



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

GIULIA ROSA SASSI

**ELABORAÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE EXTRATO DE GENGIBRE E ÓLEO DE
ANDIROBA PARA APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS**

BRASÍLIA, 2023



GIULIA ROSA SASSI

**ELABORAÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE EXTRATO DE GENGIBRE E ÓLEO DE
ANDIROBA PARA APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como
requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na
Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Dr. Atailson Oliveira da Silva

Co-orientador: Dr. Marcelo Henrique Souza

BRASÍLIA, 2023



Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Re Rosa Sassi, Giulia
ELABORAÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE EXTRATO DE GENGIBRE
E ÓLEO DE ANDIROBA PARA APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS / Giulia
Rosa Sassi; orientador Atailson Oliveira da Silva ;
co-orientador Marcelo Henrique Souza. -- Brasília, 2023.
65 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2023.

1. Câncer. 2. Nanoemulsão. 3. Óleo de andiroba. 4.
Extrato de gengibre. I. Oliveira da Silva , Atailson ,
orient. II. Henrique Souza, Marcelo, co-orient. III.
Título.



GIULIA ROSA SASSI

**ELABORAÇÃO DE NANOEMULSÕES A BASE DE EXTRATO DE GENGIBRE E ÓLEO DE
ANDIROBA PARA APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Dr. Atilson Oliveira da Silva
Pesquisador Associado PPGCTS-UnB - Faculdade de
Ceilândia – Universidade de Brasília – UnB

Co-orientador: Dr. Marcelo Henrique Souza
Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília – UnB

Dr. Luis Alexandre Muehlmann
Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília – UnB

Dr. Mac-Kedson Medeiros Salviano Santos
Centro Universitário Euro-Americano – Unieuro

BRASÍLIA, 2023



AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, que sempre me apoiou e me deu suporte para alcançar meus objetivos, especialmente minha mãe, que sempre esteve presente e preocupada com os mínimos detalhes. Agradeço aos amigos que fiz nessa caminhada, que sempre torceram por mim e estiveram comigo nos momentos bons e ruins também.

Sou grata pelos meus orientadores que foram essenciais no processo, pela paciência para ensinar e me acompanhar. Agradeço pelo apoio da Prof. Dr. Graziella Joanitti, que foi fundamental na elaboração do trabalho.



RESUMO

Neste trabalho, é proposta a elaboração de nanoemulsões a base de extratos de gengibre e óleo de andiroba com potencial para tratamento de células tumorais (carcinoma mamário murino 4T1-luciferase). Os extratos de gengibre foram obtidos pelo método de ultrassom com temperatura controlada em diferentes solventes (metanol, etanol, clorofórmio e éter) com posterior separação da fração apolar. Medidas de FTIR e absorvância UV-vis indicam que os compostos possuem composição química semelhante, avaliações do teor total de fenóis e do conteúdo total de flavonoides indicam que a extração com etanol apresentou maior teor desses componentes. O resultado do ensaio com DPPH confirmou que quanto maior o teor de fenóis e flavonoides maior a atividade antioxidante do composto. As nanoemulsões foram preparadas pelo método de sonicação na proporção de 0,4% (extrato de gengibre/óleo de andiroba) utilizando-se PEG-40 e Lecitina como surfactantes, o diâmetro médio apresentado foi de 66 ± 5 nm com PDI de $0,311 \pm 0,05$ e zeta potencial de $-6,51 \pm 1,5$ mV, dentro dos parâmetros ideais para aplicação, testes de estabilidade indicaram que a nanoemulsão é estável em temperaturas que variam de 4°C a 45°C ao longo do tempo (2 meses), em diferentes pHs (3 a 11) e condições de força iônica (0 a 1 M de NaCl). Os ensaios celulares realizados pelo método MTT indicam que os extrato de gengibre e o óleo de andiroba livres inibiram as células tumorais em 30% e 63%, respectivamente. A nanoemulsão formulada com óleo de andiroba e a nanoemulsão elaborada com extrato de gengibre e óleo de andiroba reduziram a viabilidade das células tumorais em quase 80%.

Palavras-chave: câncer, extrato de gengibre, óleo de andiroba, nanoemulsão.



ABSTRACT

In this study, it is proposed the elaboration of nanoemulsions based on ginger extracts and andiroba oil with potential for the treatment of tumor cells (murine mammary carcinoma 4T1-luciferase). The ginger extracts were obtained by the ultrasound method with controlled temperature in different solvents (methanol, ethanol, chloroform and ether) with subsequent separation of the apolar collection. FTIR and UV-vis absorbance measurements indicate that the compounds have similar chemical composition, estimates of total phenol content and total flavonoid content indicate that the inheritance with ethanol had a higher content of these components. The result of the DPPH test confirmed that the higher the content of phenols and flavonoids, the greater the antioxidant activity of the compound. The nanoemulsions were prepared by the sonication method in the proportion of 0.4% (ginger extract/andiroba oil) using PEG-40 and Lecithin as surfactants, the mean diameter shown was 66 ± 5 nm with PDI of 0.311 ± 0.05 and zeta potential of -6.51 ± 1.5 mV, within ideal parameters for application, stability tests indicated that the nanoemulsion is stable at temperatures ranging from 4°C to 45°C over 2 months, at different pHs (3 to 11) and conditions of ionic strength (0 to 1 M NaCl). The cellular assays carried out by the MTT method show inhibitory activity on the viability of tumor cells by all tested groups, free ginger extract, free andiroba oil, nanoemulsion formulated with free andiroba oil and nanoemulsion elaborated with andiroba oil and ginger extract.

Keywords: cancer, ginger extract, andiroba oil, nanoemulsion.



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Atividades nutracêuticas do gengibre validadas experimentalmente.

Figura 2. Processo de extração (A) e características moleculares dos compostos fenólicos bioativos apolares extraídos do gengibre (B).

Figura 3. Método de obtenção de emulsões e nanoemulsões.

Figura 4. Estrutura química dos surfactantes PEG-40 estearato e Lecitina (representada pela estrutura da fosfatidilcolina) com destaque para as extremidades polares das moléculas.

Figura 5. Medidas de diâmetro hidrodinâmico (a), PDI, (b) e potencial zeta (c) em diferentes temperaturas ao longo do tempo em dias para a formulação F1.

Figura 6. Diâmetro hidrodinâmico (a) e potencial zeta (b) da formulação F1 medidos em função da força iônica.

Figura 7. Resultados ensaio MTT do gingerol livre, óleo de andiroba livre, branco (surfactantes), nanoemulsão formulada com óleo de andiroba e nanoemulsão com óleo de andiroba e com o extrato de gengibre.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Espectro de FTIR medidos para os diferentes extratos ES1, 2, 3 e 4.

Gráfico 2. Espectros de absorção UV-vis para as amostras ES1, 2, 3 e 4.

Gráfico 3. Curva de calibração para teor total de fenois utilizando-se ácido gálico como padrão.

Gráfico 4. Curva de calibração para teor total de flavonoides utilizando quercetina



como padrão.

Gráfico 5. Curva de calibração para atividade antioxidante pelo métodos DPPH utilizando-se ácido ascórbico como padrão.

Gráfico 6. Porcentagem de eliminação de radicais livres obtidos pela redução da absorção de DPPH em 517nm.

Gráfico 7. Espectro de FTIR obtido para o óleo de andiroba.

Gráfico 8. Espectros de FTIR dos surfactantes Lecitina e PEG-40, da formulação (óleo + extrato) e da nanoemulsão.

Gráfico 9. Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico da formulação F1 medidos em função do pH.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais métodos de extração de compostos bioativos.

Tabela 2. Identificação das amostras em função do solvente utilizado no processo de extração.

Tabela 3. Formulações preparadas com o protocolo padrão em diferentes proporções de constituintes surfactante ou fase oleosa.

Tabela 4. Teor total de fenois obtidos para os diferentes extratos.

Tabela 5. Teor total de flavonoides obtidos para os diferentes extratos.

Tabela 6. Atividade de eliminação de radicais livres pelo método DPPH e número de equivalente de ácido ascórbico.



Tabela 7. Composição química do óleo de andiroba obtida por CG-MS.

Tabela 8. Dados de diâmetro hidrodinâmico, PDI e Potencial zeta das nanemulsões preparadas conforme descrito no tópico 5.2.d.



LISTA DE ABREVIações

g - Grama.

mg - Miligrama.

mL - Mililitro.

nm – Nanômetros

µg - Micrograma

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

MTT - bromato de 3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

FTIR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

CG-MS - Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa

CL-EM - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa

MTT - Bromato de 3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

PDI – Índice de polidispersão



SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
2. Revisão de Literatura	15
3. Justificativa	26
4. Objetivos.....	27
4.1 Objetivo Geral.....	27
4.2 Objetivos Específicos	27
5. Materiais e Métodos	28
5.1 Reagentes	28
5.2 Métodos.....	28
5.2.1 Extração dos compostos bioativos	28
5.2.2 Caracterização dos extratos.....	30
5.2.2.a Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) ...	30
5.2.2.b UV-vis	30
5.2.2.c Conteúdo total de fenóis.....	30
5.2.2.d Conteúdo total de flavonoides	31
5.2.2.e Atividade de eliminação de radicais livres (DPPH)	31
5.2.3 Caracterização do Óleo de Andiroba	31
5.2.4 Elaboração da Nanoemulsão	32
5.2.5 Investigação da Estabilidade Coloidal.....	34
5.3 Ensaio Celulares.....	34
6. Resultados e discussão	36
6.1. Extrato de Gengibre	36
6.1.a FTIR.....	36
6.1.b UV-vis	37
6.1.c Conteúdo total de fenóis.....	38
6.1.d Conteúdo total de flavonoides	39
6.1.e Atividade de eliminação de radicais livres (DPPH)	41
6.2 Caracterização do Óleo de Andiroba	43
6.2.1 Composição química por CG-MS	43
6.2.2 Aspectos estruturais por FTIR	44
6.3 Caracterização das Nanoemulsões.....	46



6.3.a Caracterização coloidal das nanoemulsões	47
6.3.b Caracterização dos componentes e da formulação	47
6.3.c Investigação da estabilidade em diferente condições (temperatura, tempo, pH e força iônica)	49
6.4. Ensaio Celulares	53
7. Conclusão e considerações finais	56
8. Referências	58
9. Anexos	61



1. Introdução

O gengibre (*Zingiber officinale*) é uma planta de origem asiática pertencente à família *Zingiberaceae*. Seus efeitos preventivos e curativos são conhecidos desde a antiguidade e recentemente seus extratos têm sido amplamente utilizados na elaboração de produtos farmacêuticos e nutracêuticos (Semwal et al., 2015). Estudos publicados na literatura (Kiyama, 2020; Srinivasan, 2017a) revelam que os componentes bioativos do gengibre possuem efeitos anti-inflamatórios, hipolipemiantes, cardioprotetores, antidiabéticos, antioxidantes e anticancerígenos, o que tem despertado cada vez mais a atenção da comunidade científica, para o desenvolvimento de estudos e ensaios *in vivo* e *in vitro*, e de empresas do ramo farmacêutico, para o desenvolvimento de novos produtos.

Os compostos extraídos do gengibre são considerados complexos e reúnem em torno de quatrocentos constituintes químicos já identificados (Promdam & Panichayupakaranant, 2022), coexistindo moléculas com características polares e apolares, voláteis e não voláteis. O teor destes constituintes varia de acordo com fatores como origem geográfica, processo de colheita, extração e condições de armazenamento. Entre os componentes ativos não voláteis se destacam os gingeróis, mais especificamente o [6]-gingerol, um composto fenólico que é considerado o mais abundante entre os ácidos fenólicos extraídos do gengibre e é o principal composto bioativo. Diversos trabalhos abordam a ação do [6]-gingerol na regulação do ciclo celular, que inclui a indução de apoptose e inibição da proliferação no câncer (de Lima et al., 2020), todavia se trata de um composto sensível ao meio (luz e temperatura), seu processo de purificação é difícil e assim com os demais gingeróis é pouco solúvel.

A administração parenteral de princípios ativos de reduzida solubilidade em meio aquoso e sensíveis ao meio representa um grande desafio para o ramo farmacêutico. Ainda que estratégias como co-solvente, variação de pH e utilização de complexantes sejam utilizadas, problemas com biocompatibilidade, efeitos colaterais e precipitação durante a administração são fatores limitantes (Bruxel et al., 2012). Diante dessa questão, as nanoemulsões tem ganhado



espaço como veículo para administração de fármacos, uma vez que na elaboração dessas nanoestruturas podem ser utilizados óleos e surfactantes de origem natural ou sintéticos com elevada biocompatibilidade. A elaboração de formulação de [6]-gingerol em sistema óleo em água utilizando surfactante e co-surfactante como agentes estabilizantes indicou aumento na concentração plasmática e na biodisponibilidade da molécula em ensaios com ratos (XU et al., 2016).

O óleo de andiroba é um produto natural extraído das sementes de *Carapa guianensis* com potencial repelente, anti-inflamatório, antioxidante e anticancerígena, e recentemente tem sido testado em microencapsulação como potencial alternativa à estabilização e liberação gradativa de compostos ativos (SENHORINI et al., 2012). Esse potencial foi confirmado em estudo com doxorubicina (MELO et al., 2021) onde a nanoemulsão com andiroba reduziu a hematotoxicidade e a gravidade das alterações histológicas causadas pelo fármaco.

As propriedades físico-químicas e farmacêuticas do [6]-gingerol e do óleo de andiroba são bastante similares e a elaboração de nanoemulsões com ambos pode potencializar as propriedades farmacológicas para o tratamento de células cancerosas. Para tanto, a investigação das condições ideais de síntese da nanoemulsão, estudos de estabilidade cinética e citotoxicidade em células sadias e tumorais é um objeto de estudo relevante para viabilizar o desenvolvimento de formas alternativas de tratamento.



2. Revisão de Literatura

Uma célula normal ou sadia, que age em benefício do corpo, torna-se cancerosa quando uma série de mutações as leva a crescer e a se dividir fora de controle, nesse momento, alterações no funcionamento do organismo começam a afetar outras áreas até então normais. Entre os diversos tipos de câncer, o câncer de mama é o que mais acomete mulheres, enquanto o de próstata é o mais comum na população masculina de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA). Em geral, a carcinogênese, formação do câncer, acontece a partir de mutações em células saudáveis após longa exposição a agentes carcinógenos químicos, físicos e/ou biológicos. A proliferação celular continua até o início do processo de invasão (JOANITTI; DE MORAIS; DE AZEVEDO, 2022) e metástase, que corresponde a uma cascata de eventos que permitem o escape de células tumorais e a propagação para ambientes ectópicos (LEE et al., 2008).

Um dos tratamentos mais aplicados no combate ao câncer é a quimioterapia, processo que compreende a administração parenteral de medicamentos nos pacientes. Entretanto, o uso de quimioterápicos possui limitações, dentre elas, a de que somente uma pequena parcela do fármaco atinge o tumor de fato, enquanto o restante é distribuído no organismo. Desse modo, uma dosagem maior de quimioterápico costuma ser administrada para que a concentração do mesmo seja aumentada na região do tumor, expondo também, com isso, tecidos saudáveis, o que torna o tratamento inespecífico (JOANITTI; DE MORAIS; DE AZEVEDO, 2022). O processo quimioterápico apresenta muitos efeitos colaterais associados à alta toxicidade para células não tumorais e à quimiorresistência (ZANESCO-FONTES et al., 2021). Sendo assim, o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diferentes tipos de câncer é essencial para melhora do prognóstico e do tratamento da doença.

Estudos sobre abordagem integrativa para prevenção e tratamento do câncer recomendam que as intervenções devem ser baseadas na melhora do estilo de vida, hábitos de exercício e dieta, redução nos efeitos de estresse, e no uso de produtos naturais e medicamentos que atinjam alvos específicos

(KARATAY et al., 2020). Algumas drogas anticâncer já disponíveis, possuem como base produtos naturais com propriedades fundamentadas na capacidade de proteger células não tumorais ao mesmo tempo que manifestam atividade tóxica contra células tumorais, detendo assim, um efeito quimiossensibilizador (ZANESCO-FONTES et al., 2021). Nesse sentido, uma das estratégias para o descobrimento de novos fármacos é a apuração de produtos naturais que possam ter ação antitumoral.

O gengibre é uma planta nativa do sudeste asiático que tem sido usada como condimento e agente medicinal por mais de 2.500 anos (POLTRONIERI et al., 2014). A planta possui alto valor nutracêutico, que é atribuído a uma variedade de compostos bioativos presentes em sua constituição. Além disso, já existem evidências (SEMWAL et al., 2015) dos efeitos benéficos do gengibre e seus metabólitos ativos contra uma variedade de carcinomas e linhas celulares, portanto, também é conhecido por sua contribuição para saúde humana, a Figura 1 resume os principais efeitos benéficos do gengibre relatados na literatura.

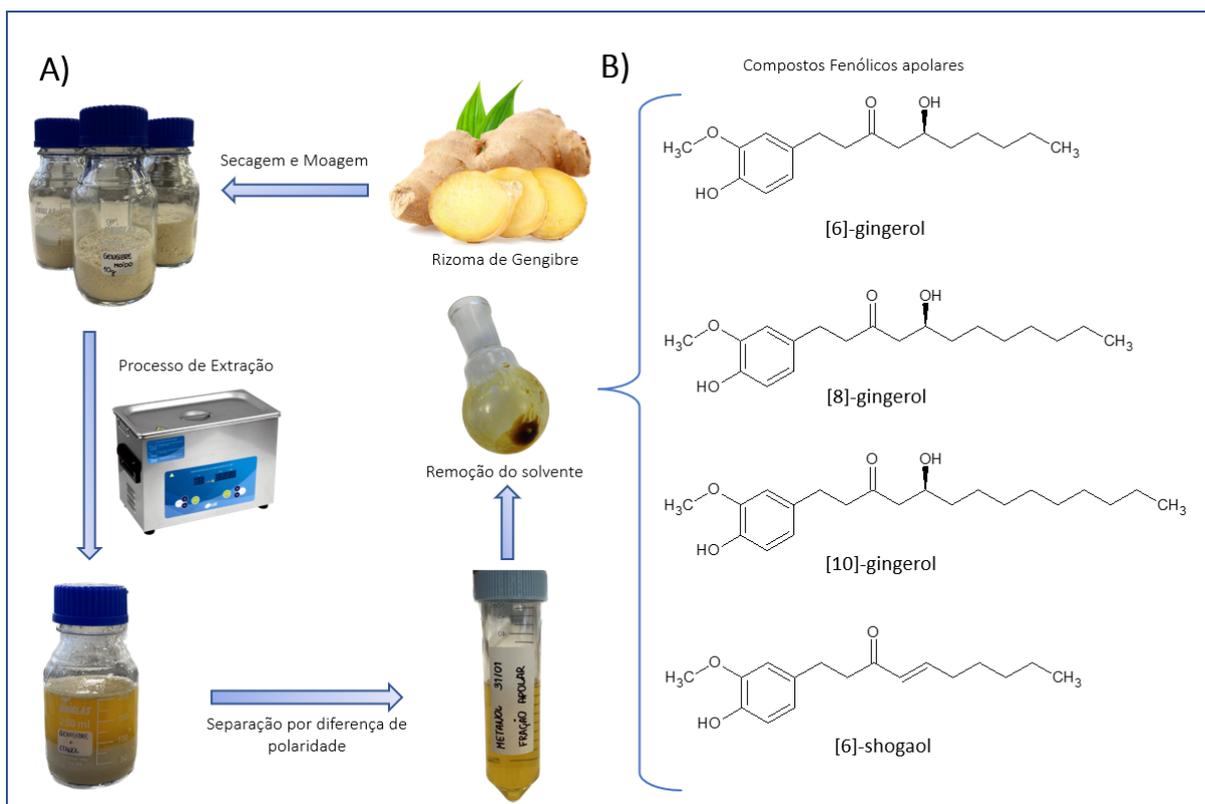
Figura 1 – Atividades nutracêuticas do gengibre validadas experimentalmente.



Fonte: Adaptado de SRINIVASAN, 2017.

Na sua composição, o gengibre possui componentes voláteis e não voláteis (POLTRONIERI et al., 2014), o conteúdo volátil varia entre 1% e 3%, sendo responsável pelo sabor e aroma da planta. Enquanto isso, os componentes não voláteis são representados por gingerol, shogaol, paradol e zingerone. Os compostos ativos de rizoma de gengibre também podem ser classificados em compostos fenólicos (gingerol, shogaol e paradols) e terpenos (zingibereno, bisaboleno, curcumeno, farneseno e sesquifelandreno), sendo, especificamente, os gingeróis (Figura 2B) os mais abundantes (PROMDAM; PANICHAYUPAKARANANT, 2022).

Figura 2 – Processo de extração (A) e características moleculares dos compostos fenólicos bioativos apolares extraídos do gengibre (B). Fonte: elaborado pelo autor (2023).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.



A maior parte das propriedades medicinais do gengibre estão associadas aos gingeróis (SEMWAL et al., 2015b), esses bioativos já foram descritos como tendo atividades antitumoral, anti-inflamatória e antimicrobiana (ZANESCO-FONTES et al., 2021). Mais especificamente, o [6]-gingerol foi identificado como um dos principais compostos que apresentam ação antitumoral, sendo ele o constituinte mais abundante no rizoma do gengibre fresco (KARATAY et al., 2020). A purificação e identificação do [6]-gingerol em extratos de gengibre pode ser alcançada a partir da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (CL-EM) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). Tendo em vista que esse composto apresenta efeitos benéficos à saúde humana, suas atividades biológicas, mecanismos de ação e avaliação da toxicidade têm sido alvo de estudos (PROMDAM; PANICHAYUPAKARANANT, 2022b).

Para estudos qualitativos e quantitativos de compostos bioativos do gengibre e de materiais vegetais em geral, a escolha do método de extração apropriado é crucial. A extração representa um papel importante no estudo de uma planta medicinal e somente é possível proceder com a separação, identificação e caracterização de compostos bioativos a partir do processo de extração adequado. As técnicas de extração possuem a finalidade de extrair compostos bioativos alvo de amostras complexas de plantas, aumentar a seletividade dos métodos analíticos, maximizar a sensibilidade do bioensaio aumentando a concentração de compostos alvo, converter os compostos bioativos em uma forma mais adequada para detecção e separação e fornecer um método forte e reprodutível que seja independente de variações na matriz da amostra (AZMIR et al., 2013). A Tabela 1 resume os métodos de extração convencionais e não convencionais de compostos bioativos.



Tabela 1 – Principais métodos de extração de compostos bioativos.

Tipo	Método	Características
<i>Convencionais</i>	<i>Extração de Soxhlet</i>	Inicialmente projetado para extração de lipídeos. Recentemente, tem sido amplamente utilizado para extração de compostos bioativos de diversas fontes naturais.
	<i>Maceração</i>	Método popular e de baixo custo para obtenção de óleos essenciais e compostos bioativos. Processo formado por várias etapas, em que a agitação ocasional facilita a extração.
	<i>Hidrodestilação</i>	Método tradicional de extração de compostos bioativos e óleo essenciais de plantas. Não faz uso de solventes orgânicos. Envolve três processos físico-químicos: hidrofusão, hidrólise e decomposição por calor. Uso limitado para extração de compostos termolábeis.
<i>Não convencionais</i>	<i>Extração assistida por ultrassom (EAU)</i>	Utilização em materiais líquidos e materiais sólidos que contêm líquidos. Promove intensificação ultrassônica da massa e acesso acelerado de solventes a materiais celulares de partes de plantas.
	<i>Extração de campo elétrico pulsado (PEF)</i>	Método reconhecido para melhora nos processos de prensagem, secagem, extração e difusão. Baseado no princípio de destruição da estrutura da membrana celular para aumento da extração.
	<i>Extração assistida por enzimas (EAE)</i>	Método novo e eficaz para liberação de compostos ligados e aumento do rendimento geral, desenvolvido principalmente para extração de óleos de sementes.
	<i>Extração assistida por micro-ondas (MAE)</i>	Método utilizado para extração de produtos solúveis em fluido de ampla gama de materiais usando energia de micro-ondas. Baseado no princípio do aquecimento e seu impacto sobre materiais polares.



<i>Extração de líquido pressurizado (PLE)</i>	Método baseado na aplicação de alta pressão para manutenção do solvente líquido além do ponto de ebulição normal, o que facilita o processo de extração. Requer pequenas quantidades de solvente.
<i>Extração com fluido supercrítico (SFE)</i>	Método adequado para extração de compostos em curto período de tempo com maiores rendimentos. Fluido supercrítico.

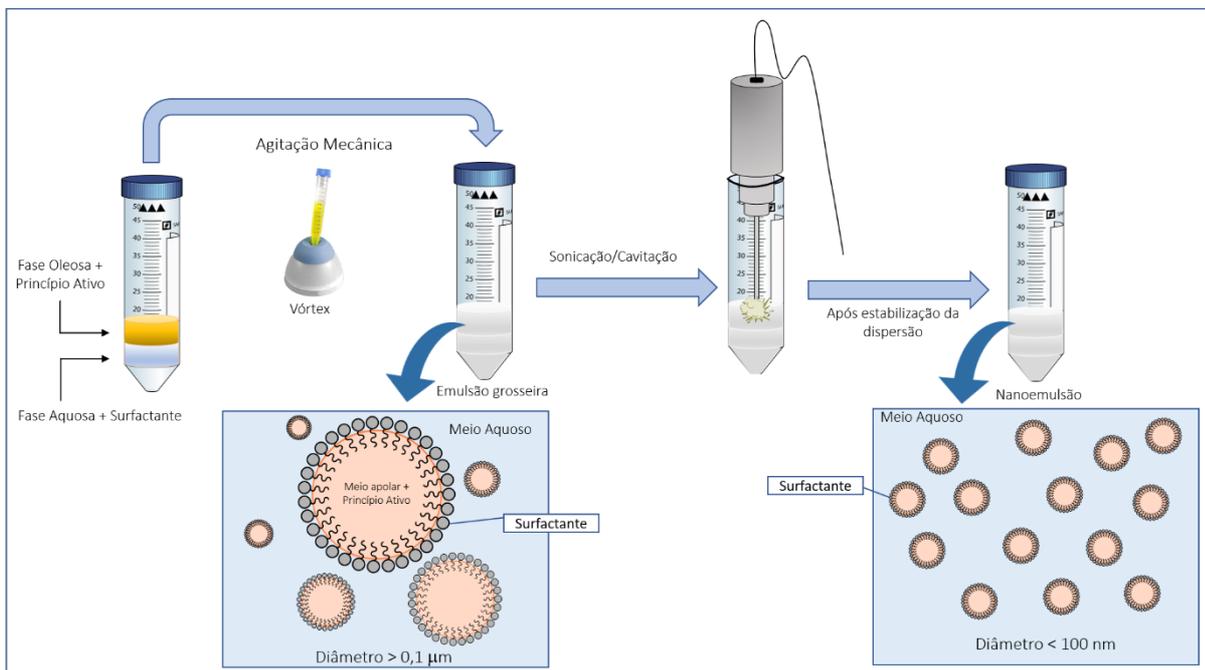
Fonte: AZMIR et al., 2013

Um estudo (M et al., 2017) com foco na identificação de alvos de câncer para gengerois, evidenciou que todos exibiram boa interação com os alvos de câncer selecionados, sendo o [6]-gingerol superior em aspectos como a solubilidade e absorção, quando comparado a outros, além de demonstrar menor efeito neurotóxico. O [6]-gingerol foi capaz de inibir células do câncer de mama, induzindo a produção celular e mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que elevou a resposta ao dano do DNA por meio de uma proteína quinase mutada. O composto bioativo ativou a expressão de um gene supressor tumoral (p53), induzindo a apoptose, ou seja, morte celular (SP et al., 2021).

Mesmo apresentando solubilidade elevada quando comparado a outros bioativos do gengibre, o [6]-gingerol ainda é uma molécula pouco solúvel em meio aquoso. Nesse sentido, outra limitação encontrada para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de câncer é a administração parental de princípios ativos com baixa solubilidade em água e sensíveis ao meio (BRUXEL et al., 2012). Em vista disso, já foi demonstrado (MELO et al., 2021) que o desenvolvimento de sistemas de liberação em escala nanométrica a partir de produtos naturais com propriedades bioativas reduz efeitos adversos. Entre as vantagens pode-se citar melhora nas propriedades farmacocinéticas, o que aumenta a eficiência, a estabilidade e a solubilidade, reduz a toxicidade e potencializa a atuação em partes específicas do organismo (drug delivery).

Entre as nanoformulações mais utilizadas, pode-se citar as nanoemulsões, que são um importante artifício nanotecnológico desenvolvidos para aplicação clínicas e farmacêuticas. Uma emulsão é classicamente definida como um sistema macroscopicamente homogêneo, formulados com um conjunto de gotículas de fase interna que, por sua vez, encontram-se carregadas por uma fase externa contínua (SAHU et al., 2017). As nanoemulsões consistem em gotículas de líquidos imiscíveis estabilizados por materiais tensoativos com diâmetro de até 100 nm (Sheth et al., 2020), na Figura 3 é apresentada, de forma esquemática, como as emulsões grosseiras e nanomulsões são preparadas. Esses sistemas são ferramentas para entrega direcionada de fármacos na terapia do câncer e foram reconhecidas como nanocarreadores capazes de contornar problemas de baixa disponibilidade e não conformidade associados às formas de dosagem quimioterapêuticas convencionais (Sahu et al., 2017).

Figura 3 – Método de obtenção de emulsões e nanoemulsões.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

As nanoemulsões podem ser do tipo água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A) e costumam ser estabilizadas por um surfactante que auxilia na manutenção do tamanho e propriedades em nanoescala. Nesses sistemas,



pode-se observar evidente estabilidade cinética e instabilidade termodinâmica, ou seja, manifestam resistência a mudanças físico-químicas no meio, porém, suas fases podem se separar e formar um complexo heterogêneo ao longo do tempo (JOANITTI; DE MORAES; DE AZEVEDO, 2022). Dessa maneira, a formulação de uma nanoemulsão deve levar em conta as propriedades das partículas que irão compor o sistema.

Como mencionado, as nanoemulsões são formadas por uma fase oleosa, que costuma ser utilizada para solubilização do fármaco lipofílico, uma fase aquosa, e surfactantes que ajudam na estabilização do sistema, reduzindo a tensão interfacial inerente entre as duas fases (SAHU et al., 2017). Numerosos óleos podem ser usados na composição da fase oleosa, sendo assim, é fundamental entender a composição e os parâmetros físico-químicos antes de selecionar o óleo, tendo em vista que tais características podem influenciar no tamanho e na estabilidade da nanoemulsão final. A fase aquosa pode conter outros componentes polares como cossolventes (oriundos do processo de extração), carboidratos, proteínas, minerais, ácidos e bases. Quando utilizada como fase contínua, a fase aquosa torna-se susceptível a contaminações e desestabilização, portanto, podem ser incorporados agentes conservantes, reguladores de pH e tampões (JOANITTI; DE MORAES; DE AZEVEDO, 2022).

Enquanto isso, a seleção de um surfactante na preparação de uma nanoemulsão deve considerar o tipo de estrutura que precisa ser formada, custo, níveis de uso, compatibilidade dos componentes, estabilidade e facilidade de utilização (JOANITTI; DE MORAES; DE AZEVEDO, 2022). Os surfactantes são estruturas químicas formadas pelos domínios lipofílicos e hidrofílicos na mesma molécula, que equilibrados, tendem a diminuir a interface ou tensão superficial óleo-água, solubilizando a fase oleosa na aquosa (SAHU et al., 2017).

Na elaboração de nanoemulsões a utilização de dois ou mais surfactantes pode melhorar a formação da nanogota e as propriedades físico-químicas quando em comparação à utilização de apenas um surfactante. Estudos comprovam que nanoemulsões feitas com a combinação de surfactantes tendem a se dispersar melhor na fase contínua (C. Rodriguez et al., 2001). Tendo isso

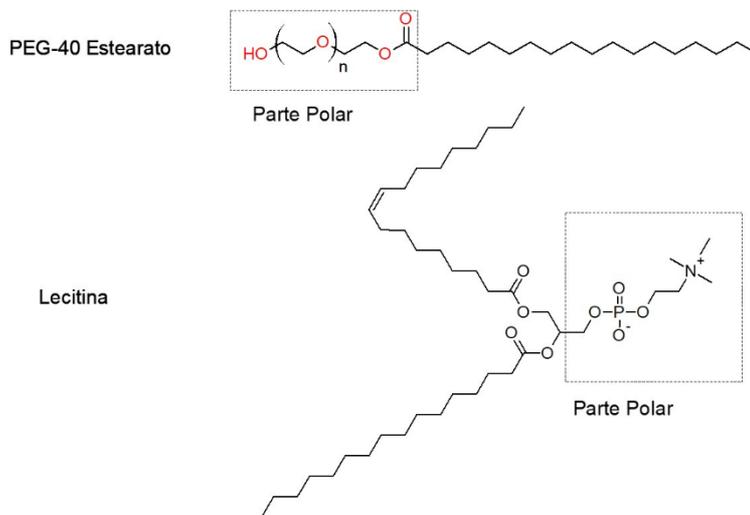


em vista, a elaboração de nanoemulsões utilizando a combinação de dois surfactantes não iônicos, como o estearato de PEG-40 e a lecitina (Figura 4), pode apresentar resultados promissores.

O estearato de polietilenoglicol (PEG) é um surfactante que pode ser utilizado como solubilizante, emulsificante e intensificador de absorção oral para fármacos de difícil absorção (Luo, Lingying, et al, 2007). Em estudos anteriores (Niu et al., 2021), o PEG e seus derivados, demonstraram diminuição nas interações entre sistemas carregados bioativos e ambientes fisiológicos. O PEG também demonstrou melhora na estabilidade coloidal do sistema de entrega devido às suas cadeias hidrofílicas que se projetam da superfície para a fase aquosa, gerando um impedimento estérico que dificulta a fixação de outras moléculas.

A lecitina, por outro lado, é um anfifílico e importante componente de membranas celulares, por essa característica, tornou-se um emulsificante natural amplamente utilizado, sendo um dos mais seguros. Geralmente, nanoemulsões a base de lecitina são altamente fluidas e apresentam aspecto translúcido se suas gotículas apresentarem tamanho inferior a 100 nm (Klang & Valenta, 2011).

Figura 4 – Estrutura química dos surfactantes PEG-40 estearato e Lecitina (representada pela estrutura da fosfatidilcolina) com destaque para as extremidades polares das moléculas.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

As nanoemulsões podem ser transformadas em diferentes formas farmacêuticas e podem ser administradas por várias vias. Além de contornarem limitações como a solubilidade, nanoemulsões podem ser utilizadas para proteger drogas contra fatores como oxidação, pH e hidrólise e para atingir órgãos específicos, explorando maior permeabilidade e efeito de retenção (SINGH et al., 2017). Esses sistemas também têm sido empregados no combate à resistência a fármacos, pelo emprego de excipientes inteligentes ou pelo uso de sistemas multimedicamentosos que potencializam atividade anticancerígena.

Em estudo recente (SAHU et al., 2017), foi formulada uma nanoemulsão de camptotecina, anticancerígeno de amplo espectro com aplicação clínica limitada por sua insolubilidade, instabilidade e toxicidade. A nanoemulsão foi preparada usando fluorocarbonos e óleo de coco como núcleos da fase interna e estabilizado com fosfolipídeos, sendo capaz de solucionar o problema de entrega da droga. Foi possível utilizar uma dose reduzida de camptotecina que apresentou citotoxicidade contra melanomas e células de câncer de ovário.

O potencial da nanoestruturação como estratégia de melhora da



farmacocinética, aumentando a biodisponibilidade, dispersão e absorção também foi confirmado em estudo (MELO et al., 2021) com doxorubicina. A doxorubicina (DOX) é um antibiótico antraciclina utilizado no tratamento contra diversos tipos de câncer e, apesar de ser eficaz para essa finalidade, seu uso clínico é limitado por efeitos colaterais graves que o medicamento provoca. No trabalho em questão, foi testada a capacidade do óleo de andiroba e de uma nanoemulsão de óleo de andiroba em reduzir os efeitos colaterais da DOX. Os resultados demonstraram uma redução da gravidade de lesões causadas pela doxorubicina, incluindo a diminuição da hematotoxicidade e da gravidade das alterações histológicas causadas pelo medicamento, além de reduzir a frequência de morte celular apoptótica.

Em suma, a nanotecnologia pode contornar limitações dos quimioterápicos, a partir da entrega do medicamento na região tumoral com maior especificidade, sem que seja necessário aumentar a concentração, o que diminui a exposição de tecidos saudáveis e os efeitos adversos da terapia. Ainda assim, um estudo aprofundado das características tumorais é essencial para elaboração de nanomateriais com controle de propriedades como tamanho, carga, formato, propriedade de superfície, entre outras (JOANITTI; DE MORAIS; DE AZEVEDO, 2022).



3. Justificativa

O gengibre apresenta compostos bioativos com comprovada eficácia anti-inflamatória, analgésica, neuroprotetiva, cardioprotetiva, antiviral, antioxidante e antitumoral, contudo, na sua grande maioria são compostos pouco solúveis em água, instável na presença de luz, ar, calor e armazenamento a longo prazo, o que dificulta o desenvolvimento de formulações que não superem esses obstáculos e que podem inativar moléculas como os gingeróis que são os compostos majoritários nos extratos de gengibre.

A manutenção das propriedades dos gingeróis e sua estabilidade pode ser aumentada quando estabilizados em nanoemulsão, conforme comprovada em estudos anteriores (XU et al., 2016), todavia não há dados de formulações de nanoemulsões envolvendo extrato de gengibre e óleo de andiroba, o que torna relevante a realização de estudos com estes constituintes para subsidiar a elaboração e a avaliação da eficácia desses fármacos, principalmente para o tratamento de células tumorais.



4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Elaborar nanoemulsões com extrato de gengibre e óleo de andiroba com potencial para tratamento de células tumorais.

4.2 Objetivos Específicos

- Promover a extração dos compostos bioativos apolares pelo método de ultrassom utilizando diferentes solventes (etanol, clorofórmio, metanol e éter) e efetuar a separação da fase apolar com hexano.
- Caracterizar os extratos por espectroscopia de absorção UV-vis e FTIR, determinar o teor de fenóis, flavonóides e a atividade antioxidante.
- Caracterizar o óleo de andiroba por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-MS) para identificar o teor de ácidos graxos e por espectroscopia FTIR.
- Estabelecer as melhores condições (proporção de surfactantes, quantidade de óleo/extrato de gingerol e volume de PBS) para preparação das nanoemulsões.
- Realizar estudos de estabilidade coloidal das nanoemulsões em diferentes temperaturas ao longo de tempo, pHs e condições de força iônica para determinar os mecanismos de desestabilização.
- Realizar estudo de citotoxicidade em células tumorais para avaliar a eficácia da nanoformulação.



5. Materiais e Métodos

5.1 Reagentes

- Polyoxyethylene(40)stearate - PEG-40 (Sigma-Aldrich)
- Lecitina de Ovo (Sigma-Aldrich)
- PBS solution 1x (Sigma-Aldrich)
- Gengibre fresco
- Metanol
- Éter
- Clorofórmio
- Alcool etílico absoluto
- Hexano
- HNO₃
- NaOH
- NaCl
- Água Milli-Q
- Na₂CO₃
- Ácido gálico
- Folin-Ciocalteu
- K₄[Fe(CN)₆]
- Ácido tricloroacético
- FeCl₃
- Ácido ascórbico
- Quercetina
- AlCl₃
- 1,1-difenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)

5.2 Métodos

5.2.1 Extração do composto bioativo

Os rizomas de gengibre foram comprados em um supermercado da região. Previamente, foram sonicados em banho ultrassônico com solução de hipoclorito de sódio a 10% por 5 min e lavados com água ultrapura por três vezes. Posteriormente, os rizomas tiveram a casca removida, foram congelados a -98°C



e liofilizados por três dias para remoção da água presente nos tecidos, esse protocolo objetivou evitar a degradação dos compostos bioativos termossensíveis que poderia ocorrer por secagem em estufa em temperaturas maiores que 60°C. O material liofilizado foi reduzido a pó utilizando-se um liquidificador e os fragmentos maiores foram removidos com uma peneira. Para extração dos compostos, 10 g do pó foram adicionados a 200 mL de solvente e sonicados em banho ultrassônico (*Unique modelo USC-2800A 40kHz 154W*) por 1h a uma temperatura constante de 40°C. Os solventes selecionados para avaliar a eficiência de extração foram metanol, etanol 95%, éter e clorofórmio, uma adaptação do método utilizado por Foudah e colaboradores (FOUDAH et al., 2020). Finalizado o procedimento de sonicação todos os solventes apresentaram uma tonalidade amarela, indicando a ocorrência do processo de extração. As soluções foram filtradas utilizando papel filtro e funil para remoção dos fragmentos sólidos. Para remoção do solvente um rotaevaporador com controle de pressão e temperatura foi utilizado, ao término do processo, um precipitado com aspecto viscoso foi formado. Para separação dos compostos com diferentes polaridades, foi escolhida a cromatografia em coluna com sílica gel (C18) e uma mistura de hexano/etanol (75:20) para eluição, a fração apolar obtida foi escolhida por reunir uma maior quantidade de gingeróis, o solvente remanescente foi novamente rotaevaporado e o extrato liofilizado por 24h. Ao longo das próximas seções, as amostras que foram extraídas pelos diferentes solventes serão referenciadas conforme a tabela 2.

Tabela 2 – Identificação das amostras em função do solvente utilizado no processo de extração.

Solvente utilizado na extração	Amostra
Metanol	ES1
Etanol	ES2
Éter	ES3
Clorofórmio	ES4

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.



5.2.2 Caracterização dos extratos

5.2.2.a Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As medidas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas em um equipamento Agilent Cary 630 acoplado a um módulo Diamond ATR, as varreduras foram realizadas de 4000 a 650 cm^{-1} com leituras de 96 scans por amostra.

5.2.2.b UV-vis

Os espectros de absorção UV-vis foram obtidos em um equipamento Hitachi modelo U-3500 com duplo feixe. As varreduras foram efetuadas de 800 a 200 nm com slit de 2 nm e 1200 nm/min utilizando etanol como solvente.

5.2.2.c Conteúdo total de fenóis

O teor de fenóis foi determinado usando o método de Folin Ciocalteu, uma adaptação do protocolo utilizado por Anwar e colaboradores (Anwar et al., 2020a). Inicialmente, volumes de 0,25 mL de solução de ácido gálico com concentrações variando de 10 a 250 $\mu\text{g/mL}$, foram misturadas com 1,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (10%) e 1 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 7,5%. As soluções foram deixadas em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente, em seguida, a absorbância foi medida em 765 nm, como branco foi utilizada a solução de reagentes sem o ácido gálico, com os dados de absorbância em função da concentração de padrão foi plotada a curva de calibração. A análise dos extratos se deu a partir da dissolução de 6,2 mg em 25 mL de metanol, onde 0,25 mL das soluções foi misturado com os mesmos reagentes utilizados para determinação da curva de calibração. O teor de fenóis totais foi calculado com a expressão:

$$C = C_1 \times V/M$$



onde C_1 representa a concentração de ácido gálico estabelecida pela curva de calibração em $\mu\text{g/mL}$, V é o volume de extrato em mL e M é a massa de extrato em gramas.

5.2.2.d Conteúdo total de flavonoides

O conteúdo total de flavonoides foi determinado por ensaio colorimétrico com cloreto de alumínio (Anwar et al., 2020b). Para obtenção da curva padrão foi utilizada a quercetina, um flavonoide abundante em frutas e vegetais. Resumidamente, 0,5 mL de uma solução de AlCl_3 2% em etanol foram misturados a 0,5 mL das soluções padrão de quercetina também em etanol em concentrações que variaram de 2,5 a 25 $\mu\text{g/mL}$. A mistura reacional foi incubada por 1h em temperatura ambiente e, após esse tempo, a absorbância foi medida em 420 nm, utilizando etanol como branco. O mesmo procedimento foi utilizado para determinação do teor total de flavonoides nos extratos, para tanto, uma solução com 2,4 mg diluídos em 10 mL de etanol foi preparada previamente.

5.2.2.e Atividade de eliminação de radicais livres (DPPH)

A atividade de eliminação de radicais livres foi determinada pelo método do DPPH (Anwar et al., 2020b), o ácido ascórbico foi utilizado como agente antioxidante padrão. A curva padrão foi preparada misturando-se 0,4 mL de solução de 0,15 mM de DPPH 0,15 mM e 0,5 mL de soluções padrão de ácido ascórbico com concentrações que variaram de 0 a 10 $\mu\text{g/mL}$. A mistura foi incubada em ambiente escuro por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, a absorbância da amostra foi medida em 517 nm utilizando etanol como branco. A absorbância do equipamento foi ajustada para menor que 1,0 com a solução padrão de DPPH (0,4 mL de DPPH e 0,5 mL de etanol) na ausência e ácido ascórbico.

5.2.3 Caracterização do Óleo de Andiroba

Para caracterização do óleo de andiroba foram efetuadas medidas de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) em colaboração com os pesquisadores Valdir Florencio da Veiga e Rayssa Ribeiro do Laboratório de Bioprocessos Avançados na Química de Produtos Naturais ABC-NP



do Instituto Militar de Engenharia – IME. O equipamento utilizado foi um Shimadzu modelo QP2020 NX (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) em modo impacto de elétrons a 70 eV utilizando coluna SH-RTX-5ms (SHIMADZU)-5% fenil: 95% dimetilpolisiloxane (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) fluxo de gás constante de 2,26 mL/min e volume de injeção de 1 mL. As injeções foram realizadas inicialmente em modo split 1:30, com a seguinte programação de temperatura do forno:

<i>Intervalo de aquecimento</i>	<i>Taxa</i>
60 °C → 140 °C	↑ 10 °C/min
140 °C → 240 °C	↑ 3 °C/min
240 °C → 280 °C (isoterma final de 2 min)	↑ 10 °C/min
<i>Total da corrida</i>	48 min

A análise dos espectros de massas foi realizada em comparação com a espectroteca do equipamento e também com dados da literatura, com os padrões de fragmentos pares resultantes dos rearranjos da McLafferty de compostos graxos carbonilados (clivagem da ligação β nos carbonos 2-3, a partir da carbonila, com a migração de um íon H^+ para o fragmento neutro formado) para ésteres metílicos de ácidos graxos saturados (EMAG) foi o de m/z 74 ($H_3 COCOHCH_2 +$); ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAG), o fragmento escolhido foi o de m/z 88 ($H_3 CCH_2 OCOHCH_2 +$).

Medidas de espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) nas mesmas condições apresentadas no tópico 5.2.2.a também foram efetuadas para caracterizar o óleo e os surfactantes utilizados na preparação das nanoemulsões (PEG 40 e Lecitina).

5.2.4 Elaboração da Nanoemulsão

As quantidades de fase polar, fase apolar, surfactante, volume de amostra e relação entre o tempo e potência de sonicação utilizadas foram adaptadas das utilizadas por Delmas, Couffin, et al., 2011; Delmas, Piraux, et al., 2011. A proporção entre a quantidade de óleo de andiroba e extrato de gingerol foi estabelecida com base no trabalho de Sari et al., 2015, ainda que nesse trabalho



tenha sido utilizado curcumina e outros surfactantes.

Inicialmente 6 mg do extrato de gengibre e 1,5 g de óleo de andiroba, proporção de 0,4% extrato/óleo de andiroba, foram misturados a uma temperatura de 40°C utilizando um vortex. Em seguida, 90 mg dessa formulação foi misturada previamente com 17,2 mg de lecitina e 77 mg de PEG-40 por 15 min utilizando um vortex e adicionados à 15 mg de PEG-40 previamente dissolvidos em 3 mL de PBS, por fim, a solução foi completada para 5 mL com PBS, agitada por 15 min em vortex e sonicada por 6 minutos com banho de gelo em ultrassom (*Sonics Modelo VCX 750 20 kHz 750 W*) utilizando uma microprobeira 1/8" (3 mm) modelo 630-0422. Na tabela 3, são apresentadas diferentes formulações de nanoemulsão que foram preparadas seguindo o protocolo descrito, com o objetivo de avaliar como a composição da nanoformulação influencia as características coloidais.

Tabela 3 – Formulações preparadas com o protocolo padrão em diferentes proporções de constituintes surfactante ou fase oleosa.

Formulação	Composição
F1	5 mL de PBS; 90 mg de óleo com composto bioativo; 17,12 mg de lecitina; 92 mg de PEG-40
F2	5 mL de PBS; 90 mg de óleo com composto bioativo; 92 mg de PEG-40
F3	5 mL de PBS; 90 mg de óleo com composto bioativo; 92 mg de lecitina
F4	5 mL de PBS; 90 mg de óleo de andiroba; 92 mg de PEG-40
F5	5 mL de PBS; 90 mg de óleo de andiroba; 92 mg de lecitina
F6	5 mL de PBS; 90 mg de óleo de andiroba; 17,12 mg de lecitina; 92 mg de PEG-40

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.



5.2.5 Investigação da Estabilidade Coloidal

Medidas de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico são fundamentais para investigar a estabilidade de sistemas nanoestruturados, principalmente nanopartículas e nanoemulsões dispersas em meio líquido. Para aquisição desses dados foi utilizado um equipamento Malvern Zeta Sizer Nano-ZS modelo ZEN3600 e uma cubeta de quartzo de fluxo contínuo modelo DTS1070. Por meio das medidas de mobilidade eletroforética o potencial zeta foi calculado com a aproximação de Smoluchowski (Bhattacharjee, 2016) e os valores de diâmetro hidrodinâmico por meio da equação de Stoke-Einstein após medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS).

A primeira avaliação das formulações ocorreu 24h após o preparo para se confirmar a formação da nanoemulsão. Os parâmetros da formulação F1 (tabela 2), selecionada por apresentar os melhores parâmetros de tamanho, foram utilizados como padrão para o preparo das formulações com o objetivo de se realizar medidas de estabilidade coloidal (potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e PDI – *Polydispersity Index*) em diferentes temperaturas (4°C, temperatura ambiente e 45°C) por um período de 2 meses. Para o ensaio de estabilidade em função da força iônica, os valores de potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e PDI foram medidos em concentrações crescentes de NaCl (0 - 1 M). A estabilidade em função do pH foi realizada utilizando-se um módulo de titulação MPT-3 acoplado ao equipamento Malvern ZetaSizer Nano, onde soluções de NaOH (0,1 e 0,01M) e HNO₃ (0,01M) foram adicionadas automaticamente na nanoemulsão para ajuste do pH (meio ácido → meio alcalino) seguindo-se das medidas de potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e PDI. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e o erro experimental apresentado foi obtido do desvio padrão médio das medidas efetuadas.

5.3 Ensaio Celulares

Foram cultivadas linhagens celulares de carcinoma mamário murino 4T1-luciferase e fibroblasto murino (NIH-3T3) em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) e 1% de



solução antibiótica (100 UI/mL Penicilina – 100 µg/mL Estreptomicina – v/v) a 37°C e 5% de CO₂. O ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando o ensaio MTT (bromato de 3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), que consiste na redução de derivados de tetrazólio em células vivas por desidrogenases mitocondriais. A partir desse ensaio, é possível estimar a atividade metabólica das células e avaliar a viabilidade celular e proliferação dos parâmetros de sobrevivência e crescimento celular (OMBREDANE et al., 2020).



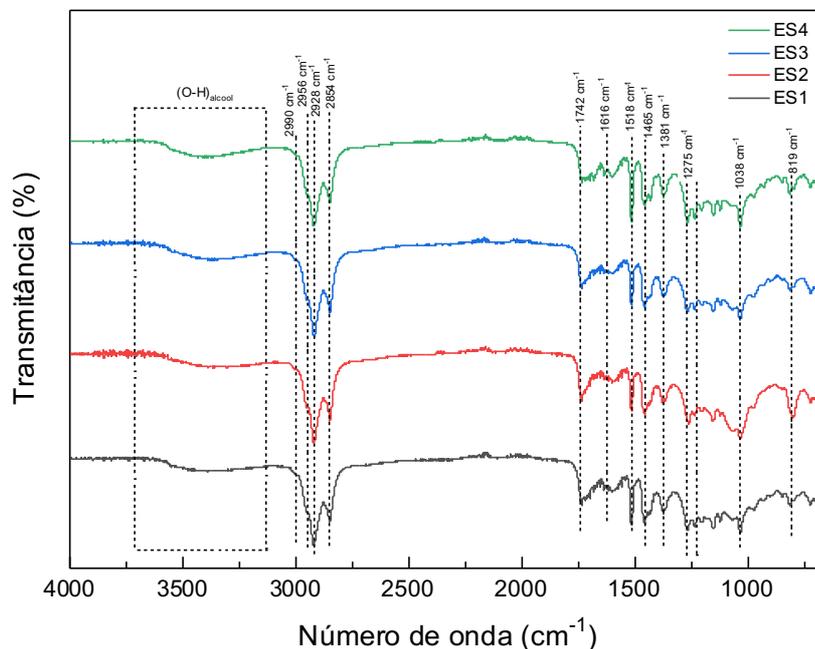
6. Resultados e discussão

6.1. Extrato de Gengibre

6.1.a FTIR

No gráfico 1 são apresentados os espectros de absorção no infravermelho para os extratos obtidos com diferentes solventes. É possível observar nos espectros uma banda larga de vibração entre 3550 e 3200 cm^{-1} correspondente à vibração de estiramento O-H característica do grupo álcool. Também são identificadas bandas de vibração em 2990, 2956, 2928 e 2854 cm^{-1} oriundas das vibrações de estiramento -C-H típicas de anel aromática (sp^2), alceno (sp^2), alceno (sp^3) e aldeídos, respectivamente. Entre 1742 e 1616 cm^{-1} estão as vibrações de estiramento da ligação C=O, 1515 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento da ligação C=C em anel aromático, a vibração de dobramento da ligação C-H em alcanos e aldeídos está presente em 1465 cm^{-1} e 1381 cm^{-1} , respectivamente, entre 1275 e 1038 cm^{-1} são observadas vibrações de estiramento C-O, por fim, em 819 cm^{-1} estão presentes dobramentos da ligação C-H. Os dados dos espectros de FTIR nos permite inferir que se tratam de extratos compostos majoritariamente por gingeróis e que entre eles não há diferenças significativas de composição química, contudo, não se pode descartar a presença de outras moléculas em quantidade menor.

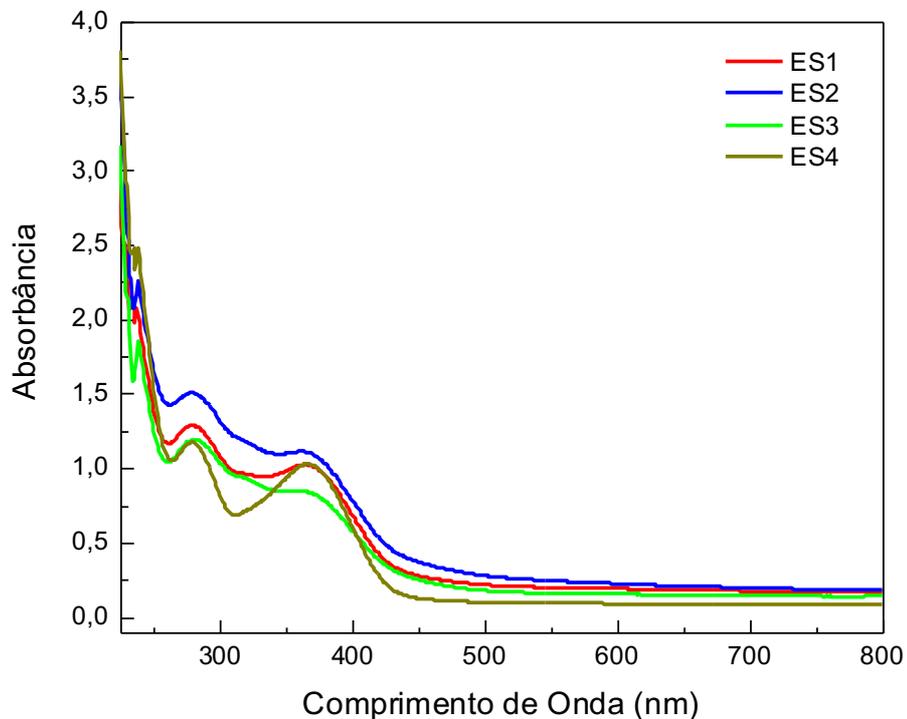
Gráfico 1 – Espectro de FTIR medidos para os diferentes extratos ES1, 2, 3, e 4.



6.1.b UV-vis

No gráfico 2 são apresentados os espectros de absorção UV-vis para os diferentes extratos, é observada uma banda de absorção em 240 nm oriunda de transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e outra banda em 270 nm correspondente à transições $n \rightarrow \pi^*$, o perfil dos espectros é similar aos encontrados nos espectros UV-vis dos gingerols isolados (Liu et al., 2014). A absorção em 360 nm ($n \rightarrow \sigma^*$) é característica de ligações duplas entre carbono e heteroátomos (ex.: C=N e C=O) encontrada em compostos ceto-enólicos e flavonoides (Avula et al., 2010). O dados obtidos por absorção UV-vis corroboram com o que foi constatado nas medidas de FTIR, as amostras apresentam similaridade de composição química e compostos como flavonoides e fenois podem estar presentes nos diferentes extratos. A maior intensidade de absorção para a amostra ES2 (extração com etanol) nos permite inferir que para estes compostos bioativos a extração com etanol foi mais eficiente.

Gráfico 2 – Espectros de absorção UV-vis para as amostras ES1, 2, 3 e 4.



6.1.c Conteúdo total de fenóis

A curva padrão de determinação do teor de fenóis obtida com as diferentes concentrações de ácido gálico (10–250 µg/mL) é apresentada no gráfico 3. O ajuste linear apresenta um coeficiente angular de $0,00273 \pm 5,89814 \cdot 10^{-5}$ e um coeficiente linear de $0,00943 \pm 0,00829$ com R^2 de 0,99. A concentração total de fenóis nos extratos foi calculada usando o ajuste linear da curva padrão. Na tabela 4, o conteúdo de fenóis foi expresso em mg equivalentes de ácido gálico (GAE), usando a equação: $TPC = C \times V/M$ onde C é a concentração de ácido gálico (mg/mL), V é o volume no qual o extrato foi diluído em mL e M é a massa do extrato puro em gramas. Em concordância com o que foi observado nos espectros de UV-vis, a amostra ES2 apresenta maior teor de fenóis.

Gráfico 3 - Curva de calibração para teor total de fenois utilizando-se ácido gálico como padrão.

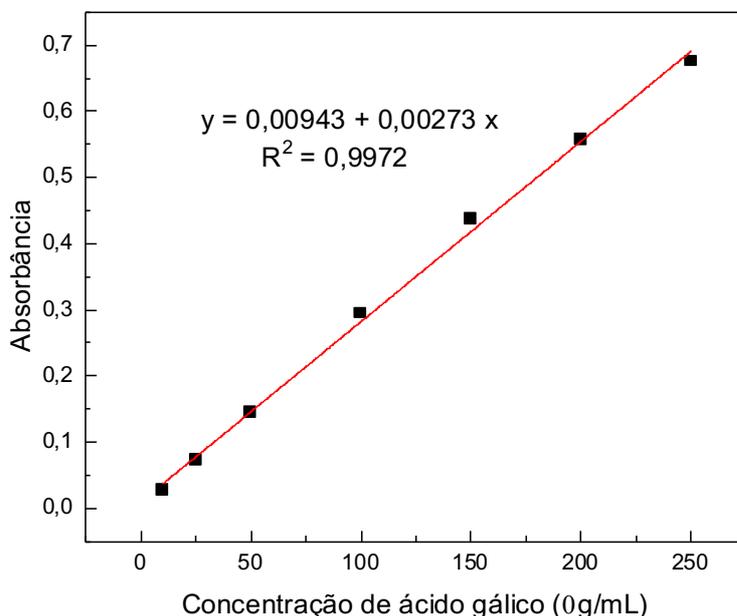


Tabela 4 - Teor total de fenois obtidos para os diferentes extratos.

Extrato	Concentração média (pela curva de padrão) ($\mu\text{g/mL}$)	Número de equivalentes (GAE) ($\mu\text{g/mg}$)
ES1	24,79 \pm 1,56	99,96 \pm 6,30
ES2	31,33 \pm 6,30	126,34 \pm 5,86
ES3	22,07 \pm 2,47	89,01 \pm 9,96
ES4	29,97 \pm 0,33	120,87 \pm 1,33

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

6.1.d Conteúdo total de flavonoides

No gráfico 4 é apresentada a curva obtida com o padrão quercetina para determinação do total de flavonoides, o ajuste linear apresenta coeficiente angular de $0,02555 \pm 0,001$ e coeficiente linear de $0,05114 \pm 0,041$ com R^2 igual a 0,988. A concentração total de flavonoides nos extratos foi determinada com base na



equação do ajuste linear do padrão quercetina, os resultados absolutos e em termos de equivalentes são apresentados na tabela 5. O conteúdo de flavonoides em termos de equivalente de quercetina foi obtido pela equação $CTF = C \times V/M$, onde C é a concentração de quercetina em $\mu\text{g/mL}$ obtida pelo gráfico do padrão, V é o volume de extrato de gengibre utilizado e M é a massa em gramas do extrato, o resultado de equivalentes é expresso em termos de micrograma de quercetina por grama de extrato ($\mu\text{g QUE/g}$). De maneira coerente com o observado nos espectros de UV-vis, e assim como ocorreu para o teor de fenóis, a amostra ES2 apresentou maior teor de flavonoides.

Gráfico 4 - Curva de calibração para teor total de flavonóides utilizando quercetina como padrão.

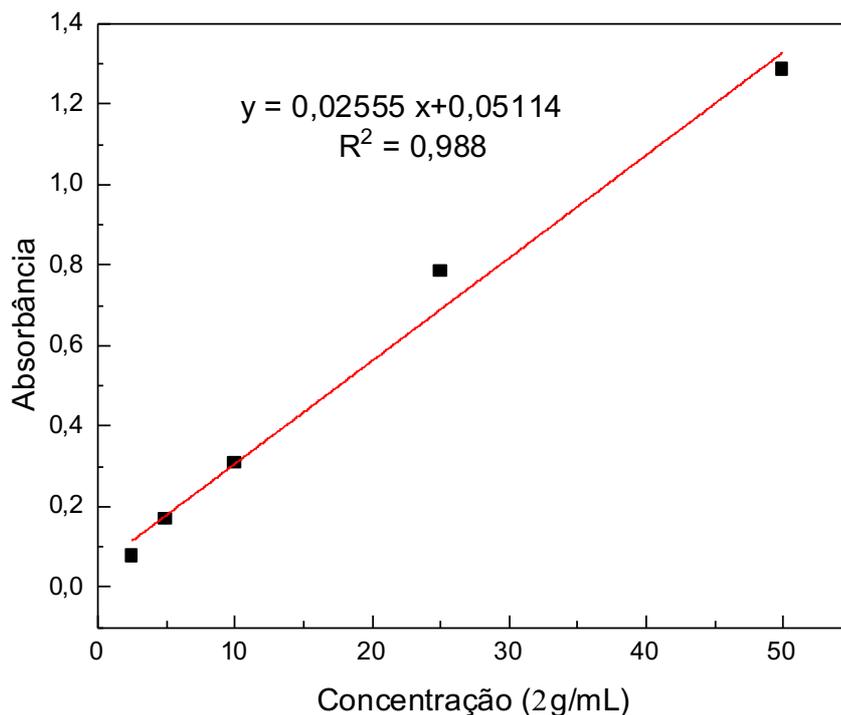




Tabela 5 - Teor total de flavonoides obtidos para os diferentes extratos.

Extrato	Concentração média (pela curva de padrão) ($\mu\text{g/mL}$)	Número de equivalentes (QUE) ($\mu\text{g/mg}$)
ES1	$6,80 \pm 0,18$	$27,44 \pm 0,74$
ES2	$9,66 \pm 0,26$	$38,96 \pm 1,05$
ES3	$7,31 \pm 0,70$	$29,49 \pm 2,84$
ES4	$8,77 \pm 0,43$	$35,38 \pm 1,72$

6.1.e Atividade de eliminação de radicais livres (DPPH)

O radical DPPH \cdot possui uma cor púrpura com absorção entre 515 e 520 nm em meio etanólico. Na presença de uma substância antioxidante o radical DPPH \cdot se tornam aceptores de elétrons e, ao aceitar o mesmo de uma espécie química redutora, se torna uma molécula estável na forma reduzida DPPH-H com a consequente perda da cor violeta até o surgimento de uma cor amarelada. No gráfico 5 é apresentada a curva obtida utilizando-se o ácido ascórbico como padrão antioxidante e o ajuste linear aplicado apresenta coeficiente angular de -0,05115 e linear de 0,5608 com $R^2 = 0,982$. A atividade de eliminação de radicais livres em termos de equivalente é calculada pela equação $AER = C \times V/M$, onde C é a concentração obtida pela curva padrão de ácido ascórbico em mg/mL, V é o volume de extrato de gengibre em mL e M é a massa em gramas de extrato. Na tabela 6 são apresentados os valores obtidos para os diferentes extratos. A partir da diminuição da absorbância do DPPH é possível determinar o efeito inibitório ou % de atividade de eliminação de radicais livre com a equação:

$$\% \text{ de atividade de eliminação de radicais livres} = \left(\frac{[A_c - A_s]}{A_c} \right) \cdot 100\%$$

onde A_c é a absorbância da solução padrão de DPPH e A_s é a absorbância na presença do extrato de gengibre. Os resultados obtidos são apresentados no



gráfico 6, é possível correlacionar que quanto maior o teor de fenois e flavonoides maior a atividade antioxidante. Conforme constatado anteriormente o extrato ES2 apresentou maior teor desses compostos e a avaliação dos dados de atividade antioxidante apenas corroboram com as evidências anteriores. Para todos os extratos foi identificada uma elevada atividade de eliminação de radicais, para todos os extratos foi constatado valores de eliminação do radical DPPH acima de 80%.

Gráfico 5 - Curva de calibração para atividade antioxidante pelo método DPPH utilizando-se ácido ascórbico como padrão.

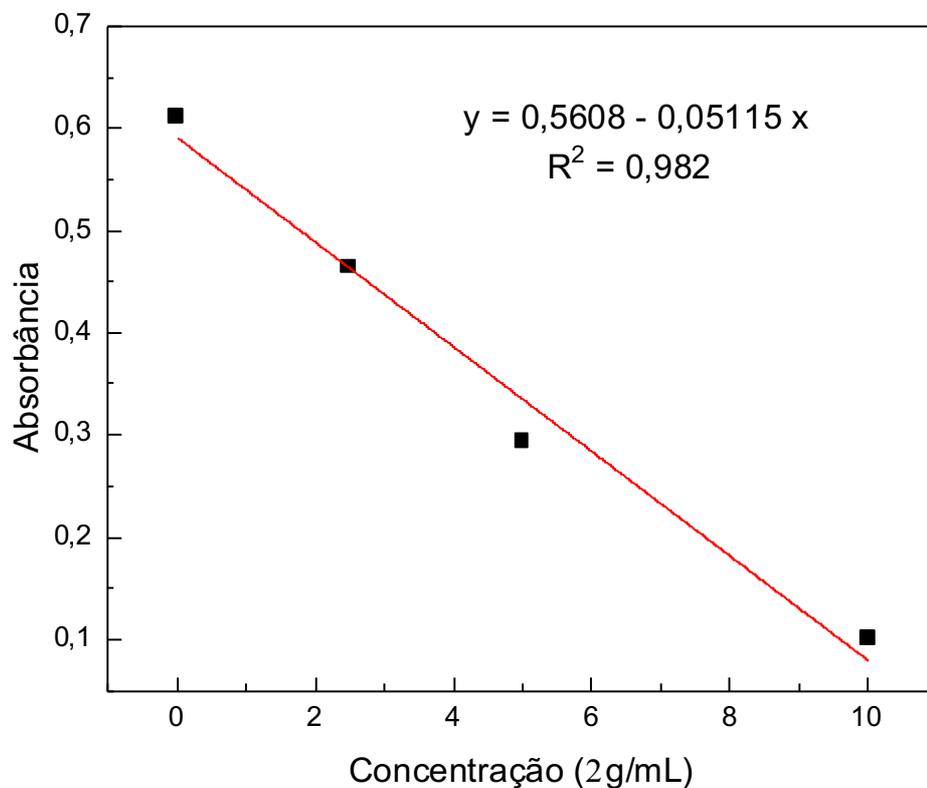


Tabela 6 - Atividade de eliminação de radicais livre pelo método DPPH e número de equivalente de ácido ascórbico.

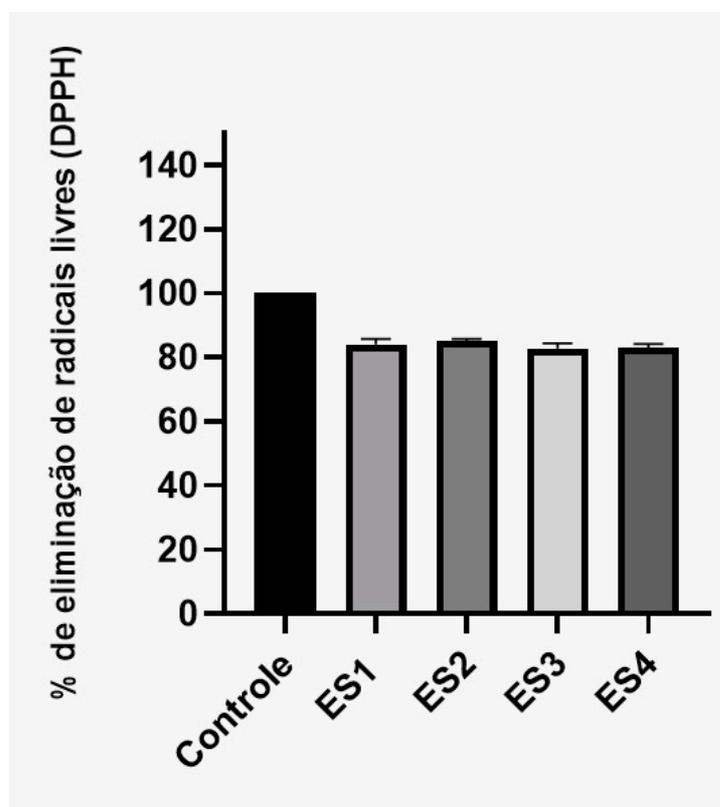
Extrato	Concentração média (pela curva de padrão) ($\mu\text{g/mL}$)	Número de equivalentes (AUE) ($\mu\text{g/mg}$)
---------	--	---



ES1	9,51 ± 0,09	38,36 ± 0,38
ES2	9,77 ± 0,06	39,39 ± 0,23
ES3	9,49 ± 0,13	38,28 ± 0,54
ES4	9,64 ± 0,16	38,86 ± 0,65

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Gráfico 6 – Porcentagem de eliminação de radicais livres obtida pela redução da absorção de DPPH em 517 nm.



6.2 Caracterização do Óleo de Andiroba

6.2.a Composição química por CG-MS

Na tabela 7 é apresentada a composição química do óleo de andiroba obtida por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), todas as análises foram realizadas em triplicata e o valor apresentado na última coluna corresponde à media obtida. Os dados indicam que o óleo é formado



majoritariamente por ácido palmítico (Ácido hexadecanóico), ácido oléico (Ácido 9-octadecenóico), ácido linoléico (Ácido 9-12-octadecadienóico) e ácido esteárico (ácido octadecanoico).

Tabela 7 – Composição química do óleo de andiroba obtida por CG-MS.

Tempo de retenção (Tr)	Substâncias	PM	PP			Média
			1	2	3	
21,317	Ácido 9-hexadecenóico*	268	0,60	0,51	0,46	0,52
21,733	Ácido hexadecanóico*	270	27,87	28,21	27,51	27,83
25,238	Ácido 9-12-octadecadienóico*	294	9,79	9,19	9,63	9,53
25,383	Ácido 9-octadecenóico*	296	45,59	46,86	46,39	47,28
25,483	Ácido 13-octadecenóico*	296	-	1,24	1,17	1,20
25,927	Ácido esteárico (ácido octadecanoico)*	298	8,84	8,99	8,99	8,94
30,567	Ácido 18-metilnonadecanoato*	326	1,16	-	0,91	1,03
34,883	Hexadecanoato de 2-hidroxi-1-(hidroximetil)	330	1,01	0,43	0,47	0,63
	Total identificado		95,1%	95,4%	95,5%	96,9%

*identificado como seu éster metílico

PM = Peso molecular

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

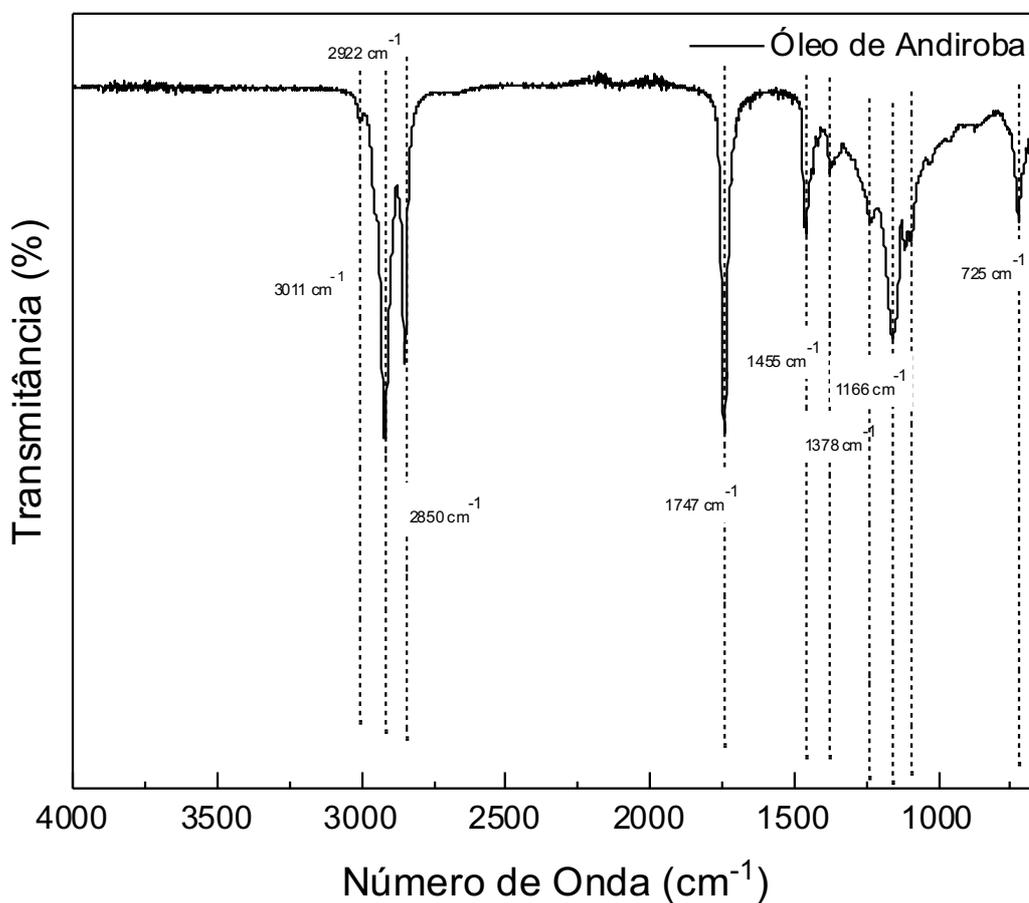
6.2.b Aspectos estruturais por FTIR

O espectro de FTIR do óleo de andiroba é apresetando no gráfico 7, as varreduras foram realizadas nas condições indicadas no tópico 5.2.2.a a partir da gota do óleo. No espectro são observadas bandas de estiramento da ligação C-H entre 3050 e 3000 cm^{-1} de hidrocarboneto alifático, os picos estreitos em 2922 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} são de estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H presente em alcenos (carbono hibridizado sp^2), o alargamento desses picos se deve às vibrações de estiramento $-\text{CH}_3$, CH_2 e CH que ocorrem em cadeias saturadas, as



vibrações em 1455 cm^{-1} e 1378 cm^{-1} tem origem nos dobramentos da ligação C-H. A vibração em 1747 cm^{-1} tem origem na vibração de estiramento da ligação C=O e em 1166 cm^{-1} está associada à ligação C-O, por fim a vibração em 725 cm^{-1} está associada à vibração de dobramento C=C presente nos ácidos oléico e linoléico. Os modos vibracionais observados no espectro de FTIR são característicos de mistura de ácidos graxos saturados e insaturados.

Gráfico 7 - Espectro de FTIR obtido para o óleo de andiroba.





6.3 Caracterização das Nanoemulsões

6.3.a Caracterização coloidal das nanoemulsões

Na tabela 8 são apresentados os valores de diâmetro hidrodinâmico, PDI (índice de polidispersão) e potencial zeta para as formulações descritas no tópico 5.2.4. No Anexo 1 são apresentados os histogramas de distribuição de tamanho para cada amostra. Foi observada que a utilização de dois surfactantes proporcionou melhores características de tamanho, conforme pode ser visto nos dados de diâmetro hidrodinâmico e PDI das formulações F1 e F6, a melhor estabilidade neste caso é assegurada para gotículas menores que 100 nm e com baixo índice de polidispersão (PDI) (<0,4) (Danaei et al., 2018). A utilização de apenas um surfactante (estearato de PEG 40 ou Lecitina) não foi suficiente para assegurar tamanhos menores que 100 nm como ocorreu de F2 até F5, ainda que o PDI tenha sido inferior a 0,3 nas formulações F2 e F4 este parâmetro não pode assegurar sozinho a qualidade da nanoemulsão. Os dados também indicam que a Lecitina sozinha como surfactante não formou nanoemulsões estáveis, como pode ser visto para as formulações F3 e F5. Apesar do potencial zeta ser baixo, quando comparado a outros sistemas coloidais estáveis ($< \pm 25\text{mV}$), as amostras F1 e F6 apresentaram estabilidade ao longo do tempo, o que reforça a hipótese da estabilidade coloidal dessas nanoemulsões terem origem no impedimento estérico, e não somente na repulsão eletrostática.

Tabela 8 – Dados de diâmetro hidrodinâmico, PDI e Potencial zeta das nanoemulsões preparadas conforme descrito no tópico 5.2.4.

Formulação	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
<i>F1</i>	78	0,312	-6,4
<i>F2</i>	111,8	0,208	- 0,736



F3	258,4	0,736	-4,41
F4	111,7	0,247	-1,58
F5	394	0,856	- 1,32
F6	80,96	0,433	- 1,32

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

6.3.b Caracterização dos componentes e da formulação

No gráfico 8 são apresentados os espectros de absorção no infravermelho para os surfactantes (PEG-40 e Lecitina), para a fase oleosa formulada (óleo de andiroba + extrato de gengibre) e para a nanoemulsão (F1). As informações relativas ao FTIR do óleo de andiroba e do extrato de gengibre já foram discutidas anteriormente e para a proporção em massa de óleo:extrato (250:1) utilizada não foi constatada mudança significativa no espectro de FTIR do óleo de andiroba pela presença do extrato de gengibre, nesse sentido será dada maior atenção para os surfactantes e para a nanoformulação.

O espectro de FTIR da lecitina apresenta bandas de estiramento simétrico e antissimétrico para os grupos $-CH_2$, estiramento antissimétrico $-CH_3$ e vibração de torção $-CH_2$ situados em 2856, 2923, 2957 e 1465 cm^{-1} , nessa ordem, esses modos vibracionais também estão presentes no espectro FTIR do PEG-40 estearato. A vibração de estiramento $C=O$ está localizada em 1739 cm^{-1} sendo mais intensa para a Lecitina que possui mais carbonilas que o PEG-40 estearato. Em 1498 cm^{-1} é observada a vibração de deformação assimétrica do grupo $-N^+(CH_3)$, em 1247 cm^{-1} é observada uma vibração de estiramento assimétrico do grupo PO_2^- juntamente com uma vibração de estiramento assimétrico em 1169 cm^{-1} e simétrico em 1058 cm^{-1} das ligações $CO-O-C$, a vibração de estiramento simétrico e assimétrico do grupo PO_2^- está presente em 1097 cm^{-1} e em 820 cm^{-1} .

¹, respectivamente, em 720 cm^{-1} é observada a vibração de dobramento do grupo $-\text{CH}_2$. Na região que vai de 1520 cm^{-1} até 800 cm^{-1} para o PEG-40 estearato são identificadas vibrações de dobramento de C-H entre 1386 e 1321 cm^{-1} , estiramento C-O entre 1297 e 1226 cm^{-1} característica de ésteres e de C-O em 1150 cm^{-1} , 1107 cm^{-1} e 1070 cm^{-1} , típicas de éter alifático, álcool secundário e álcool primário, respectivamente, por fim, a vibração de dobramento C-H é observada em 844 cm^{-1} . No espectro apresentado pela nanoemulsão é observada uma similaridade com o espectro do PEG-40 estearato, o que se justifica pela maior quantidade desse surfactante em relação à lecitina, a menor intensidade nos modos vibracionais tem relação com o menor grau de liberdade ocasionado pela formação das nanogotas.

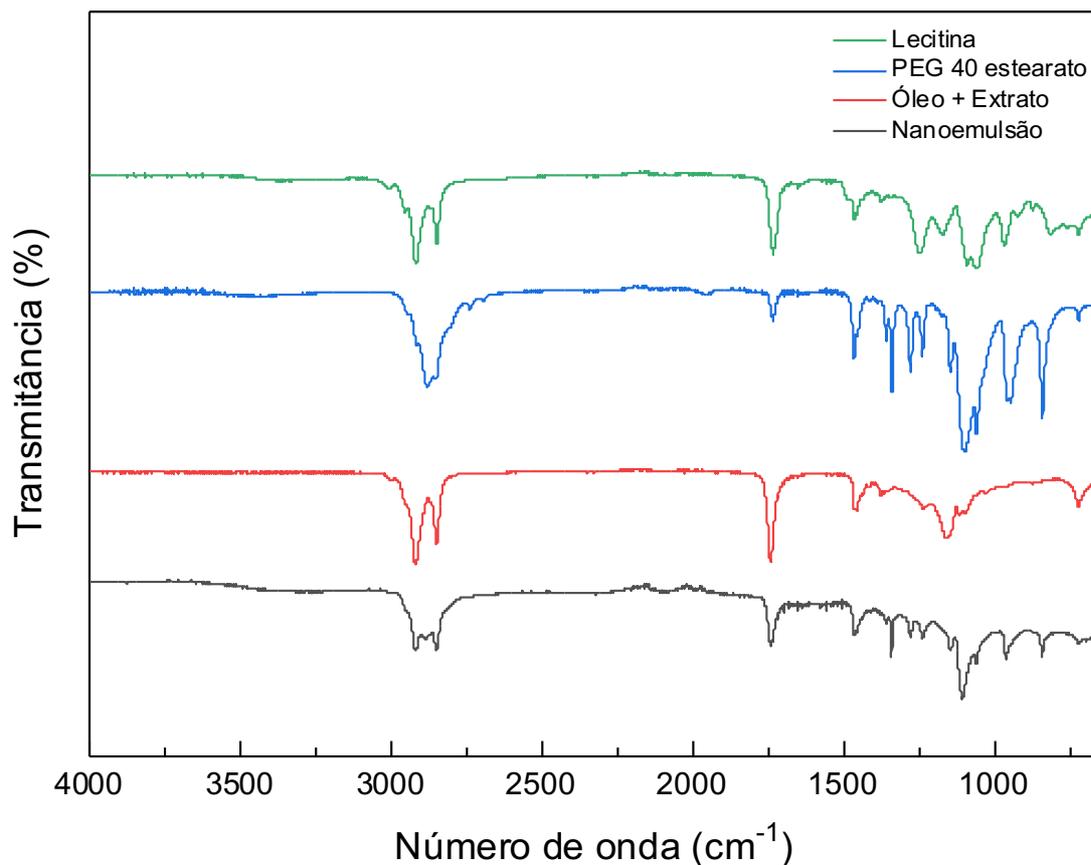


Gráfico 8 - Espectros de FTIR dos surfactantes Lecitina e PEG-40, da formulação (óleo + extrato)



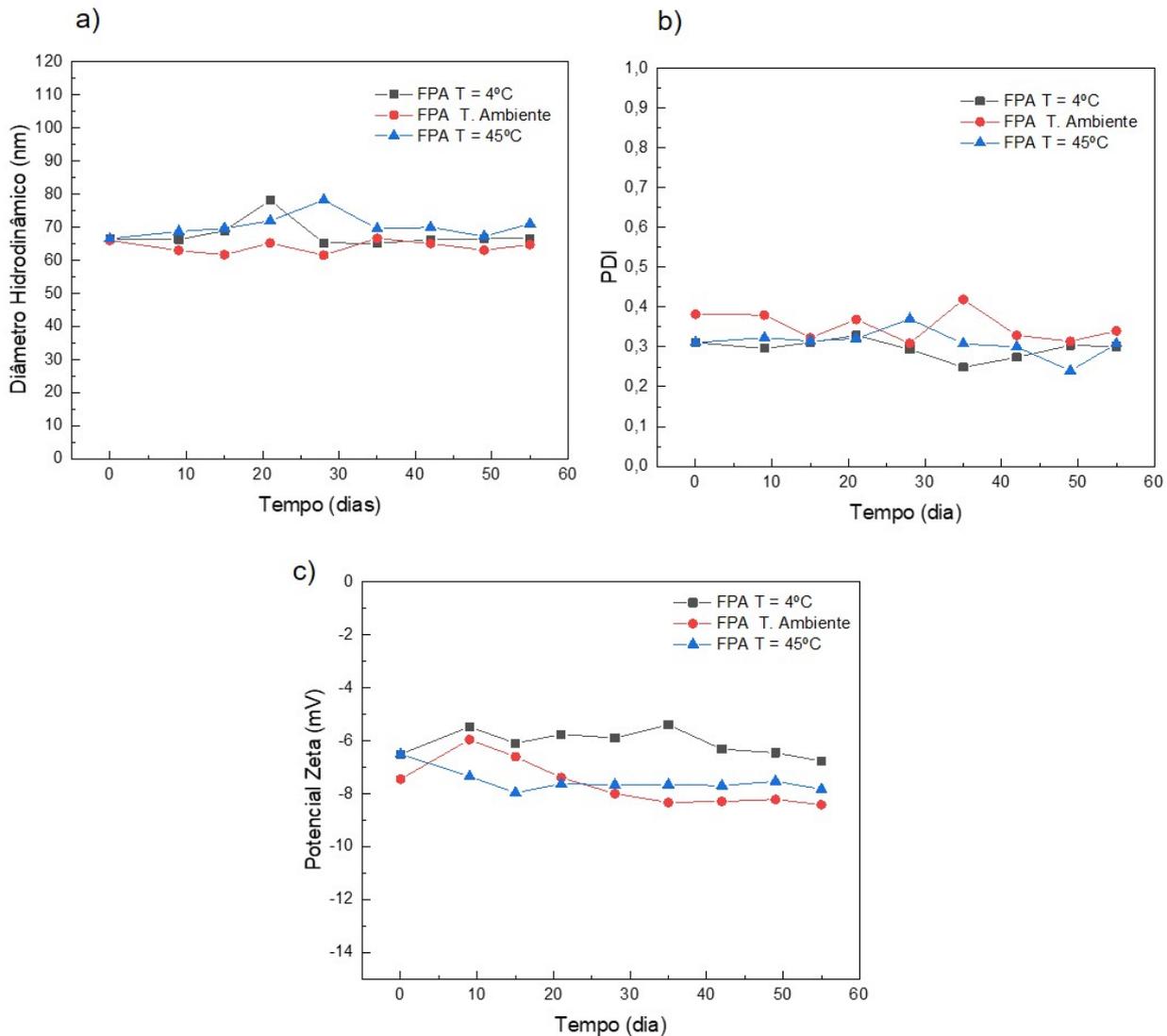
e nanoemulsão.

6.3.c Investigação da estabilidade em diferentes condições (temperatura, tempo, pH e força iônica)

A estabilidade físico-química de formulações para aplicações biomédicas ao longo do tempo e em diferentes condições de armazenamento é indispensável para viabilizar o estudo a longo prazo. As medidas de diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta da nanoemulsão (F1) em função de diferentes temperaturas de armazenamento por um período de 55 dias estão apresentadas nos gráficos da figura 5, durante esta avaliação as amostras permaneceram em ambiente protegido da luz. Os dados apresentados indicam que a formulação apresenta estabilidade nas diferentes temperaturas no período de tempo avaliado com flutuações inferiores a ± 15 nm no diâmetro hidrodinâmico, $\pm 0,1$ no PDI e inferiores a ± 2 mV no potencial zeta, o que assegura que a nanoemulsão pode ser armazenada por um período de tempo à temperatura ambiente ou refrigerada ao abrigo da luz.



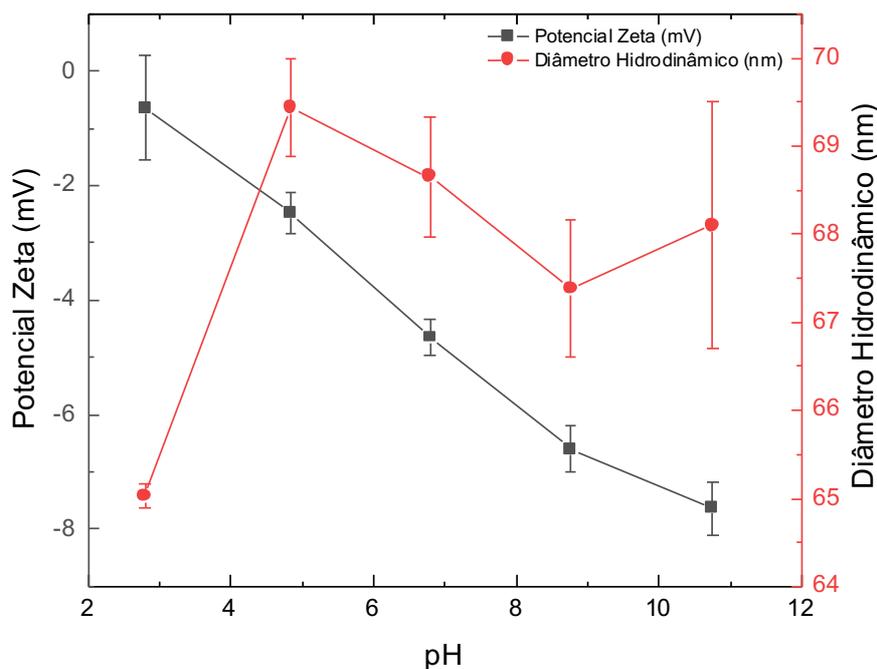
Figura 5 – Medidas de diâmetro hidrodinâmico (a) PDI (b) e potencial zeta (c) em diferentes temperaturas ao longo do tempo em dias para a formulação F1.



A avaliação da estabilidade em função do pH é apresentada no gráfico 9. É possível identificar um comportamento pH-dependente do grupo fosfato pertencente à lecitina o qual tende a se comportar como um ácido fraco de Brönsted. Nesse momento é importante destacar que para a geração de carga superficial, constatada nas medidas de potencial zeta, o surfactante PEG-40 estearato, por ser um surfactante não-iônico e não apresentar grupos químicos capazes de doar ou receber prótons H^+ , não exerce qualquer influência. No gráfico é possível observar que em pH ácido o grupo fosfato está

majoritariamente protonado (-POOH), e isto se traduz em um potencial zeta menor em módulo, e à medida que o pH aumenta os grupos fosfato tende a desprotonar gerando a espécie química -POO^- refletindo diretamente no aumento do potencial zeta em módulo. O diâmetro hidrodinâmico, por sua vez, não aumenta significativamente com valores oscilando dentro do intervalo de 64,5 nm a 69,5 nm, tanto o aumento da repulsão eletrostática quando o aumento da força iônica que tem origem no contra íon da base adicionada (Na^+) justificam essas flutuações.

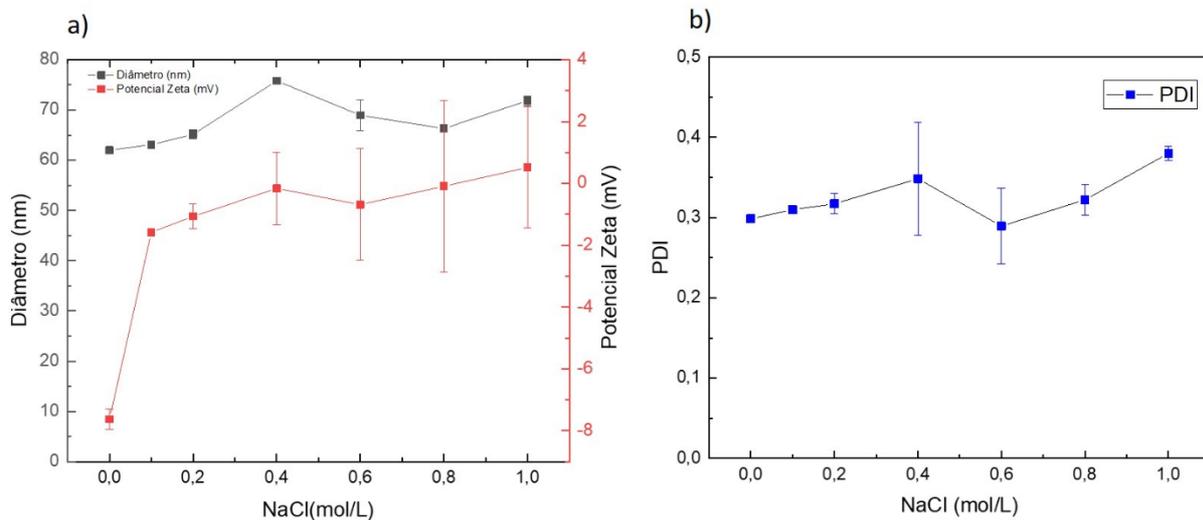
Gráfico 9 – Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico da formulação F1 medidos em função do pH.



Na figura 6 são apresentados os valores de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta em função da força iônica para a formulação F1. À medida que a concentração de íons aumenta ocorre flutuações no diâmetro hidrodinâmico e no PDI, contudo, o tamanho permanece inferior à 80 nm e o PDI permanece inferior a 0,4 indicando que o aumento da força iônica dentro do intervalo estudado não foi suficiente para induzir a desestabilização das nanogotas, este parâmetro é fundamental para viabilizar estudos realizados em fluido biológicos

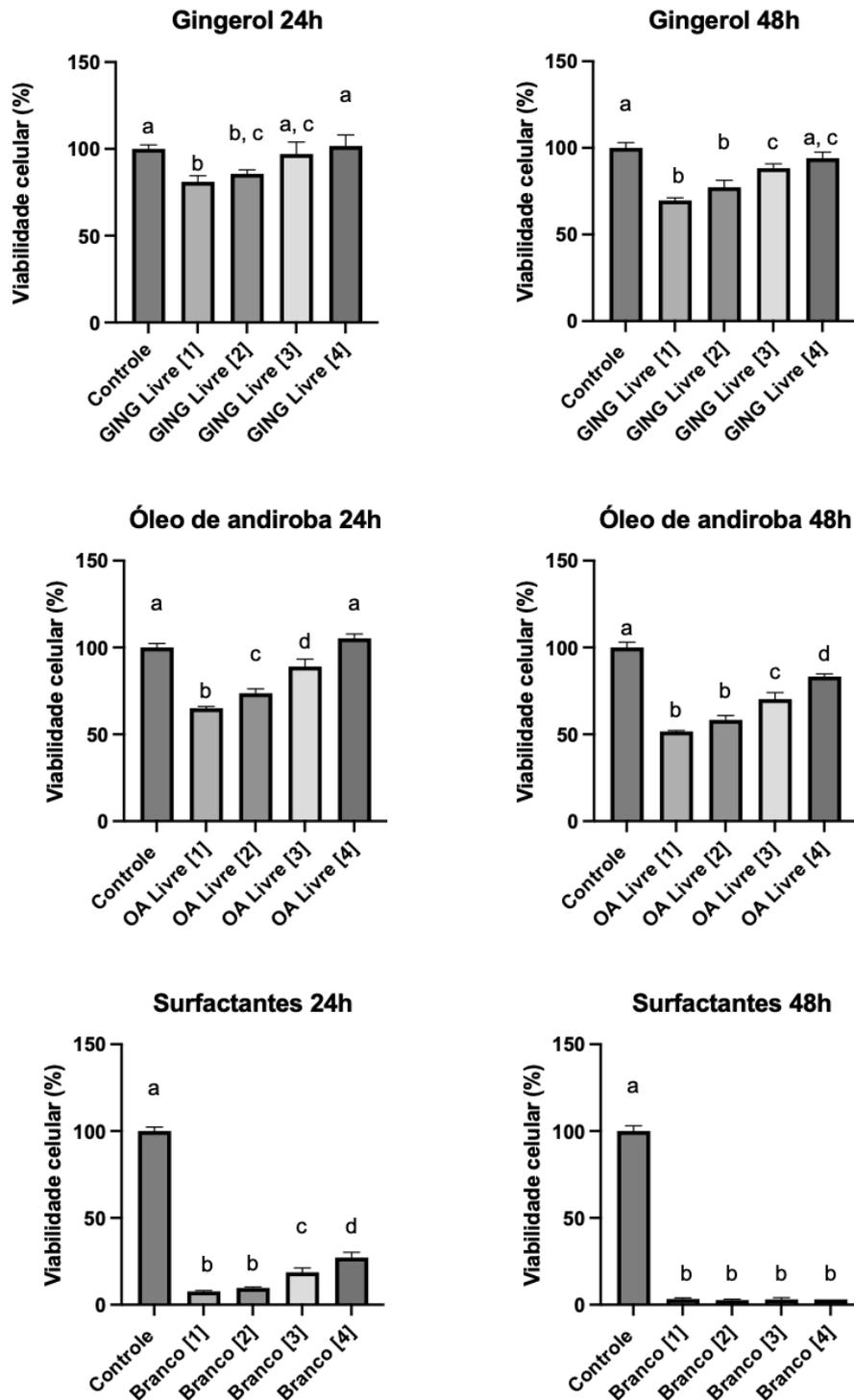
e/ou soluções tamponadas. O potencial zeta por sua vez diminui significativamente com o aumento da força iônica, isto se deve ao fenômeno de blindagem (*screening effect*) ocasionado pelo aumento da dupla camada elétrica, este leva à diminuição do potencial zeta e em algumas circunstâncias pode levar à inversão de carga. Mesmo com a ocorrência do efeito de blindagem as nanogotas não perderam a estabilidade, reforçando a hipótese de que outros mecanismos de estabilização coloidal estão presentes na nanoemulsão sintetizada.

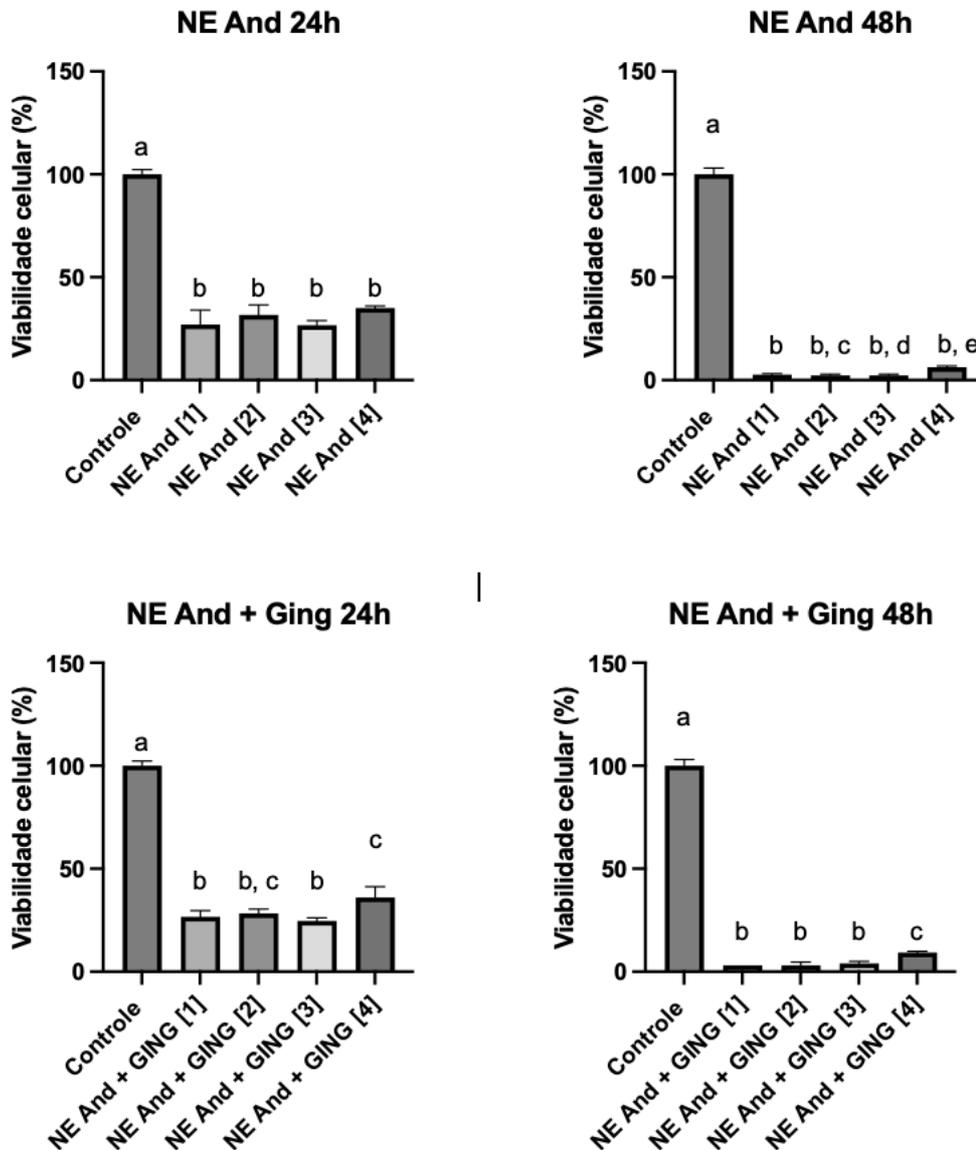
Figura 6 – Diâmetro hidrodinâmico (a) e potencial zeta (b) da formulação F1 medidos em função da força iônica.



6.4 Ensaios Celulares

Figura 7. Resultados ensaio MTT do gingerol livre, óleo de andiroba livre, branco (surfactantes), nanoemulsão formulada com óleo de andiroba e nanoemulsão com óleo de andiroba e com o extrato de gengibre. Dados apresentados com média \pm desvio padrão (n=3) e análise estatística baseado no teste ANOVA ($p < 0,05$)





Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Com os ensaios MTT, foi possível determinar a eficácia da inibição de células tumorais a partir do gingerol livre, do óleo de andiroba livre, da nanoemulsão elaborada com óleo de andiroba e da nanoemulsão formulada com óleo de andiroba e extrato de gengibre (nas condições F1). O branco consistiu na junção dos dois surfactantes utilizados na nanoemulsão, PEG-40 e lecitina. As concentrações utilizadas para cada grupo avaliado estão descritas no Anexo 2 e a figura 7 apresenta os resultados obtidos nos ensaios. O extrato de gengibre livre foi



capaz de inibir as células tumorais nas quatro concentrações testadas quando comparado ao grupo controle. Na concentração de 50 mM de extrato foi observada uma redução da viabilidade da célula em até 30%. O óleo de andiroba livre também apresentou efeitos de inibição da célula tumoral, sendo que 2770 mg/mL foi capaz de reduzir a viabilidade da célula em 63% quando comparada ao grupo controle. O grupo do óleo de andiroba livre não apresentou reprodutibilidade quando testado em dois ensaios com variação de 24 horas.

Tanto a nanoemulsão elaborada com óleo de andiroba, como a formulada com óleo de andiroba e extrato de gengibre, apresentaram eficácia na redução da viabilidade da célula tumoral. Houve redução da viabilidade da célula em até 76% a partir da nanoemulsão com óleo de andiroba em maior concentração, equanto que a nanoemulsão com óleo de andiroba e extrato de gengibre reduziu em até 78%. Portanto é possível concluir que em todos os grupos houve uma diminuição da viabilidade em função do tempo de exposição.

Os testes feitos utilizando o branco, que consistia na mistura dos surfactantes, demonstraram toxicidade para as células, em razão da alta concentração de PEG-40.

Para análise estatística dos dados obtidos pelo ensaio foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade e para a análise de variância entre as médias dos grupos testados foi feito o teste ANOVA ($p < 0,05$).

Vale ressaltar que para utilização do material em ampla escala, mais testes *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados a fim de melhorar a proporção dos surfactantes com a fase oleosa e, conseqüentemente, as condições da nanoemulsão, a fim de evitar possível toxicidade para células. O ensaio MTT também deve ser realizado em células sadias para verificar o comportamento da nanoformulação na inibição da viabilidade celular.



7. Conclusão e considerações finais

A extração do composto bioativo ativo do gengibre foi realizada por um método rápido, de baixo custo e reprodutível. Os extratos do gengibre obtidos por diferentes solventes (ES1, 2, 3 e 4) não apresentaram diferenças significativas em sua composição química, conforme foi demonstrado pelos espectros obtidos por FTIR e UV-vis. Os espectros apresentaram similaridade com os encontrados na literatura (Hussein et al., 2017), sendo sua composição majoritária gingeróis, podendo também apresentar outras moléculas, como fenois e flavonoides.

O ensaio do teor total de fenois pelo método de Follin Ciocalteu confirmou a presença de compostos fenólicos em todos os extratos do gengibre, sendo que a amostra ES2 (extração por etanol) apresentou maior teor, 126,34 μg de equivalentes de ácido gálico por miligrama de extrato. O extrato ES2 também apresentou maior teor de flavonoides em sua composição, determinado pelo ensaio colorimétrico com cloreto de alumínio, cerca de 38,96 μg de quercetina por grama de extrato. O método DPPH indicou elevada atividade de eliminação de radicais livres em todos os extratos, cerca de 80%, sendo que ES2 novamente apresentou o maior resultado. Tendo isso em vista, as medidas obtidas pelo método DPPH confirmam que quanto maior o teor de fenois e flavonoides, maior será a atividade antioxidante do composto.

A determinação da composição química do óleo de andiroba por CG-MS foi capaz de identificar quase 97% da sua composição, sendo a maior parte representada por ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico e ácido esteárico. Os modos vibracionais observados no espectro de FTIR são indicativos de mistura de ácidos graxos saturados e insaturados, o que corrobora com as evidências apresentadas anteriormente.

As formulações F1 e F6, elaboradas a partir da junção dos dois surfactantes, PEG-40 e lecitina, apresentaram melhor tamanho e estabilidade, o que é confirmado pelo baixo valor de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (Pdl) obtidos nas medidas. Ainda que as outras formulações (F2 até F5) tenham apresentado baixo valor de Pdl, a elaboração da nanoemulsão utilizando somente um dos surfactantes não foi o bastante para garantir tamanho de partículas menor



do que 100 nm. As amostras F1 e F6 apresentaram estabilidade quando testadas ao abrigo da luz em diferentes temperaturas ao longo do tempo. Também mantiveram as características coloidais desejáveis para uma nanoemulsão quando submetidas à diferentes condições de pH e força iônica. Nos espectros de FTIR apresentados, foi possível observar uma similaridade entre o espectro do PEG-40 e o da nanoemulsão, tendo em vista que uma maior quantidade desse surfactante foi utilizada na formulação. Os modos vibracionais apresentaram menor intensidade devido ao menor grau de liberdade gerado pela formação das nanogotas.

Embora o ensaio com o óleo de andiroba não tenha apresentado boa reprodutibilidade, o método MTT indicou atividade de inibição de células tumorais pelo óleo de andiroba livre, assim como pelo extrato de gengibre livre que foram utilizados na formulação. A nanoemulsão elaborada com óleo de andiroba livre também apresentou atividade de redução da viabilidade celular, do mesmo modo que a nanoemulsão formulada com óleo de andiroba e extrato de gengibre, em torno de 77%. O branco indicou toxicidade para células, devido à alta concentração de PEG-40.

Contudo, a nanoemulsão elaborada a partir de extrato de gengibre e óleo de andiroba demonstrou potencial no tratamento de células tumorais, uma vez que a viabilidade celular foi diminuída pela ação dos compostos bioativos presentes nos componentes da formulação.

Para que a nanoemulsão seja utilizada como tratamento de tumores, novos testes devem ser realizados no intuito de avaliar a proporção dos surfactantes em relação a fase oleosa ou considerar uma possível troca dos componentes da formulação para diminuir a toxicidade apresentada nos ensaios. Devem ser realizados testes *in vitro* e *in vivo*, tanto em células tumorais como em células sadias, para determinar o comportamento da nanoemulsão e seus possíveis efeitos adversos quando em contato com as células.



8. Referências

Anwar, S., Almatroudi, A., Allemailem, K. S., Jacob Joseph, R., Khan, A. A., & Rahmani, A. H. (2020). Protective Effects of Ginger Extract against Glycation and Oxidative Stress-Induced Health Complications: An In Vitro Study. *Processes*, 8(4), 468

Avula, B., Wang, Y.-H., Smillie, T. J., Fu, X., Li, X. C., Mabusela, W., Syce, J., Johnson, Q., Folk, W., & Khan, I. A. (2010). Quantitative determination of flavonoids and cycloartanol glycosides from aerial parts of *Sutherlandia frutescens* (L.) R. BR. by using LC-UV/ELSD methods and confirmation by using LC-MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(2), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.01.010>

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, v. 117, n. 4, p. 426–436, ago. 2013.

Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Química Nova*, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

C. Rodriguez, Md. H. Uddin, H. Furukawa, A. Harashima, & H. Kunieda. (2001). Effect of mixing lipophilic and hydrophilic silicone surfactant systems. In *Progress in Colloid and Polymer Science: Vol. Volume 118* (pp. 53–62).

Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>

DE LIMA, R. M. T. et al. Antitumoral effects of [6]-gingerol [(S)-5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone] in sarcoma 180 cells through cytogenetic mechanisms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 126, p. 110004, jun. 2020.

Delmas, T., Couffin, A.-C., Bayle, P. A., Crécy, F. de, Neumann, E., Vinet, F., Bardet, M., Bibette, J., & Texier, I. (2011). Preparation and characterization of highly stable lipid nanoparticles with amorphous core of tuneable viscosity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 360(2), 471–481. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.04.080>

Delmas, T., Piraux, H., Couffin, A.-C., Texier, I., Vinet, F., Poulin, P., Cates, M. E., & Bibette, J. (2011). How To Prepare and Stabilize Very Small Nanoemulsions. *Langmuir*, 27(5), 1683–1692. <https://doi.org/10.1021/la104221q>

FOUDAH, A. I. et al. Simultaneous Determination of 6-Shogaol and 6-Gingerol in Various Ginger



(Zingiber officinale Roscoe) Extracts and Commercial Formulations Using a Green RP-HPTLC-Densitometry Method. *Foods*, v. 9, n. 8, p. 1136, 18 ago. 2020.

Hussein, U., Hassan, N., Elhalwagy, M., Zaki, A., Abubakr, H., Nagulapalli Venkata, K., Jang, K., & Bishayee, A. (2017). Ginger and Propolis Exert Neuroprotective Effects against Monosodium Glutamate-Induced Neurotoxicity in Rats. *Molecules*, 22(11), 1928. <https://doi.org/10.3390/molecules22111928>

JOANITTI, G. A.; DE MORAES, P. C.; DE AZEVEDO, R. B. Nanoemulsões: preparação, características e estabilidade. Em: FLORINDO, M. C. DE M.; ARTEMIS, G.; SOARES, B. R. (Eds.). *Nanotecnologia: Considerações em materiais, saúde e meio ambiente*. Brasília, Brasil: Editora Universidade de Brasília, 2022. p. 45–76.

JOANITTI, G. A.; DE MORAIS, P. C.; DE AZEVEDO, R. B. Aplicações da nanotecnologia em câncer. Em: FLORINDO, M. C. DE M.; ARTEMIS, G.; SOARES, B. R. (Eds.). *Nanotecnologia: Considerações em materiais, saúde e meio ambiente*. Brasília, Brasil: Editora Universidade de Brasília, 2022. p. 220–265.

KARATAY, K. B. et al. Radioiodinated Ginger Compounds (6-gingerol and 6-shogaol) and Incorporation Assays on Breast Cancer Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 9, p. 1129–1139, 20 ago. 2020.

KIYAMA, R. Nutritional implications of ginger: chemistry, biological activities and signaling pathways. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 86, p. 108486, dez. 2020.

Klang, V., & Valenta, C. (2011). Lecithin-based nanoemulsions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21(1), 55–76. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(11\)50006-1](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(11)50006-1)

Liu, M., Xia, X., Chou, G., Liu, D., Zuberi, A., Ye, J., & Liu, Z. (2014). Variations in the Contents of Gingerols and Chromatographic Fingerprints of Ginger Root Extracts Prepared by Different Preparation Methods. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 97(1), 50–57. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-437>

Luo, Lingying, et al. "Polyoxyethylene 40 stearate modulates multidrug resistance and enhances antitumor activity of vinblastine sulfate." *The AAPS journal* 9 (2007): E329-E335.

MAJUMDER, D., Nath, P., Debnath, R., & Maiti, D. (2021). Understanding the complicated relationship between antioxidants and carcinogenesis. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(2). <https://doi.org/10.1002/jbt.22643>

MELO, K. M. et al. Andiroba oil and nanoemulsion (*Carapa guianensis* Aublet) reduce lesion severity caused by the antineoplastic agent doxorubicin in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 138, p. 111505, jun. 2021.

Niu, Z., Thielen, I., Loveday, S. M., & Singh, H. (2021). Emulsions Stabilised by Polyethylene Glycol



(PEG) 40 Stearate and Lactoferrin for Protection of Lactoferrin during In Vitro Digestion. *Food Biophysics*, 16(1), 40–47. <https://doi.org/10.1007/s11483-020-09647-7>.

OMBREDANE, A. S. et al. Nanoemulsion-based systems as a promising approach for enhancing the antitumoral activity of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) in breast cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 58, p. 101819, ago. 2020.

POLTRONIERI, J. et al. [6]-gingerol as a Cancer Chemopreventive Agent: A Review of Its Activity on Different Steps of the Metastatic Process. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 4, p. 313–321, 31 abr. 2014.

PROMDAM, N.; PANICHAYUPAKARANANT, P. [6]-Gingerol: A narrative review of its beneficial effect on human health. *Food Chemistry Advances*, v. 1, p. 100043, out. 2022a.

SAHU, P. et al. Nanoemulsion: A Novel Eon in Cancer Chemotherapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 18, 7 nov. 2017.

SEM WAL, R. B. et al. Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger. *Phytochemistry*, v. 117, p. 554–568, set. 2015a.

Sari, T. P., Mann, B., Kumar, R., Singh, R. R. B., Sharma, R., Bhardwaj, M., & Athira, S. (2015). Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocolloids*, 43, 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.011>

SENHORINI, G. A. et al. Microparticles of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) loaded with andiroba oil: Preparation and characterization. *Materials Science and Engineering: C*, v. 32, n. 5, p. 1121–1126, jul. 2012.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 252, p. 28–49, abr. 2017.

Sheth, T., Seshadri, S., Prileszky, T., & Helgeson, M. E. (2020). Multiple nanoemulsions. *Nature Reviews Materials*, 5(3), 214–228. <https://doi.org/10.1038/s41578-019-0161-9>

SRINIVASAN, K. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. *PharmaNutrition*, v. 5, n. 1, p. 18–28, mar. 2017a.

XU, Y. et al. Enhanced oral bioavailability of [6]-Gingerol-SMEDDS: Preparation, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Functional Foods*, v. 27, p. 703–710, dez. 2016.

ZANESCO-FONTES, I. et al. [10]-Gingerol-Loaded Nanoemulsion and its Biological Effects on Triple-Negative Breast Cancer Cells. *AAPS PharmSciTech*, v. 22, n. 5, p. 157, 18 jul. 2021.

Conceito e magnitude. Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2022. Disponível em <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-do-cancer-de-mama/conceito-e-magnitude>>. Acesso em 20/01/2023.



9. Anexos

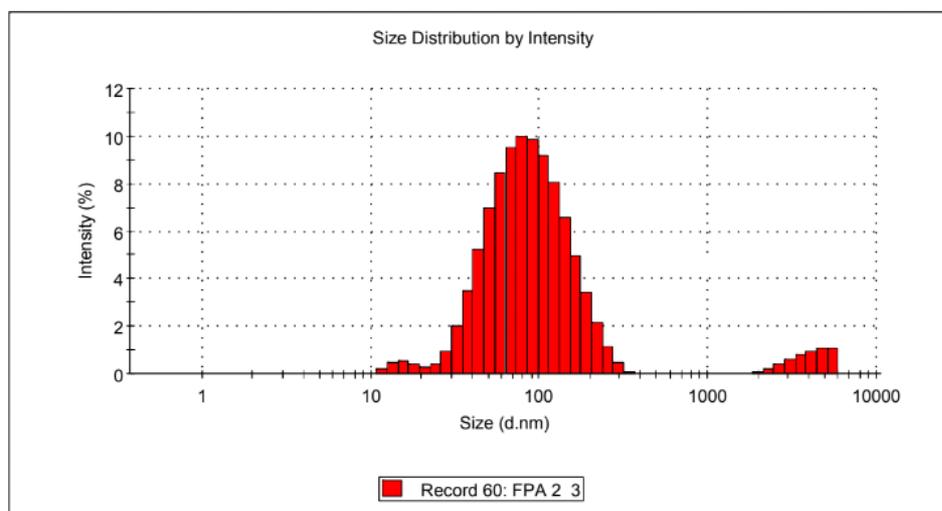
Anexo 1

Formulação F1

Results

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 78,00	Peak 1: 95,83	92,9	50,39
Pdl: 0,312	Peak 2: 4129	5,2	1043
Intercept: 0,905	Peak 3: 16,03	1,9	2,899

Result quality : Good

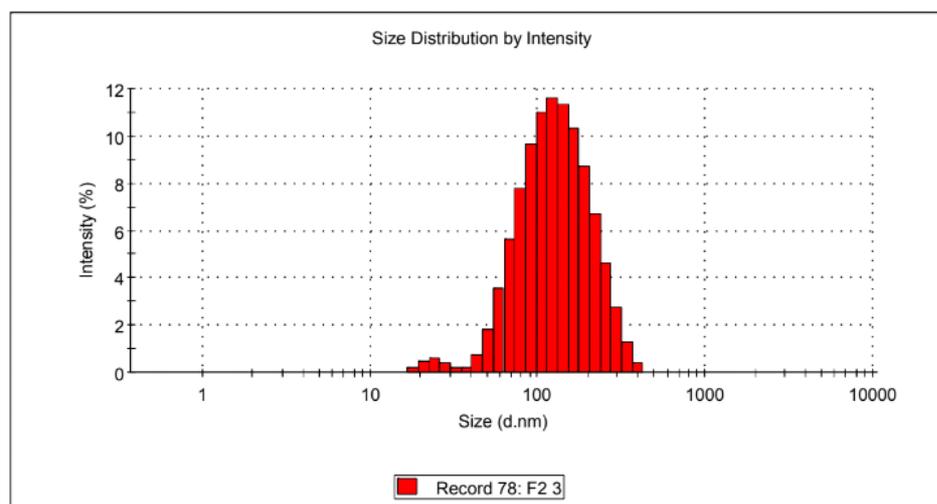


Formulação F2

Results

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 111,8	Peak 1: 140,8	98,1	65,65
Pdl: 0,208	Peak 2: 24,36	1,9	4,184
Intercept: 0,913	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good



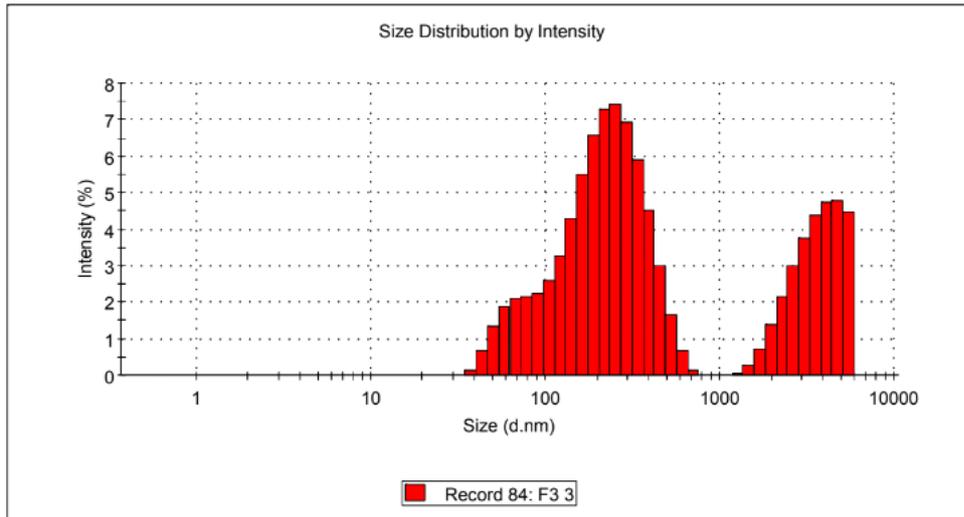


Formulação F3

Results

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 258,4	Peak 1: 231,7	70,3	124,8
Pdl: 0,736	Peak 2: 3781	29,7	1148
Intercept: 0,821	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report

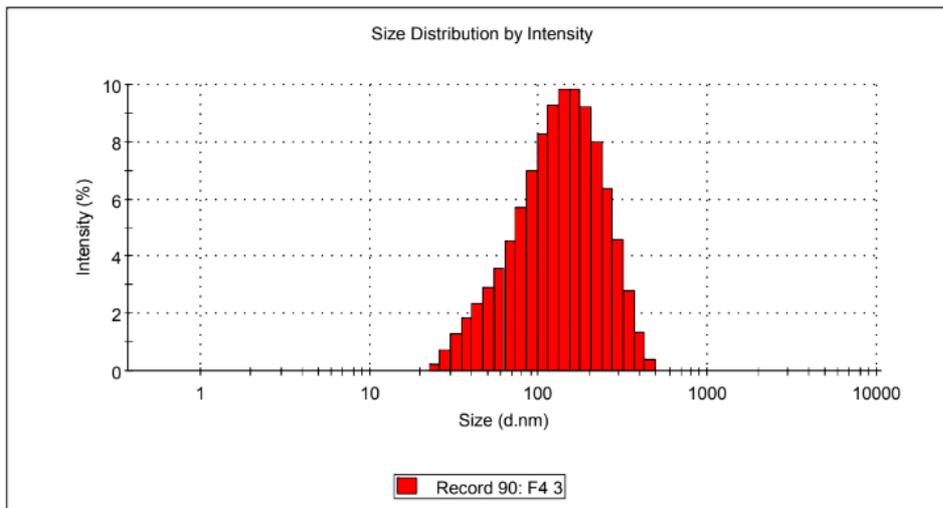


Formulação F4

Results

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 111,7	Peak 1: 151,7	100,0	83,25
Pdl: 0,247	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,919	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good



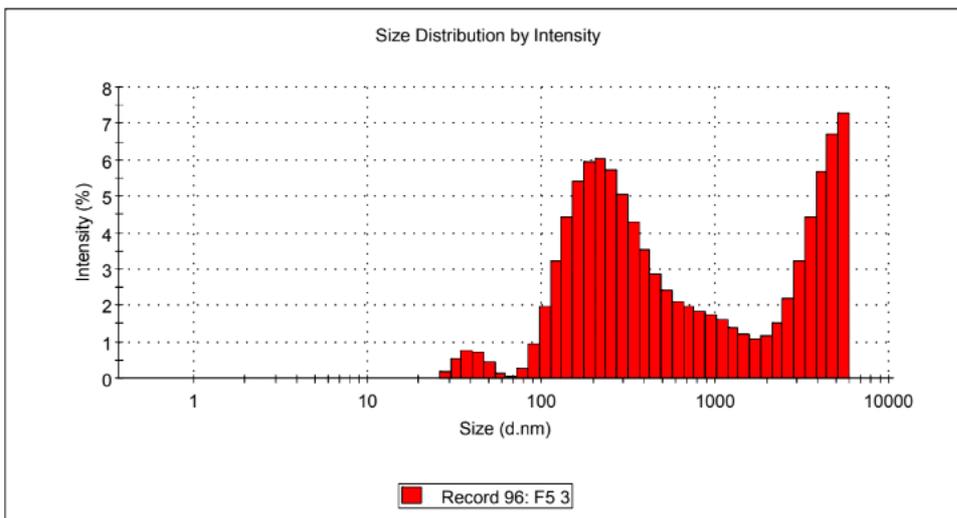
Formulação F5



Results

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 394,0	Peak 1: 402,7	64,3	354,7
Pdl: 0,856	Peak 2: 4075	32,9	1151
Intercept: 0,764	Peak 3: 41,24	2,8	8,300

Result quality : **Refer to quality report**

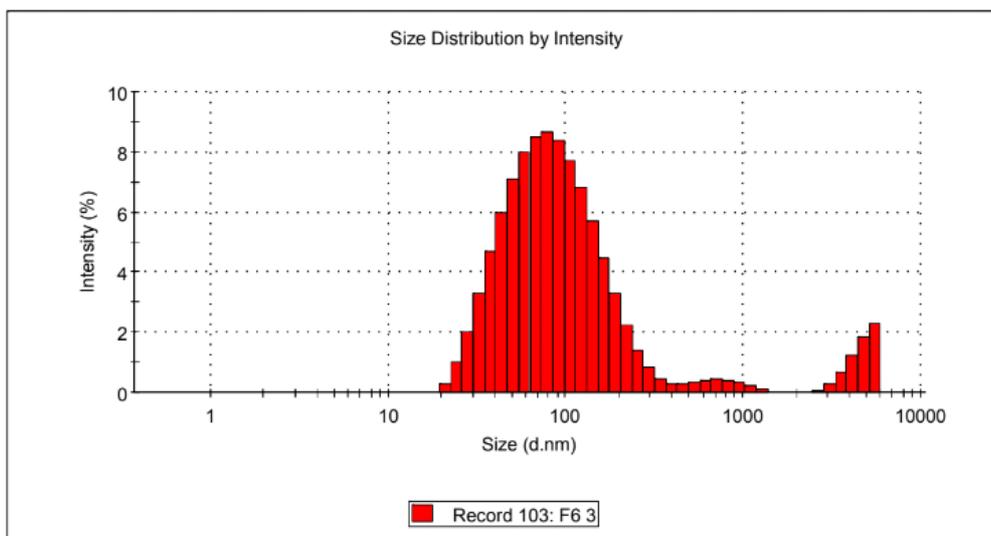


Formulação F6

Results

	Size (d.nm):	% Intensity	Width (d.nm):
Z-Average (d.nm): 80,96	Peak 1: 96,37	91,1	62,69
Pdl: 0,433	Peak 2: 4720	6,4	780,9
Intercept: 0,894	Peak 3: 748,5	2,5	223,0

Result quality : **Good**





Anexo 2

Concentração de extrato de gengibre e óleo de andiroba utilizados nos ensaios MTT para cada grupo avaliado.

Grupo	Concentração de extrato de gengibre (μM)	Concentração de óleo de andiroba ($\mu\text{g/mL}$)
Óleo de andiroba livre [1]	-	4620
Óleo de andiroba livre [2]	-	2770
Óleo de andiroba livre [3]	-	1385
Óleo de andiroba livre [4]	-	692,5
Extrato de gengibre livre [1]	50	-
Extrato de gengibre livre [2]	30	-
Extrato de gengibre livre [3]	15	-
Extrato de gengibre livre [4]	7,5	-
Nanoemulsão com óleo de andiroba [1]	-	4620
Nanoemulsão com óleo de andiroba [2]	-	2770
Nanoemulsão com óleo	-	1385



de andiroba [3]		
Nanoemulsão com óleo de andiroba [4]	-	692,5
Nanoemulsão com óleo de andiroba e extrato de gengibre [1]	50	4620
Nanoemulsão com óleo de andiroba e extrato de gengibre [2]	30	2770
Nanoemulsão com óleo de andiroba e extrato de gengibre [3]	15	1385
Nanoemulsão com óleo de andiroba e extrato de gengibre [4]	7,5	692,5