio (MSE), raiz do erro quadrático médio (RMSE), raiz do erro quadrático médio normalizado (NRMSE) e a análise estatística da eficiência do modelo (EF), representa pelas Equações 17 a 21.

$$X^2 = \frac{\sum (Y_{exp} - Y_{cal})^2}{N_o - N_c} \quad (17)$$

$$MSE = \frac{1}{N_o} \sum (Y_{exp} - Y_{cal})^2 \quad (18)$$

$$RMSE = \left(\frac{1}{N_o} \sum (Y_{exp} - Y_{cal})^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (19)$$

$$NRMSE = \frac{RMSE}{Y_{max} - Y_{min}} \quad (20)$$

$$EF = \frac{\sum (Y_{exp} - \overline{Y_{exp}})^2 - \sum (Y_{cal} - Y_{exp})^2}{\sum (Y_{exp} - \overline{Y_{exp}})^2} \quad (21)$$

N_o representa número de observações, N_c o número de constantes do modelo em estudo, $\overline{Y_{exp}}$ é o valor médio do rendimento da extração do composto bioativo, Y_{max} e Y_{min} os valores de fenólicos totais máxima e mínima. Para X^2 , MSE, RMSE e

NRMSE, o valor que possui melhor ajuste é próximo de 0, enquanto que para EF, o melhor valor é aproximadamente 1

5.7 Encapsulação do extrato em lipossomas

Os nanoagregados foram preparados utilizando os métodos de injeção de etanol e microfluídica.

5.7.1 Produção de lipossomas por injeção de etanol

Os lipossomas foram produzidos por injeção de etanol realizado conforme a metodologia utilizada por Zômpero et al. (2015), com modificações.

Para a produção da fase orgânica, foram utilizados dois fosfolipídios (i) fosfatidilcolina de soja 70% (Phospholipon 80H - MM:780 g mol⁻¹) e (ii) fosfatidilcolina de ovo 96% (Lipoid E PC S - MM: 770 g mol⁻¹). Para o lipídio (i), foi disperso em etanol sob aquecimento ($60 \pm 2^\circ\text{C}$), até total dissolução. Para o (ii), o lipídio foi disperso em etanol, em temperatura ambiente e a solução foi sonicada por 5 min (Cole-Parmer Ultrasonic Bath 08895-43). A concentração final do lipossoma foi de 4,64 Mm. O extrato de gojiberry foi adicionado a fase aquosa nas proporções de 5, 10 e 20% (m/m) em relação ao fosfolipídio.

Em seguida, realizou-se a injeção da fase orgânica (10%, v/v) em água na mesma temperatura de preparação do lipídio, a uma vazão de 2,5 mL min⁻¹ e velocidade de agitação de 1336 rpm.

5.7.2 Produção de lipossomas por microfluídica

Os lipossomas foram produzidos a partir do método utilizado por Balbino et al. (2013), com modificações. O fosfolipídio (E PC S - MM:770 g mol⁻¹) foi diluído em etanol sob sonificação por 5 min. As soluções de lipídio e de extrato foram preparadas de forma a se obter a mesma concentração final do sistema produzido por injeção de etanol.

Para o dispositivo microfluídico com foco hidrodinâmico simples (T longo) variou-se a razão da taxa de vazão (FRR) em 5 e 10 e para o dispositivo microfluídico

de advecção caótica variou-se a taxa de vazão total (TFR) em 0,2, 5 e 20 min mL⁻¹. As vazões foram calculadas de acordo com as equações 22 e 23.

$$FRR = \frac{2 Q_w}{Q_A} \quad (22)$$

$$TFR = 2 Q_w + Q_A \quad (23)$$

Q_w representa a vazão composta pela solução aquosa e Q_A representa a vazão da corrente alcoólica.

5.7.3 Caracterização Físico-química dos Lipossomas

Os lipossomas foram caracterizados quanto a análise do tamanho de partícula, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta através do equipamento DLS (Dynamic Light Scattering) (LitesizerTM 500, Aton Paar), na temperatura de 25°C.

5.7.4 Eficiência de Encapsulação (EE) e Capacidade de Carregamento (CC) dos Lipossomas

A separação do encapsulado do não encapsulado foi realizada por microfiltração adicionando uma alíquota de 2,0 mL da solução de lipossomas a um microfiltro (Amicon Ultra - 15 (10k) Merck Milipor) e centrifugada a 6000 g por 20 min em temperatura ambiente (Centrifuga Heal Force - Neofuge 23R). O lipossoma foi lavado com 1 mL de água deionizada nas mesmas condições.

Uma curva padrão foi construída utilizando o extrato de gojiberry em diferentes concentrações no comprimento de onda de 256 nm ($y=0,911x+0,001$, $R^2=0,995$). As absorbâncias do filtrado foram medidas em espectrofotômetro e a partir da curva do extrato obteve-se a massa de extrato livre e encapsulado.

A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada com base na massa de extrato encapsulado (m_e), em relação ao extrato adicionado inicialmente (m_i), sendo dada pela Equação 24.

$$EE\% = \frac{m_e}{m_i} \cdot (100) \quad (24)$$

A capacidade de carregamento (CC), Equação 25, foi calculada com base na massa de extrato encapsulado (m_e) em relação a massa de lipídio adicionado inicialmente (m_{lip})

$$CC\% = \frac{m_e}{m_{lip}} \cdot (100) \quad (25)$$

Os ensaios foram realizados em triplicata e utilizou-se a média e desvio padrão dos resultados.

5.8 Avaliações Biológicas

Foram realizados testes de citotoxicidade para o extrato de gojiberry comparando os diferentes métodos de extração e comparando os métodos de produção dos lipossomas sintetizados frente diferentes linhagens de células tumorais.

5.8.1 Teste de citotoxicidade/atividade antiproliferativa para os extratos obtidos pelos métodos de extração em *Shaker* e Ultrassom

A linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HUH7.5) foi cultivada em meio de cultura DMEM (10 mL) e suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal. As células foram incubadas com 5% de CO₂, 95% de umidade e temperatura de 37°C.

O ensaio de citotoxicidade do MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio de brometo] foi realizado de acordo com o método de Mosmann (1983), com modificações. Foram semeadas células em placas de cultura (96 poços). Após a estabilização, 24 h, foi descartado o meio de cultura e substituído por 100 µL do controle negativo (meio de cultura suplementado), do controle positivo (agente citotóxico metil-metanossulfonato MMS – 500 µM em 100 µL de meio de cultura suplementado) e das amostras em diferentes concentrações (5 à 1000 µg mL⁻¹ de meio de cultura suplementado).

O sistema ficou em incubação por 24, 48 e 72 h. Em seguida, o meio de cultura foi trocado por MTT (0,167 mg mL⁻¹ de meio de cultura DMEM sem suplementação) e incubados por mais 4 h. Por fim, para solubilização dos cristais de formazan o meio

foi trocado por 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Foram realizadas as leituras das absorbâncias a 560 nm em espectrofotômetro UV-Vis utilizando a leitora de microplacas (Thermo Plate).

Os resultados foram realizados a partir da análise de variância (*one way ANOVA*), do teste Tukey (n=4), com o uso do *software RStudio* (p<0,05).

As viabilidades celulares (VC) foram determinadas segundo a Equação 26.

$$VC = \left(\frac{ABS_T}{ABS_{CO-}} \right) * 100 \quad (26)$$

VC corresponde a viabilidade celular (%), ABS_T corresponde a absorbância do tratamento e ABS_{CO-} corresponde a absorbância do controle negativo.

5.8.2 Teste de citotoxicidade/atividade antiproliferativa para os lipossomas carregadas com extrato de gojiberry

A linhagem celular de câncer colorretal (HT29 P.112 - Banco de células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) foram cultivadas em meio McCoy 5A modificado (Sigma), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, e incubadas em 5% de CO₂ e 95% de umidade. O meio foi trocado a cada 2 dias até confluência de aproximadamente 80%.

Para o ensaio de MTT as células foram tripsinizadas, semeadas em placa de 96 poços e incubadas por 48h para aderência e crescimento. Em seguida, o meio foi aspirado e os poços foram lavados 2 vezes com solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS) para remover as células mortas. Foram adicionadas 100 µL do meio McCoy 5A modificado com 1% de antibiótico e as amostras (Quadro 3 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**) na proporção 1:1 (v/v) na quantidade de 105 células por poço. As células com as amostras foram incubadas por 24h, em quadruplicata.

Quadro 3 - Amostras utilizadas para análise

Amostra	Descrição
1	Controle (meio de cultura sem soro fetal bovino)
2	Phospholipon 80H Bulk
3	E PC S Bulk
4	E PC S T longo
5	E PC S Advecção caótica
6	Extrato concentrado

Fonte: Autoria própria (2023)

Após incubação o meio foi removido e cuidadosamente lavado 2 vezes com DPBS para a remoção de excesso de meio e outros reagentes. Foi adicionado 50 μL de MTT (5 mg mL^{-1}) em cada poço. Após incubação por 3 h, foi adicionado o DMSO para solubilizar o cristal formado e a leitura foi feita em leitor de microplaca (Thermo Plate) a 570 nm.

Os resultados foram analisados a partir da análise de variância (ANOVA), com o uso do *software RStudio* ($p < 0,05$). Os valores de viabilidade celular (VC) foram calculados pela Equação 26.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Determinação da proporção de solvente na extração de gojiberry

Os resultados da capacidade antioxidante dos extratos obtidos variando-se a proporção de etanol:água pelos métodos DPPH, ABTS e Habilidade quelante de Fe (II) estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e Habilidade quelante de Fe (II)

Proporção Etanol:Água (v/v)	DPPH (%)	ABTS (%)	HQ (%)
50:50	90,48±0,75 ^{ab}	88,89±0,28 ^c	80,55±0,37 ^b
60:40	91,08±1,23 ^{ab}	97,80±0,53 ^{ab}	84,03±0,36 ^a
70:30	92,14±0,87 ^a	96,53±0,13 ^b	71,68±0,45 ^c
80:20	87,90±0,79 ^b	98,22±0,19 ^a	67,29±0,52 ^d
90:10	72,67±0,94 ^c	98,33±0,52 ^a	72,25±1,04 ^c

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=6). Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey. HQ: Habilidade quelante de Fe (II).

Fonte: Autoria própria (2023)

Os resultados obtidos pelo método de sequestro do radical livre DPPH, demonstraram um elevado potencial para todos os extratos, na concentração testada, variando entre 72,67% e 92,14%. As melhores respostas foram obtidas para as proporções de etanol: água 50:50, 60:40 e 70:30, não apresentando diferença significativa entre seus valores. O menor potencial antioxidante foi obtido para a proporção de etanol: água 90:10. Para o teste de captura do radical ABTS, também foram obtidos altos percentuais de atividade antioxidante (88,89% a 98,33%), com destaque para as proporções de etanol: água 60:40, 80:20 e 90:10, não apresentando diferença significativa entre seus valores.

Pedro et al. (2018) estudaram a atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS do extrato do gojiberry e obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo, em que a proporção 70% etanol apresentou elevada capacidade antioxidante. Os autores atribuíram a proporção de solvente aos grupos funcionais constituinte dos compostos fenólicos. A presença desses grupos na estrutura dos compostos contribui

para a transferência de elétrons e átomos de hidrogênio, aumentando assim a atividade antioxidante do extrato (GULCIN, 2020; PEDRO et al., 2018).

O ensaio de Habilidade quelante de Fe (II) mostrou resultados inferiores aos outros testes, porém também indicaram atividades antioxidantes relevantes, com o melhor resultado para a proporção de etanol:água 60:40 (84,03%) e menor porcentagem para a proporção de etanol: água 80:20 (67,30%).

A variação entre as atividades antioxidantes apresentadas pelos métodos acontece devido aos diferentes mecanismos de ação dos ensaios. Os testes DPPH e ABTS indicam a capacidade dos compostos de sequestrar os radicais formados, enquanto que a Habilidade quelante do Fe (II) está relacionada a capacidade da amostra em quelar os íons ferro formados. Essa relação entre os mecanismos fica evidente na semelhança dos resultados entre os testes DPPH e ABTS. Em todos os casos, obtiveram-se alta atividade antioxidante indicando a efetividade da reação na presença dos compostos.

Avaliando os três testes, observa-se que a extração com proporção de solvente de etanol: água 60:40 apresentou diferença significativa em relação as outras proporções. Os resultados indicam a influência do solvente na extração de compostos bioativos. Estudos apontam que a polaridade moderada do solvente é ideal para a extração de compostos bioativos e que sistemas de solventes com altas e baixas polaridades não são eficientes (CATENA et al., 2020; HERRERA-POOL et al., 2021; NG; SAMSURI; YONG, 2020; RAUF; NAWAZ; SHAD, 2018). Os compostos fenólicos são constituídos por um grupo hidroxila ligado a um anel aromático e portanto interagem com álcoois, resultando em altos índices de extração (LU et al., 2019; PEDRO et al., 2018; PIRES et al., 2018; POTTERAT, 2010; WANG et al., 2010).

6.2 Planejamento experimental 2² com delineamento composto central rotacional

Avaliou-se a tabela ANOVA e partir das variáveis que apresentaram diferença significativa fez-se o ajuste da equação. Com o ajuste, construiu-se o gráfico de comparação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo e a superfície de resposta para cada método separadamente.

6.2.1 Ultrassom

A influência do tempo (t) e da temperatura (T) em relação a atividade antioxidante foi avaliada por meio da tabela ANOVA, na qual observa-se as condições que apresentaram interferência significativa na variável resposta.

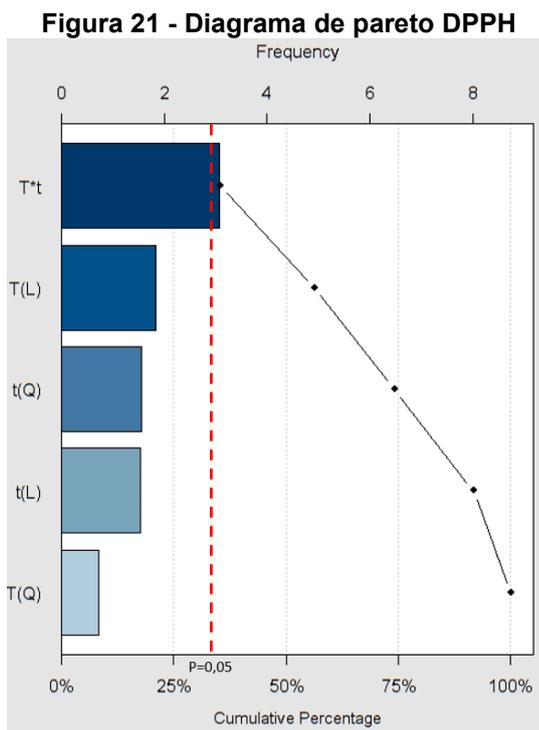
Para o DPPH (Tabela 5), nota-se que a interação secundária T*t foi o único efeito que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Tabela ANOVA DPPH

	GL	SQ	MQ	F	Pr(>F)
T	1	2,104	2,104	3,353	0,0720
t	1	1,488	1,488	2,372	0,1288
T ²	1	0,330	0,330	0,526	0,4710
t ²	1	1,517	1,517	2,419	0,1252
T*t	1	5,980	5,980	9,533	0,0031*

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma de quadrados; MQ = Média de quadrados
Fonte: Autoria própria (2023)

O diagrama de pareto (Figura 21) comprova os resultados apresentados na tabela ANOVA, em que apenas a interação entre tempo e temperatura exerce influência no aumento da atividade antioxidante. Além disso, observa-se que mesmo apresentando diferença significativa entre as médias dos tratamentos, a influência da variável é muito pequena, apontando que não existe necessidade de se ajustar um modelo para se obter um valor ótimo pela superfície de resposta.

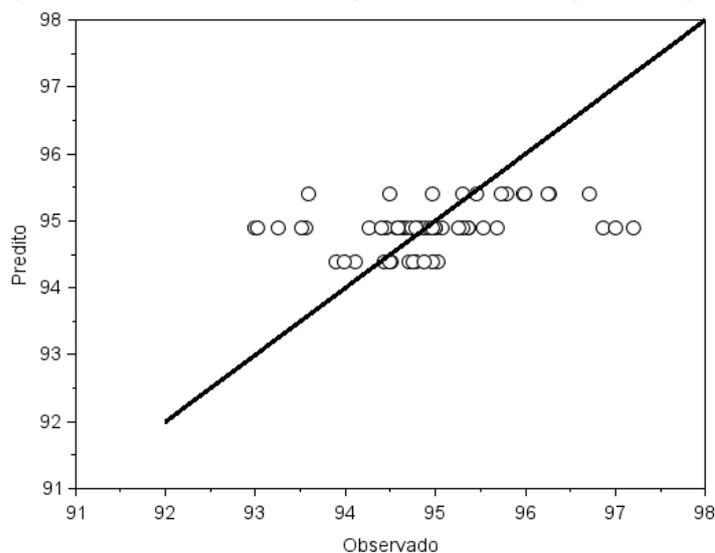


Fonte: Autoria própria (2023)

Dessa forma, ajustou-se a equação do modelo considerando apenas a interação T*t (Equação 27).

$$y = 94,8962 + 0,4992 (T * t) \quad (27)$$

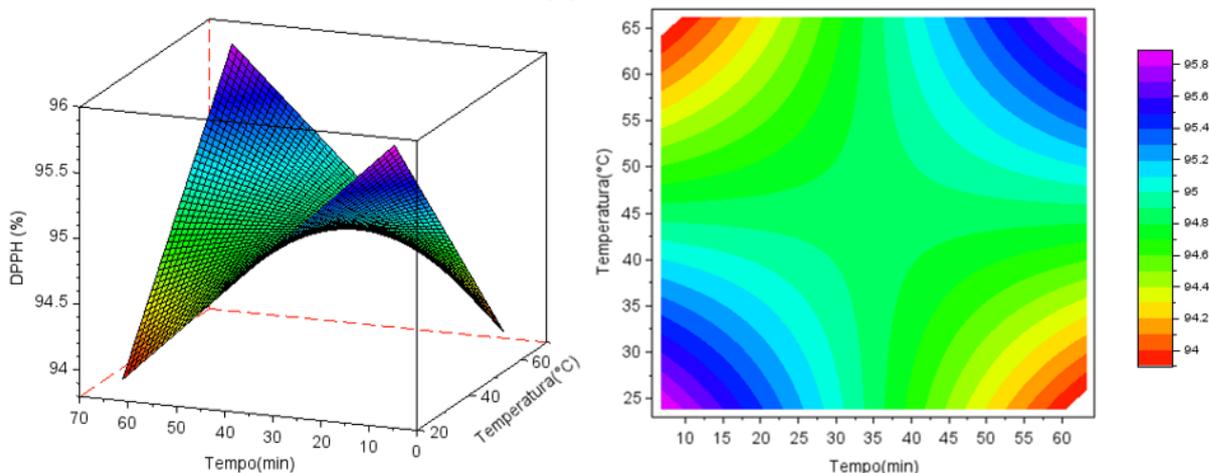
Com a equação ajustada foi gerado o gráfico de comparação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo (Figura 22) e a superfície de resposta (Figura 23).

Figura 22 - Comparação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo DPPH

Fonte: Autoria própria (2023)

O modelo apresentou valor de R^2 foi de 0,1219, porém a Figura 22 mostra a baixa variabilidade dos dados, apresentando atividades antioxidantes entre 94 e 96%. Sendo assim, mesmo com uma baixa eficiência do modelo, obteve-se um desvio padrão da regressão de 0,8204, representando que 95% das observações estariam dentro de 1,64% (duas vezes o valor do desvio padrão) da superfície ajustada, o que indica adequada previsão do modelo. A análise da superfície de resposta para o teste DPPH, Figura 23, indica que o potencial máximo é alcançado em tempos inferiores a 20 min e temperaturas abaixo de 33°C e tempos acima de 50 min e temperaturas superiores a 57°C. Porém, observa-se elevadas atividades antioxidantes para todos os extratos.

Figura 23 - Superfície de resposta para o teste DPPH em relação a temperatura e tempo. (A) Gráfico 3D e (B) Gráfico de contorno



Fonte: Autoria própria (2023)

O teste de determinação de atividade antioxidante ABTS (Tabela 6), indicou a influência da temperatura linear e da interação entre o tempo e a temperatura, com valores de p inferiores a 0,05.

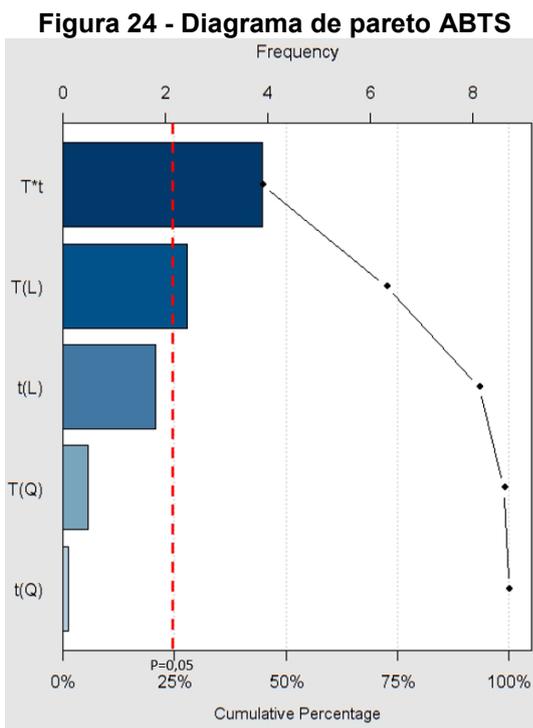
Tabela 6 - Tabela ANOVA ABTS

	GL	SQ	MQ	F	Pr(>F)
T	1	6,316	6,316	5,916	0,0180*
t	1	3,474	3,474	3,254	0,0763
T ²	1	0,253	0,2535	0,237	0,6278
t ²	1	0,011	0,0107	0,010	0,9205
T*t	1	16,14	16,14	15,11	0,0003**

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma de quadrados; MQ = Média de quadrados

Fonte: Autoria própria (2023)

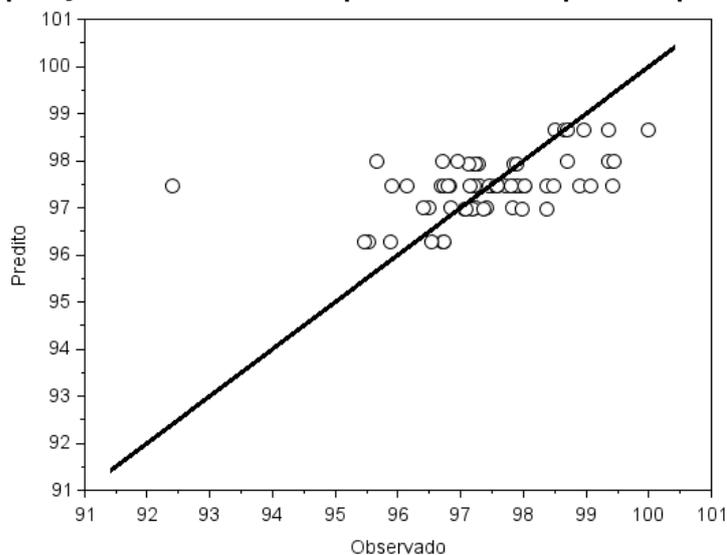
A representação do diagrama de pareto, Figura 24, confirma os resultados obtidos pela análise ANOVA, em que a interação entre tempo e temperatura e a temperatura linear interferem de forma significativa na média da atividade antioxidante.



A partir das variáveis T e T*t, ajustou-se a equação (Equação 28) do modelo e plotou-se o gráfico de desvio (Figura 25) e a superfície de resposta (Figura 26).

$$y = 97,4688 + 0,3633 T - 0,8200(T * t) \quad (28)$$

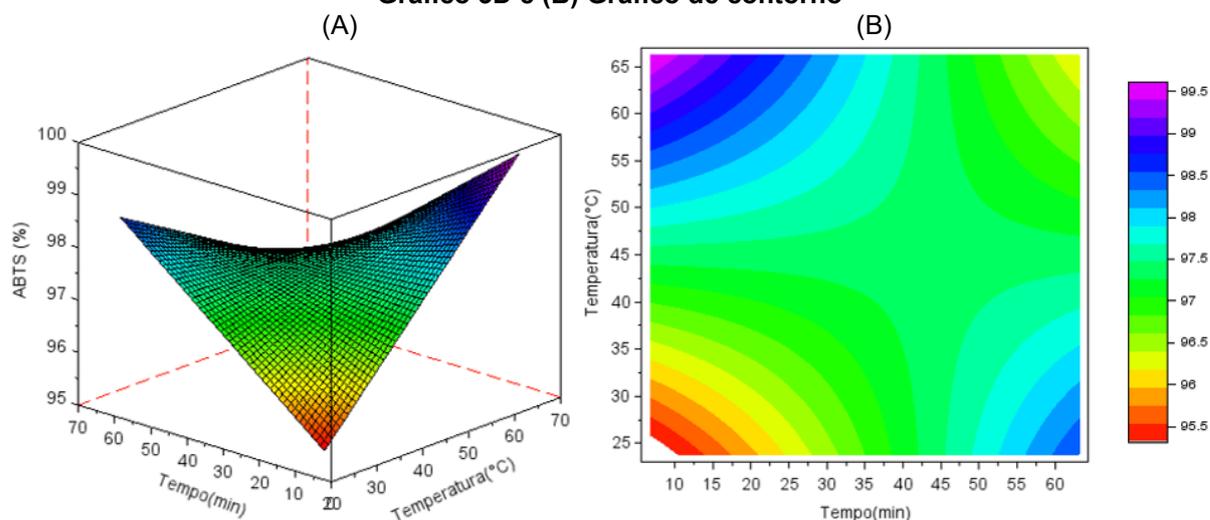
O gráfico de desvio (Figura 25) mostra a baixa variabilidade dos dados o que pode ter influenciado no baixo valor de R^2 , igual a 0,2488.

Figura 25 - Comparação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo – ABTS

Fonte: Autoria própria (2023)

Mesmo o modelo apresentando baixa eficiência, o desvio padrão da regressão foi de 1,037, indicando que 95% dos dados estariam dentro de 2,07% da superfície ajustada. Dessa forma, a Figura 26 indica uma previsão adequada em que para o teste ABTS os resultados apresentaram elevadas atividades antioxidantes em duas regiões, para tempos inferiores a 25 min com temperaturas superiores a 55°C e para tempos superiores a 60 min e temperaturas menores que 25°C, indicando então estas as melhores condições para obtenção do extrato. Porém, todos os extratos apresentam atividade antioxidante elevada, superiores a 95,5%.

Figura 26 - Superfície de resposta para o teste ABTS em relação a temperatura e tempo. (A) Gráfico 3D e (B) Gráfico de contorno



Fonte: Autoria própria (2023)

A Tabela 7 mostra que o tempo quadrático e a interação entre tempo e temperatura são significativos, apresentando interferência nas médias da atividade antioxidante do extrato para a Habilidade quelante de Fe (II).

Tabela 7 - Tabela ANOVA Habilidade quelante de Fe (II)

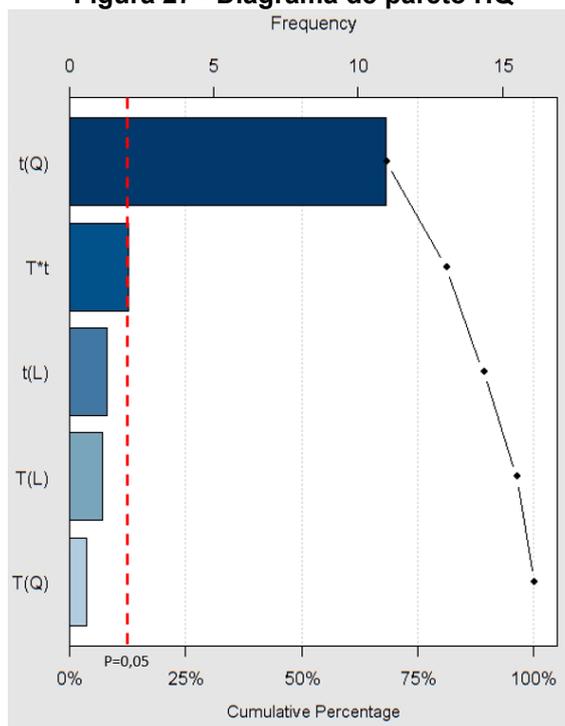
	GL	SQ	MQ	F	Pr(>F)
T	1	10,28	10,28	1,324	0,2544
t	1	13,18	13,18	1,697	0,1976
T ²	1	2,82	2,82	0,3630	0,5491
t ²	1	932,8	932,8	120,1	5,890e ⁻¹⁶ ***
T*t	1	33,18	33,18	4,274	0,0430*

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma de quadrados; MQ = Média de quadrados

Fonte: Autoria própria (2023)

Além da tabela ANOVA, o diagrama de pareto (Figura 27) valida os resultados obtidos, e também indica maior influência do tempo quadrático sob a atividade antioxidante.

Figura 27 - Diagrama de Pareto HQ



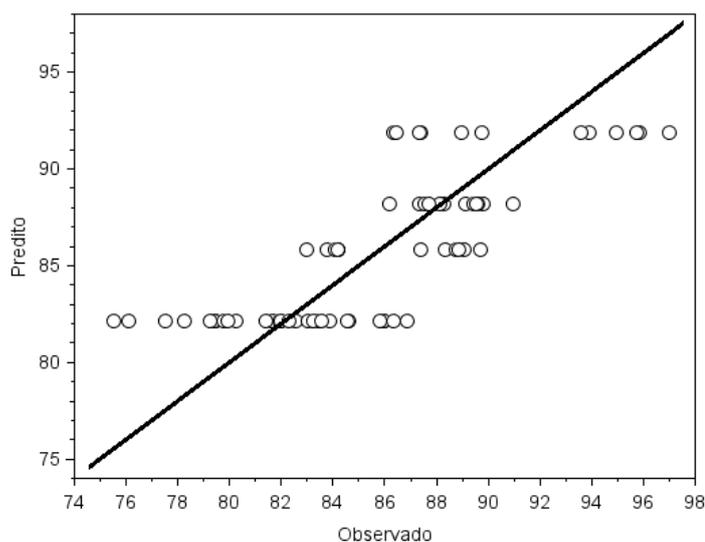
Fonte: Autoria própria (2023)

Com os termos que apresentaram valores de p menores que 0,05, fez-se o ajuste da equação (Equação 29).

$$y = 82,125 + 4,902t^2 + 1,176(T * t) \quad (29)$$

Plotou-se o gráfico dos dados preditos pelo modelo em função dos dados experimentais (Figura 28) onde foi possível observar que o modelo apresentou ajuste razoável aos dados, com valor de R^2 de 0,6279. Além disso, o desvio padrão da regressão foi de 2,934, o que representa que 95% dos dados estariam dentro de 5,87% da superfície ajustada.

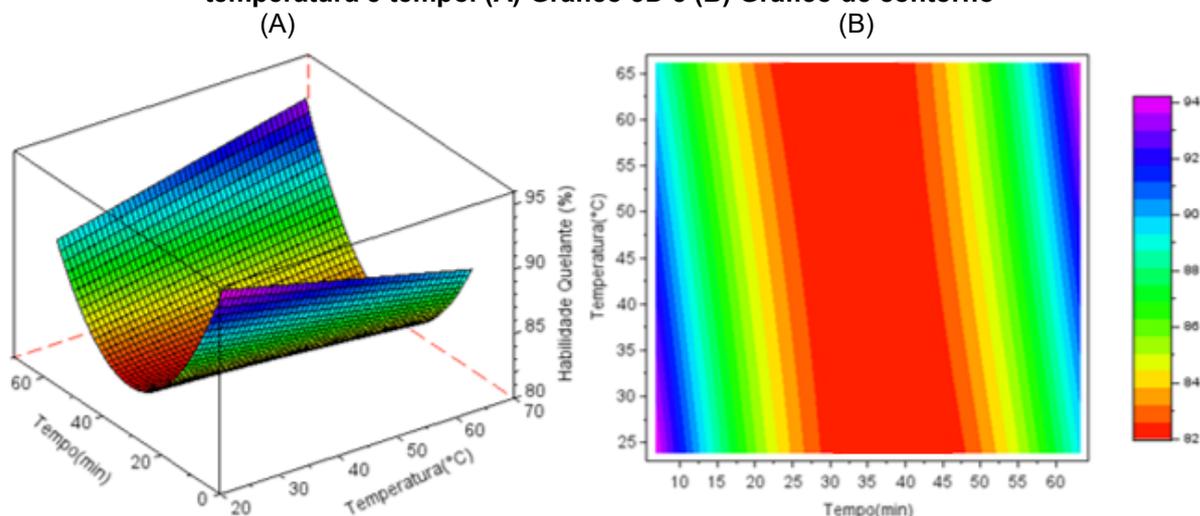
Figura 28 - Comparação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo - HQ



Fonte: Autoria própria (2023)

O gráfico de superfície de resposta para a Habilidade quelante de Fe (II) (Figura 29) apresentou potencial máximo nas regiões em que tem-se temperaturas inferiores a 60°C e tempos menores que 15 min e também em temperaturas acima de 30°C e tempos superiores a 57 min.

Figura 29 - Superfície de resposta para o teste Habilidade quelante de Fe (II) em relação a temperatura e tempo. (A) Gráfico 3D e (B) Gráfico de contorno



Fonte: Autoria própria (2023)

Os resultados indicam que para análise do ajuste do modelo não deve ser considerado apenas o valor do R^2 , pois observa-se devido à baixa variabilidade dos dados obtêm-se um ajuste inadequado. Além disso, quanto menor a diferença significativa apresentada pelas variáveis menor o ajuste.

6.2.2 Shaker

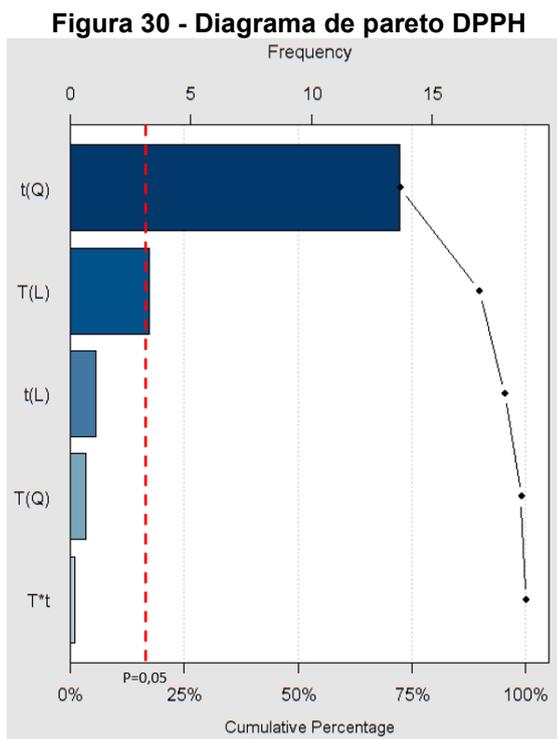
Aplicou-se as mesmas análises para os extratos do Shaker. Os resultados para o teste do DPPH (Tabela 8) indicaram que os efeitos de temperatura linear e tempo quadrático obtiveram diferença significativa na média da variável resposta, com um valor de p menor que 0,05.

Tabela 8 - Tabela ANOVA DPPH

	GL	SQ	MQ	F	Pr(>F)
T	1	27,60	27,60	10,83	0,0017**
t	1	2,870	2,870	1,126	0,2929
T ²	1	1,150	1,150	0,4510	0,5045
t ²	1	474,3	474,3	186,2	< 2,2e ⁻¹⁶ ***
T*t	1	0,1000	0,1000	0,0390	0,8435

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma de quadrados; MQ = Média de quadrados
Fonte: Autoria própria (2023)

As variáveis indicadas pela análise de variância aparecem no diagrama de pareto (Figura 30) com barras que ultrapassam a linha vermelha tracejada, observa-se maior influência do tempo quadrático sob a atividade antioxidante.

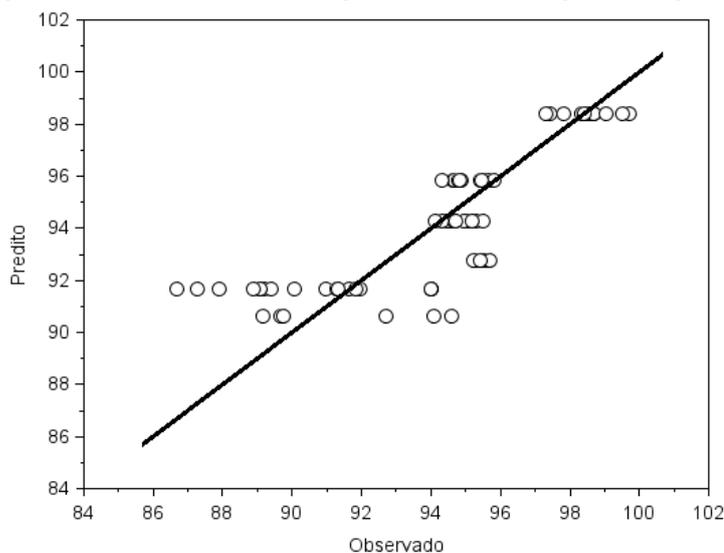


Os efeitos T e t^2 interferem significativamente nas médias da atividade antioxidante, e, portanto, foram utilizados no ajuste da equação (Equação 30).

$$y = 91,6754 - 0,7594T + 3,3861t^2 \quad (30)$$

Pela equação, gerou-se o gráfico dos resultados preditos e a superfície de resposta. O gráfico dos dados do modelo (Figura 31) indicou um ajuste razoável do modelo, apresentando um valor de R^2 de 0,6811. Além disso, o desvio padrão da regressão foi de 1,826, o que representa que 95% dos dados estariam dentro de 3,65% da superfície ajustada.

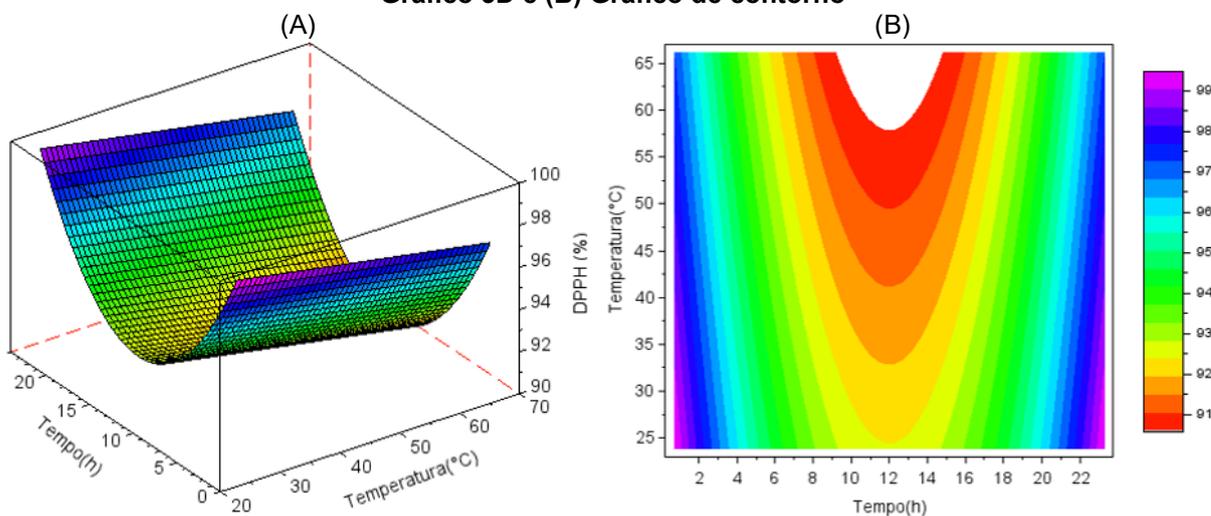
Figura 31 - Comparação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo – DPPH



Fonte: Autoria própria (2023)

A Figura 32, indica os resultados do DPPH, na qual tem-se o potencial máximo em duas faixas, alcançado elevadas atividades antioxidantes em toda a faixa de temperatura em tempos inferiores a 3 h e superiores a 21 h.

Figura 32 - Superfície de resposta para o teste DPPH em relação a temperatura e tempo. (A) Gráfico 3D e (B) Gráfico de contorno



Fonte: Autoria própria (2023)

A Tabela 9 mostra que os efeitos que interferem nas médias da atividade antioxidante ABTS são a temperatura linear, a temperatura quadrática, o tempo quadrático e a interação entre o tempo e a temperatura para o ABTS.

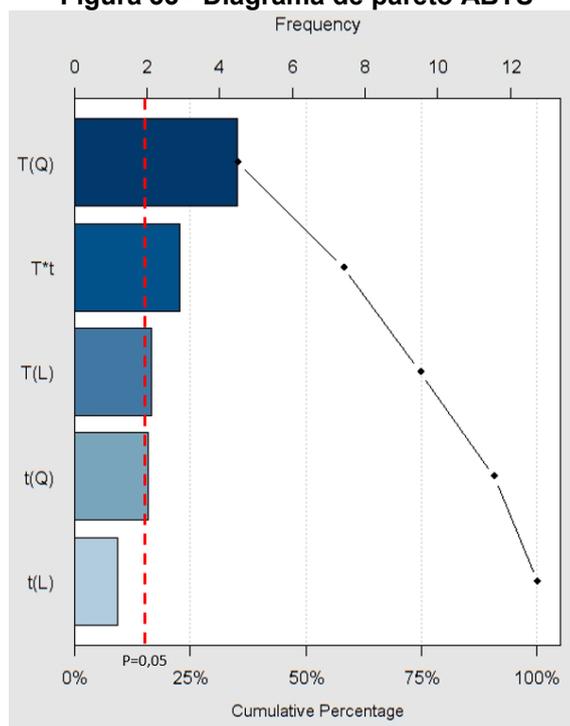
Tabela 9 - Tabela ANOVA ABTS

	GL	SQ	MQ	F	Pr(>F)
T	1	4,796	4,797	4,492	0,0382*
t	1	1,506	1,506	1,410	0,2397
T ²	1	21,57	21,57	20,21	3,230e ⁻⁵ ***
t ²	1	4,398	4,398	4,119	0,0469*
T*t	1	9,016	9,016	8,444	0,0051**

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma de quadrados; MQ = Média de quadrados
 Fonte: Autoria própria (2023)

O diagrama de pareto (Figura 33) foi construído como complemento da tabela ANOVA, onde é possível observar que apenas o tempo linear não exerce influência sobre a atividade antioxidante. Dentre as outras variáveis, a temperatura quadrática é a que apresentou maior influência sobre o sistema.

Figura 33 - Diagrama de pareto ABTS



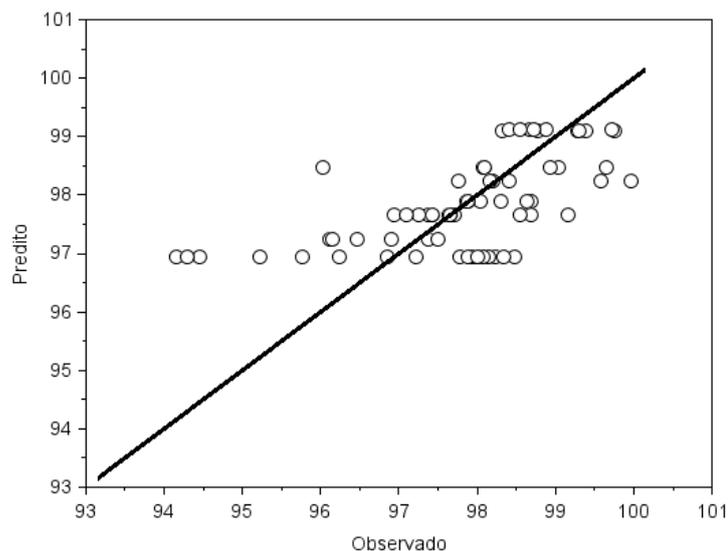
Fonte: Autoria própria (2023)

Fez-se o ajuste da equação utilizando os efeitos que apresentaram influência significativa (Equação 31).

$$y = 96,946 + 0,3166T + 0,8718T^2 + 0,3617t^2 - 0,6129(T * t) \quad (31)$$

O gráfico dos desvios (Figura 34) gerado a partir da equação ajustada, indicou um valor de R^2 de 0,3776. Porém, o desvio padrão da regressão foi de 1,037, o que representa que 95% dos dados estariam dentro de 2,07% da superfície ajustada.

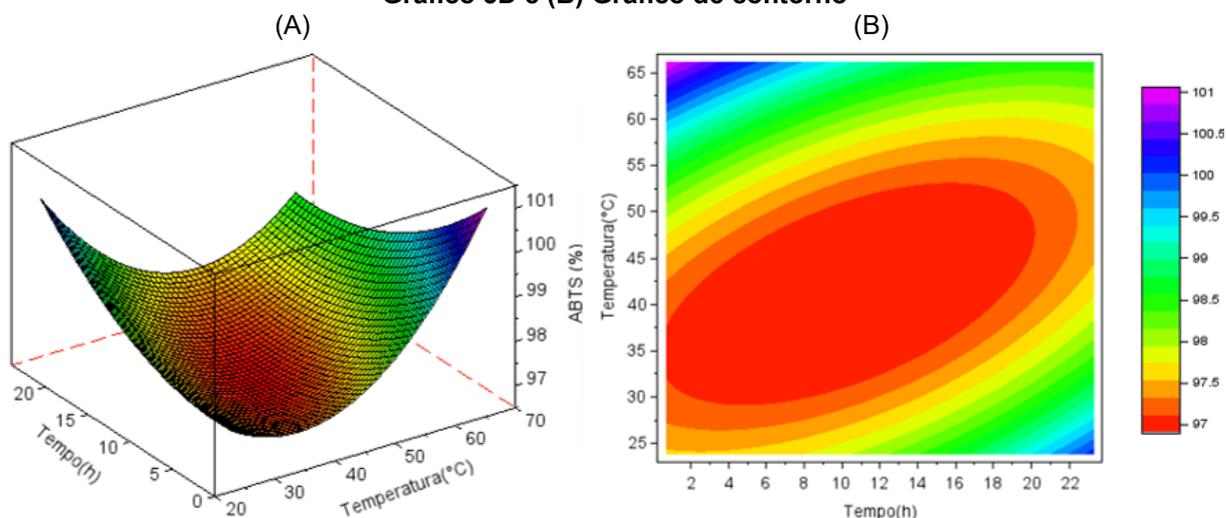
Figura 34 - Comparação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo – ABTS



Fonte: Autoria própria (2023)

A Figura 35 que relaciona os tempos e temperaturas para o ensaio do ABTS. Obteve-se o potencial máximo em duas regiões, a primeira indica elevadas atividades antioxidantes para os tempos inferiores a 7 h e temperaturas superiores a 60°C, já a segunda região para tempos maiores que 21 h e temperaturas menores que 27°C. Os resultados possuem baixa variabilidade, com atividades antioxidantes entre 95 e 99%.

Figura 35 - Superfície de resposta para o teste ABTS em relação a temperatura e tempo. (A) Gráfico 3D e (B) Gráfico de contorno



Fonte: Autoria própria (2023)

A Tabela 10 indica os resultados que interferem nas médias da atividade antioxidante pela Habilidade quelante de Fe (II), sendo elas a temperatura linear, o tempo linear e o tempo quadrático.

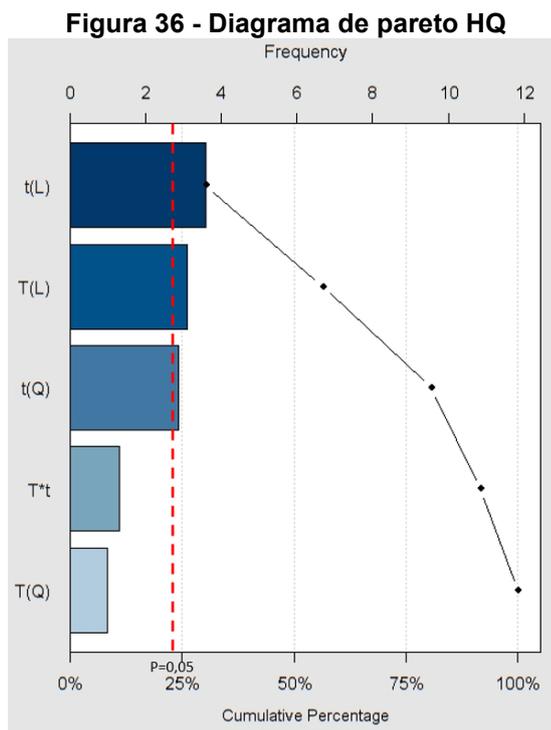
Tabela 10 - Tabela ANOVA Habilidade quelante de Fe (II)

	GL	SQ	MQ	F	Pr(>F)
T	1	80,50	80,50	9,592	0,0030**
t	1	107,5	107,5	12,807	0,0007***
T ²	1	8,200	8,200	0,985	0,3249
t ²	1	69,20	69,20	8,249	0,0056**
T*t	1	14,26	14,26	1,699	0,1975

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma de quadrados; MQ = Média de quadrados

Fonte: Autoria própria (2023)

Para melhor interpretação dos resultados, o diagrama de Pareto foi utilizado (Figura 36) para comprovar os resultados obtidos pela tabela ANOVA. O diagrama também mostrou que as variáveis de temperatura linear, tempo linear e tempo quadrático possuem influência sobre o sistema.



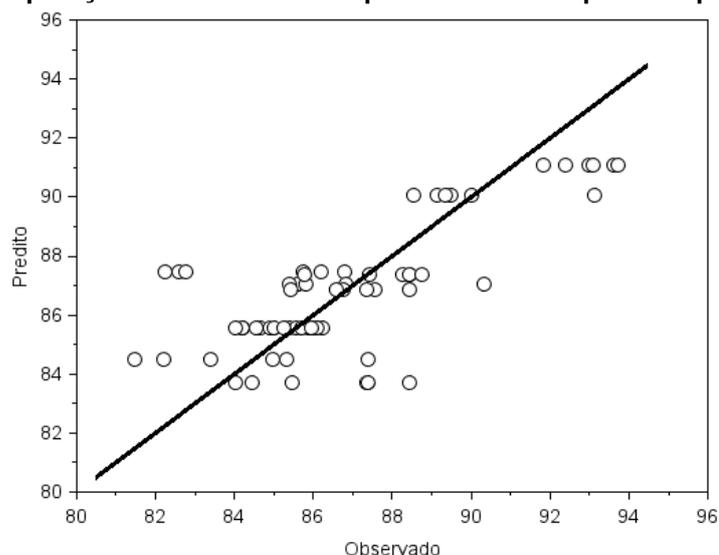
Fonte: Autoria própria (2023)

Considerando os efeitos que apresentaram valor de p inferior a 0,05, ajustou-se a equação (Equação 32) para elaboração do gráfico de comparação e superfície de resposta.

$$y = 85,950 + 1,297T + 1,499t + 1,452t^2 \quad (32)$$

Por meio do gráfico da Figura 37, observa-se que o modelo se ajustou razoavelmente aos dados, com valor de R^2 foi de 0,5577. Contudo, vale ressaltar que o desvio padrão da regressão foi de 2,891, o que representa que 95% dos dados estariam dentro de 5,78% da superfície ajustada.

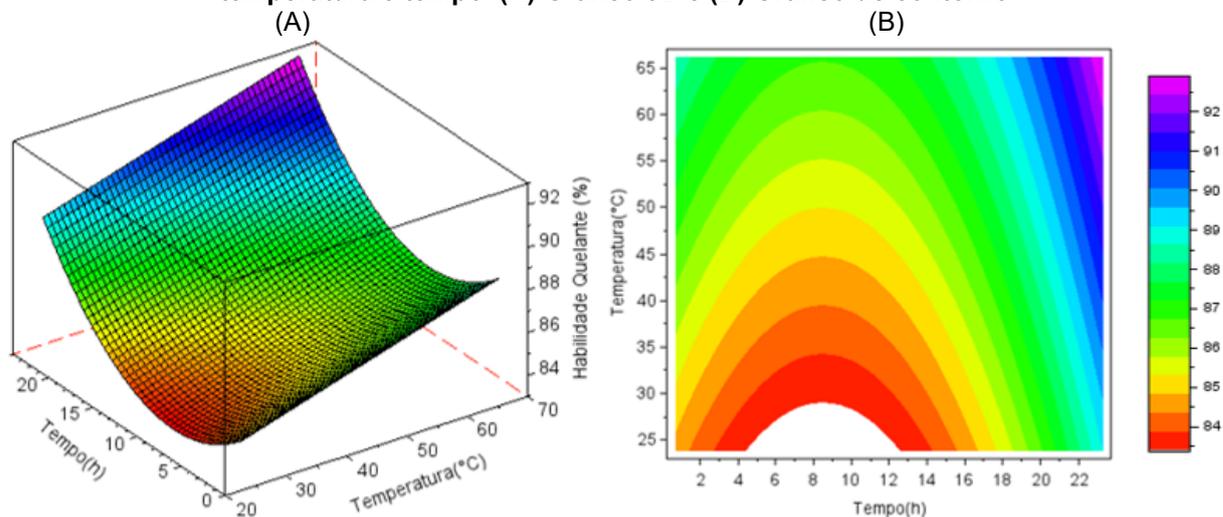
Figura 37 - Comparação entre os dados experimentais e os preditos pelo modelo – HQ



Fonte: Autoria própria (2023)

Para a Habilidade quelante de Fe (II), os gráficos (Figura 38) apresentaram potencial máximo nas regiões em que tem-se tempos acima de 19 h e em temperaturas acima de 30°C.

Figura 38 - Superfície de resposta para o teste Habilidade quelante de Fe (II) em relação a temperatura e tempo. (A) Gráfico 3D e (B) Gráfico de contorno



Fonte: Autoria própria (2023)

A partir das análises nota-se que na maior parte dos casos estudados, observa-se a baixa interferência dos tratamentos nas médias das atividades antioxidantes, conforme apresentado pelos dados da tabela ANOVA refletindo na baixa efetividade do ajuste dos modelos observada pelos valores de R^2 . Portanto, os

resultados indicam a limitada confiabilidade dos modelos em descrever a variação da atividade antioxidante em função dos tratamentos.

Por outro lado, os modelos ajustados apresentaram alta eficácia, pois os desvios padrão das regressões foram bem próximos a zero. Assim, há indícios de que as atividades antioxidantes dos extratos foram pouco alteradas pelo tempo e temperatura de extração, sendo assim foi considerada uma alternativa em se utilizar o teste Tukey para determinar entre as condições de extração aquela cujas amostras apresentaram maior atividade antioxidante.

6.3 Determinação das condições de extração e método de extração

Devido à baixa variabilidade dos dados, avaliou-se as atividades antioxidantes pelo teste Tukey e determinou-se as condições analisando os resultados dos três testes. As atividades antioxidantes dos extratos obtidos através da extração assistida por ultrassom, variando tempo e temperatura, conforme o planejamento experimental e utilizando o solvente etanol: água 60: 40 estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e Habilidade quelante de Fe (II) para os extratos obtidos através da extração assistida por ultrassom

Extrato	Tempo (min)	Temperatura (°C)	DPPH (%)	ABTS (%)	HQ (%)
1	15,00	30,0	94,98±0,84 ^b	96,14±0,59 ^c	87,88±1,18 ^{bc}
2	55,00	30,0	94,46±0,42 ^b	97,43±0,34 ^{abc}	88,69±0,78 ^b
3	15,00	60,0	94,63±0,35 ^b	99,02±0,56 ^a	83,89±0,48 ^d
4	55,00	60,0	96,11±0,41 ^a	97,04±0,55 ^{bc}	89,40±1,05 ^b
5	6,71	45,0	94,84±0,20 ^b	98,03±0,45 ^{ab}	95,16±1,29 ^a
6	35,00	45,0	94,63±1,30 ^b	97,42±0,53 ^{abc}	80,73±2,61 ^e
7	63,28	45,0	95,16±0,53 ^{ab}	97,00±2,63 ^{bc}	87,70±1,37 ^{bc}
8	35,00	24,0	94,76±0,23 ^b	97,52±0,54 ^{abc}	80,98±1,56 ^e
9	35,00	66,2	95,02±0,21 ^b	97,80±1,57 ^{abc}	85,93±0,77 ^{cd}

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=6). Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey. HQ: Habilidade quelante de Fe (II)

Fonte: Autoria própria (2023)

Para o ultrassom (Tabela 11), a atividade antioxidante pelo método DPPH variou entre 94,46±0,42% (30°C por 55 min) e 96,11±0,41% (60°C por 55 min). Para o ABTS, grande parte dos resultados não apresentaram diferença significativa, nas

condições de 30°C por 55 min, 45°C por 6,71 min, 45°C por 35 min, 24°C por 35 min e 66,2°C por 35 min chegando a um percentual de 99,02±0,56% para 60°C por 15 min. A maior atividade antioxidante pelo método de Habilidade quelante de Fe (II) foi obtido para 45°C por 6,71 min, enquanto a menor foi para 24°C por 35 min. Os resultados mostraram que em todos os casos foram obtidos extratos com alta capacidade antioxidante, porém comparando os resultados de cada método é possível verificar que o extrato 5 (45°C por 6,71 min) apresentou destaque entre os três testes. Dessa forma, percebe-se que apesar de altos tempos e temperaturas possuírem eficiência de extração, foi possível obter resultados satisfatórios com temperatura intermediária em baixo tempo.

Os resultados da determinação da atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e Habilidade quelante de Fe II dos extratos obtidos através da extração com agitação, utilizando shaker, variando tempo e temperatura, conforme o planejamento experimental e utilizando o solvente etanol: água 60: 40, estão representados na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e Habilidade quelante de Fe (II) para os extratos obtidos com agitação em *Shaker*

Extrato	Tempo (h)	Temperatura (°C)	DPPH (%)	ABTS (%)	HQ (%)
1	4,00	30,0	94,69 ± 0,20 ^b	96,75 ± 0,60 ^d	84,13 ± 2,19 ^d
2	20,00	30,0	95,59 ± 0,15 ^b	98,30 ± 1,27 ^{abc}	84,39 ± 2,07 ^d
3	4,00	60,0	94,47 ± 0,22 ^b	99,14 ± 0,51 ^a	86,59 ± 1,89 ^{cd}
4	20,00	60,0	95,11 ± 0,28 ^b	98,23 ± 0,36 ^{abc}	89,94 ± 1,64 ^b
5	0,68	45,0	98,36 ± 1,04 ^a	97,46 ± 0,17 ^{bcd}	87,02 ± 1,02 ^c
6	12,00	45,0	90,48 ± 2,24 ^c	96,94 ± 1,52 ^{cd}	85,26 ± 0,72 ^{cd}
7	23,32	45,0	98,65 ± 0,22 ^a	98,01 ± 0,91 ^{abcd}	92,94 ± 0,72 ^a
8	12,00	24,0	95,46 ± 0,18 ^b	98,68 ± 0,88 ^{ab}	86,19 ± 1,79 ^{cd}
9	12,00	66,2	91,66 ± 2,42 ^c	98,83 ± 0,47 ^{ab}	87,84 ± 1,10 ^{bc}

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=6). Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey. HQ: Habilidade quelante de Fe (II)

Fonte: Autoria própria (2023)

Os resultados obtidos pelo método de extração com agitação em incubadora *Shaker* também demonstram um alto potencial antioxidante. O método DPPH mostrou alta atividade antioxidante para os ensaios 5 (98,36±1,04%) e 7 (98,65±0,22%), enquanto os ensaios 6 (90,48±2,24%) e 9 (91,66±2,42%) apresentaram resultados com menores níveis desta atividade. A atividade antioxidante para o método ABTS

variou entre $99,14\pm 0,51\%$ (60°C por 4 h) e $96,75\pm 0,60\%$ (30°C por 4 h). Para a Habilidade quelante de Fe (II) o ensaio 7 (45°C por 23,3 h) se destacou com $92,94\pm 0,72\%$ de atividade antioxidante. Comparando os resultados obtidos pelos três métodos, é possível observar que para a extração em *Shaker* o ensaio que proporcionou melhores respostas foi o 7 (45°C por 23,3 h) com percentuais de $98,65\pm 0,22\%$ para o DPPH, $98,01\pm 0,91\%$ para o ABTS e $92,94\pm 0,72\%$ para a Habilidade quelante de Fe (II).

Os resultados apresentados indicaram elevadas atividades antioxidantes para os dois métodos de extração. Autores constataram que a extração com agitação quando comparada com a extração assistida por ultrassom não apresentou diferença significativa em suas atividades antioxidantes (MUNEKATA et al., 2020; ZANNOU et al., 2022).

Ambos os métodos apresentaram resultados ótimos para a temperatura de extração de 45°C . Autores comprovaram a influência da temperatura de extração em relação a qualidade do extrato e notaram que baixas temperaturas são ineficientes na extração de compostos bioativos, pois o aumento da temperatura está relacionado a solubilidade dos compostos, causando o aumento dos processos difusivos e a maior transferência de massa do sistema. Porém, temperaturas muito elevadas provocam a degradação dos compostos. Dessa forma, temperaturas intermediárias são ideais para o processo de extração (HE; DU; XU, 2018; PATIL et al., 2021; ZHENG et al., 2022).

Ali et al. (2019) constataram a decomposição de flavonoides no extrato de gojiberry ao comparar a extração por ultrassom e com agitação e perceberam a ineficiência do método convencional. Os autores observaram que a exposição dos compostos a altas temperaturas por longos períodos, no método convencional, provocou a degradação das estruturas dos compostos, levando a diminuição da concentração de tais compostos.

Embora sejam obtidas elevadas atividades antioxidantes é necessário avaliar se não houve degradação dos compostos. Desse modo, foi realizada a quantificação de compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas e carotenoides presentes nos extratos da melhor condição, 45°C por 6,71 min para o ultrassom e 45°C por 23,3 h para o *Shaker* (Tabela 13).

Tabela 13 - Resultados de atividade antioxidante e compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas e carotenoides para os extratos obtidos por ultrassom e *Shaker*

	Ultrassom (45°C; 6,71 min)	<i>Shaker</i> (45°C; 23,3 h)
DPPH (%)	94,84±0,20 ^{ab}	98,65±0,22 ^a
ABTS (%)	98,03±0,45 ^{ab}	98,01±0,91 ^a
HQ (%)	95,16±1,29 ^a	92,94±0,72 ^b
Fenólicos Totais (mg EAG 100 g ⁻¹ de amostra)	503,96±3,24 ^a	443,99±4,67 ^b
Flavonoides (mg EQ 100 g ⁻¹ de amostra)	314,64±4,42 ^a	299,34±1,89 ^b
Antocianinas (mg 100 g ⁻¹ de extrato)	8,40±0,10 ^a	10,15±0,01 ^a
Carotenoides (mg β-caroteno 100 g ⁻¹ de extrato)	1,94±0,05 ^a	1,72±0,03 ^b

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=6). Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey. HQ: Habilidade quelante de Fe (II)

Fonte: A autoria própria (2023)

Os resultados de quantificação dos compostos bioativos comprovam a maior eficiência da extração assistida por ultrassom se comparada à extração com agitação em *Shaker*, com valores superiores para fenólicos totais, flavonoides e carotenoides indicando resultados de 503,9586 mg EAG 100 g⁻¹ de amostra, 314,6407 mg EQ 100 g⁻¹ de amostra e 1,9448 mg β-caroteno 100 g⁻¹ de extrato, respectivamente. Deng et al. (2017) obtiveram resultados semelhantes para a quantificação dos compostos fenólicos. Os resultados do estudo mostraram maior eficiência pela extração assistida por ultrassom, demonstrando que o ultrassom não apresentou degradação dos compostos. Além disso, a cavitação acústica causada pelo ultrassom ocorre pela geração de ondas sonoras que provocam o rompimento da superfície da amostra refletindo em um aumento da taxa de extração dos compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides (WEN et al., 2019).

Também observa-se o efeito do tempo de extração sob as concentrações dos compostos. Estudos mostraram que a exposição dos compostos à temperatura por longos períodos geram a degradação de fenólicos (HU et al., 2022; NA; LIHUI, 2021; SONG et al., 2020; ZHENG et al., 2022). Portanto, a grande diferença nos tempos de extração entre os métodos, mostrados neste estudos, é um fator significativo nos resultados apresentados. Para obtenção de altas atividades antioxidantes, o método convencional requer extrações por tempos superiores a 20 h. Dessa forma, os

compostos extraídos pelo *Shaker* são expostos a temperatura por muito mais tempo que os extraídos pelo ultrassom, apresentando assim, diferença significativa entre eles.

Fatores como condições, métodos de extração, armazenamento, local e forma de cultivo influenciam diretamente nos resultados. Entretanto, autores confirmam os altos índices de compostos bioativos presentes na fruta, bem como sua elevada atividade antioxidante (ALI et al., 2019; BENCHENNOUF et al., 2017; GULCIN, 2020; ILIĆ et al., 2020; NA; LIHUI, 2021; PEDRO et al., 2022; ZHENG et al., 2022).

Pedro et al. (2022) avaliaram as concentrações de compostos fenólicos para o extrato de gojiberry, indicando altos índices desses compostos e os resultados não indicaram diferença significativa entre o *Shaker* e o ultrassom. Ilić et al. (2020) compararam as concentrações de compostos fenólicos entre três espécies de gojiberry e observaram resultados variando 162,4 e 295,7 mg GAE 100 g⁻¹.

Portanto, considerando os resultados apresentados em relação a quantificação dos compostos para os diferentes métodos, o extrato produzido por ultrassom nas condições de 45°C por 6,71 min, além de apresentar elevadas atividades antioxidantes indicou maiores concentrações de compostos, se destacando em relação ao extrato produzido pelo *Shaker*. Além disso, do ponto de vista industrial, menores tempos estão relacionados a maior produtividade, aumentando consequentemente a lucratividade.

6.4 Cinética de extração pelo método de Fenólicos Totais

Os resultados gráficos obtidos pelos modelos cinéticos a partir das concentrações de fenólicos totais ao longo do tempo para o ultrassom e *Shaker*, na 45°C, condição ótima de extração, estão expressos nas Figura 39 e 40. As Tabelas 14 e 15 indicam os coeficientes e os parâmetros estatísticos obtidas para cada modelo.

Tabela 14 - Coeficientes dos modelos cinéticos de extração

Ultrassom						
Modelo	y_0	y_1	B	C_1	C_2	n
Difusão parabólica	0,0012	0,0005	-	-	-	-
Lei de potência	-	-	$7,8125e^{-4}$	-	*	0,500
Hiperbólico	-	-	-	0,0012	0,2762	-
Modelo	C_e^w	C_e^d	C_s	k_w	k_d	k_1
Pseudo segunda ordem	-	-	-	-	-	94,3748
So e Mc Donald's	$2,2257e^{-7}$	$1,8555e^{-7}$	-	0,3050	0,1223	-
Primeira Ordem	-	-	-	-	-	0,1949
Segunda Ordem	-	-	-	-	-	$9,435e^5$
Shaker						
Modelo	y_0	y_1	B	C_1	C_2	n
Difusão parabólica	$0,6985e^{-3}$	$0,0047e^{-3}$	-	-	-	-
Lei de potência	-	-	-	-	-	-
Hiperbólico	-	-	-	0,0330	39,1285	-
Modelo	C_e^w	C_e^d	C_s	k_w	k_d	k_1
Pseudo segunda ordem	-	-	-	-	-	$3,2044e^4$
So e Mc Donald's	$8,4147e^{-8}$	$3,4795e^{-10}$	-	1,2418	0,0049	-
Primeira Ordem	-	-	-	-	-	1,0225
Segunda Ordem	-	-	-	-	-	$3,2044e^8$

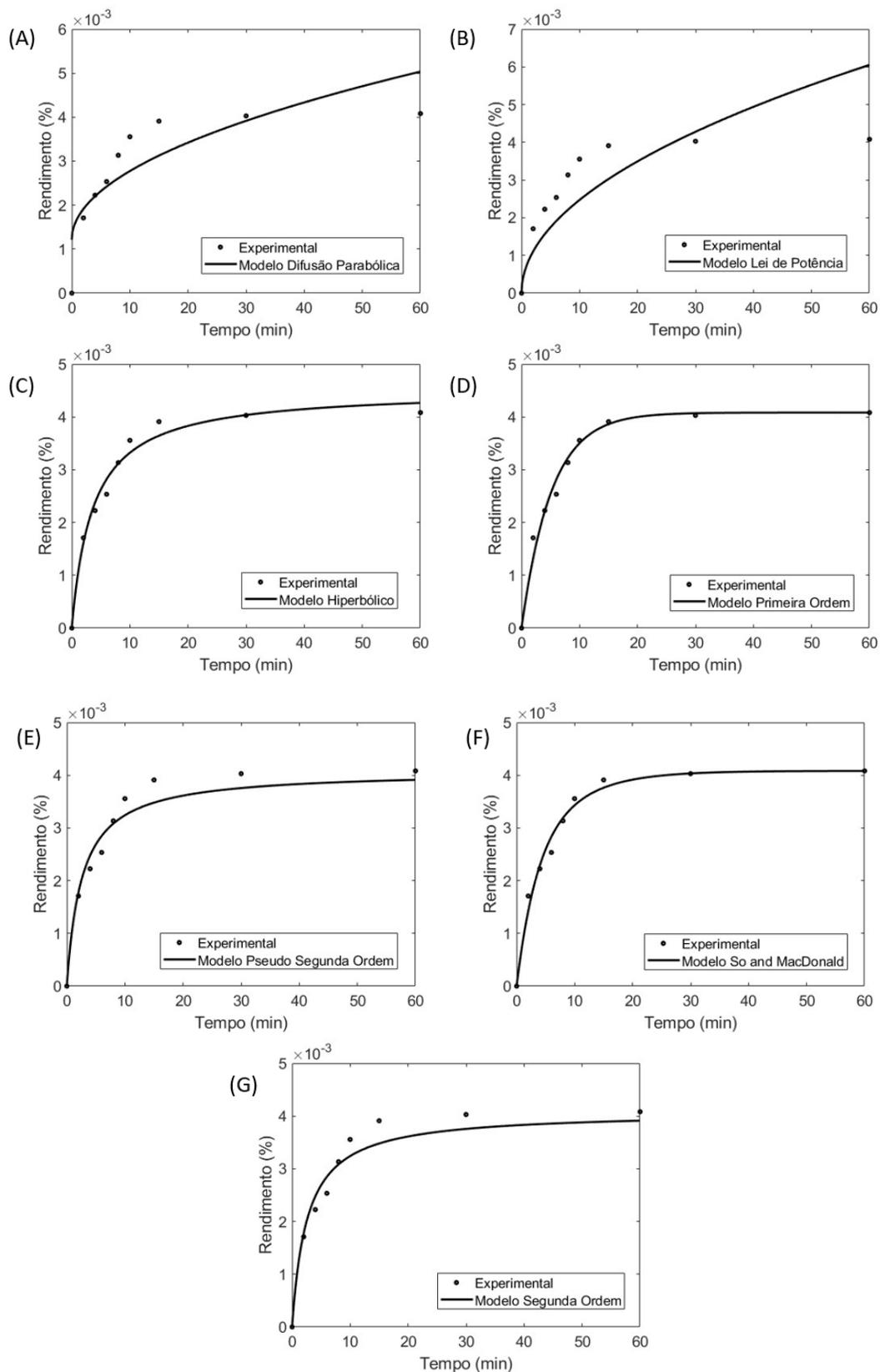
Fonte: Autoria própria (2023)

Tabela 15 - Análise estatística dos modelos cinéticos de extração

Ultrassom					
Modelo	χ^2	MSE	RMSE	NRMSE	EF
Difusão parabólica	5,6468e ⁻⁷	4,3920e ⁻⁷	6,6272e ⁻⁴	0,1624	0,7273
Lei de potência	9,9339e ⁻⁷	8,8301e ⁻⁷	9,3969e ⁻⁴	0,2303	0,4517
Hiperbólico	3,9097e ⁻⁸	3,0409e ⁻⁸	1,7438e ⁻⁴	0,0427	0,9811
Pseudo Segunda Ordem	7,9275e ⁻⁸	6,1659e ⁻⁸	2,4831e ⁻⁴	0,0608	0,9617
So e Mc Donald's	3,1018e ⁻¹⁶	2,4125e ⁻¹⁶	1,5532e ⁻⁸	0,0381	0,9850
Primeira Ordem	3,0714e ⁻⁸	2,7302e ⁻⁸	1,6523e ⁻⁴	0,0405	0,9830
Segunda Ordem	6,9366e ⁻¹⁶	6,1659e ⁻¹⁶	2,4831e ⁻⁸	0,0608	0,9617
Shaker					
Modelo	χ^2	MSE	RMSE	NRMSE	EF
Difusão parabólica	8,0751e ⁻⁸	6,2807e ⁻⁸	2,5061e ⁻⁴	0,2966	0,1046
Lei de potência	3,8709e ⁻⁷	3,4408e ⁻⁷	5,8658e ⁻⁴	0,6942	-3,9051
Hiperbólico	6,9977e ⁻¹³	5,4426e ⁻¹³	7,3774e ⁻⁷	8,7312e ⁻⁴	0,9999
Pseudo Segunda Ordem	1,9580e ⁻¹²	1,5229e ⁻¹²	1,2341e ⁻⁶	0,0015	0,9999
So e Mc Donald's	8,8648e ⁻²²	6,8949e ⁻²²	2,6258e ⁻¹¹	3,1077e ⁻⁴	0,9999
Primeira Ordem	4,0353e ⁻¹²	3,5869e ⁻¹²	1,8939e ⁻⁶	0,0022	0,9999
Segunda Ordem	1,7133e ⁻²⁰	1,5229e ⁻²⁰	1,2340e ⁻¹⁰	0,0015	0,9999

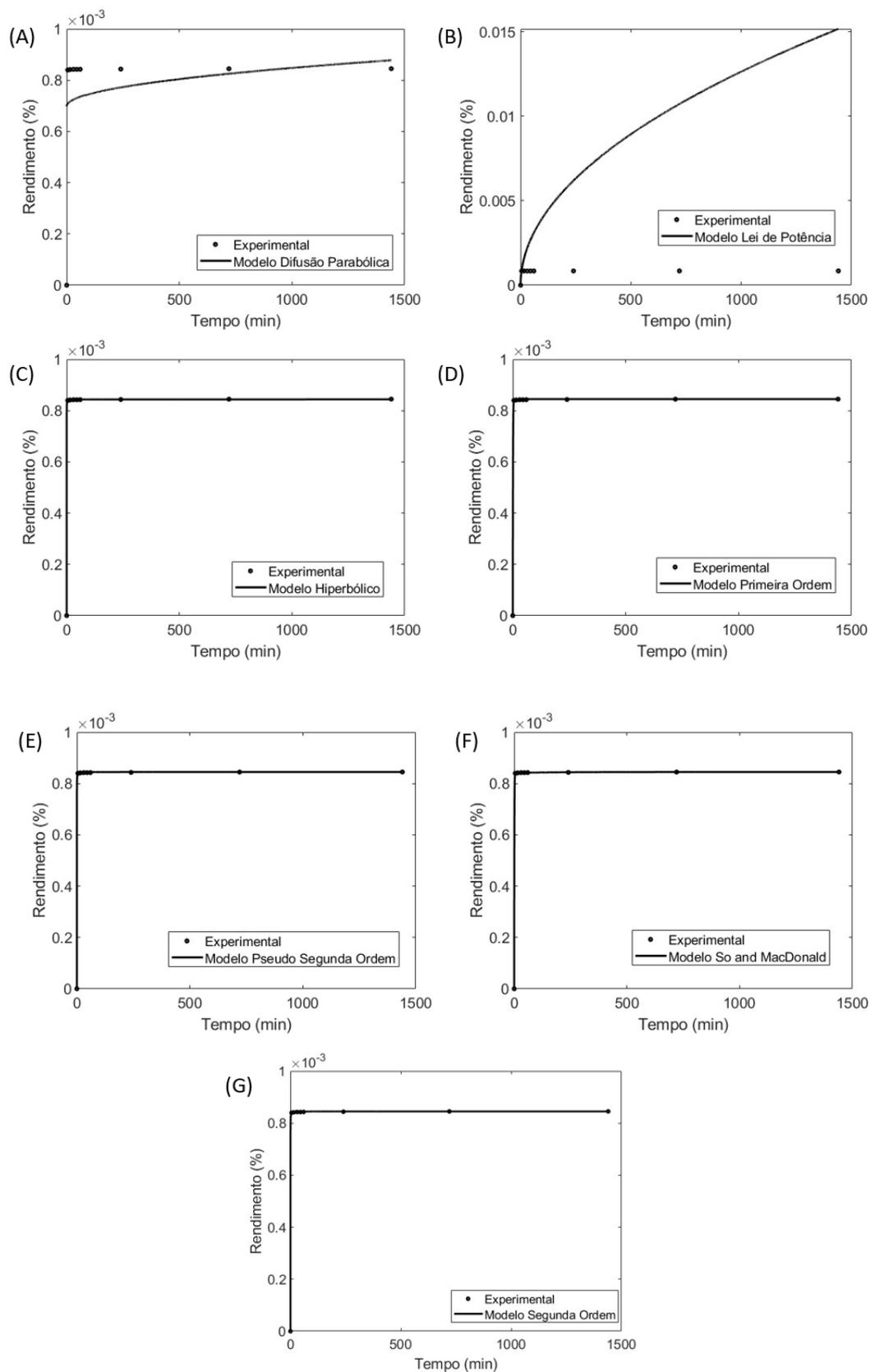
Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 39 - Ajustes matemáticos dos modelos cinéticos de extração para o Ultrassom. (A) Modelo Difusão parabólica; (B) Modelo Lei de potência; (C) Modelo Hiperbólico; (D) Modelo Primeira Ordem; (E) Modelo Pseudo Segunda Ordem; (F) Modelo So and MacDonald; (G) Modelo Segunda Ordem



Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 40 - Ajustes matemáticos para os modelos cinéticos da extração para o *Shaker*. (A) Modelo Difusão parabólica; (B) Modelo Lei de potência; (C) Modelo Hiperbólico; (D) Modelo Primeira Ordem; (E) Modelo Pseudo Segunda Ordem; (F) Modelo So and MacDonald; (G) Modelo Segunda Ordem



Fonte: Autoria própria (2023)

A partir dos resultados, observa-se que a extração utilizando *Shaker* extrai os compostos bioativos presentes na superfície do material em contato com o solvente, uma vez que o equilíbrio é atingido rapidamente. Por outro lado, o ultrassom alcançou o equilíbrio após os primeiros 15 min de extração. Entretanto, apesar de apresentar um tempo superior ao *Shaker*, mostrou rendimentos superiores. Esse comportamento, demonstra a interferência dos efeitos difusivos, indicando que além dos compostos presentes na superfície também foram extraídos os compostos do interior do material.

Além disso, a cinética de extração apresentada pelos diferentes métodos comprova os resultados obtidos anteriormente pela otimização da extração, em que as atividades antioxidantes das amostras extraídas pelo *Shaker* não apresentam diferença significativa entre os tempos de 0,68 e 23,32 h, apresentando o equilíbrio rapidamente. Para o ultrassom, os resultados também não indicam diferença significativa entre os tempos de 6,71 e 15,00 min. Entretanto, a cinética de extração avalia-se apenas a concentração dos compostos fenólicos, enquanto que a atividade antioxidante engloba um conjunto de compostos presentes nos extratos, refletindo no equilíbrio após os 15,00 min para o ultrassom.

Em relação aos modelos aplicados, para ambos os métodos, Ultrassom e *Shaker*, os modelos So e MacDonald's e Segunda Ordem apresentaram os melhores ajustes e os modelos de Difusão parabólica e da Lei de potência foram os que indicaram os piores ajustes de acordo os dados cinéticos de extração e os parâmetros estatísticos avaliados.

O modelo So e MacDonald's analisa os processos de lavagem (k_w) e a difusão (k_d) que ocorrem durante a extração. Quando k_w apresenta valores maiores que k_d , tem-se o processo de lavagem mais rápido que o processo de difusão e o inverso representa que o processo de difusão é mais rápido (ARANHA et al., 2021; NATOLINO; PORTO, 2020). Além disso, os resultados observados pelos modelos ajustados comprovam que a difusão foi maior para os modelos ajustados com os dados da extração por ultrassom, com valores de 0,1223, quando comparado ao valor apresentado pelo *Shaker* de 0,0049.

Para o modelo de segunda ordem, a extração ocorre em dois processos simultâneos. A princípio, a taxa de extração é rápida e permanece constante à medida que o equilíbrio está sendo alcançado. Esse modelo, é amplamente utilizado para

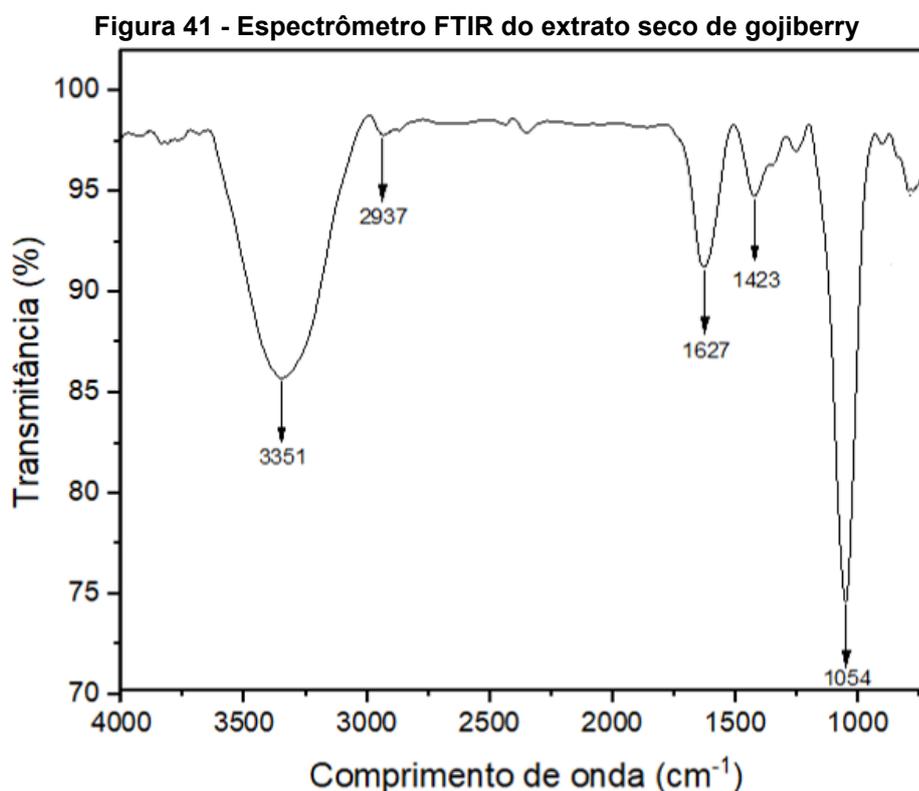
extrações de líquido sólido, e, portanto, se adequa aos dados cinéticos apresentados (ALARA; ABDURAHMAN; UKAEGBU, 2018; GALGANO et al., 2021).

6.5 Caracterização do extrato

A caracterização do extrato, obtido a partir da melhor condição e método, foi realizada por FTIR e análises térmicas.

6.5.1 FTIR

O espectro FTIR mostrado na Figura 41, indica os grupos funcionais que apresentam vibrações para os comprimentos de onda entre 4000 e 700 cm^{-1} . As bandas formadas representam os compostos presentes no extrato de gojiberry.



Fonte: Autoria própria (2023)

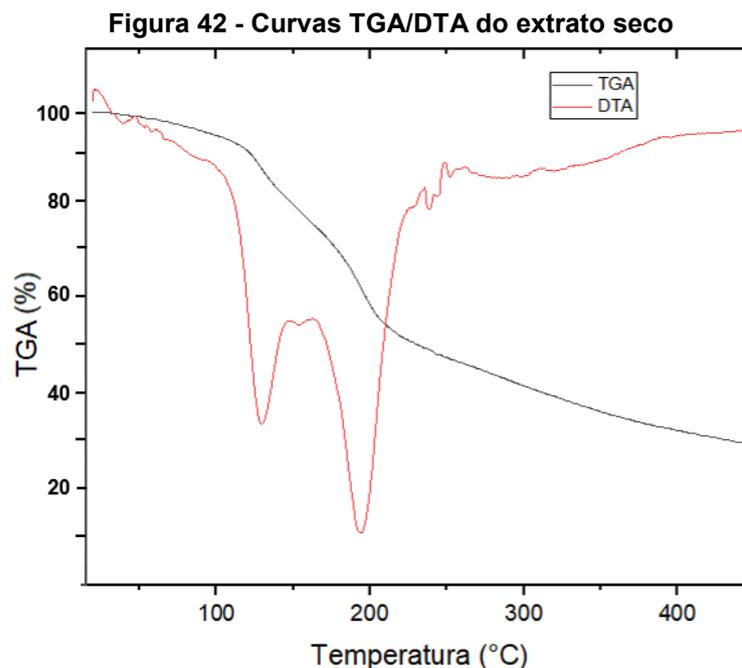
A banda em 3351 cm^{-1} corresponde ao grupo hidroxila (O-H), presente em álcoois e fenóis (ELLERBROCK; GERKE, 2021; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008; ZHANG et al., 2018b). Em 2937 cm^{-1} observa-se vibrações de estiramento C-

H, característico de compostos orgânicos (AGATONOVIC-KUSTRIN, 2013; ELLERBROCK; GERKE, 2021; LIU et al., 2021; ZHANG et al., 2022). Para 1627 cm^{-1} tem-se outra banda, apontando a presença de água associada a polissacarídeos (ABUDUWAILI et al., 2022; ZHANG et al., 2018a). O comprimento de onda 1423 cm^{-1} sugere a existência de CH_2 (HSU et al., 2017; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008; STEHFEST; TOEPEL; WILHELM, 2005). A banda de menor transmitância está associada as vibrações C-O-C, grupo característico de açúcares, indicando a presença de polissacarídeos glicosilados (ELLERBROCK; GERKE, 2021; LIU et al., 2021; ZHANG et al., 2018b).

Dessa forma, a partir dos grupos funcionais identificados no espectro de FTIR os resultados indicam a existência de como polissacarídeos, carotenoides e compostos fenólicos (GAO et al., 2017; LIU et al., 2021; PIRES et al., 2018; QIAN et al., 2017; ZHANG et al., 2022).

6.5.2 Análises Térmicas - TGA/DTA e DSC

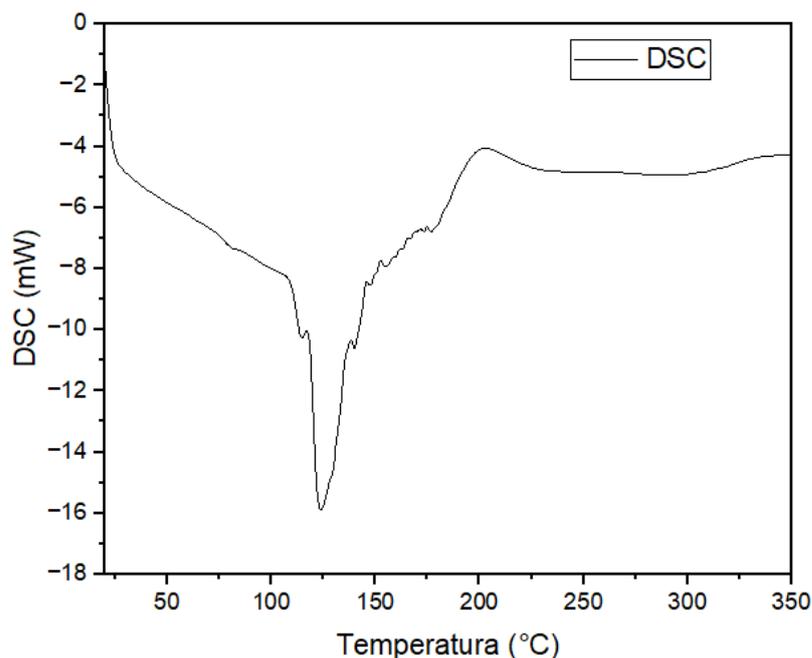
A Figura 42 apresentada abaixo mostra as propriedades térmicas do extrato do gojiberry a partir do TGA/DTA. O teste foi realizado para temperaturas entre 20 e 800°C , indicando a degradação do extrato com o aumento da temperatura.



A figura mostra a presença de dois picos de temperatura, em que a primeira faixa representa a perda de massa relacionada a desidratação do extrato e volatilização de solvente orgânico utilizado na extração dos compostos bioativos, ocorrendo entre 115 e 140°C e reduzindo em aproximadamente 10,75%. A segunda faixa entre 180 e 210°C, representa a degradação da matéria orgânica presente no extrato, com perda de 19,58%.

Pedro et al. (2022) encontrou resultados semelhantes para o extrato de gojiberry, com perdas de massa nas faixas entre 30-174°C e 174 e 395°C. Os autores atribuíram as perdas de massa da primeira faixa aos solventes utilizados e na segunda faixa de degradação a decomposição dos antioxidantes presentes no extrato. As diferenças entre os resultados estão diretamente relacionadas ao método de extração e as condições de extração utilizadas.

A Figura 43 representa a curva obtida pelo DSC para o extrato de gojiberry indicando o comportamento endotérmico da amostra, com pico entre 100 e 150°C, indicando a perda de água por desidratação da amostra.

Figura 43 – Curva de DSC do extrato de gojiberry seco

Fonte: Autoria própria (2023)

Autores constaram comportamento semelhante para o extrato de gojiberry, com picos endotérmicos entre 120 e 164°C. O estudo relaciona a variação de entalpia com as ligações de hidrogênio presentes nos compostos que constituem o extrato (ZHANG et al., 2022). Dessa forma, de acordo com os grupos identificados pelo FTIR, as ligações de hidrogênio e ligações covalentes presentes nos compostos necessitam de energias para serem rompidas, resultando em ΔH positivos e refletindo no comportamento endotérmico da amostra (OLADELE; DUODU; EMMAMBUX, 2020; ZHANG et al., 2022).

6.6 Encapsulação do extrato em lipossomas

O extrato foi encapsulado para melhorar a estabilidade dos compostos, evitando sua degradação, bem como melhorar a internalização do extrato nas células. Dessa forma, avaliou-se as características dos nanoagregados produzidos a partir de diferentes fosfolípidios (Phospholipon 80H e E PC S) e a influência dos métodos de produção na qualidade do sistema e no aumento da produtividade.

6.6.1 Caracterização dos lipossomas produzidos pelo método de injeção de etanol a partir de diferentes lipídios

Os lipossomas produzidos por injeção de etanol a partir dos lipídios Phospholipon 80H e E PC S foram caracterizadas quanto ao seu diâmetro médio hidrodinâmico, índice de polidispersidade (PDI), potencial zeta, eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carregamento (CC) (Tabela 16).

Tabela 16 - Caracterização dos lipossomas produzidos pelo método de injeção de etanol para as diferentes proporções de extrato (m/m)

	Phospholipon 80H			
	0%	5%	10%	20%
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	83,5±2,5 ^a	80,9±1,4 ^a	82,1±5,6 ^a	82,4±0,6 ^a
PDI (%)	26,3±0,2 ^a	25,8±0,9 ^a	24,3±0,3 ^b	22,1±0,3 ^c
Potencial Zeta (mV)	-41,30±2,03	-35,17±2,83	-31,97±3,40	-33,77±2,40
EE (%)	-	24,06±4,58 ^a	21,98±3,10 ^a	26,26±0,41 ^a
CC (%)	-	0,0608±0,0116 ^c	0,1094±0,0154 ^b	0,2516±0,0039 ^a
	E P C S			
	0%	5%	10%	20%
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	130,2±5,8 ^a	129,4±4,2 ^a	129,0±4,0 ^a	129,8±4,1 ^a
PDI (%)	17,3±1,1 ^a	17,5±2,7 ^a	18,8±0,5 ^a	19,0±1,6 ^a
Potencial Zeta (mV)	-4,11±0,81	-2,54±0,49	-4,46±0,93	-1,70±0,20
EE (%)	-	52,55±6,79 ^a	46,42±1,40 ^b	36,32±2,60 ^c
CC (%)	-	0,1083±0,0140 ^c	0,1868±0,0056 ^b	0,3025±0,0217 ^a

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey

Fonte: A autoria própria (2023)

A partir dos resultados apresentados na Tabela 16, observa-se que os lipossomas formados para o Phospholipon 80H, apresentaram pequenos tamanhos sem diferença significativa entre eles, com diâmetros entre 80,9 e 83,5 nm. O tamanho da partícula é uma característica importante e está relacionada a aplicação final do sistema. Estudos demonstram que sistemas com tamanhos entre 20 e 200 nm apresentam alta permeabilidade em células tumorais (HAN et al., 2019; YETISGIN et al., 2020).

Em relação ao PDI, os lipossomas apresentaram valores entre 22,1 e 26,3%, diminuindo a polidispersidade de acordo com o aumento da proporção de extrato, indicando maior homogeneidade para maiores proporções. O potencial zeta para o

lipídio indicou a estabilidade da partícula que apresentou carga negativa superior a 30 mV em todos os casos (KUMAR; DIXIT, 2017; MODENA et al., 2019; PEIXOTO et al., 2022). Pesquisas mostram que potenciais inferiores a -10 mV e superiores a 10 mV melhoram a entrega e absorção celular (KUMAR; DIXIT, 2017; YETISGIN et al., 2020). Esses resultados estão relacionados a geometria molecular da fosfatidilcolina. No caso do lipídio hidrogenado, a ligação insaturada é rompida, alterando assim a estrutura e estabilidade do lipídio (SAINAGA JYOTHI et al., 2022; SONG et al., 2022).

Apesar dos resultados obtidos em relação ao tamanho e estabilidade, os lipossomas produzidos com fosfatidilcolina de soja apresentaram baixas eficiências de encapsulação, sem diferença significativa para as três proporções de extrato, com maior capacidade de carregamento para o lipossoma carregada com 20% de extrato. Isso ocorre devido ao aumento de ligações saturadas gerados pela quebra da dupla ligação na estrutura do fosfolipídio, aumentando a interação entre as cadeias acila e consequentemente melhorando o empacotamento das caudas (SONG et al., 2022). Dessa forma, lipossomas produzidos a partir de fosfolipídios hidrogenados apresentam tamanhos menores e consequentemente apresenta limitação de espaços para incorporação dos compostos, diminuindo assim a eficiência de encapsulação do sistema.

O lipídio E PC S também apresentou baixos diâmetros sem diferença significativa entre eles, variando entre 129,0 e 130,2 nm, possibilitando a aplicação do sistema em células tumorais. Além disso, apresentou baixos índices de polidispersidade com valores inferiores a 19,0% e não apresentou diferença significativa para as diferentes proporções de extrato. Păvăloiu et al. (2021) também encontraram resultados semelhantes, com diâmetro de 141,6 nm e PDI de 18,7%.

O potencial zeta dos lipossomas foram próximos do zero, indicando baixa estabilidade. Entretanto, obteve-se altas eficiências de encapsulação, com eficiência máxima para o lipossoma carregado com 5% de extrato (52,55%), apresentando valores duas vezes maiores de eficiência em relação aos resultados obtidos para o lipídio hidrolisado. As diferenças apresentadas pelos sistemas estão diretamente relacionadas a saturação do lipídio. O lipídio E PC S possui insaturações que tornam as caudas hidrofóbicas assimétricas, resultando em espaços entre os lipídios e aumentando a capacidade de incorporação de compostos hidrofóbicos (SAINAGA JYOTHI et al., 2022; SONG et al., 2022).

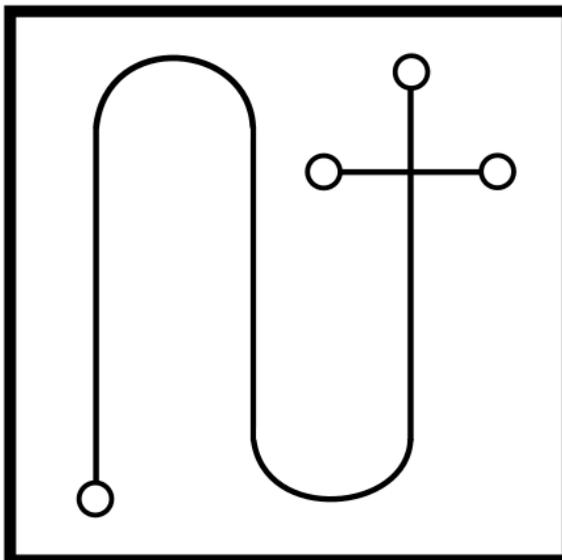
Para ambos os casos, observa-se um aumento da capacidade de carregamento com o aumento a proporção de extrato. Porém, mesmo com maior quantidade de extrato encapsulado, tem-se um aumento da quantidade de extrato livre para as proporções mais altas. Gómez-Mascaraque et al. (2017) realizaram a encapsulação de curcumina em lipossomas. Os autores observaram que o aumento da capacidade de carregamento resultou na diminuição da eficiência de encapsulação e relacionaram essa diminuição a formação e precipitação de cristais com o aumento da concentração do composto.

Portanto, considerando os resultados expostos a fosfatidilcolina do ovo indicou nanoagregados com pequenos diâmetros e maior eficiência de encapsulação para o lipossoma contendo 5% de extrato quando comparado as outras proporções utilizadas. Além disso, outro fator que afeta as características do lipossoma formado é a temperatura de transição de fases. A temperatura de transição de fases é inversamente proporcional insaturação, de forma que o lipídio hidrogenado apresenta valores superiores ao lipídio insaturado (SAINAGA JYOTHI et al., 2022; SONG et al., 2022; TAI et al., 2020). Devido a essa temperatura, a produção do lipossoma utilizando microfluídica apresentou-se inviável para o Phospholipon 80H, não sendo possível garantir o controle da temperatura em todos os pontos do processo. Dessa forma, o fosfolipídio E PC S será utilizado para produção em microfluídica.

6.6.2 Caracterização dos lipossomas produzidos por microfluídica

As características dos lipossomas são afetadas por fatores como método e condições de produção (BALBINO et al., 2013; FIRMINO et al., 2021; GOMEZ-MASCARAQUE et al., 2017; ISMAIL et al., 2020; SEDIGHI et al., 2019). Dessa forma, buscando avaliar a influência do método, da vazão total e da razão entre as vazões nas características do lipossoma, foram produzidas a partir do fosfolipídio E PC S com 5% de extrato, por microfluídica operando com o dispositivo T longo (Figura 44) onde foram avaliadas duas FRR, 5 e 10, mantendo a TFR constante ($200 \mu\text{L min}^{-1}$).

Figura 44 – Representação dispositivo T longo



Fonte: Autoria própria (2023)

Os lipossomas foram caracterizados em relação ao seu diâmetro médio hidrodinâmico, índice de polidispersidade (PDI), potencial zeta, eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carregamento (CC) e os resultados foram expressos na Tabela 17.

Tabela 17 - Caracterização dos lipossomas por microfluídica produzidas no T longo

	FRR 5		FRR 10	
	Branco	Extrato	Branco	Extrato
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	141,8±0,9 ^b	147,7±0,7 ^a	129,9±0,7 ^c	129,6±1,9 ^c
PDI (%)	9,8±0,6 ^a	6,9±0,9 ^a	11,1±0,2 ^a	10,4±0,3 ^a
Potencial Zeta (mV)	-1,48±0,37	-3,89±0,53	-0,41±0,14	-1,83±0,45
EE (%)	-	28,39±0,76 ^b	-	36,22±3,92 ^a
CC (%)	-	0,7014±0,0188 ^a	-	0,8461±0,0915 ^a

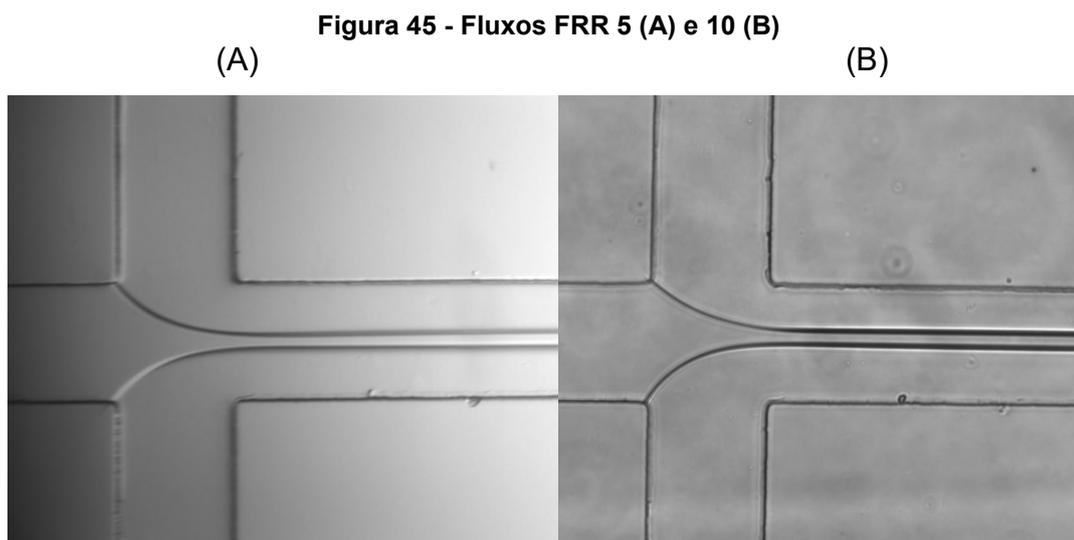
Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey

Fonte: Autoria própria (2023)

Os resultados indicados na Tabela 17, mostram diferença significativa em relação ao diâmetro dos nanoagregados em que para a FRR 10 obteve menor tamanho, 129,6 nm. O aumento da FRR está relacionado a diminuição da corrente alcoólica, essa redução favorece os processos difusivos, diminuindo a concentração

de solvente e aumentando a transferência de massa (BALBINO et al., 2013; FIRMINO et al., 2021; SEDIGHI et al., 2019).

A Figura 45 exibe os fluxos respectivos para cada FRR (5 e 10). A FRR 5 possui vazão aquosa menor que a FRR 10, e, portanto, o aumento da FRR reflete no estreitamento da corrente alcoólica e diminuição do tamanho do nanoagregado.



Fonte: Autoria própria (2023)

Além disso, o sistema apresentou baixa polidispersidade, com valores inferiores a 12%, indicando alta homogeneidade do sistema (KUMAR; DIXIT, 2017; MODENA et al., 2019; PEIXOTO et al., 2022). O potencial zeta apresentado em todos os casos se aproxima de zero, sugerindo a baixa estabilidade do lipossoma. Os resultados se assemelham aos obtidos por Roces et al. (2020), que avaliaram três FRR (1, 3 e 5) para diferentes lipídios e constataram a diminuição do diâmetro com o aumento da FRR em todos os casos. Também, observaram melhora na polidispersidade do sistema. A quantidade de água presente está diretamente ligada à formação do lipossoma. Quanto maior a vazão aquosa, mais rápida a agregação do lipídio e portanto menor o diâmetro hidrodinâmico e maior a homogeneidade do sistema (GONZALEZ GOMEZ; HOSSEINIDOUST, 2020; LIN; MALMSTADT, 2019; ROCES et al., 2020).

Ademais, os dados apontam a diferença entre as eficiências de encapsulação, em que a FRR 10, apresentou valores superiores a FRR 5, sem diferença significativa para a capacidade de carregamento. Segundo Lin e Malmstadt (2019), o aumento da FRR colaborou para a diminuição do tamanho da nanopartícula, bem como para o

aumento da eficiência de carregamento. Os autores relacionaram o aumento da eficiência de encapsulação aos processos difusivos e a característica do composto encapsulado.

No presente estudo, o extrato foi adicionado a fase aquosa, indicando a presença de compostos de maior polaridade. Devido as características do lipossoma, bicamada hidrofóbica e núcleo hidrofílico, é possível incorporar maior porção hidrofílica (AJEESHKUMAR et al., 2021; CARVALHO et al., 2022; GONZALEZ GOMEZ; HOSSEINIDOUST, 2020; LIN; MALMSTADT, 2019). Esse fator atrelado ao aumento dos processos difusivos gerados pelo acréscimo da FRR, refletem no aumento da eficiência de encapsulação. A capacidade de carregamento não apresentou diferença significativa entre as vazões, o resultado é esperado, pois a concentração de compostos e lipídio no sistema foram fixadas no processo para avaliação das vazões.

Dentre os parâmetros, a polidispersidade apresentou evidente diferença entre os métodos, com baixos resultados para a produção por microfluídica, indicando maior homogeneidade do sistema. Diferente dos métodos convencionais, na microfluídica o fluxo é controlado e possui comportamento laminar (baixos números de Reynolds), prevalecendo as trocas por processos difusivos. Dessa forma, o processo permite a obtenção de sistemas menores e mais homogêneos (GKIONIS et al., 2020; GOMEZ-MASCARAQUE et al., 2017; HECKERT BASTOS et al., 2020; ISMAIL et al., 2020; SEDIGHI et al., 2019; WANG et al., 2018).

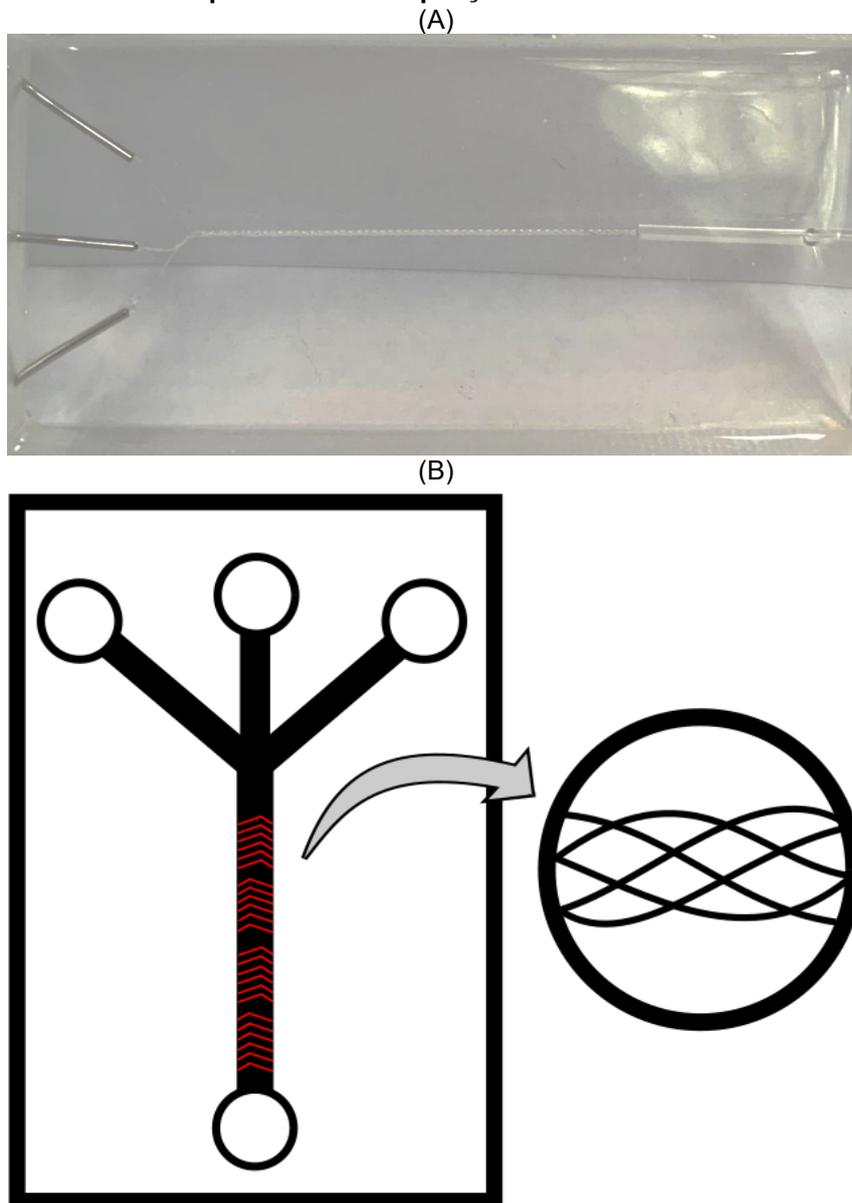
Além disso, o processo por microfluídica é contínuo, garantindo maior reprodutibilidade em relação a métodos convencionais de produção de lipossomas (CARVALHO et al., 2022; GKIONIS et al., 2020; LIN; MALMSTADT, 2019; WANG et al., 2018). Portanto, os resultados obtidos comprovam a importância do controle de fluxo na distribuição dos tamanhos e na distribuição das partículas.

6.6.3 Caracterização dos lipossomas produzidos por microfluídica – Advecção Caótica

A microfluídica é caracterizada pelo fluxo laminar, limitando a técnica a baixas vazões. Modificações nos microcanais promovendo a advecção caótica permitem o aumento das vazões mantendo o regime laminar. Como forma de aumentar a

produtividade do processo, para a FRR 10 avaliou-se diferentes TFR (0,2, 5 e 20 mL min⁻¹) utilizando o dispositivo de advecção caótica (Figura 46).

Figura 46 – (A) Dispositivo utilizado de advecção caótica (B) Representação esquemática do dispositivo com ampliação do microcanal



Fonte: Autoria própria (2023)

Os resultados de diâmetro médio hidrodinâmico, índice de polidispersidade (PDI), potencial zeta, eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carregamento (CC) estão expostos na Tabela 18.

Tabela 18 - Caracterização dos lipossomas por microfluídica produzidas por advecção caótica

	TFR 0,2 mL min ⁻¹		TFR 5 mL min ⁻¹		TFR 20 mL min ⁻¹	
	Branco	Extrato	Branco	Extrato	Branco	Extrato
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	130,4±3,1 ^c	156,9±2,0 ^a	129,5±2,7 ^c	136,7±1,2 ^b	91,9±0,6 ^d	87,7±1,9 ^d
PDI (%)	12,6±1,2 ^c	14,5±1,7 ^c	24,1±0,5 ^{ab}	27,3±2,2 ^a	23,4±0,5 ^b	24,7±0,5 ^{ab}
Potencial Zeta (mV)	0,52±0,53	-2,29±0,33	0,10±0,41	-1,90±0,32	0,23±0,17	-7,49±2,86
EE (%)	-	40,79±5,70 ^b	-	49,02±1,69 ^a	-	28,17±8,69 ^c
CC (%)	-	0,9567±0,1336 ^{ab}	-	1,149±0,040 ^a	-	0,6816±0,2103 ^b

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey

Fonte: Aatoria própria (2023)

A primeira TFR (0,2 mL min⁻¹) reproduz as mesmas condições anteriores, no dispositivo de advecção caótica. Os resultados indicam aumento em todas as características dos lipossomas em relação à técnica de produção convencional. A advecção caótica tem como objetivo aumentar os índices de mistura, melhorando a eficiência. Esse processo ocorre pela formação de vórtices transversais, refletindo nas características de tamanho e polidispersidade das partículas (CARVALHO et al., 2022; HAN et al., 2019).

Além disso, a vazão total se apresentou inversamente proporcional aos diâmetros, reduzindo de 156,9 nm para 87,7 nm em relação ao lipossoma carregado. Os resultados condizem com o encontrado por Roces et al. (2020) que observaram a relação entre a TFR e o diâmetro das partículas, sendo esses inversamente proporcionais, para diferentes lipídios.

Segundo Guimarães et al. (2017), ocorre a diminuição no tamanho da partícula com a velocidade da mistura. Em vazões maiores, a mistura é mais rápida, aumentando a tensão de cisalhamento, e, portando, as partículas formadas são menores. De acordo com Firmino et al. (2021), o aumento da produtividade na produção de lipossomas acontece devido à combinação entre altas vazões e a estrutura trançada dos microcanais, promovendo uma mistura mais rápida e reduzindo o comprimento de difusão. Para Ismail et al. (2020), os lipossomas são formado a partir da mudança de polaridade gerada pelo contato entre o solvente e a solução

aquosa, o aumento da superfície de contato entre as correntes promove o perfil caótico.

A advecção caótica se apresenta como uma alternativa em relação aos métodos convencionais para solucionar as limitações relacionadas a produtividade (CARVALHO et al., 2022; FIRMINO et al., 2021; ISMAIL et al., 2020). Considerando os resultados apresentados na Tabela 18, para o aumento da produtividade do sistema a TFR de 5 mL min⁻¹, mostrou resultados satisfatórios, com diâmetro de 136,7 nm e elevada eficiência de encapsulação (49,02%), apresentando diferença significativa em relação as outras vazões. A capacidade de carregamento foi de 1,15%, maior resultado alcançado em todos os testes.

A Tabela 19 representa os resultados da comparação entre os três métodos para o mesmo lipídio.

Tabela 19 - Resultados caracterização dos lipossomas para as melhores condições de cada método de produção

	Injeção de etanol	T longo	Advecção caótica
Diâmetro médio hidrodinâmico (nm)	129,4±4,2 ^a	129,6±1,9 ^a	136,7±1,2 ^a
PDI (%)	17,5±2,7 ^b	10,4±0,3 ^c	27,3±2,2 ^a
Potencial Zeta (mV)	-2,54±0,49	-1,83±0,45	-1,90±0,32
EE (%)	52,55±6,79 ^a	36,22±3,92 ^b	49,02±1,69 ^a
CC (%)	0,1083±0,0140 ^c	0,8461±0,0915 ^b	1,149±0,040 ^a

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey

Fonte: Autoria própria (2023)

A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre os métodos, apresentando partículas de mesmo tamanho. Independentemente do método adotado, as soluções lipídicas e aquosas foram preparadas de forma a se obter a mesma concentração final no lipossoma. Dessa forma, é esperado que os tamanhos se mantenham constantes. O índice de polidispersidade apresentou diferença significativa entre os métodos, com valores inferiores para o processo realizado com o dispositivo T longo, indicando a influência dos processos difusivos em relação a homogeneidade das partículas. Além disso, observa-se que o aumento da vazão total desfavorece a dispersão dos lipossomas, indicando altos PDI. O potencial

zeta, em todos os casos foi próximo de zero, indicando potencial neutro, característico do lipídio utilizado.

A eficiência de encapsulação, não apresentou diferença significativa entre o método convencional e a produção utilizando o dispositivo de advecção caótica. Porém nota-se a grande diferença em relação a capacidade de carregamento, em que se observou um aumento considerável entre os métodos, indicando que quantidade de extrato encapsulado em relação a massa de lipídio adicionada foi maior para o chip de advecção caótica. Portanto, os resultados indicam a necessidade de desenvolver estudos mais aprofundados para encontrar o melhor sistema fluidodinâmico para a encapsulação de compostos bioativos.

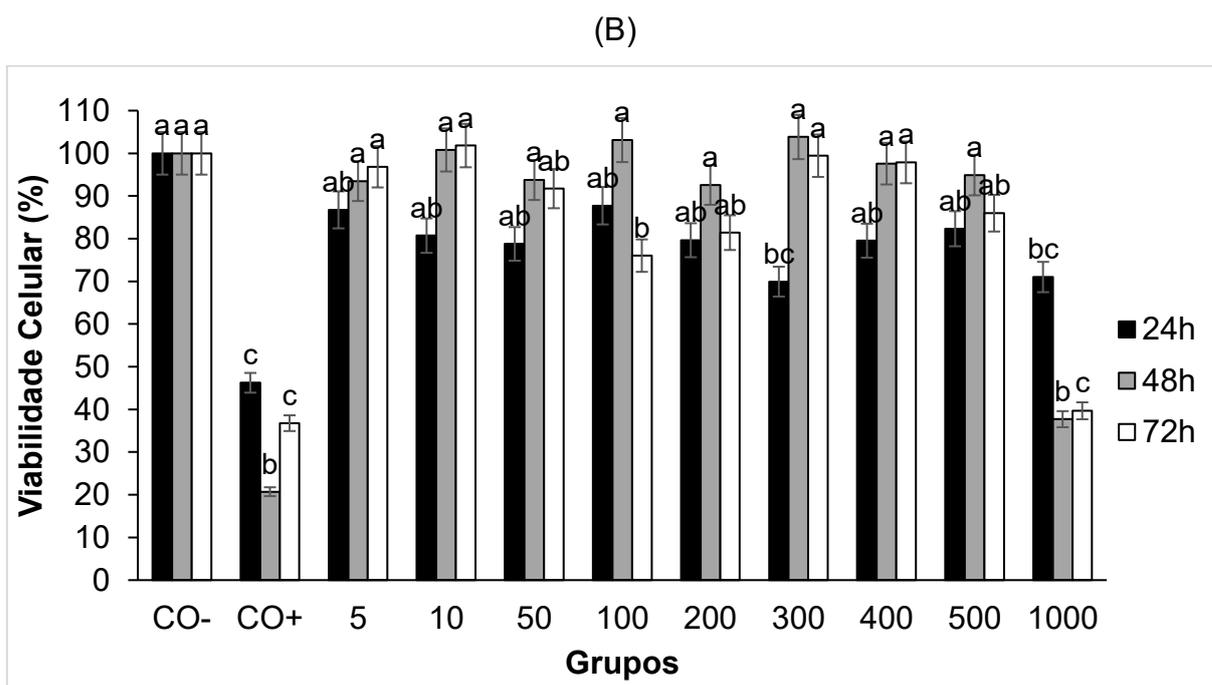
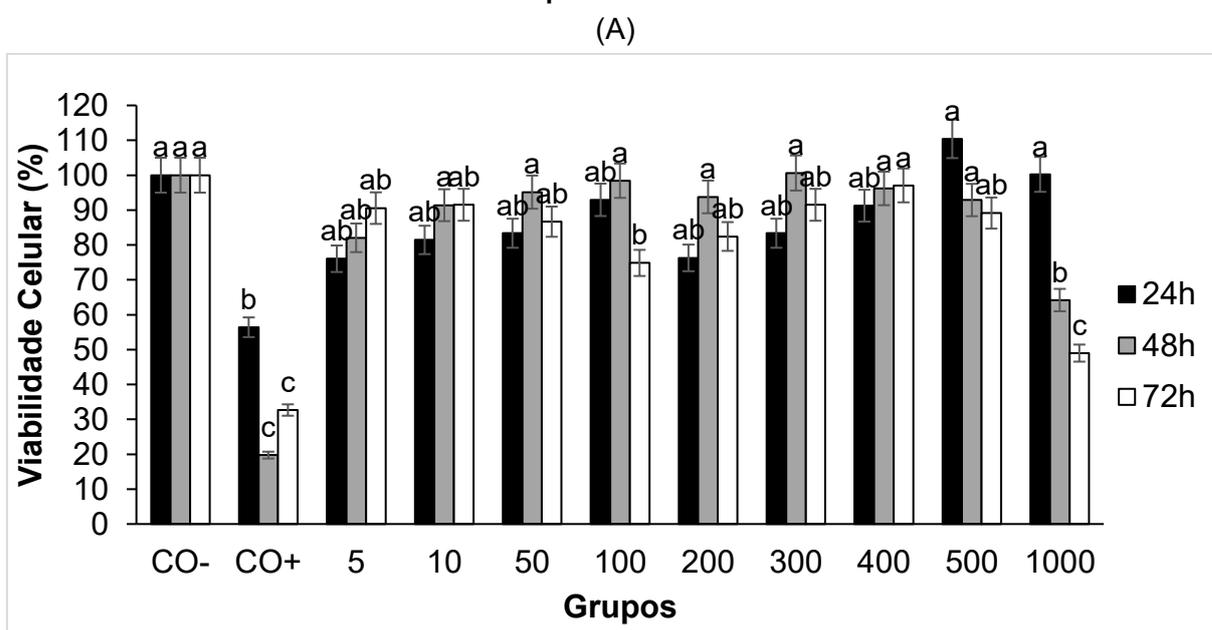
6.7 Atividade Antitumoral

Foram avaliadas a atividade antitumoral para o extrato livre relacionado aos métodos de extração *Shaker* e ultrassom, bem como para os sistemas nanoagregados.

6.7.1 Avaliação da atividade antitumoral do extrato livre pelos métodos de extração *Shaker* e Ultrassom

Os resultados do teste de citotoxicidade para a linhagem celular de hepatocarcinoma humano estão representados na Figura 47. Com relação ao *Shaker*, a concentração e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (48 h) e as concentrações de 100, e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (72 h) apresentaram viabilidades celulares menores que o controle negativo, indicando a atividade antitumoral do extrato de gojiberry. Para o ultrassom, a mesma concentração ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi eficiente após todos os tempos e também mostrou atividade antitumoral nas concentrações de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (72h) e $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ (24h).

Figura 47 – Viabilidades celulares para os tempos 24, 48, 72 h com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato de goji berry produzido utilizando (A) *Shaker* e (B) ultrassom para a linhagem celular de hepatocarcinoma humano



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; $1,0 \times 10^4$ células por poço. Letras iguais indicam que não há diferenças significativas no mesmo tempo (Teste de Tukey, $p < 0,05$)
 Fonte: Autoria própria (2023)

Os resultados indicam a influência da concentração de extrato em relação a atividade antitumoral, de forma que se obtenham baixas viabilidades celulares para o extrato em maiores concentrações. Gong et al. (2020) observaram o efeito antiproliferativo do extrato de gojiberry em diferentes concentrações para células

tumorais hepáticas. Os autores observaram a dependência do crescimento celular com a concentração, em que a concentração de 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ indicou viabilidades celulares entre 85 e 78%. Segundo Xiong et al. (2021) o extrato de gojiberry apresentou efeitos antiproliferativos dose-dependente para a linhagem de celular tumorais mamárias. Os autores atribuíram a atividade citotóxica do extrato aos compostos presentes.

O gojiberry é fonte de polissacarídeos, compostos fenólicos, carotenoides, entre outros compostos bioativos. Esses compostos possuem em sua estrutura grupos como hidroxila, duplas ligações e anéis aromáticos que contribuem para a deslocalização de elétrons, inibindo os processos oxidativos causados pelas células tumorais (GONG et al., 2020; JIANG et al., 2021; PĂVĂLOIU et al., 2021; PEDRO et al., 2018; XIONG et al., 2021). O efeito citotóxico foi observado no trabalho para ambos os extratos, inibindo a atividade celular e evitando sua proliferação de acordo com a concentração de extrato presente.

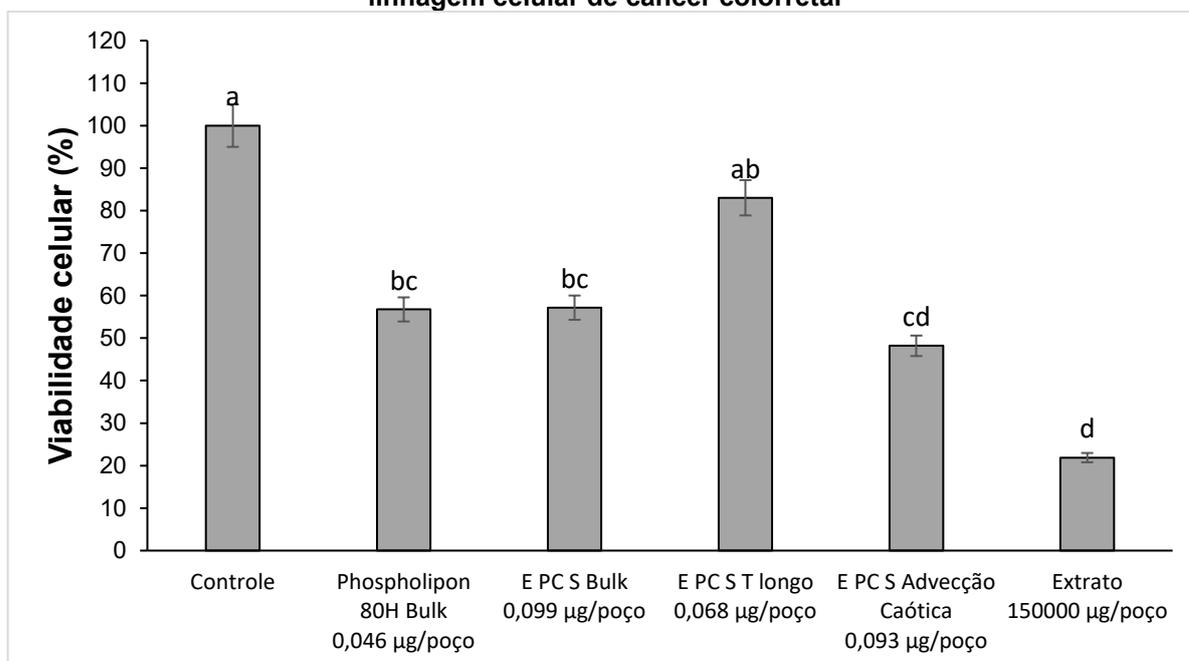
Além disso, nota-se a influência do método de extração na atividade tumoral do extrato. Para a concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o *Shaker* apresentou valores viabilidades de 100,24%, 64,20% e 48,99% para os tempos de 24, 48 e 72 h respectivamente, enquanto para o ultrassom, as viabilidades foram inferiores para os mesmos tempos de avaliação com valores de 71,01%, 37,71% e 39,67%. De acordo com Hao et al. (2020), o método de extração influencia diretamente na atividade imunomoduladora do extrato de gojiberry. Os autores observaram que os métodos com maiores concentrações dos compostos apresentaram atividade fagocítica superiores.

O método de extração influencia no rendimento do extrato e a exposição dos compostos por longos períodos a temperaturas reflete na degradação dos mesmos, levando a diminuição de suas concentrações (ALI et al., 2019; HU et al., 2022; MUNEKATA et al., 2020; NA; LIHUI, 2021; SONG et al., 2020; ZHENG et al., 2022). O presente estudo evidencia as diferentes concentrações de compostos fenólicos presentes nos extratos, indicando índices superiores para o ultrassom.

6.7.2 Avaliação da atividade antitumoral dos sistemas nanoagregados comparados ao extrato livre

Os estudos preliminares em relação a atividade citotóxica indicaram as viabilidades celulares apresentadas pelas amostras para a linhagem celular de câncer colorretal e estão representados na Figura 48. Foram utilizados o extrato concentrado e os extratos encapsulados na proporção 5% para os diferentes lipídios (Phospholipon 80H e E PC S) produzido pelo método convencional em bulk e por microfluídica para as condições determinadas (T longo com FRR 10 e Advecção caótica TFR 5 mL min⁻¹).

Figura 48 – Viabilidade celulares apresentadas para os lipossomas e extrato livre para a linhagem célula de câncer colorretal



Resultados expressos como média e desvio padrão (n=4). Letras iguais indicam que não há diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Concentrações testadas indicadas por sistema

Fonte: Autoria própria (2023)

O teste foi realizado utilizando a proporção 1:1 (v/v), dessa forma, não foi considerado a eficiência de encapsulação de cada sistema e a concentração de extrato presente, portanto, a massa de ativo em cada poço foi diferente. Porém, é possível realizar a análise do efeito da atividade citotóxica em relação a encapsulação do extrato, o lipídio utilizado e o método de produção dos lipossomas, considerando a variação de ativo presente.

Avaliando a encapsulação, nota-se que não houve diferença significativa entre o extrato encapsulado e o extrato livre, sugerindo a potencialidade dos lipossomas, que apresentaram baixas viabilidades celulares para menores massas de ativo, uma vez que o extrato livre estava em maior concentração. Os lipossomas são utilizados como carregadores de fármacos devido a sua compatibilidade com as células humanas, melhorando a internalização e absorção dos compostos encapsulados (MAJA; ŽELJKO; MATEJA, 2020; MARITIM; BOULAS; LIN, 2021; PĂVĂLOIU et al., 2021; TRAN et al., 2020). Dessa maneira, obtêm-se respostas efetivas para concentrações inferiores.

Hong et al. (2020) avaliaram o efeito citotóxico de lipossomas carregados de catequina e curcumina produzidas por microfluídica em diferentes concentrações. O estudo mostra o efeito antiproliferativo dependentes da dose para todos os sistemas testados. Além disso, os autores constataram o aumento do efeito citotóxico após a encapsulação dos compostos em relação as células tumorais de cólon e atribuíram esse aumento a biodisponibilidade dos lipossomas.

Em relação aos lipossomas produzidos a partir de diferentes lipídios, a análise não indicou diferença significativa entre eles. Porém, devido a eficiência de encapsulação, a massa de ativo presente no lipossoma formado a partir do lipídio insaturado foi duas vezes menor que a massa de ativo encapsulado pelo lipídio hidrolisado, indicando que os lipossomas formados com Phospholipon 80H apresentam atividade antiproliferativa para menores concentrações de extrato. Os resultados estão relacionados ao potencial zeta apresentado pelo sistema, pois indicaram valores menores que -30 mV, facilitando os processos de fagocitose celular, e, portanto melhorando a entrega de ativos (KUMAR; DIXIT, 2017; YETISGIN et al., 2020).

Os resultados apresentados pelos lipossomas produzidos a partir do dispositivo T longo não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Porém, dentre os sistemas estudados, a caracterização realizada para o dispositivo T longo apresentou baixa eficiência de encapsulação, de forma que a massa de ativo presente foi inferior aos demais métodos. Além disso, o teste estatístico mostrou que não houve diferença significativa entre o extrato encapsulado a partir do dispositivo T longo e a encapsulação em bulk, para o mesmo fosfolipídio, ficando evidente a relação da viabilidade celular com a massa de ativo presente no sistema.

Hsu et al. (2017) estudaram a atividade antiproliferativa do extrato de gojiberry encapsulado em nanoemulsões. Os autores avaliaram a viabilidade celular para diferentes concentrações e observaram o aumento da atividade antiproliferativa com o acréscimo da concentração.

Considerando os diferentes métodos de produção para o mesmo lipídio, nota-se que não houve diferença significativa entre eles para massa de ativo semelhantes (método convencional e advecção caótica). Dessa forma, percebe-se a necessidade de investigar a ação citotóxica dos diferentes sistemas com maior especificidade, considerando as eficiências de encapsulação e particularidades de cada técnica. De todo modo, notou-se a importância da encapsulação na entrega de compostos, obtendo baixas viabilidades celulares para menores concentrações de ativo.

7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, observa-se que a extração com proporção de solvente de etanol: água 60:40 apresentou as maiores atividades antioxidantes para os testes ABTS, DPPH e Habilidade quelante de Fe (II) com valores de 97,80%, 91,08% e 84,03%, respectivamente.

O modelo proposto pelo planejamento fatorial 2^2 com delineamento composto central rotacional apresentou pouca confiabilidade, indicando baixos valores de R^2 . Este resultado provavelmente ocorreu devido à baixa variabilidade dos dados experimentais para uma mesma condição experimental. Apesar da baixa eficiência dos modelos, os desvios padrões da regressão foram baixos, representando que 95% das observações estariam próximas da superfície ajustada, o que indica adequada previsão do modelo.

Dessa forma, as condições de extração foram avaliadas pelo teste tukey e obteve-se elevadas atividades antioxidantes em relação aos três testes para o extrato obtido por ultrassom à 45°C por 6,71 min e com o *Shaker* à 45°C por 23,33 h. A quantificação dos compostos foi determinada, indicando diferença entre os métodos com elevadas concentrações de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides para o extrato obtido por ultrassom.

Através da análise da cinética de extração, observa-se que na extração com *Shaker* a cinética indicou que o equilíbrio foi atingido rapidamente e houve indícios de que somente os compostos presentes na superfície foram extraídos. Diferentemente, para a extração com ultrassom, os resultados apresentaram influência dos processos difusivos, com rendimentos superiores ao *Shaker*. Além disso, os modelos So e Mac Donald e Pseudo Segunda Ordem apresentaram os melhores ajustes para os dados experimentais.

Foi realizada a caracterização do extrato para as condições ótimas de extração e os resultados indicaram a presença de grupos funcionais que constituem fenóis e polissacarídeos. Além disso as análises térmicas mostraram o comportamento endotérmico da amostra, com pico entre 100 e 150°C.

O extrato de gojiberry produzido nas condições ótimas pelo Ultrassom foi encapsulado em lipossomas por injeção de etanol, em que o lípidio E PC S mostrou maior eficiência de encapsulação (52,55%) em relação ao Phospholipon 80H.

Aplicado a microfluídica, o extrato encapsulado apresentou tamanhos inferiores a 130 nm para a FRR 10 e notou-se a diminuição da polidispersidade quando comparado a técnica convencional. Para o aumento da produtividade, testou-se o dispositivo de advecção caótica em que foi possível alcançar a vazão total de 5 mL min^{-1} obtendo diâmetro da nanopartícula de 136,7 nm e eficiência de encapsulação de 49,02%.

A atividade citotóxica do extrato livre indicou atividade antiproliferativa para os dois métodos de extração. Porém, os resultados indicaram menores viabilidades celulares para o extrato produzido pelo ultrassom com valores de 37,82% para a concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ após 48 h. O extrato encapsulado apresentou atividade antitumoral para a linhagem celular de cólon em relação a todos os sistemas e os resultados indicaram que o extrato encapsulado utilizando o dispositivo de advecção caótica apresentou a menor viabilidade celular de 48,19%.

O estudo comprovou o elevado potencial da fruta e o extrato apresentou atividade antioxidante e antitumoral, atendendo os objetivos propostos e evidenciando a importância do estudo de otimização da extração, bem como de sistemas de encapsulação.

REFERÊNCIAS

- ABDUL MUDALIP, S. K. et al. A short review on encapsulation of bioactive compounds using different drying techniques. **Materials Today: Proceedings**, v. 42, p. 288–296, 2021.
- ABUDUWAILI, A. et al. Isolation, structural modification, characterization, and bioactivity of polysaccharides from Folium Isatidis. **Industrial Crops and Products**, v. 176, n. 114319, 2022.
- ADADI, P.; BARAKOVA, N. V.; KRIVOSHAPKINA, E. F. Selected Methods of Extracting Carotenoids , Characterization , and Health Concerns : A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 5923–5947, 2018.
- AGATONOVIC-KUSTRIN, S. The Use of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy and Artificial Neural Networks (ANNs) to Assess Wine Quality. **Modern Chemistry & Applications**, v. 01, n. 04, p. 1–8, 2013.
- AGU, C. M. et al. Nonlinear Kinetics , Thermodynamics , and parametric studies of *Colocynthis vulgaris* Shrad seeds oil extraction. **Industrial Crops & Products**, v. 123, n. May, p. 386–400, 2018.
- AHMED, G. H. G.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.; GARCÍA, M. E. D. Nano-encapsulation of grape and apple pomace phenolic extract in chitosan and soy protein via nanoemulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 108, n. May 2019, p. 1–10, 2020.
- Al, G. et al. Aspirin and salicylic acid decrease c-Myc expression in cancer cells: a potential role in chemoprevention. **Tumor Biology**, v. 37, n. 2, p. 1727–1738, 2015.
- AJAP - ASSOCIAÇÃO DOS JOVENS AGRICULTORES DE PORTUGAL. **Manual Boas Práticas para Culturas Emergentes A cultura de bagas de goji**, p. 1-44, 2017.
- AJEESHKUMAR, K. K. et al. Advancements in liposome technology: Preparation techniques and applications in food, functional foods, and bioactive delivery: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 1280–1306, 2021.
- AKAR, Z.; BURNAZ, N. A. A new colorimetric method for CUPRAC assay with using of TLC plate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 112, n. April, p. 108212, 2019.
- AKAR, Z.; KÜÇÜK, M.; DOĞAN, H. A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 640–647, 2017.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.

- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I. Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 11, n. July, p. 12–17, 2018.
- ALASALVAR, C.; SALVADÓ, J.; ROS, E. Bioactives and health benefits of nuts and dried fruits. **Food Chemistry**, v. 314, n. January, p. 126192, 2020.
- ALI, A. et al. Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from betel leaves (*Piper betle*): Extraction kinetics and modeling. **Separation Science and Technology**, p. 1–14, 2018.
- ALI, M. C. et al. Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction. **Talanta**, v. 203, n. April, p. 16–22, 2019.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- ANGELINO, D. et al. Fruit and vegetable consumption and health outcomes : an umbrella review of observational studies. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, p. 1–16, 2019.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 232–240, 2007.
- ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, p. 183–198, 2001.
- ARANHA, A. C. R. et al. Modelling of bioactive components extraction from corn seeds. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 175, p. 339–347, 2021.
- ARVAYO-ENRÍQUEZ, H. et al. Carotenoids extraction and quantification: A review. **Analytical Methods**, v. 5, n. 12, p. 2916–2924, 2013.
- ASSUNÇÃO, L. S. et al. Estudo Prospectivo Sobre Encapsulamento De Compostos Bioativos. **Revista Geintec**, v. 4, p. 200–209, 2015.
- BALBINO, T. A. et al. Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 226, p. 423–433, 2013.
- BALSANO, C.; ALISI, A. Antioxidant Effects of Natural Bioactive Compounds. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, p. 3063–3073, 2009.
- BANWO, K. et al. Functional importance of bioactive compounds of foods with Potential Health Benefits: A review on recent trends. **Food Bioscience**, v. 43, n. July, p. 101320, 2021.
- BENCHENNOUF, A. et al. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Lycium barbarum* (GOJI) cultivated in Greece. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 596–602, 2017.
- BO, R. et al. Simple nanoliposomes encapsulating *Lycium barbarum* polysaccharides

as adjuvants improve humoral and cellular immunity in mice. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 6289–6301, 2017.

BOROSKI, M. et al. **Antioxidantes: Princípios e Métodos Analíticos**. 1. ed. Curitiba, 2015.

BUTNARIU, M. Methods of Analysis (Extraction, Separation, Identification and Quantification) of Carotenoids from Natural Products. **Journal of Ecosystem & Ecography**, v. 6, n. 2, p. 1–19, 2016.

CARVALHO, B. G. et al. Advanced Microfluidic Technologies for Lipid Nano-Microsystems from Synthesis to Biological Application. **Pharmaceutics**, v. 14, p. 1–31, 2022.

CATENA, S. et al. Solubility study and intensification of extraction of phenolic. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 68, p. 105231, 2020.

CHANG, C. C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178–182, 2002.

CHEN, J.; HU, L. Nanoscale Delivery System for Nutraceuticals : Preparation, Application, Characterization, Safety, and Future Trends. **Food Engineering Reviews**, v. 12, p. 14–31, 2019.

CHENG, J. et al. An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of Lycium barbarum polysaccharides. **Drug design, development and therapy**, v. 9, p. 33–78, 2015.

CORDEIRO, H. M. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Embrapara Agroindústria Tropical**, v. 16, p. 89–97, 2005.

DELBONE, C. A. C.; LANDO, R. L. Importância Ecológica e Evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais. **X congresso de educação do norte pioneiro UENP-CCHE-CLCA-Campus jacarezinho - Anais**, p. 396–404, 2010.

DENG, J. et al. Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 37, p. 328–334, 2017.

EL ABED, H. et al. Extraction optimization and in vitro and in vivo anti-postprandial hyperglycemia effects of inhibitor from Phoenix dactylifera L. parthenocarpic fruit. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 88, p. 835–843, 2017.

ELLERBROCK, R. H.; GERKE, H. H. FTIR spectral band shifts explained by OM-cation interactions. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 184, n. 3, p. 388–397, 2021.

ELSEVIER. **Science direct**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/>>. Acesso em: 09 jan. 2023.

FENG, L. et al. Effects of different processing methods on bioactive substances and antioxidation properties of Lycium barbarum (goji berry) from China. **Food**

Bioscience, v. 42, p. 101048, 2021a.

FENG, X. et al. Extraction and characterization of matrix protein from pacific oyster (*Crassostrea gigas*) shell and its anti-osteoporosis properties in vitro and in vivo. **Food and Function**, v. 12, n. 19, p. 9066–9076, 2021b.

FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, n. 4, p. 778–789, 2021.

FERREIRA, R. M. et al. Water Extraction Kinetics of Bioactive Compounds of *Fucus vesiculosus*. **Molecules**, v. 24, n. 18, p. 1–15, 2019.

FIGUEROA-ROBLES, A.; ANTUNES-RICARDO, M.; GUAJARDO-FLORES, D. Encapsulation of phenolic compounds with liposomal improvement in the cosmetic industry. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 593, n. November 2020, p. 120125, 2021.

FIRMINO, P. C. O. S. et al. 3D micromixer for nanoliposome synthesis: a promising advance in high mass productivity. **Lab on a Chip**, v. 21, n. 15, p. 2971–2985, 2021.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative Methods for Anthocyanins. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 72–77, 1968.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 1, p. 171–178, 2006.

GALGANO, F. et al. Extraction kinetics of total polyphenols, flavonoids, and condensed tannins of lentil seed coat: Comparison of solvent and extraction methods. **Foods**, v. 10, n. 8, p. 1–19, 2021.

GAO, Y. et al. *Lycium barbarum*: A traditional Chinese herb and a promising anti-aging agent. **Aging and Disease**, v. 8, n. 6, p. 778–791, 2017.

GIL-CHÁVEZ, G. J. et al. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5–23, 2013.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy Anthocyanin. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, 2001.

GKIONIS, L. et al. Manufacturing drug co-loaded liposomal formulations targeting breast cancer: Influence of preparative method on liposomes characteristics and in vitro toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 590, n. October, p. 119926, 2020.

GOMEZ-MASCARAQUE et al. A step forward towards the design of a continuous process to produce hybrid liposome / protein microcapsules. **Journal of Food Engineering**, v. 214, p. 175–181, 2017.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G. et al. Microencapsulation structures based on protein-coated liposomes obtained through electrospraying for the stabilization and improved bioaccessibility of curcumin. **Food Chemistry**, v. 233, p. 343–350, 2017.

- GONG, G. et al. Isolation, structural characterization, and antioxidativity of polysaccharide LBLP5-A from *Lycium barbarum* leaves. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 314–324, 2016.
- GONG, G. et al. Arabinogalactan derived from *Lycium barbarum* fruit inhibits cancer cell growth via cell cycle arrest and apoptosis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 639–650, 2020.
- GONG, Y. et al. Development of an effective method based upon second-order overlapping repeated sample injections for isolation of carotenoids from *Lycium barbarum* L. fruits with elution-extrusion counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1645, p. 462026, 2021.
- GONZALEZ GOMEZ, A.; HOSSEINIDOUST, Z. Liposomes for Antibiotic Encapsulation and Delivery. **ACS infectious diseases**, v. 6, n. 5, p. 896–908, 2020.
- GOUDA, A. et al. Ethanol injection technique for liposomes formulation : An insight into development , influencing factors , challenges and applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, n. May 2020, p. 1–10, 2021.
- GUIMARÃES, M. et al. Microfluidic manufacturing of phospholipid nanoparticles: Stability, encapsulation efficacy, and drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 516, p. 91–99, 2017.
- GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods : an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 651-715, n. 0123456789, 2020.
- HABEYCH, E. et al. Strategies to limit colour changes when fortifying food products with iro. **Food Research International**, v. 88, p. 122-128, 2016.
- HAN, X. et al. Applications of nanoparticles in biomedical. **Nanoscale**, v. 11, p. 799–819, 2019.
- HE, Q.; DU, B.; XU, B. Extraction optimization of phenolics and antioxidants from black goji berry by accelerated solvent extractor using response surface methodology. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 8, n. 10, 2018.
- HECKERT BASTOS, L. P. et al. Encapsulation of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil with gelatin and sodium alginate by complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, v. 102, n. September 2019, 2020.
- HERRERA-POOL, E. et al. Effect of solvent polarity on the Ultrasound Assisted extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from habanero pepper leaves (*Capsicum chinense*) and its identification by UPLC-PDA-ESI-MS/MS. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 76, 2021.
- HONG, S. et al. Microfluidic assembly of liposomes dual-loaded with catechin and curcumin for enhancing bioavailability. **Colloids and Surfaces A**, v. 594, n. March, p. 1–7, 2020.
- HOOGEVEST, P. VAN; FAHR, A. **Nanocosmetics: Phospholipids in Cosmetic Carriers**. Springer, p. 95–140, 2019.
- HOU, X. et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. **Nature Reviews Materials**, v.

6, n. 12, p. 1078–1094, 2021.

HSU, H. J. et al. Preparation of carotenoid extracts and nanoemulsions from *Lycium barbarum* L. and their effects on growth of HT-29 colon cancer cells.

Nanotechnology, v. 28, n. 13, 2017.

HU, J. et al. Efficient extraction of polysaccharides from *Lycium barbarum* L. by aqueous two-phase system combined with tissue-smashing extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 184, n. December 2021, p. 115036, 2022.

HUANG, W. et al. Revisiting the structure of arabinogalactan from *Lycium barbarum* and the impact of its side chain on anti-ageing activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 286, n. November 2021, p. 119282, 2022.

ILIĆ, T. et al. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial properties of goji berries cultivated in serbia. **Foods**, v. 9, n. 11, p. 1–15, 2020.

INCA. **Câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/perguntas-frequentes/cancer>>. Acesso em: 17 dez 2022.

ISMAIL, E. et al. High-throughput conventional and stealth cationic liposome synthesis using a chaotic advection-based microfluidic device combined with a centrifugal vacuum concentrator. **Chemical Engineering Journal**, v. 382, n. September 2019, p. 1–12, 2020.

JACKMAN, R. L. et al. Anthocyanins As Food Colorants —a Review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 11, n. 3, p. 201–247, 1987.

JIANG, Y. et al. Phenolic compounds in *Lycium* berry: Composition, health benefits and industrial applications. **Journal of Functional Foods**, v. 77, n. December 2020, p. 1–22, 2021.

JUAN-GARCÍA, A. et al. Carotenoids present in goji berries *Lycium barbarum* L. are suitable to protect against mycotoxins effects : An in vitro study of bioavailability. **Journal of Functional Foods**, v. 92, n. March, 2022.

JUSTO, O. R.; MORAES, Â. M. Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up : Effect of temperature and batch volume. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 9, n. September, p. 785–792, 2010.

KADERIDES, K. et al. Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels : Optimization , kinetics , and comparison with ultrasounds extraction. **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**, v. 137, n. November 2018, p. 1–11, 2019.

KALYNIUKOVA, A. et al. Application of deep eutectic solvents for separation and determination of bioactive compounds in medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 172, n. September 2021, p. 1–10, 2021.

KANG, M. J. et al. Derrone induces autophagic cell death through induction of ROS and ERK in A549 cells. **PLoS ONE**, v. 14, n. 6, p. 1–15, 2019.

KASHANINEJAD, M. et al. Freeze dried extract from olive leaves : Valorisation ,

extraction kinetics and extract characterization. **Food and Bioproducts Processing**, v. 124, p. 196–207, 2020.

KIM, J. et al. Generalized multi-scale kinetic model for data-driven modelling : Mangifera pajang antioxidant degradation in choline chloride / ascorbic acid natural deep eutectic solvent. **Journal of Food Engineering**, v. 312, n. May 2021, p. 1–10, 2022.

KIRTANE, A. R. et al. Nanotechnology approaches for global infectious diseases. **Nature Nanotechnology**, v. 16, n. April, p. 369–384, 2021.

KULCZYŃSKI, B.; GRAMZA-MICHAŁOWSKA, A. Goji Berry (*Lycium barbarum*): Composition and Health Effects - A Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 66, n. 2, p. 67–75, 2016.

KUMAR, A.; DIXIT, C. K. Methods for characterization of nanoparticles. In: **Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids**. [s.l.] Woodhead Ppublishing, p. 44–58, 2017.

KUSUMA, H. S.; MAHFUD, M. Comparison of kinetic models of oil extraction from sandalwood by microwave-assisted hydrodistillation. **International Food Research Journal**, v. 24, n. August, p. 1697–1702, 2017.

LEE, J.; KIM, J. H. Kaempferol inhibits pancreatic cancer cell growth and migration through the blockade of EGFR-related pathway in vitro. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–14, 2016.

LI, Y. et al. Antioxidant properties and free radical scavenging mechanisms of cyclocurcumin. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 15, p. 12698–12705, 2018.

LI, Z. DONG et al. Apigenin inhibits proliferation of ovarian cancer A2780 cells through Id1. **FEBS Letters**, v. 583, n. 12, p. 1999–2003, 2009.

LIN, W. Z. S.; MALMSTADT, N. Liposome production and concurrent loading of drug simulants by microfluidic hydrodynamic focusing. **European Biophysics Journal**, v. 48, n. 6, p. 549–558, 2019.

LIU, J. et al. Polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L. by integrated tandem hybrid membrane technology exert antioxidant activities in mitochondria. **Industrial Crops and Products**, v. 168, n. April 2021, p. 1–10, 2021.

LIU, Q. et al. Encapsulation of curcumin in zein/ caseinate/sodium alginate nanoparticles with improved physicochemical and controlled release properties. **Food Hydrocolloids**, v. 93, n. August 2018, p. 432–442, 2019.

LIU, Y. et al. Effect of emulsifier composition on oil-in-water nano-emulsions : Fabrication , structural characterization and delivery of zeaxanthin dipalmitate from *Lycium barbarum* L . **LWT**, v. 161, n. February, p. 1–10, 2022.

LOURENÇO, S. C.; MOLDÃO-MARTINS, M.; ALVES, V. D. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 14–16, 2019.

LU, Y. et al. Comparison of Functional Components and Antioxidant Activity of

Lycium barbarum L . **Journal Molecules**, v. 24, n. 12, p. 1–16, 2019.

MA, R. et al. Research progress of Lycium barbarum L . as functional food : phytochemical composition and health benefits. **Current Opinion in Food Science**, v. 47, n. May 2022, p. 1–7, 2022.

MAJA, L.; ŽELJKO, K.; MATEJA, P. Sustainable technologies for liposome preparation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 165, n. July 2020, p. 1–17, 2020.

MARCILLO-PARRA, V. et al. Encapsulation of bioactive compounds from fruit and vegetable by-products for food application – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, n. August 2020, p. 11–23, 2021.

MARCUCCI, M. C. et al. Accessible methodologies for quantification of flavonoids and total phenols in propolis. **Revista Virtual de Quimica**, v. 13, n. 1, p. 61–73, 2021.

MARITIM, S.; BOULAS, P.; LIN, Y. Comprehensive analysis of liposome formulation parameters and their influence on encapsulation, stability and drug release in glibenclamide liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, n. October 2020, p. 1–13, 2021.

MENDES-SILVA, T. DE C. D. et al. Production of carotenoid sarcinaxanthin by *Kocuria palustris* isolated from Northeastern Brazil Caatinga soil and their antioxidant and photoprotective activities. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 44–53, 2021.

MENKITI, M. C.; AGU, C. M.; UDEIGWE, T. K. Kinetic and parametric studies for the extractive synthesis of oil from *Terminalia catappa* L . kernel. **Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis**, n. October 2016, p. 1–19, 2016.

METIBEMU, D. S. et al. Carotenoid isolates of *Spondias mombin* demonstrate anticancer effects in DMBA-induced breast cancer in Wistar rats through X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) antagonism and anti-inflammation. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 12, p. 1–17, 2020.

MILIĆEVIĆ, N. et al. Kinetic modelling of ultrasound-assisted extraction of phenolics from cereal brans. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 79, n. September 2021, p. 1–7, 2021.

MINUSSI, R. C.; ROSSI, M.; BOLOGNA, L. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry**, v. 82, n. August, p. 409–416, 2003.

MODENA, M. M. et al. Nanoparticle Characterization: What to Measure? **Advanced Materials**, v. 31, n. 32, p. 1–26, 2019.

MOHARRAM, H. A.; YOUSSEF, M. M. Methods for Determining the Antioxidant Activity : A Review. **Alex. J. Fd. Sci. & Technol.**, v. 11, n. 1, p. 31–42, 2014.

MONTEIRO, M. et al. Effect of extraction method and solvent system on the phenolic content and antioxidant activity of selected macro- and microalgae extracts. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 1, p. 349–362, 2020.

MONTESANO, D. et al. Chemoprotective effect of carotenoids from *Lycium barbarum* L. on SH-SY5Y neuroblastoma cells treated with beauvericin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 141, n. May, p. 1–8, 2020.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. June 1983, p. 55–63, 1983.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 134–179, 2008.

MUNEKATA, P. E. S. et al. Impact of ultrasound-assisted extraction and solvent composition on bioactive compounds and in vitro biological activities of thyme and rosemary. **Food Research International**, v. 134, n. February, p. 1–12, 2020.

NA, A.; LIHUI, W. Optimization of Extraction Process for Total Flavonoids of *Lycium Barbarum* by Response Surface Methodology. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 687, n. 1, p. 1–9, 2021.

NATOLINO, A.; PORTO, C. DA. Kinetic models for conventional and ultrasound assistant extraction of polyphenols from defatted fresh and distilled grape marc and its main components skins and seeds. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 156, n. January 2020, p. 1–12, 2020.

NEVES, L. C. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity in pre-harvest camu-camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh] fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 186, p. 223–229, 2015.

NG, Z. X.; SAMSURI, S. N.; YONG, P. H. The antioxidant index and chemometric analysis of tannin, flavonoid, and total phenolic extracted from medicinal plant foods with the solvents of different polarities. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 9, p. 1–11, 2020.

NGUYEN, L. T. et al. Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 21, n. 2, p. 205–213, 2017.

OKIYAMA, D. C. G. et al. Pressurized liquid extraction of flavanols and alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent. **Food Research International**, v. 114, n. July, p. 20–29, 2018.

OLADELE, A. K.; DUODU, K. G.; EMMAMBUX, N. M. Hydrolysis and antioxidant activity of starch modified with phenolic extracts from grape pomace and sorghum bran under alkaline conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 240, n. February, p. 1–9, 2020.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph: Estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.

OROIAN, M.; DRANCA, F.; URSACHI, F. Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis.

Journal of Food Science and Technology, v. 57, n. 1, p. 70–78, 2020.

PATIL, D. M.; AKAMANCHI, K. G. Microwave assisted process intensification and kinetic modelling: Extraction of camptothecin from *Nothapodytes nimmoniana* plant. **Industrial Crops & Products**, v. 98, p. 60–67, 2017.

PATIL, S. S. et al. Study of Extraction Kinetics of Total Polyphenols from Curry Leaves. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2021, n. May 2021, p. 1–8, 2021.

PATRA, S. et al. Chemical diversity of dietary phytochemicals and their mode of chemoprevention. **Biotechnology Reports**, v. 30, n. May 2021, p. 1–12, 2021.

PĂVĂLOIU, R. D. et al. Encapsulation of polyphenols from lycium barbarum leaves into liposomes as a strategy to improve their delivery. **Nanomaterials**, v. 11, n. 8, p. 1–13, 2021.

PEDRO, A. C. et al. Bioactive compounds of organic goji berry (*Lycium barbarum* L.) prevents oxidative deterioration of soybean oil. **Industrial Crops and Products**, v. 112, n. May, p. 90–97, 2018.

PEDRO, A. C. et al. Biological activities, chromatographic profile and thermal stability of organic and conventional goji berry. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 16, n. 2, p. 1263–1273, 2022.

PEIXOTO, F. B. et al. Extraction and encapsulation of bioactive compounds: A review. **Journal of Food Process Engineering**, v. 45, n. 12, p. 1–17, 2022.

PHAT, T. et al. Assessing the kinetic model on extraction of essential oil and chemical composition from lemon peels (*Citrus aurantifolia*) by hydro-distillation process. **Materials Today: Proceedings**, v. 51, p. 172–177, 2022.

PIRES, T. C. S. P. et al. Phenolic compounds profile, nutritional compounds and bioactive properties of *Lycium barbarum* L.: A comparative study with stems and fruits. **Industrial Crops and Products**, v. 122, n. February, p. 574–581, 2018.

POTTERAT, O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. **Planta Medica**, v. 76, n. 1, p. 7–19, 2010.

POVOLO, C.; FOSCHINI, A.; RIBAUDO, G. Optimization of the extraction of bioactive molecules from *Lycium barbarum* fruits and evaluation of the antioxidant activity: a combined study. **Natural Product Research**, v. 33, n. 18, p. 2694–2698, 17 set. 2019.

QI, Y. et al. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on cell signal transduction pathways. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 147, n. November 2021, p. 1–7, 2022.

QIAN, D. et al. Systematic review of chemical constituents in the genus lycium (*solanaceae*). **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 1–33, 2017.

QU, W.; PAN, Z.; MA, H. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 1, p. 16–23, 2010.

- RAKSHIT, M.; SRIVASTAV, P. P.; BHUNIA, K. Kinetic modeling of ultrasonic-assisted extraction of punicalagin from pomegranate peel. **Journal Food Process Engineering**, n. June, p. 1–13, 2020.
- RAUF, A.; NAWAZ, H.; SHAD, M. A. Effect of solvent polarity and extraction time on in vitro antioxidant properties of Brassica oleracea Convar Capitata Var L. Seeds. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 5, p. 1889–1897, 2018.
- REQUE, P. M.; BRANDELLI, A. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals : Applications in functional food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, n. April, p. 1–10, 2021.
- ROCES, C. B. et al. Manufacturing considerations for the development of lipid nanoparticles using microfluidics. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 11, p. 1–19, 2020.
- RODRIGUES, F. T. et al. Effects of electron beam irradiation on the bioactive components of goji-berry. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 179, n. August 2020, p. 1–20, 2021.
- ROSHANPOUR, S. et al. Improving antioxidant effect of phenolic extract of Mentha piperita using nanoencapsulation process. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 1, p. 23–32, 2021.
- RSTUDIO. **RStudio: Integrated Development Environment for R**. Boston, MA, 2020. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>. Acesso em: 22 set 2022.
- RUFINO, M. DO S. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 127, p. 1–4, 2007a.
- RUFINO, M. DO S. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS.+. **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 128, p. 0–3, 2007b.
- RUFINO, M. DO S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.
- SAGAR, N. A. et al. Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 3, p. 512–531, 2018.
- SAINAGA JYOTHI, V. G. S. et al. Stability characterization for pharmaceutical liposome product development with focus on regulatory considerations: An update. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 624, n. July, p. 1–16, 2022.
- SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v. 76, n. July 2015, p. 735–750, 2015.
- SALES, R. L. DE; ROCHA, J. L. M.; BRESSAN, J. Utilização de hormônios e antibióticos em produtos alimentícios de origem animal: aspectos gerais e toxicológicos. **Nutrire**, v. 40, n. 3, p. 409–420, 2015.

- SEDIGHI, M. et al. Rapid optimization of liposome characteristics using a combined microfluidics and design-of-experiment approach. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 9, p. 404–413, 2019.
- SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757–781, 2015.
- SHARMA, G. et al. Role of Nanotechnology in Cancer Treatment. In: **Importance and applications of nanotechnology**. MedDocs Publishers, v. 7p. 1–9, 2021a.
- SHARMA, S. et al. Functional relationship of vegetable colors and bioactive compounds: Implications in human health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 92, p. 108615, 2021b.
- SHARMA, S. H.; RAJAMANICKAM, V.; NAGARAJAN, S. Antiproliferative effect of p-Coumaric acid targets UPR activation by downregulating Grp78 in colon cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 291, n. June 2018, p. 16–28, 2018.
- SHENG, Y. N. et al. Zeaxanthin induces apoptosis via ROS-regulated MAPK and Akt signaling pathway in human gastric cancer cells. **OncoTargets and Therapy**, v. 13, p. 10995–11006, 2020.
- SHENG, Z. Z. Anticancer effects of catechin flavonoid in human glioma cells are mediated via autophagy induction, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and invasion and targeting MAPK/ ERK signalling pathway. **Journal of B.U.ON.**, v. 25, n. 2, p. 1084–1090, 2020.
- SHUKLA, A.; GOUD, V. V.; DAS, C. Antioxidant potential and nutritional compositions of selected ginger varieties found in Northeast India. **Industrial Crops and Products**, v. 128, n. July 2018, p. 167–176, 2019.
- SILVA, L. E. S. DA; CLARO, R. M. Time trends in the consumption of fruits and vegetables among adults in brazilian state capitals and the federal district, 2008-2016. **Cadernos de Saude Publica**, v. 35, n. 5, p. 2008–2016, 2019.
- SIMEONOV, E.; YANEVA, Z.; CHILEV, C. Kinetics of green solid-liquid extraction of useful compounds from plant materials : kinetics coefficients and modeling. **Green Process Synth**, n. February 2019, p. 1–7, 2017.
- SINGH, R. P.; GANGADHARAPPA, H. V; MRUTHUNJAYA, K. Phospholipids : Unique carriers for drug delivery systems. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 39, p. 166–179, 2017.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. **Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.
- SKENDERIDIS, P. et al. Assessment of the antioxidant and antimutagenic activity of extracts from goji berry of Greek cultivation. **Toxicology Reports**, v. 5, n. February, p. 251–257, 2018.
- SKENDERIDIS, P. et al. Chemical properties, fatty-acid composition, and antioxidant activity of Goji berry (*Lycium barbarum* L. and *Lycium Chinense* mill.) fruits. **Antioxidants**, v. 8, n. 3, p. 1–13, 2019.

- SONG, F. et al. Effect of phospholipids on membrane characteristics and storage stability of liposomes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 81, n. August, p. 1–9, 2022.
- SONG, J. et al. Optimization of ultrasonic extraction of Lycium barbarum polysaccharides using response surface methodology. **International Journal of Food Engineering**, v. 16, n. 11, p. 1–14, 2020.
- STEHFEST, K.; TOEPEL, J.; WILHELM, C. The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 717–726, 2005.
- SUBRAMANI, T.; GANAPATHYSWAMY, H. An overview of liposomal nano-encapsulation techniques and its applications in food and nutraceutical. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 10, p. 3545–3555, 2020.
- SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2014.
- SULAIMAN, S.; AZIZ, A. R. A.; KHEIREDDINE, M. Optimization and modeling of extraction of solid coconut waste oil. **Journal of Food E**, v. 114, n. 2, p. 228–234, 2013.
- SUN, Y. et al. Arctigenin inhibits liver cancer tumorigenesis by inhibiting gankyrin expression via C/EBP α and PPAR α . **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. March 2018, p. 1–12, 2018.
- TAI, K. et al. Stability and release performance of curcumin-loaded liposomes with varying content of hydrogenated phospholipids. **Food Chemistry**, v. 326, n. May 2020, p. 1–11, 2020.
- TAVARES, L. Bioactive compounds of garlic: A comprehensive review of encapsulation technologies, characterization of the encapsulated garlic compounds and their industrial applicability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, n. March, p. 232–244, 2021.
- TIRADO-KULIEVA, V. Phenolic compounds of mango (*Mangifera indica*) by-products : Antioxidant and antimicrobial potential , use in disease prevention and food industry ,. **Scientia Agropecuaria**, v. 12, n. 2, p. 283–293, 2021.
- TIWARI, P. et al. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, p. 98–106, 2011.
- TODA, T. A.; SAWADA, M. M.; RODRIGUES, C. E. C. Kinetics of soybean oil extraction using ethanol as solvent : Experimental data and modeling. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, n. December 2015, p. 1–10, 2015.
- TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação.**, p. 1963–1967, 2007.

- TRAN, P. et al. Recent advances of nanotechnology for the delivery of anticancer drugs for breast cancer treatment. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 50, n. 3, p. 261–270, 2020.
- TRIPODO, G. et al. Optimization of pressurized liquid extraction by response surface methodology of Goji berry (*Lycium barbarum* L.) phenolic bioactive compounds. **Electrophoresis**, v. 39, n. 13, p. 1673–1682, 2018.
- UDAYAWARA RUDRESH, D. et al. Neoxanthin prevents H₂O₂-induced cytotoxicity in HepG2 cells by activating endogenous antioxidant signals and suppressing apoptosis signals. **Molecular Biology Reports** 2021 **48:10**, v. 48, n. 10, p. 6923–6934, 6 set. 2021.
- VÁSQUEZ-REYES, S. et al. Dietary bioactive compounds as modulators of mitochondrial function. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 96, n. 15, p. 1–18, 2021.
- WANG, C. C. et al. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 120, p. 184–192, 2010.
- WANG, S. et al. Evaluation of Direct Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Potato Peels. **Processes**, v. 8, n. 12, p. 1–14, 2020.
- WANG, X. et al. Synthesis of biomaterials utilizing microfluidic technology. **Genes**, v. 9, n. 6, p. 1–28, 2018.
- WAWRUSZAK, A.; HALASA, M.; OKLA, K. **Lycium barbarum (goji berry), human breast cancer, and antioxidant profile**. 2. ed. Elsevier Inc., 2021.
- WEN, C. et al. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 105, p. 308–322, 2020.
- WEN, L. et al. Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 11, p. 1826–1841, 2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guide to cancer early diagnosis**. Geneva, 2017.
- WU, D. et al. Review of the structural characterization, quality evaluation, and industrial application of *Lycium barbarum* polysaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, n. September 2017, p. 171–183, 2018.
- XIE, Y. et al. Modeling Kinetics of the Water Extraction of Protein from *Caragana korshinskii* Kom. **BioResources**, v. 15, n. 3, p. 5032–5048, 2020.
- XIONG, L. et al. Goji berry (*Lycium* spp.) extracts exhibit antiproliferative activity via modulating cell cycle arrest, cell apoptosis, and the p53 signaling pathway. **Food and Function**, v. 12, p. 6513–6525, 2021.
- YARIBEYGI, H.; ATKIN, S. L. A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia - induced free radical generation leading to oxidative stress. **Journal**

of **Cellular Physiology**, v. 234, n. 2, p. 1300–1312, 2018.

YETISGIN, A. A. et al. Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 1–31, 2020.

YUSOFF, I. M. et al. A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds : Phenolics , flavonoids , thymols , saponins and proteins. **Food Research International**, v. 157, n. February, p. 1–17, 2022.

ZANNOU, O. et al. Green and highly extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from kinkeliba (*Combretum micranthum* G. Don) by natural deep eutectic solvents (NADESs) using maceration, ultrasound-assisted extraction and homogenate-assisted extraction. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 1–14, 2022.

ZHANG, T. et al. Structural characteristics and bioactive properties of a novel polysaccharide from *Flammulina velutipes*. **Carbohydrate Polymers**, v. 197, n. 1023, p. 147–156, 2018a.

ZHANG, W. et al. Synthesis and antioxidant properties of *Lycium barbarum* polysaccharides capped selenium nanoparticles using tea extract. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. 7, p. 1463–1470, 2018b.

ZHANG, X. X. et al. Physicochemical and antioxidant properties of *Lycium barbarum* seed dreg polysaccharides prepared by continuous extraction. **Food Chemistry: X**, v. 14, n. March, p. 1–8, 2022.

ZHAO, Q. et al. *Lycium barbarum* polysaccharides ameliorates renal injury and in flammatory reaction in alloxan-induced diabetic nephropathy rabbits. **Life Sciences**, v. 157, n. July 2016, p. 82–90, 2016.

ZHENG, B. et al. Green extraction of phenolic compounds from foxtail millet bran by ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction: Optimization, comparison and bioactivities. **Lwt**, v. 154, n. January 2022, p. 1–11, 2022.

ZÔMPEIRO, R. H. DE F. et al. Hybrid encapsulation structures based on β -carotene-loaded nanoliposomes within electrospun fibers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 134, n. October 2015, p. 475–482, 2015.