

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

**Extratos do fruto de *Guazuma ulmifolia* (mutamba): perfil fitoquímico, avaliação do potencial anti-inflamatório e nano-encapsulação com poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)**

Doutoranda: Mara Núbia Guimarães dos Santos  
Orientadora: Patrícia Pommé Confessori Sartoratto  
Co-orientadora: Cecília Maria Alves de Oliveira

BRASÍLIA  
2020

**MARA NÚBIA GUIMARÃES DOS SANTOS**

**Extratos do fruto de *Guazuma ulmifolia* (mutamba): perfil fitoquímico, avaliação do potencial anti-inflamatório e nano-encapsulação com poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, como exigência para a obtenção do título de doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientadora: Patrícia Pommé Confessori Sartoratto

Co-orientadora: Cecília Maria Alves de Oliveira

**BRASÍLIA**

2020

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

G237e Guimarães dos Santos, Mara Núbia  
Extratos do fruto de Guazuma ulmifolia (mutamba): perfil fitoquímico, avaliação do potencial anti-inflamatório e nano encapsulação com poli (ácido lático-co-ácido glicólico) / Mara Núbia Guimarães dos Santos; orientador Patrícia Pommé Confessori Sartoratto; co-orientador Cecília Maria Alves de Oliveira. -- Brasília, 2020.  
135 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia) -- Universidade de Brasília, 2020.

1. Guazuma ulmifolia Lam.. 2. Perfil Fitoquímico. 3. Produção de EROs . 4. Produção de NO. 5. Atividade Anti inflamatória. I. Pommé Confessori Sartoratto, Patrícia , orient. II. Alves de Oliveira, Cecília Maria , co-orient. III. Título.

Dedico ao meus pais Manoel Lúcio dos Santos e Elisabeth Guimarães dos Santos, que muito me incentivaram ao longo da jornada, me apoiando incondicionalmente. Aos meus avós paternos, Sebastião Canuto de Mendonça (*in memoriam*) e Geralda Magela de Mendonça; maternos, José Martins Guimarães e Guilhermina Cândida Guimarães.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pela fé que me fortalece nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Manoel Lúcio dos Santos e Elisabeth Guimarães dos Santos, pelo amor, atenção, apoio incondicional de sempre, pela torcida e orações.

Ao mano, Marco Túlio Guimarães dos Santos, pelo auxílio prestado ao longo do doutorado, e pela companhia no dia a dia que amenizou a solidão de nosso apartamento.

Ao meu amigo, Bruno da Silva Ferreira, pelo apoio e companheirismo de sempre. E aos "tios", Nadelcione Ferreira Lima Silva e Helena Lourenço da Silva Lima, pela atenção e desprendimento com que me receberam em sua casa, na qual pude me sentir partícipe da família; pelo apoio e cuidados especiais a mim dedicados.

Aos meus amigos e afilhados, Alípio Teles Nery Neto e Dryele Sousa Lopes, a minha gratidão pela verdadeira e sincera amizade; pelo apoio incondicional e pelo meu acolhimento no seu lar em São Sebastião - DF e em outros momentos cruciais, em que precisei de auxílio; meu mais sincero muito obrigada.

À minha colega de doutorado, Alicia Simalie Ombredane, pelos momentos de cumplicidade e no convívio cotidiano das disciplinas; pelo apoio essencial todo o tempo e, especialmente, durante o período de realização dos experimentos biológicos, pelas palavras de incentivo nos momentos de maior angústia e dificuldade. A ela o meu maior apreço, o meu carinho, a minha amizade sincera e a minha gratidão!

Ao colega Michel Ivan Osandon Albarran, pela parceria ao longo das disciplinas de Nanociência e Nanobiotecnologia; pelo companheirismo e atenção a mim dedicada. A ele, meu carinho e gratidão!

À colega Luana Alves de Freitas Afiune, pela parceria ao longo de disciplinas do curso; por sua habilidade e delicadeza que tornaram indolor a injeção intramuscular, durante um processo viral fortíssimo e com muita tosse, do qual fui cometida em plena aula.

Ao colega Bruce Cardoso, que me apelidou de ELISA, pelo apoio ao longo do doutorado.

Ao amigo Ywmuniry (Francisco de Moura Cândido - Francisco Apurinã), pela amizade e companheirismo; pelos momentos de conversação, descontração, papos de "buteco" e pela oportunidade de conhecer algo da rica cultura indígena, em especial, a cultura do povo Apurinã.

Ao amigo angolano, António Hélder Manuel Francisco, pelo apoio emprestado e pela profícua amizade construída durante a estadia na Colina-UnB. Em especial, pela presença na defesa da tese, transmitindo-me boas vibrações.

Ao amigo, Eli Silveira Silva Júnior, pela pronta e constante presença e apoio incondicional ao longo do doutorado; pela sabedoria contida em seus aconselhamentos; pela força incentivadora; pelos momentos de descontração e relaxamento mental, minha profunda e inarredável gratidão!

À amiga, Lisiane Cruz Menezes, pela amizade, apoio e por ser confidente e conselheira sentimental, minha especial gratidão. Também, pela cumplicidade nos momentos de fuga e refazimento físico e mental.

À amiga Fabiana Vieira da Silva, pela amizade, apoio e, em especial, pela presença na defesa da tese, transmitindo-me boas vibrações. E pela sua companhia, completando o inseparável trio, nos momentos de fuga e refazimento físico e mental.

À Andressa Rodrigues Souza pelo convívio agradável nas atividades de laboratório e nos momentos de bate-papos descontraídos.

Ao colega de doutorado, Breiner Gabriel Canedo Silva, pelo apoio, pelos momentos de confabulação, incentivo, pela companhia e pelas caronas.

À colega de laboratório e aluna de Iniciação Científica, da Universidade Federal de Goiás, Anna Flávia Dias Zafred, pela parceria, apoio e pronta atenção.

Ao Vinícius Galvão Wakui, Jorge Luiz Souza Simão e Marcos Pereira Martins, do laboratório de Química Orgânica da UFG, pelo especial apoio e pelo aprendizado proporcionado.

À amiga Rosirene da Silva Alves, pelo apoio ao longo de todo o curso, pela companhia nos almoços às terças-feira (deliciosos), pelos especiais pães-de-mel e doces maravilhosos que tornavam meus dias na UFG mais saborosos; também pelas conversas, conselhos e confiança em mim depositada.

Ao Professor, Dr. Sebastião William da Silva, ex-coordenador do curso de pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, pelo apoio na fase inicial do curso.

À Direção do alojamento Colina, Bloco G, na pessoa de Raimundo Nonato de Sousa Franco, pelo acolhimento durante o curso de disciplinas e realização de experimentos na UnB, em Brasília-DF.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Patrícia Pommé Confessori Sartoratto, pela oportunidade concedida; pelo tempo e paciência a mim dedicados ao longo do curso; pelo aprendizado adquirido, fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional.

À minha co-orientadora, Dr<sup>a</sup>. Cecília Maria Alves de Oliveira, pelo apoio com as análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLAE-EMAE).

À Dr<sup>a</sup>. Jaqueline Rodrigues da Silva, pela orientação e auxílio no aprendizado das técnicas e métodos na área biológica.

Ao Professor Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, pelo apoio no processo de aprendizado relacionados aos experimentos biológicos.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica, em especial ao aluno Luiz Paulo Araújo dos Santos, pela disponibilidade e auxílio no processo de liofilização das amostras em análise.

Ao Professor Dr. Armando Garcia Rodriguez, pelo apoio informacional em momento crucial e pelo apoio durante a análise realizada com *Artemia salina*.

Ao laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética, nas pessoas dos professores Dr. Luiz Artur Mendes Bataus e Ivan Torres Nicolau de Campos, cuja atenção e apoio, me facultou a utilização de equipamentos fundamentais para realização das sínteses de nanopartículas poliméricas do extrato em análise.

À Universidade Federal de Goiás e, em especial, ao Instituto de Química, pela oportunidade que me foi concedida e local onde realizei parte experimental do curso.

Ao Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI) pelas análises de CLAE-EMAE.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), cujo financiamento, me facultou a realização deste curso (Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia - Universidade de Brasília).

À Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Godoy Soler Pajanian, Dr<sup>a</sup>. Lucília Kato e Dr. Armando Garcia Rodriguez membros da banca examinadora, pela valiosa contribuição emprestada à minha tese.

À minha estimada prima Karine Siqueira Guimarães pelo apoio e pelos momentos de descontração.

Às minhas vizinhas queridas, Guilhermina Cândida Guimarães e Geralda Magela de Mendonça (vovós Fia e Totinha) pelo amor, carinho, dedicação e tantas orações em todos os momentos (à vovó Fia pela manhã de oração e sintonia emocional durante a defesa da Tese). Ao meu vizinho querido, José Martins Guimarães, pelo apoio e vibração positiva.

À minha prima, amiga e comadre, Ariana Cristina Rezende Araújo, pelo apoio, vibração positiva e momentos de descontração nos finais de semana ao longo do curso.

Minha especial gratidão ao meu amado afilhado Brayan Rezende Ribeiro, por me proporcionar tanta alegria e me permitir olvidar todo e qualquer problema à minha volta, só pela sua maravilhosa presença. Por fazer transbordar de amor minha vida e por sempre proclamar: "Madinha, Bayan te ama!". Como esse amor é recíproco! Também te amo do tamanho do Universo, meu pequeno!

Ao meu especial amigo Willian Mascimiano da Silva, por ter tornado muitos dos meus dias mais felizes, protagonizando junto a mim alguns capítulos, especiais, da história de minha vida.

Ao professor de dança de salão e amigo Victor Américo, por dar maior ritmo e sentido aos "meus passos" e tornar minha vida mais leve, mormente, nos dias mais estressantes e pesados do curso.

À Isis Moreno de Farias Borges, João Caputo e Oliveira e Vera Lucia Mariano Defacio Caputo, que me acompanharam durante parte do curso e me auxiliaram nos momentos mais difíceis.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que me apoiaram e contribuíram, direta ou indiretamente, no período de realização do curso.



"Quem desejar a bênção divina, trabalhe por merecê-la. O aprendiz ausente da aula não pode reclamar benefícios decorrentes da lição."

(Chico Xavier pelo Espírito Emmanuel)

## RESUMO

Dentre os frutos do Cerrado brasileiro, a *Guazuma ulmifolia* Lam., ou mutamba, se destaca devido à presença de compostos bioativos de interesse para pesquisas. O objetivo desta pesquisa é estudar o perfil fitoquímico em extratos de média polaridade e identificar compostos fenólicos em extratos dos frutos de *G. ulmifolia*, bem como a avaliar o potencial antioxidante e anti-inflamatório, relacionados ao teor de compostos fenólicos nestes frutos. Nos extratos dos frutos, foram avaliados os teores de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, taninos condensados, o potencial antioxidante, Também, foram avaliadas a viabilidade celular (método de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo - MTT) e a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Óxido Nítrico (NO) em células de macrófagos de murino (RAW 264.7), fibroblastos de camundongo (NIH-3T3) e endotelial de aorta humana (EAHy 926), bem como a atividade anti-inflamatória através da produção de Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina 10 (IL-10) em macrófagos de murino e a toxicidade para *Artemia salina*. Os compostos fenólicos identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLAE-EMAR) foram: ácido protocatequínico, ácido gentísico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido gálico, catequina, epicatequina, quercetina-3-O- $\beta$ -glucosídeo, rutina, quercetina, naringenina, luteolina e kaempferol. Os extratos do fruto de *G. ulmifolia* apresentaram alto teor de compostos fenólicos e alto potencial antioxidante. Nos extratos metanólico (ExMet) e de acetato de etila (ExAc), os teores de compostos fenólicos, flavonóides, taninos condensados e o potencial antioxidante foram, respectivamente: 2145,0 e 5292,6 mg de AGE/100g; 264,87 e 546,02 mg de flavonóides/100 g; 729,05 e 557,67 mg de CE/100 g;  $EC_{50} = 147,6$  e  $67,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os extratos ExMet e ExAc apresentaram-se pouco tóxicos para *Artemia salina*, sendo esta toxicidade maior para os extratos metanólicos da casca ( $DL_{50} = 60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e da polpa ( $DL_{50} = 42 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). O extrato metanólico da semente não foi tóxico em nenhuma das concentrações testadas. O teste de viabilidade celular mostrou que o ExMet não exerceu efeito citotóxico sobre nenhuma das células testadas, enquanto o ExAc apresentou baixa citotoxicidade, com 48,37% (macrófagos) e 51,71% (fibroblastos) de células viáveis para a maior concentração empregada ( $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Nenhum dos extratos alterou a produção de EROs nos ensaios realizados com as células RAW 264.7 e NIH-3T3, mas, ambos reduziram a produção de EROs para as células EAHy 926. A presença dos extratos nas três células não reduziu a produção de NO nas condições analisadas (sem estímulo de LPS). As análises de produção de TNF- $\alpha$  e IL-10, após adição dos extratos ( $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) em macrófagos, apontaram que o ExMet possui significativa resposta à inflamação, reduzindo TNF- $\alpha$ , sem alterar a produção de IL-10. A nanoencapsulação do ExAc em PLGA, pelo método de emulsão-evaporação, também foi investigada, obtendo-se nanopartículas poliméricas com formatos esféricos, diâmetro médio de 192 nm e índice de polidispersão de 0,59, conforme análise por MET. Os valores de  $D_h^M$  e o PDI das nanopartículas suspensas em água, determinados por DLS, foram de 237 nm e 0,108, e não houve variação significativa durante 30 dias de avaliação. A média da eficiência de encapsulação foi de 12,7%, valor considerável do ponto de vista da encapsulação de um extrato vegetal.

**Palavras-chave:** *Guazuma ulmifolia*, perfil fitoquímico, produção de EROs e NO, atividade anti-inflamatória.

## ABSTRACT

Among the fruits of the Brazilian Cerrado, *Guazuma ulmifolia* Lam., or mutamba, stands out due to the presence of bioactive compounds of interest for research. The objective of this research is to study the phytochemical profile in extracts of medium polarity and to identify phenolic compounds in extracts of the fruits of *G. ulmifolia*, as well as to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory potential, related to the content of phenolic compounds in these fruits. In the extracts of the fruits, the contents of total phenolic compounds, total flavonoids, condensed tannins, the antioxidant potential were evaluated. Also, the cell viability (method of 3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide - MTT) and the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Nitric Oxide (NO) in murine macrophage cells (RAW 264.7), mouse fibroblasts (NIH-3T3) and human aorta endothelial (EAHy 926), as well as anti-inflammatory activity through the production of Tumor Necrosis Factor - alpha (TNF- $\alpha$ ) and Interleukin 10 (IL-10) in murine macrophages and toxicity to *Artemia salina*. The phenolic compounds identified by High Performance Liquid Chromatography coupled with High Resolution Mass Spectrometry (HPLC-EMAR) were: protocatechinic acid, gentisic acid, caffeic acid, p-cumáric acid, vanylic acid, gallic acid, catechin, epicatechin, quercetin -3-O- $\beta$ -glucoside, rutin, quercetin, naringenin, luteolin and kaempferol. The extracts of the fruit of *G. ulmifolia* had a high content of phenolic compounds and a high antioxidant potential. In the methanolic (ExMet) and ethyl acetate (ExAc) extracts, the contents of phenolic compounds, flavonoids, condensed tannins and the antioxidant potential were, respectively: 2145.0 and 5292.6 mg AGE/100g; 264.87 and 546.02 mg of flavonoids/100 g; 729.05 and 557.67 mg EC/100 g; IC<sub>50</sub> = 147.6 and 67.63  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . ExMet and ExAc extracts were not very toxic for *Artemia salina*, this toxicity being greater for the methanol extracts of the bark (LD<sub>50</sub> = 60  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and of the pulp (LD<sub>50</sub> = 42  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The methanol extract from the seed was not toxic at any of the concentrations tested. The cell viability test showed that ExMet did not have a cytotoxic effect on any of the cells tested, while ExAc showed low cytotoxicity, with 48.37% (macrophages) and 51.71% (fibroblasts) of viable cells for the highest concentration employed (500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). None of the extracts altered the production of ROS in the tests performed with RAW 264.7 and NIH-3T3 cells, but both reduced the production of ROS for EAHy 926 cells. The presence of extracts in the three cells did not reduce NO production under the conditions analyzed (without LPS stimulation). Analysis of TNF- $\alpha$  and IL-10 production, after adding extracts (0.25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in macrophages, showed that ExMet has a significant response to inflammation, reducing TNF- $\alpha$ , without altering the production of IL-10. The nanoencapsulation of ExAc in PLGA, by the emulsion-evaporation method, was also investigated, obtaining polymeric nanoparticles with spherical shapes, mean diameter of 192 nm and polydispersity index of 0.59, according to analysis by MET. The values of DhM and PDI of nanoparticles suspended in water, determined by DLS, were 237 nm and 0.108, and there was no significant variation during 30 days of evaluation. The average encapsulation efficiency was 12.7%, a considerable value from the point of view of encapsulation of a plant extract.

**Keywords:** *Guazuma ulmifolia*, phytochemical profile, production of ROS and NO, anti-inflammatory activity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> A) Árvore da <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.; B) Galho; C) Folhas.	29
<b>Figura 2:</b> A) Fruto de <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam.; B) Fruto seccionado; C) Casca; D) Polpa e E) Semente.	29
<b>Figura 3:</b> Esquema de classificação dos compostos fenólicos, com exemplos.	32
<b>Figura 4:</b> Estruturas básicas dos A) Ácidos fenólicos hidrobenzóicos e B) Ácidos fenólicos hidrocínâmicos.	33
<b>Figura 5:</b> Estrutura básica das lignanas.	33
<b>Figura 6:</b> Estrutura básica dos flavonóides, com a identificação dos respectivos anéis A, B, C e numeração dos Carbonos.	33
<b>Figura 7:</b> Estruturas químicas dos flavonóides: A) Flavanonas; B) Isoflavonas; C) Flavanóis; D) Flavonas; E) Flavonóis e F) Antocianidinas.	33
<b>Figura 8:</b> Estrutura química das molécula de A) Quercetina, B) Catequina e C) Rutina.	34
<b>Figura 9:</b> Estrutura básica do estilbenos.	34
<b>Figura 10:</b> Estruturas químicas dos A) Tanino Hidrolisáveis (Casuarictina (elagitanino)) e B) Taninos Condensados ou Proantocianidinas.	35
<b>Figura 11:</b> Bioensaios que podem ser correlacionados com a atividade antioxidante.	39
<b>Figura 12:</b> Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: 1) Nanocápsula com fármaco dissolvido no seu núcleo; 2) Nanocápsula com o fármaco adsorvido na membrana polimérica; 3) Nanoesfera com fármaco retido na sua matriz polimérica; 4) Nanoesfera com fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica.	43
<b>Figura 13:</b> Hidrólise do polímero PLGA.	44
<b>Figura 14:</b> A exsicata depositada no herbário da Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO, sob código de registro: UFG-60803.	52
<b>Figura 15:</b> Os frutos frescos da espécie <i>Guazuma ulmifolia</i> .	53
<b>Figura 16:</b> A) Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) do extrato metanólico (ExMet) e B) A expansão na região dos hidrogênios aromáticos.	73
<b>Figura 17:</b> A) Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do extrato de acetato de etila (ExAc) e B) A expansão da região dos hidrogênios aromáticos.	73
<b>Figura 18:</b> Estruturas químicas dos composto fenólicos encontrados nos extratos ExCMet, ExPMet, ExSMet e ExAc.	74
<b>Figura 19:</b> Resultados de viabilidade celular do extrato metanólico de mutamba (ExMet) e do extrato de acetato de etila (ExAc). A)- Células RAW 264.7; B)- Células NIH-3T3 e C)- Células EAHy 926.	76
<b>Figura 20:</b> Produção de EROs em células de macrófagos de murino (RAW 264.7), fibroblastos de camundongo (NIH-3T3) e endotelial de aorta humana (EAHy 926), marcadas com CellRox, após 24 h de exposição em extratos (ExMet e ExAc) na concentração de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ .	78
<b>Figura 21:</b> Produção de NO em macrófagos de murino (RAW 264.7), fibroblastos de camundongo (NIH-3T3) e endotelial de aorta humana (EAHy 926), após 24h de incubação com extratos (ExMet e ExAc) na concentração de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ .	79
<b>Figura 22:</b> Produção de A) TNF- $\alpha$ e B) IL-10 após adição de extratos (ExMet e ExAc) na concentração de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ em macrófagos (RAW 264.7).	80
<b>Figura 23:</b> A) Curva padrão de cianeto de potássio (KCN) para o teste de	82

citotoxicidade com *Artemia salina*. Teste de toxicidade *in vivo* com *Artemia salina*, para extratos: B) ExMet, C) ExAc, D) ExCMet, E) ExPMet e F) ExSMet em diferentes concentrações.

- Figura 24:** Micrografia da nanopartícula polimérica do extrato de acetato de etila de mutamba (Np-ExAc) obtidas por MET. 83
- Figura 25:** Histograma de tamanho das nanopartículas poliméricas de acetato de etila de mutamba (Np-ExAc). 83
- Figura 26:** Diâmetro hidrodinâmico médio ( $D_h^M$ ) e Índice de Polidispersão (PdI) de nanopartículas Np-PLGA e Np-ExAc armazenadas a 18 °C durante 30 dias. 84
- Figura 27:** Espectro de absorção na região UV-Vis da solução padrão do extrato ExAc de *Guazuma ulmifolia* (solução 0,20 mg.mL<sup>-1</sup> em clorofórmio). 86
- Figura 28:** Curva de calibração do extrato ExAc em clorofórmio. 86
- Figura 29:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido gálico no ExCMet. 119
- Figura 30:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da catequina no ExCMet. 119
- Figura 31:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido protocatequínico no ExCMet. 120
- Figura 32:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da epicatequina no ExCMet. 120
- Figura 33:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido cafeico no ExCMet. 121
- Figura 34:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido vanílico no ExCMet. 121
- Figura 35:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido gentísico no ExCMet. 122
- Figura 36:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido p-cumárico no ExCMet. 122
- Figura 37:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da quercetina 3 O -  $\beta$  glucosídeo no ExCMet. 123
- Figura 38:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da rutina no ExCMet. 123
- Figura 39:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da quercetina no ExCMet. 124
- Figura 40:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da naringenina no ExCMet. 124
- Figura 41:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do kaempferol no ExCMet. 125
- Figura 42:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido gálico no ExPMet. 125
- Figura 43:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da catequina no ExPMet. 126
- Figura 44:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido protocatequínico no ExPMet. 126
- Figura 45:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da epicatequina no ExPMet. 127
- Figura 46:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido cafeico no ExPMet. 127
- Figura 47:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido vanílico no ExPMet. 128

- Figura 48:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido gentísico no ExPMet. 128
- Figura 49:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido p-cumárico no ExPMet. 129
- Figura 50:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da rutina no ExPMet. 129
- Figura 51:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da naringenina no ExPMet. 130
- Figura 52:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da luteolina no ExPMet. 130
- Figura 53:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido gálico no ExSMet. 131
- Figura 54:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da catequina no ExSMet. 131
- Figura 55:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido protocatequínico no ExSMet. 132
- Figura 56:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da epicatequina no ExSMet. 132
- Figura 57:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido cafeico no ExSMet. 133
- Figura 58:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido gentísico no ExSMet. 133
- Figura 59:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido p-cumárico no ExSMet. 134
- Figura 60:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da rutina no ExSMet. 134
- Figura 61:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da quercetina no ExSMet. 135
- Figura 62:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da luteolina no ExSMet. 135

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classes de compostos bioativos presentes na planta <i>Guazuma ulmifolia</i> .	30
<b>Tabela 2:</b> Nanoencapsulação de compostos bioativos, usando método de emulsão-evaporação para obtenção de nanopartículas poliméricas.	47
<b>Tabela 3:</b> Reagentes, solventes e materiais empregados neste trabalho.	49
<b>Tabela 4:</b> Rendimento percentual dos frutos liofilizados, do extrato metanólico (ExMet) e do extrato de acetato de etila (ExAc) dos frutos de <i>Guazuma ulmifolia</i> .	68
<b>Tabela 5:</b> Teores de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoide totais (FT), taninos condensados (TC) e o potencial antioxidante dos extratos metanólico (ExMet) e de acetato de etila (ExAc) dos frutos de <i>Guazuma ulmifolia</i> . Os dados são apresentados como valor médio $\pm$ DP.	70
<b>Tabela 6:</b> Teor de compostos fenólicos totais (CFT) e o potencial antioxidante de extratos de algumas espécies de plantas frutíferas, para comparação.	71
<b>Tabela 7:</b> Valores de diâmetro hidrodinâmico médio de intensidade ( $Dh^I$ ), diâmetro hidrodinâmico médio numérico ( $Dh^N$ ) e diâmetro hidrodinâmico médio ( $Dh^M$ ) e índice de polidispersão (PDI) das amostras Np-PLGA e Np-ExAc.	85
<b>Tabela 8:</b> Compostos encontrados no extrato da casca da mutamba (ExCMet) através da análise por CLAE-EMAR.	108
<b>Tabela 9:</b> Compostos encontrados no extrato da polpa da mutamba (ExPMet) através da análise por CLAE-EMAR.	111
<b>Tabela 10:</b> Compostos encontrados no extrato da semente da mutamba (ExSMet) através da análise por CLAE-EMAR.	114
<b>Tabela 11:</b> Compostos encontrados no extrato ExAc através da análise por CLAE-EMAR.	117

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE - Ácido Gálico Equivalente  
ATCC - American Type Culture Collection  
BHA - butil hidroxianisol  
BHT - butil-hidroxil-tolueno  
CE - Catequina Equivalente  
CFT - Compostos Fenólicos Totais  
CLAE-EMAR - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução  
CS - Casca e Semente  
Ctrl - Controle  
Dh - Diâmetro hidrodinâmico  
Dh<sup>I</sup> - Diâmetro hidrodinâmico de Intensidade  
Dh<sup>M</sup> - Diâmetro hidrodinâmico Médio  
Dh<sup>N</sup> - Diâmetro hidrodinâmico de Número  
DL<sub>50</sub> - Dose Letal média  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
DNA - Ácido Desoxirribonucleico  
DP - Desvio Padrão  
D<sub>t</sub> - Difusão translacional  
EAHy 926 - Endotelial de Aorta Humana  
EC<sub>50</sub> - Concentração Equivalente para afetar 50%  
EDS - Energy Dispersive Spectrometry  
EE - Eficiência de Encapsulação  
ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio  
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio  
ExAc - Extrato de Acetato de Etila  
ExMet - Extrato Metanólico  
ExCMet - Extrato Metanólico da Casca  
ExPMet - Extrato Metanólico da Polpa  
ExSMet - Extrato Metanólico da Semente  
F - Fruta  
FDA - Food and Drug Administration  
FT - Flavonóides Totais  
IL-1 - Interleucina 1  
IL-6 - Interleucina 6  
IL-8 - Interleucina 8  
IL-10 - Interleucina10  
IL-12 - Interleucina12  
K<sub>B</sub> - Constante de Boltzmann  
LPS - Lipolissacarídeo  
MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão  
MTT - 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo  
MS - Espectrometria de Massa  
m/z - massa/carga  
η - viscosidade dinâmica  
NIH-3T3 - Fibroblastos de camundongo  
NO - Óxido Nítrico



Np-ExAc - Nanopartícula de Extrato de Acetato de etila  
Np-PLGA - Nanopartícula de PLGA  
P - Polpa  
P.A. - Para Análise  
PdI - Índice de Polispersão  
PGA - Ácido Glicólico  
PLA - Ácido poli-lático  
PLGA - Ácido poli-lático-co-glicólico  
PVA - Polivinil álcool  
T - Temperatura  
TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral - alfa  
TR - Tempo de Retenção  
RAW 264.7 - Macrófagos de murino  
RC - Célula Regenerada  
RMN - Ressonância Magnética Nuclear  
RNA - Ácido Ribonucleico  
RDC - Resolução da Diretoria Coletiva  
Vol - Volume

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b>	19
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	20
<b>2 OBJETIVO GERAL</b>	23
<b>2.1 Objetivos Específicos</b>	23
<b>CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	24
<b>3 CERRADO BRASILEIRO</b>	25
<b>4 FRUTOS DO CERRADO E SEUS COMPOSTOS BIOATIVOS</b>	26
<b>4.1 A espécie <i>Guazuma ulmifolia</i> (mutamba)</b>	26
<b>5 COMPOSTOS FENÓLICOS</b>	30
<b>6 ANTIOXIDANTES</b>	36
<b>7 ESTRESSE OXIDATIVO</b>	40
<b>8 INFLAMAÇÃO</b>	41
<b>9 SISTEMAS NANO-ESTRUTURADOS POLIMÉRICOS PARA ENCAPSUAÇÃO E LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS</b>	43
<b>CAPÍTULO 3 - PARTE EXPERIMENTAL</b>	48
<b>10 MATERIAIS</b>	49
<b>11 MÉTODOS</b>	51
<b>11.1 Obtenção dos extratos dos frutos de <i>Guazuma ulmifolia</i></b>	51
11.1.1 Coleta dos Frutos	51
11.1.2 Preparação do Extrato Metanólico	51
11.1.3 Preparação dos Extratos metanólicos da Casca, Polpa e Semente de Mutamba	53
11.1.4 Preparação dos Extrato de Acetato de Etila	53
<b>11.2 Análises Químicas dos Extratos</b>	54
11.2.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais	54
11.2.2 Determinação de Flavonóides Totais	55
11.2.3 Determinação de Taninos Condensados	55
11.2.4 Determinação do Potencial Antioxidante pelo método de DPPH	56
<b>11.3 Análises Espectrométricas</b>	57
11.3.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN <sup>1</sup> H)	57
11.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLAE-EMAR)	57
<b>11.4 Ensaios Biológicos</b>	58
11.4.1 Cultura Celular	58
11.4.2 Viabilidade celular pelo método de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo)	59
11.4.3 Produção de EROs	59
11.4.4 Produção de Óxido Nítrico (NO)	60
11.4.5 Produção de TNF- $\alpha$ e IL-10	61
11.4.6 Análise Estatística	61
<b>11.5 Determinação de toxicidade <i>in vivo</i> por bioensaio com <i>Artemia salina</i> e Análise qualitativa de cianeto</b>	61
<b>11.6 Nanoencapsulação do extrato de <i>Guazuma ulmifolia</i> (mutamba) em PLGA</b>	62
11.6.1 Obtenção de nanopartículas de PLGA/ExAc	62
11.6.2 Caracterização das nanopartículas de PLGA/ExAc	63
11.6.3 Eficiência de Encapsulação do ExAc em PLGA	64

<b>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	66
<b>12 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	67
<b>12.1 Rendimento dos Extratos dos Frutos de Mutamba</b>	67
<b>12.2 Caracterização Química dos Extratos do Fruto de Mutamba</b>	68
<b>12.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLAE-EMAR)</b>	72
<b>12.4 Teste de Viabilidade Celular</b>	75
<b>12.5 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Óxido Nítrico (NO)</b>	77
<b>12.6 Determinação de Toxicidade <i>in vivo</i> por bioensaio com <i>Artemia salina</i> e Análise qualitativa de cianeto</b>	80
<b>12.7 Encapsulação do extrato de acetato de etila em PLGA</b>	82
12.7.1 Caracterização das Nanopartículas de PLGA e de PLGA/ExAc	83
12.7.2 Eficiência de Encapsulação do ExAc em PLGA	85
<b>13 CONCLUSÃO</b>	87
<b>REFERÊNCIAS</b>	89
<b>ANEXOS</b>	107

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, há um crescente interesse pelas frutas tropicais devido às suas propriedades nutricionais e terapêuticas. Dentre as terapêuticas, se destacam aquelas que podem ser incluídas na dieta natural e que possuem propriedades antioxidantes, cuja ação é capaz de prevenir doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como disfunções cardiovasculares, inflamações, diabetes e até mesmo o câncer. Os efeitos mais favoráveis dos frutos estão, altamente, relacionados ao conteúdo de microconstituintes, incluindo ácido ascórbico, carotenóides, tocoferóis e polifenóis. Estes últimos são identificados como potentes eliminadores de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estão entre os antioxidantes mais abundantes na dieta humana.

O Cerrado é um dos biomas mais ricos do mundo, possuindo uma grande quantidade de frutas nativas e exóticas, com sabores intensos, exclusivos e com reconhecido potencial para exploração nas indústrias de alimentos e fármacos. Porém, apesar de todo esse potencial, estas frutas permanecem, ainda, em parte desconhecidas.

A *Guazuma ulmifolia* Lam., conhecida por mutamba, eleita para estudos nesta pesquisa, pertence à família Malvaceae e é amplamente utilizada na medicina popular, particularmente, pela população da região do Cerrado (CRUZ, 1995). Os usos populares de *G. ulmifolia* têm motivado pesquisas experimentais (*in vitro* e *in vivo*), nas quais foram comprovadas bioatividade associada à composição fitoquímica, principalmente pela presença de taninos condensados (PEREIRA et al., 2019).

Uma revisão bibliográfica detalhada, sobre a *G. ulmifolia*, recentemente publicada por Pereira e colaboradores (2019), evidencia a presença de compostos fenólicos bioativos. Dentre as principais bioatividades detectadas, inclui-se a antimicrobiana, antiprotozoária, antidiarreica, antidiabética, cardioprotetora e anti-inflamatória.

Em função de sua bioatividade, a espécie *G. ulmifolia* segue sendo investigada e pesquisadores buscam validar seu uso como planta terapêutica, através dos estudos fitoquímicos. Estudos com extratos aquosos das frutas e flores de mutamba mostraram resultados positivos para os seguintes compostos bioativos: alcalóides, taninos, saponinas, flavonóides, terpenóides, glicosídeos cardíacos e esteróides (PATIL e BIRADAR, 2013). Extratos alcóolicos das folhas da mutamba apresentaram ácidos fenólicos como ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido rosmarínico, além de flavonóides como rutina, luteolina, apigenina, quercetina, catequina e quercitrina

(CALIXTO JÚNIOR et al., 2016; MORAIS et al., 2017). No extrato do fruto de mutamba, composto por água deionizada com metanol e acetona, foi identificada a presença de ácido p-hidroxibenzóico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido gentísico, ácido p-cumárico, ácido protocatequínico, catequina, epicatequina, epigallocatequina, kaempferol, kaempferol 3-O-glucósido (astragalina), kaempferol 3-O-ramnosil-glucósido (nicotiflorina), luteolina, luteolina 7-O-glucósido (cynaroside), naringenina, dímero de procianidina B1, dímero de procianidina B2, trímero de procianidina C1, quercetina, quercetina 3-O-galactósido (hiperósido), quercetina 3-O-metil éter, (isorhamnetina), rutina, vanilina (PEREIRA et al., 2020). Estas pesquisas somadas a outros estudos já realizados, indicam uma expressiva presença de compostos bioativos, principalmente, compostos fenólicos, na *Guazuma ulmifolia* e comprovam sua atividade antioxidante, entre outras propriedades.

O interesse das indústrias de produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, pelo uso de extratos bioativos e de substâncias bioativas procedentes de frutas, é crescente, com vistas, principalmente, ao desenvolvimento de produtos funcionais (CYBORAN et al., 2014). A utilização dos compostos bioativos, como os fenólicos, óleos essenciais, alcalóides, carotenóides e terpenóides, na produção de alimentos, cosméticos e fármacos, tem sido limitada, principalmente, por serem pouco solúveis em água e apresentarem baixa absorção e, também, por não serem capazes de atravessar as membranas lipídicas das células ou por terem tamanho molecular excessivamente alto, o que pode levar à perda de biodisponibilidade e de eficácia (BONIFÁCIO et al., 2014). A instabilidade química durante a estocagem (temperatura, presença de oxigênio, luz, etc.) é outro fator que pode limitar o desenvolvimento de tais produtos (LI, ROUAUD e PONCELET, 2015; WANG et al., 2014).

Uma das formas possíveis de se reduzir os inconvenientes acima referidos, seria a utilização dos sistemas nanoestruturados, que podem facilitar e aumentar o controle da estabilidade, melhorar a solubilidade, a biodisponibilidade e controlar a liberação de compostos bioativos (ABBAS et al., 2015; NEVES et al., 2015). Entre os biomateriais, o polímero biodegradável poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) - PLGA, apresenta enorme potencial como veículo carreador de compostos, além de ser um polímero aprovado pela FDA (Food and Drug Administration). O PLGA é, fisicamente, resistente e biocompatível e tem sido empregado como veículo de liberação de fármacos, proteínas e várias outras macromoléculas, tais como DNA, RNA e peptídeos (RUHE et al., 2003; BOUISSOU et al., 2006). Tem sido usado, também, para nanoencapsulação

de extratos de plantas (PEREIRA et al., 2015; SILVA et al., 2014; PEREIRA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2017; HILL, MATTHEW e GOMES, 2013).

Ao se aliar o reconhecido potencial dos frutos nativos do cerrado, com a possibilidade de redução das limitações, naturalmente existentes, para sua utilização em maior escala, inclusive, em âmbito industrial, ampliam-se significativamente as perspectivas de aproveitamento destes frutos, dentre os quais se destaca a mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam.), objeto deste trabalho.

À frente, são apresentados e detalhados os procedimentos metodológicos e os principais resultados alcançados do estudo realizado neste trabalho com extratos metanólico e de acetato de etila do fruto de *Guazuma ulmifolia*. O estudo pretendeu avaliar algumas características dos extratos deste fruto, particularmente a presença de quantidade significativa de compostos fenólicos que, em princípio, poderiam influenciar a produção de marcadores inflamatórios em testes *in vitro*.

## 2 OBJETIVO GERAL

Estudar o perfil fitoquímico dos extratos de média polaridade dos frutos de *Guazuma ulmifolia* Lam, identificar compostos bioativos, investigar o potencial antioxidante e anti-inflamatório, e avaliar a utilização do método de emulsão-  
evaporação para nanoencapsulação de compostos presentes nos extratos.

### 2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o teor de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, taninos condensados e o potencial antioxidante dos extratos metanólicos (ExMet) e de acetato de etila (ExAc) dos frutos de *Guazuma ulmifolia*;
- ✓ Identificar compostos fenólicos por CLAR-EMAE presentes nos extratos metanólicos da casca (ExCMet), polpa (ExPMet), semente (ExSMet) e de acetato de etila (ExAc) dos frutos de *Guazuma ulmifolia*;
- ✓ Avaliar o possível efeito citotóxico dos extratos ExMet e ExAc sobre as células de macrófagos de murino (RAW 264.7), fibroblastos de camundongo (NIH-3T3) e endotelial de aorta humana (EAHy 926);
- ✓ Avaliar *in vitro* a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), Óxido Nítrico (NO), Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina 10 (IL-10);
- ✓ Avaliar o possível efeito tóxico dos extratos ExCMet, ExPMet, ExSMet, ExMet e ExAc para *Artemia salina*;
- ✓ Investigar características morfológicas e texturais de nanopartículas de PLGA/ExAc obtidas pelo o método de emulsão-  
evaporação.



## **CAPÍTULO 2**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### 3 CERRADO BRASILEIRO

O Cerrado é uma savana neotropical que ocupa cerca de 2 milhões de km<sup>2</sup>, ou 22% do território brasileiro, e se situa no coração da América do Sul. Em extensão, entre os biomas brasileiros, o Cerrado fica atrás apenas da Amazônia e ocorre nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Maranhão, Piauí e Distrito Federal. Além disso, incorpora ainda partes do território de países vizinhos como Bolívia e Paraguai (CAVALCANTI et al., 2012).

Sendo assim, o segundo maior bioma da América Latina, o Cerrado brasileiro é considerado um dos principais centros de conservação da diversidade biológica do mundo, devido à riqueza da biodiversidade e altos níveis de endemismo (SANO et al., 2019), hospedando mais de 12.400 espécies de plantas (JBRJ, 2017).

Na sua maior parte, o Cerrado apresenta período chuvoso que dura de outubro a março, seguido por período seco, de abril a setembro (KLINK e MACHADO, 2005). O clima, classificado como tropical chuvoso, com invernos secos e verões chuvosos, apresenta média anual de precipitação da ordem de 1500 mm, variando de 750 a 2000 mm (ADÁMOLI et al., 1987).

A flora na região do Cerrado apresenta várias fitofisionomias, que englobam formações florestais, savânicas e campestres, sendo que a área de florestas apresenta predominância de espécies arbóreas com formação de dossel, contínuo ou descontínuo; as savanas compreendem as áreas com árvores e arbustos entremeados em um estrato gramíneo, sem a formação de dossel contínuo; e nos campos predominam as espécies herbáceas e arbustivas, faltando árvores na paisagem (RIBEIRO e WALTER, 2008).

Em decorrência do grau de ameaça à enorme diversidade de espécies, incluindo espécies endêmicas, o Cerrado, assim como a Mata Atlântica, é considerado um dos “hotspots” mundiais, ou seja, um dos biomas mais ricos e ameaçados do mundo (MYERS et al. 2000).

De acordo com Almeida et al., (2011), o Cerrado é um bioma brasileiro que tem várias espécies frutíferas nativas e exóticas subexploradas, de potencial interesse para a agroindústria e uma possível fonte de renda para a população.

## 4 FRUTOS DO CERRADO E SEUS COMPOSTOS BIOATIVOS

Muitas das espécies frutíferas do bioma Cerrado já tiveram suas potencialidades de uso identificadas, sendo aproveitadas para alimentação, para produção de forragem, ornamentação, medicina, óleos, madeira, entre outros (RATTER, BRIDGEWATER e RIBEIRO, 2003). Várias dessas espécies produzem frutos comestíveis, com formatos variados e cores atrativas, apresentando características sensoriais únicas, apreciável valor nutricional e elevadas concentrações de compostos funcionais, como fibras, vitamina C, compostos fenólicos e alto potencial antioxidante (DUARTE, 1998; LIMA et al., 2015a,b).

A necessidade de preservação e manutenção das espécies nativas do Cerrado é um consenso no meio científico, e o aproveitamento comercial sustentável de algumas espécies, tem sido apontado como uma alternativa econômica para a população desta região (LIMA et al., 2015a,b). Porém, apesar da rica diversidade de frutos de espécies nativas do Cerrado, há, ainda, carência de estudos a respeito de suas qualidades e potencialidades. Faltam, assim, dados confiáveis, por exemplo, sobre o conteúdo de compostos bioativos e a capacidade antioxidante das frutas, como ferramentas de grande importância para a saúde pública, já que o consumo regular de frutas e vegetais está associado a um risco reduzido de desenvolver doenças cardiometabólicas. Além disso, a informação sobre o conteúdo fitoquímico ajuda a agregar valor comercial e industrial aos frutos (ALVES et al. 2017; ARTS e HOLLMAN, 2005).

Estudos com frutos nativos do Cerrado, mostram potencial nutricional e de compostos bioativos com propriedades promotoras de saúde, incluindo-se o auxílio na atividade antioxidante. Na medicina popular, são utilizados como anti-inflamatórios, antibióticos e hipocolesterolêmicos (MESQUITA et al., 2009; GONÇALVES, LAJOLO e GENOVESE, 2010). Embora os estudos sobre a eficácia dos efeitos terapêuticos de extratos brutos ou de compostos isolados de diversas plantas e frutas deste bioma, sejam insuficientes, sabe-se que há um vasto espectro de atividade biológica a ser explorado, incluindo propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (JÚNIOR et al., 2009).

### 4.1 A espécie *Guazuma ulmifolia* (mutamba)

Entre as espécies de plantas promissoras do Cerrado brasileiro, tem-se a *Guazuma ulmifolia* Lam., pertencente à família Malvaceae (MORAIS et al., 2017), e

conhecida popularmente como mutamba, mutambo, fruta-de-macaco, embira, embireira e mutamba verdadeira (LORENZI, 2002).

A árvore *Guazuma ulmifolia* é semidecídua (suas folhas caem após estação seca prolongada) podendo atingir de 8 a 30 m de altura e 60 cm de diâmetro na altura do peito (CARVALHO, 2007) (Figura 1A). Sua copa é densa e larga, com ramos horizontais e folhas agrupadas alternadamente ao longo dos galhos (Figura 1B). As folhas (Figura 1C) são de filotaxia alternada, simples, ovalada ou lanceolada (formato de lança), com 5 a 18 cm de comprimento e 2 a 6 cm de largura, membranácea, mais ou menos aguda no ápice, com a margem moderadamente denteada ou crenada; a superfície adaxial é brilhante com três a cinco veias emergindo da base, conectadas ao caule ao longo do pecíolo de 0,8 a 2,5 cm (CARVALHO, 2007).

O fruto de *G. ulmifolia* é classificado como uma cápsula globular a ovoide, seco, verrucoso e sua cor muda de verde para preto durante o amadurecimento. A mutamba *in natura* apresenta massa, comprimento e diâmetro médio de 3,64 g, 1,94 cm e 2,04 cm, respectivamente. Esse fruto é protegido com tubérculos duros e abertura (deiscência) em cinco fendas estreitas ligados um ao outro no ápice ou, irregularmente, por poros (Figura 2A) (CARVALHO, 2007; SOBRINHO e SIQUEIRA, 2008). Internamente, o fruto é duro e seco, apresentando estruturas coriáceas e lenhosas, contendo em média 87 sementes, envolvidos pelo mesocarpo doce e mucilaginoso (Figura 2B-D). As sementes são ovóides, de cor acinzentada, com cerca de 2 mm de comprimento, pesando 0,72 g em média (Figura 2E) (CARVALHO, 2007; SOBRINHO e SIQUEIRA, 2008).

Esta espécie é utilizada na medicina popular para o tratamento da elefantíase, doenças cutâneas, sífilis e infecções respiratórias. Os extratos das folhas e frutos são explorados pelas empresas de cosméticos na fabricação de xampus e condicionadores antiqueda. O óleo essencial tem grande demanda para aromatização de ambientes e fabricação de perfumes devido ao cheiro agradável (NUNES et al., 2005). O chá das cascas é utilizado no Brasil como sudorífero, sendo também empregado em casos de febre, tosse, bronquite, asma, pneumonia e problemas de fígado (CRUZ, 1995). A mutamba (cascas e folhas) é também empregada em diversos países da América do Sul e América Central, para tratamento de problemas gastrintestinais, distúrbios renais e alopecia (RAMIREZ, et al., 1988).

Segundo Berenguer e colaboradores (2007), as flores e as folhas de *Guazuma ulmifolia* são usadas como remédio, nos casos de doenças renais e gastrointestinais, febre e diabetes. Os estudos de Berenguer et al., (2007) mostraram que o tratamento

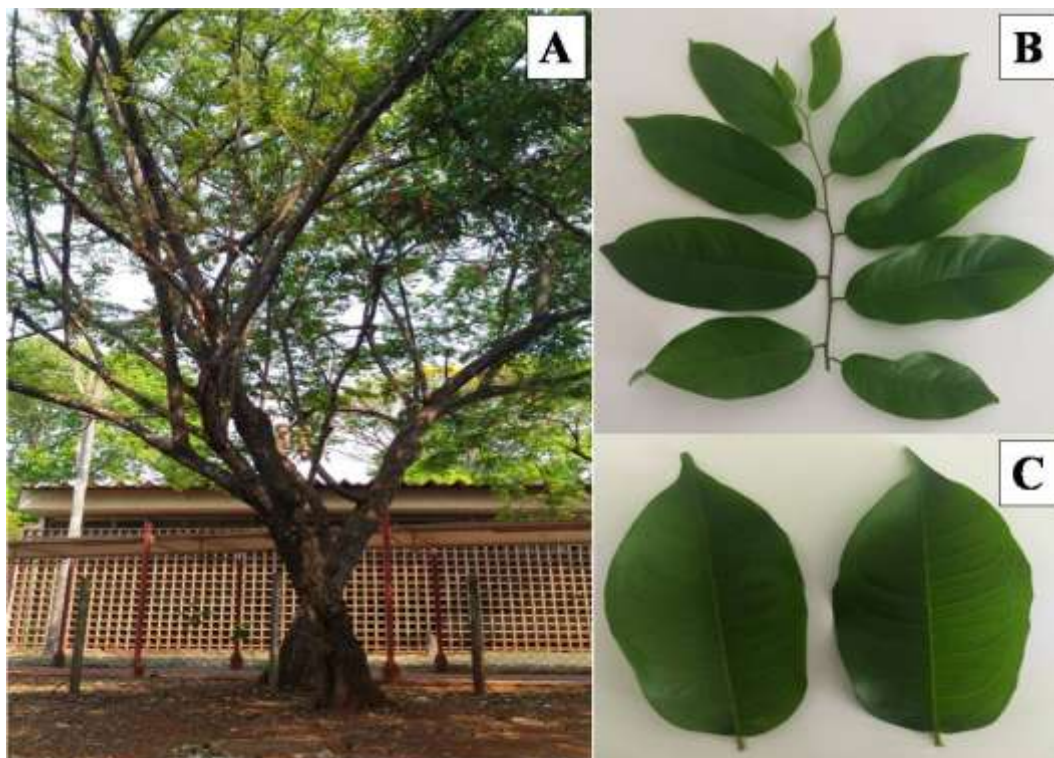
com o extrato etanólico das partes aéreas (flores e folhas) de *G. ulmifolia*, nas concentrações de 125, 250 e 500 mg/kg, diminuiu a úlcera na mucosa gástrica em ratos de forma dose-dependente. Outros estudos com *G. ulmifolia* demonstraram o potencial dos extratos aquosos das folhas para baixar os níveis de glicose no plasma de coelhos saudáveis em até 22% (ALARCON-AGUILAR et al., 1998).

Pesquisas bibliográficas realizadas sobre a bioatividade desta espécie, mostram o potencial antidiabético da casca, caule e folhas da planta (ALARCON-AGUILAR et al., 1998; ALONSO-CASTRO e SALAZAR-OLIVO, 2008; ADNYANA, YULINAH e KURNIATI, 2013). Efeitos antimicrobiano da casca e caule (LUNA-CAZARES e GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2017; CATES et al., 2013); antibacteriano (folhas) (CÁCERES, SAMAYOA e AGUILAR, 1990; BOLIGON et al., 2013); gastro-protetor (folhas e flores) (BERENGUER et al., 2007); efeito hipotensor e vasorelaxante (casca) (MAGOS et al., 2008) também já foram demonstrados. Cascas e folhas apresentaram efeito antioxidante e anticolinesterásico (MORAIS et al., 2017), além de atividade antiparasitária (CALIXTO-JÚNIOR et al., 2016), antifúngica (SALCEDO et al., 2014) e antiobesidade (ISWANTINI et al., 2011). Foram identificadas outras propriedades importantes como: inibição sobre a adipogênese (HIDAYAT et al., 2015; NURI, SUKARDIMAN e BAMBANG PRAYOGO, 2016); reepitelização e cicatrização de feridas em ratos (SENTHIL et al., 2011); antiproliferação de células cancerígenas (DA'I et al., 2016); e efeitos anti-inflamatórios (MALDINI et al., 2013).

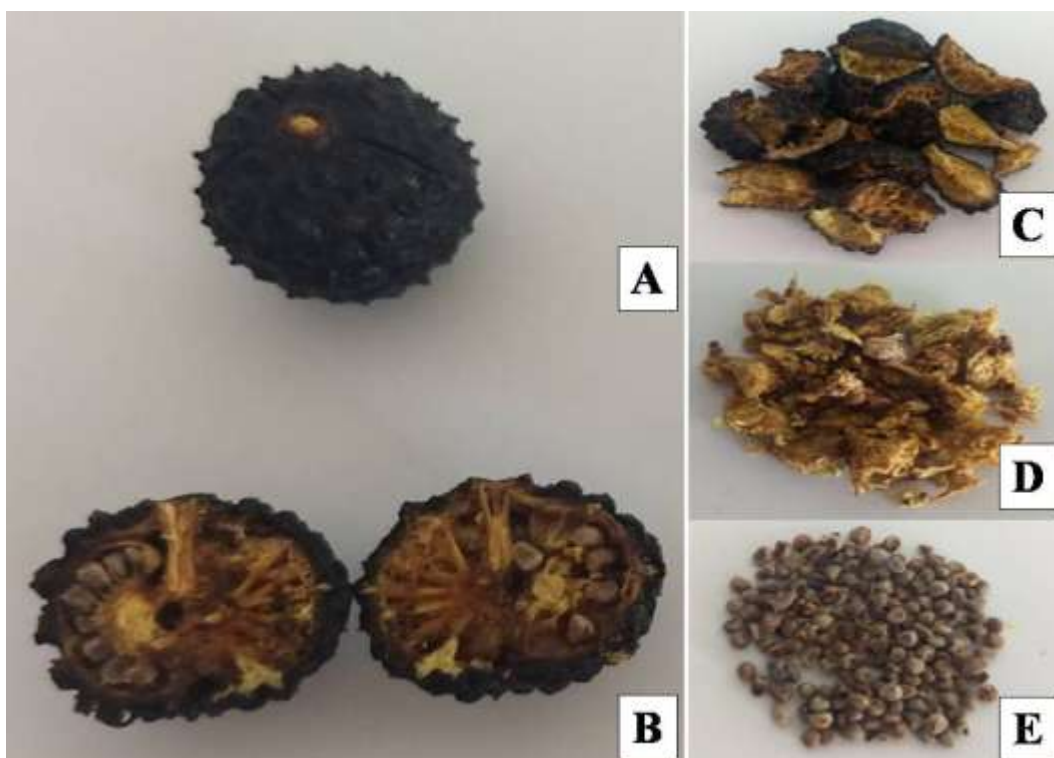
Estudos fitoquímicos dos extratos desta espécie revelaram a presença de compostos fenólicos (QUINTANAR-ISAIAS et al., 2005), taninos e alcalóides (ANDRADE-CETTO e HEINRICH, 2005), sendo que, a estes últimos, são atribuídos efeitos hipoglicemiantes (JUNG et al., 2006). A presença de flavonóides e ácidos fenólicos com reconhecido potencial antioxidante, combinada com o potencial anti-colinesterase, corrobora com a possibilidade de uso da *G. ulmifolia* no tratamento de doenças gastrointestinais (MORAIS et al., 2017). O extrato etanólico da folha de *G. ulmifolia* foi considerado eficiente, também, contra as cepas de alguns parasitas testados (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania infantum*), possivelmente devido à presença de quercetina, composto conhecido como potente leishmanicida (CALIXTO JÚNIOR et al., 2016).

Vários estudos comprovaram a presença de compostos bioativos em partes da planta *G. ulmifolia*, por exemplo, os citados na Tabela 1.

**Figura 1:** A) Árvore da *Guazuma ulmifolia* Lam.; B) Galho; C) Folhas.



**Figura 2:** A) Fruto de *Guazuma ulmifolia* Lam.; B) Fruto seccionado; C) Casca; D) Polpa e E) Semente.



**Tabela 1:** Classes de compostos bioativos presentes na planta *Guazuma ulmifolia*.

<b>Parte da Planta</b>	<b>Classe dos Compostos</b>	<b>Autor</b>
Folha	Flavonóides; Ácidos Fenólicos	Morais et al., (2017)
Folha	Ácidos Fenólicos; Flavonóides	Calixto-Júnior et al., (2016)
Casca	Flavonóides; Taninos	Hor, Heinrich e Rimpler (1996); Caballero-George, et al., 2002; Rocha (2005)
Casca	Taninos	Galina (2003); Maldini et al., (2013)
Casca	Flavonóides	Magos et al., (2008)
Casca	Taninos; Alcalóides	Andrade-Cetto e Heinrich (2005)
Folha, Casca, Fruto	Proantocianidina; Taninos	Pereira et al., (2019)
Fruto	Ácidos Fenólicos; Flavonóides; Taninos	Pereira et al., (2020)
Casca, Folha e Fruto	Taninos; Flavonóides; Saponinas, Mucilagens, Alcalóides, Triterpenos e Esteróides	Galina et al., (2005); Iswantini et al., (2011); Assis et al., (2019)
Folhas	Taninos e Flavonóides	de Souza et al., (2018); dos Santos et al., (2018)

Dentre os compostos fenólicos presentes no fruto de *G. ulmifolia*, predominam os seguintes: trímero de procianidina C1, dímero de procianidina B2, rutina, epicatequina, hiperósido, catequina, ácido protocatequínico, ácido gálico e dímero de procianidina B1 (PEREIRA et al., 2020).

O trímero de procianidina C1 é um tanino condensado que, quando isolado mostrou bioatividades, como: anti-inflamatório (BYUN et al., 2013); antialérgico (NAKANO et al., 2008); anti-câncer (KIN et al., 2013); efeitos cardioprotetores (BYUN et al., 2014); efeitos neuroprotetores (SONG, LEE e KANG, 2019); capacidade de modular as respostas imunes (SUNG et al., 2013).

## 5 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são um amplo grupo de fitoquímicos que possuem, no mínimo, um anel aromático ao qual se encontra ligado um ou mais grupos hidroxila. A sua estrutura pode variar entre uma simples molécula fenólica a polímeros complexos de elevado peso molecular (IGNAT, VOLF e POPA, 2011).

Os compostos fenólicos estão divididos em: ácidos fenólicos (ácido hidroxibenzóico e ácido hidroxicinâmico) lignanas, flavonóides, estilbenos e taninos, conforme apresentado na (Figura 3), com alguns exemplos.

Os ácidos fenólicos (Figura 4), apresentam um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, o que lhes confere propriedades antioxidantes, sendo assim indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares, etc. (BRAVO, 1998; CROFT, 1998).

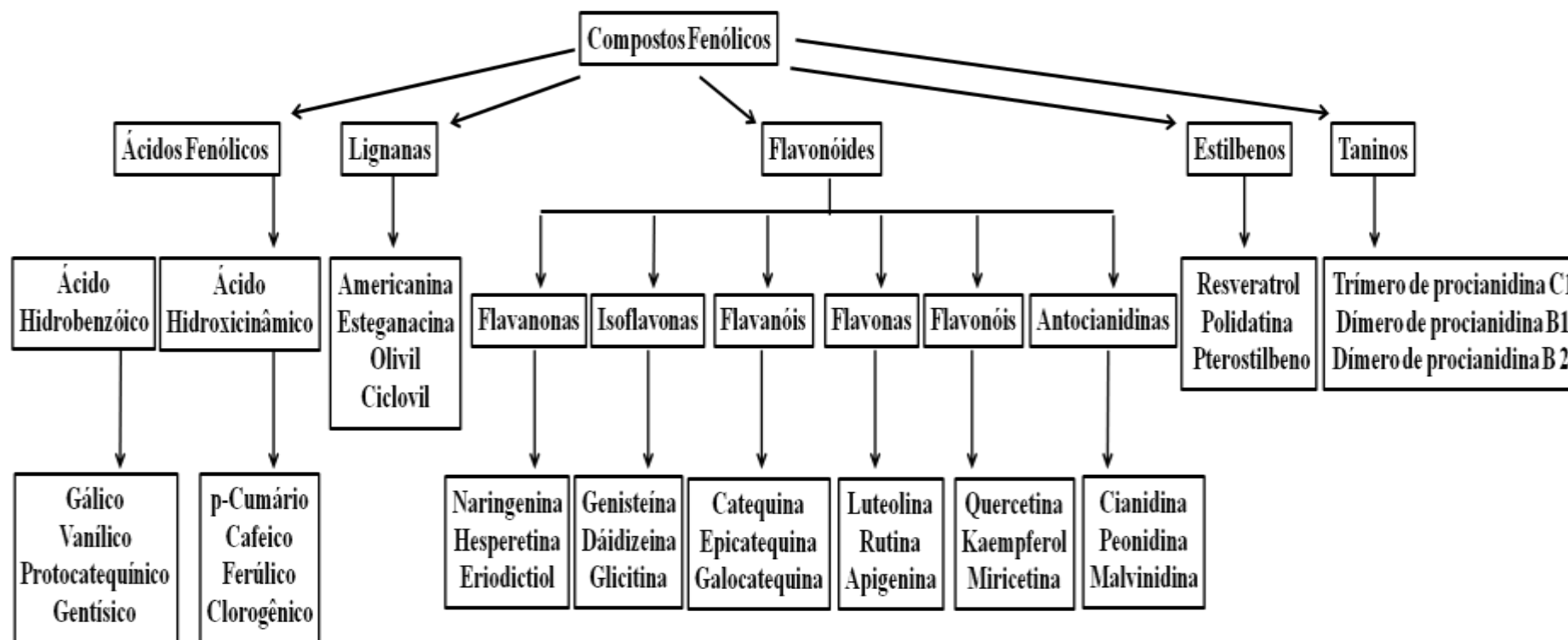
As lignanas são compostos formados pela união de duas unidades de fenilpropanoide pela ligação  $\delta$ - $\delta'$  (Figura 5) (HAWORTH, 1942). Algumas lignanas podem apresentar atividades farmacológicas e/ou imunológicas, além de propriedade anti-inflamatória, anti-tumoral, anti-mitótica, antiviral, antiaterosclerótica e/ou citotóxica para alguns tipos de parasitas (MACRAE e TOWERS, 1984) e antialérgicas (ROW et al., 1964).

Os flavonóides são frequentemente encontrados nas formas glicosiladas ou esterificadas, consistindo em anéis  $C_6-C_3-C_6$ , ou seja, anéis A e B ligados por um anel C de três carbonos (Figura 6). De acordo com as variações do padrão de substituição, os flavonóides são classificados em diferentes subclasses, com uma gama extremamente diversificada de derivados (ISODA et al., 2014). Eles são divididos em seis subgrupos (Figura 7): flavanonas, isoflavonas, flavanóis, flavonas, flavonóis e antocianidinas, de acordo com o grau de hidrogenação e substituição do heterociclo oxigenado: (HEIM, TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002; IGNAT, VOLF e POPA, 2011).

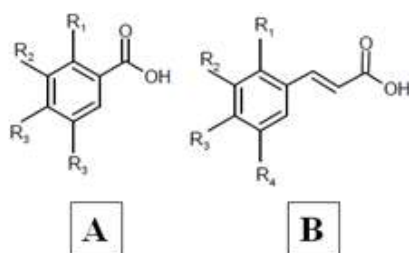
Encontrados em plantas, os compostos flavonóides mostram maior concentração nas sementes e nos frutos, podendo ser ingeridos em altas quantidades como componentes normais da dieta humana (HODEK, TREFIL e STIBOROVÁ, 2002; MENNEN et al., 2005). Estima-se que o consumo diário de flavonóides pode ser de centenas de miligramas por dia (HOLLMAN e KATAN, 1998). Dentre os flavonóides mais encontrados nos frutos, têm-se a quercetina, catequina e rutina.



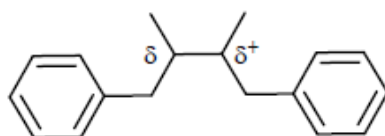
**Figura 3:** Esquema de classificação dos compostos fenólicos, com exemplos.



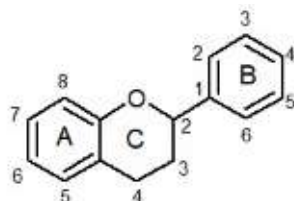
**Figura 4:** Estruturas básicas dos A) Ácidos fenólicos hidrobencícos e B) Ácidos fenólicos hidroxicínâmicos.



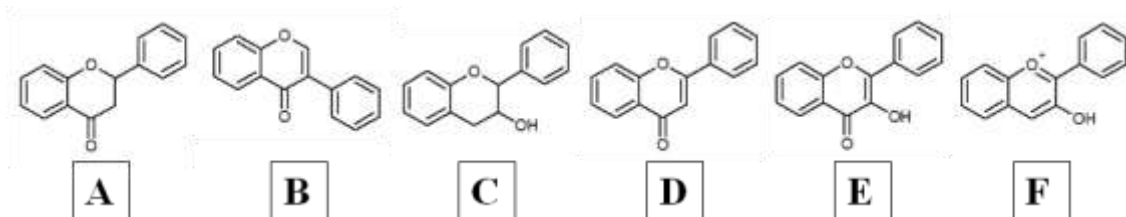
**Figura 5:** Estrutura básica das lignanas.



**Figura 6:** Estrutura básica dos flavonóides, com a identificação dos respectivos anéis A, B, C e numeração dos Carbonos.



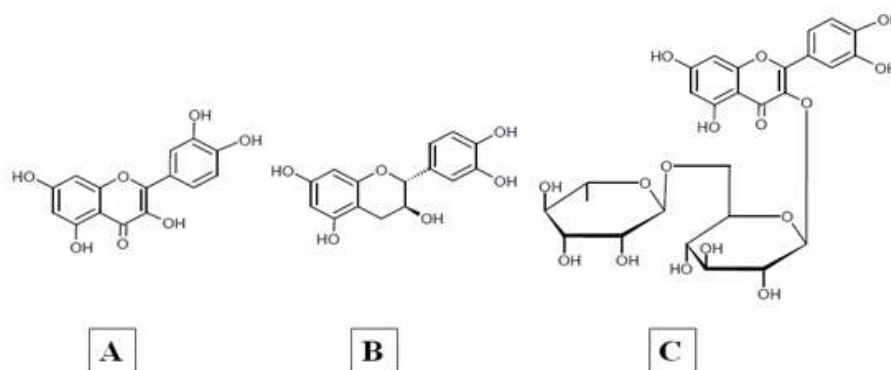
**Figura 7:** Estruturas químicas dos flavonóides: A) Flavanonas; B) Isoflavonas; C) Flavanóis; D) Flavonas; E) Flavonóis e F) Antocianidinas.



A quercetina (Figura 8A) é associada a características antioxidantes, reagindo com ânion superóxido, oxigênio singlete e radicais peroxil. Também forma complexos com ferro, o que pode prevenir a formação de radicais ativos de oxigênio e, também, pode preservar a vitamina C. Portanto, a quercetina pode ser associada à prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, lipoproteína aterogênica, e à formação de placas ateroscleróticas (COSTA, 2003). A catequina (Figura 8B) é um composto com atividade antioxidante encontrado, principalmente, em frutas vermelhas, cacau e chá-

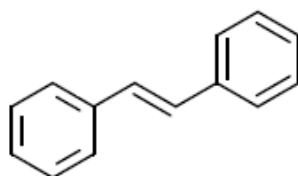
verde, sendo mais abundantes nas partes externas das plantas, como na casca das frutas. Está associada à prevenção do câncer (NILE e PARK, 2014). A rutina (Figura 8C) apresenta várias propriedades terapêuticas atribuídas, principalmente, às suas potentes atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. Estudos demonstraram essas excelentes propriedades benéficas à saúde, capazes de prevenir distúrbios neurodegenerativos, doenças cardiovasculares e câncer de pele, entre outros (FRUTOS, RINCÓN-FRUTOS e VALERO-CASES, 2019).

**Figura 8:** Estrutura química das moléculas de A) Quercetina, B) Catequina e C) Rutina.



Os estilbenos são pequenos compostos, com um peso molecular entre 210 e 270  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , que ocorrem naturalmente e caracterizam-se por um esqueleto 1,2-di-fenil-etileno (Figura 9) (ROUPE et al., 2006). Os estilbenos e os seus derivados possuem uma variedade de atividades biológicas e farmacológicas (JAYATILAKE et al., 1993), incluindo um forte potencial antioxidante (WAFFO-TÉGUO et al., 1998), atividades antifúngicas (DELAUNOIS et al., 2009), antimicrobianas e quimiopreventivas do cancro (CHONG, POUTARAUD e HUGUENEY, 2009).

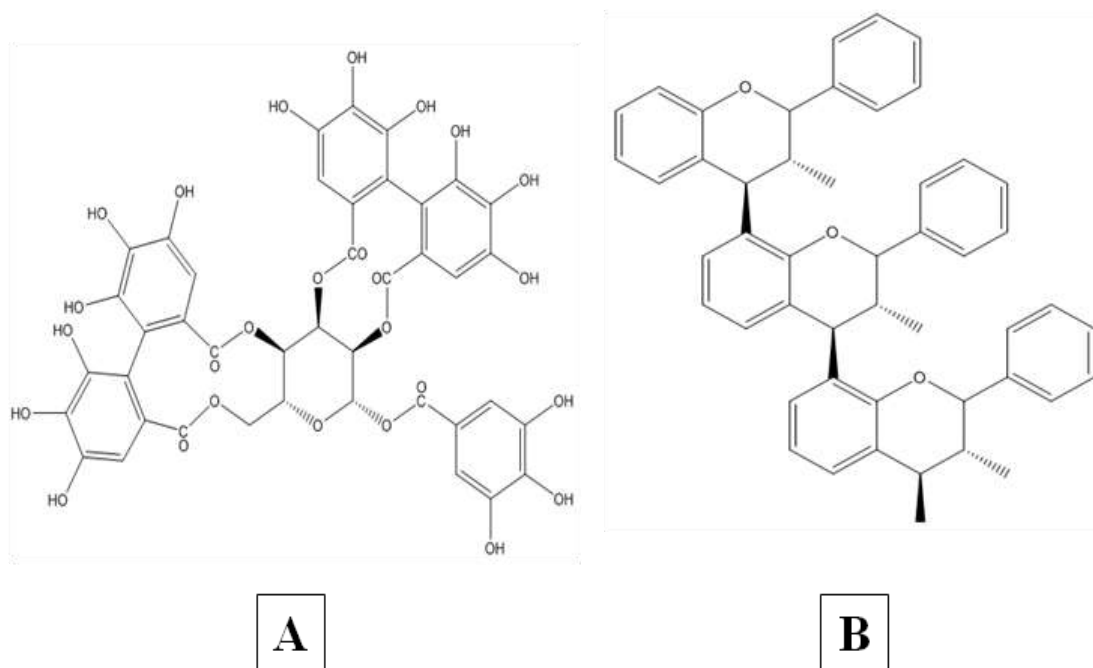
**Figura 9:** Estrutura básica do estilbenos.



O termo "tanino" é definido por duas classes diferentes de compostos químicos de natureza fenólica: os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados (PIZZI, 1993). Segundo Metche (1980), os taninos hidrolisáveis (Figura 10A) são poliésteres da glucose, podendo ser classificados em duas categorias: (a) os galotaninos, que por

hidrólise ácida liberam o ácido gálico e seus derivados; (b) os elagitaninos, que por hidrólise liberam o ácido elágico, ácido valônico, sendo o ácido elágico o mais importante. Segundo Pizzi (1993), os taninos condensados (proantocianidinas) (Figura 10B) são compostos por unidades de flavonóides e possuem diferentes graus de condensação, estando, invariavelmente, associados a seus precursores inéditos, denominados de flavan-3-ols (catequina) e flavan 3-4 diols (leucoantocianidina).

**Figura 10:** Estruturas químicas dos A) Tanino Hidrolisáveis (Casuarictina (elagitanino)) e B) Taninos Condensados ou Proantocianidinas.



Segundo Oliveira e Berchielli (2007) os taninos são considerados "componentes que promovem a saúde" por causa dos efeitos funcionais, assim como os flavonóides e outros compostos fenólicos. A atividade biológica dos taninos condensados pode estar associada à presença do ácido gálico em sua cadeia. Dentre as atividades biológicas encontram-se a anticancerígena, antimutagênica, antimicrobiana, antioxidante (AMAROWICZ, 2007); antialérgica, redução de risco de doenças cardiovasculares e de úlceras (ZHANG et al., 2010); redução da pressão arterial, ação anti-inflamatório e anti-helmíntica (TIAN et al., 2012).

Ademais, os compostos fenólicos são antioxidantes primários que atuam como sequestradores de radicais livres, além de quelarem metais de transição e inibirem a lipo-oxigenase. Por outro lado, os compostos fenólicos podem, também, propiciar reação oxidativa *in vitro*, atuando como pró-oxidantes, ao agirem sobre metais,

reduzindo-os e aumentando a formação de radicais livres e peróxidos (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004).

## 6 ANTIOXIDANTES

Do ponto de vista químico, os antioxidantes são compostos aromáticos que contém no mínimo uma hidroxila, podendo ser sintético, como o butil hidroxianisol (BHA), e o butil hidroxitolueno (BHT), ou naturais como no caso de substâncias bioativas (organossulfuratos, fenólicos e terpenos), que estão presentes em vários alimentos (OLIVEIRA et al., 2010).

Uma substância antioxidante é aquela capaz de retardar ou impedir danos devidos à oxidação, mesmo em pequenas concentrações em relação a um agente oxidante. Tal substância pode apresentar diferentes propriedades protetivas e agir em várias etapas do processo oxidativo, podendo funcionar por diferentes mecanismos (MAISUTHISAKUL, SUTTAJIT e PONGSAWATMANIT, 2007).

De acordo com o mecanismo de ação, os antioxidantes são classificados como primários e secundários. Os antioxidantes primários são os compostos que atuam interrompendo a cadeia da reação por meio da doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, transformando-os em produtos termodinamicamente estáveis (MAISUTHISAKUL, SUTTAJIT e PONGSAWATMANIT, 2007), ou reagindo com os radicais livres, formando um complexo lipídico-antioxidante, que pode reagir com outro radical livre, por exemplo butil-hidroxianisol, butil-hidroxitolueno, ésteres do ácido gálico, da butil-hidroquinona, do tocoferol e dos flavonóides (ADEGOKE et al., 1998). Já os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da auto-oxidação por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais; sequestro de oxigênio; decomposição de hidroperóxidos para produzir espécies não radicalares; absorção de radiação UV ou desativação de oxigênio singlete (GORDON, 1990).

Os mecanismos de ação antioxidante dos compostos fenólicos são: doação de átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila do anel aromático aos radicais livres, agindo como agentes redutores; sequestro de moléculas radicalares; também, quelam metais divalentes, além de inibir a atividade de enzimas oxidativas, reduzindo, assim, o dano oxidativo no organismo. Bloqueiam a ação de enzimas específicas que causam inflamação; modificam rotas metabólicas das prostaglandinas; protegem contra a aglomeração plaquetária e inibem a ativação de carcinógenos (VALKO et al., 2007).

Segundo Decker (1998), os antioxidantes fenólicos atuam, de preferência, com o radical peroxila, que é predominante na etapa de propagação da auto-oxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, o que favorece a abstração do seu hidrogênio. A ação dos compostos fenólicos como antioxidantes depende da concentração e do tipo de compostos, podendo haver sinergismo ou antagonismo entre diferentes compostos. Um dos principais determinantes da atividade antioxidante dos compostos fenólicos, está relacionado ao grau de hidroxilação e à posição dos grupos hidroxila na molécula (HASSIMOTTO, GENOVESE e LAJOLO, 2005).

Segundo Sánchez-Moreno, (2002) a eficiência dos compostos fenólicos como antioxidantes, depende do número de determinantes estruturais, incluindo o número e posição dos grupos OH, o tipo e posição da glicosilação e o grau de impedimento estérico aliado a abstração de hidrogênio. O fenol por si só é inativo como antioxidante. Portanto, os compostos *orto* e *para*-difênóis possuem atividade antioxidante que se acentua com a substituição de seus átomos de hidrogênio por grupos etil ou *n*-butil.

A ótima atividade antioxidante dos flavonóides, está relacionada com a presença de grupos hidroxila nas posições 3' e 4' do anel B, os quais conferem uma elevada estabilidade ao radical formado, participando no deslocamento do elétron, e uma dupla ligação entre os carbonos C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> do anel C em conjugação com o grupo carbonilo na posição C<sub>4</sub>, o qual possibilita o deslocamento de um elétron do anel B. Por fim, grupos hidroxila livres na posição 3 do anel C e na posição 5 do anel A, juntamente com o grupo carbonilo na posição 4, também são importantes para a atividade antioxidante destes compostos. A quercetina, um flavonóide que reúne todas estas características, é um dos antioxidantes naturais mais potentes (SÁNCHEZ-MORENO,2002). De acordo com Rice-Evans, Miller e Paganga, (1996), a eficiência dos flavonóides diminui com a substituição de grupos hidroxila por açúcares, sendo os glicosídeos menos antioxidantes que suas agliconas correspondentes.

Apesar da atividade antioxidante dos taninos ser muito menos caracterizada do que a dos flavonóides, pesquisas recentes mostram que o grau de polimerização destas substâncias está relacionado com suas atividades antioxidantes. Nos taninos condensados e nos hidrolisáveis (elagitaninos) de alto peso molecular, esta atividade pode chegar a ser quinze a trinta vezes superior a atribuída aos fenóis simples (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Os ácidos fenólicos e seus ésteres apresentam uma elevada atividade antioxidante, principalmente os ácidos hidroxibenzóico, hidrozicinâmico, cafeico e

clorogênico. Outras características contribuem, também, para a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus ésteres que, em geral, é determinada pelo número de grupos hidroxila presentes em sua molécula. Em geral, os ácidos cinâmicos hidroxilados são mais efetivos que seus ácidos benzóicos homólogos (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

A hidroxila do ácido ferúlico, presente na posição *orto* com o grupo metoxila doador de elétrons, é um fator que aumenta a estabilidade do radical fenoxila e a eficiência antioxidante deste ácido. A existência de uma segunda hidroxila na posição *orto* ou *para*, também aumenta a atividade antioxidante dos compostos fenólicos. O ácido cafeico, que tem essa característica, possui uma atividade antioxidante maior do que a do ácido ferúlico. O efeito sequestrante do radical hidroxila está relacionado, diretamente, aos grupos localizados na posição *para* no anel aromático. Do mesmo modo, os ácidos sinápico e p-cumárico são antioxidantes mais efetivos do que os derivados do ácido hidrobenzóico, como o protocatequínico, o siríngico e o vanílico, devido à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico (-HC=CH-COOH), que participa da estabilização do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto os derivados do ácido hidrobenzóico não têm essa característica (DEGÁSPARI e WASCZYNSKYJ, 2004).

Segundo Oliveira et al., (2010), os antioxidantes possuem a propriedade de interceptar os radicais livres gerados pelo mecanismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque aos lipídios, aos aminoácidos das proteínas, à dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e às bases do DNA, evitando a formação de lesões e a perda da integridade celular.

Assim, de modo geral, a atividade antioxidante depende do número e das posições dos grupos hidroxila e de outros substituintes, e da glicosilação das moléculas dos polifenóis (CAI et al., 2006). Por exemplo, a presença de certos grupos hidroxila no núcleo do flavonóide, aumenta a sua atividade antioxidante, assim como os padrões de substituição nos anéis A e B, a dupla ligação 2,3 (insaturação) e o grupo 4-oxo no anel C, também afetam a atividade antioxidante dos flavonóides (CAI et al., 2006).

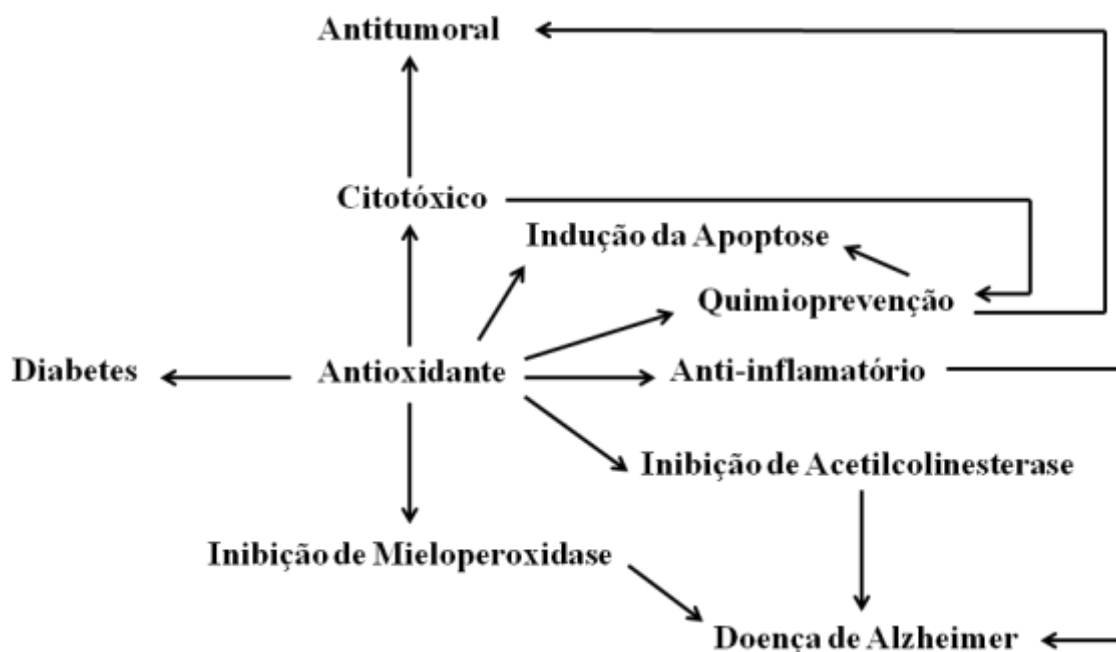
Antioxidantes naturais presentes em alimentos, atraíram interesse devido aos seus potenciais efeitos nutricionais e terapêuticos (RUFINO et al., 2009). Frutas são fonte de compostos antioxidantes, como fenólicos, vitaminas, carotenóides e minerais, que contribuem na proteção contra doenças (ALMEIDA et al., 2011).

As frutas são consideradas fontes importantes de macro e micronutrientes e, também, possuem outros compostos com propriedades bioativas, que promovem

benefícios adicionais à saúde e protegem o corpo humano contra diferentes doenças crônicas, como obesidade, diabetes mellitus, dislipidemias, hepatopatias e cânceres (DEMBITSKY et al., 2011; DEVALARAJA; JAIN; YADAV, 2011; WOOTTON-BEARD; RYAN, 2011). Souza et al., (2013) e Martins et al., (2011) corroboram com os autores citados acima, ao afirmar que dentre os efeitos benéficos dos compostos bioativos de origem natural, estão a redução da incidência de doenças degenerativas, a atuação como anticancerígeno, a redução dos fatores de risco cardiovascular e as ações antioxidante, antialérgica, anti-inflamatória e antimicrobiana.

O potencial antioxidante de plantas pode estar relacionado a outras atividades biológicas importantes na prevenção ou até mesmo no controle de doenças, como diabetes, inflamação, câncer, entre outras, como mostra a Figura 11.

**Figura 11:** Bioensaios que podem ser correlacionados com a atividade antioxidante. FONTE: FRANCO (2010).



Dentre os compostos bioativos, aqueles com ação antioxidante, como as vitaminas e os compostos fenólicos, têm atraído grande interesse por seus efeitos comprovados na proteção contra o estresse oxidativo (DAI; MUMPER, 2010; MALTA et al., 2012; NIKI, 2010).



## 7 ESTRESSE OXIDATIVO

De acordo com Barbosa e colaboradores (2010), o estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre a produção de substâncias oxidantes e a ação do sistema de defesa antioxidante, pela geração excessiva de radicais livres, ou pela perda da velocidade de remoção destes.

A produção de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico, que cumpre funções biológicas relevantes. Entretanto, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos. O estresse oxidativo é caracterizado pelo acúmulo intracelular de compostos reativos ao oxigênio e ao nitrogênio, denominados de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), respectivamente. O estresse oxidativo ocorre nas células, geralmente, como consequência de um desequilíbrio do sistema redox, devido ao excesso do acúmulo de espécies reativas, principalmente EROs, ou pela redução de antioxidantes, ou ainda, por ambos os processos (CUNNINGHAM et al., 2012; MESTMAN, 2012).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo celular, produzindo radicais livres de forma natural ou devido a uma disfunção biológica. Esses radicais livres, cujo elétron desemparelhado se encontra centrado nos átomos de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN), estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, imunidade e defesa celular e síntese de substâncias biológicas de organismos vivos. Entretanto, quando em excesso, apresentam efeitos prejudiciais, como a peroxidação dos lipídios de membrana e a agressão às proteínas dos tecidos, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS et al., 2006; OLIVEIRA e SCHOFFEN, 2010).

Segundo Pelúzio, Rosa e Oliveira (2010), o estresse oxidativo está relacionado com a etiologia de diversas doenças crônicas e deve-se ao desequilíbrio entre as reações produtoras de radicais livres, particularmente, espécies reativas de oxigênio (EROs), e a capacidade dos antioxidantes de agirem como mecanismos de sequestro ou eliminação de radicais livres. A produção de radicais livres é capaz de influenciar a proliferação celular (necrose e apoptose) e a expressão de genes, e estão envolvidos em vários mecanismos de sinalização como mensageiros para muitos estímulos fisiológicos, além de desempenhar importante papel na defesa e regulação da homeostase de oxirredução do organismo. Células fagocitárias do sistema imunológico, como neutrófilos,

monócitos e macrófagos, produzem radicais livres, principalmente superóxido e óxido nítrico, como parte dos seus mecanismos de defesas.

Radicais livres induzidos pela peroxidação, são importantes por causa de seu envolvimento em diversas condições patológicas como aterosclerose, inflamação, câncer, entre outras, podendo ser produzidos por fontes endógenas ou exógenas (ARUOMA, 2003). Além disso, os processos inflamatórios também promovem o aumento da concentração dos radicais livres no organismo (SOARES, 2002). Os principais radicais livres observados são: o superóxido ( $\bullet\text{O}^{2-}$ ), a hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), o hidroperóxido ( $\text{HOO}\bullet$ ), o óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) e o dióxido de nitrogênio ( $\bullet\text{NO}_2$ ). Dentre estes, o radical hidroxila é o mais reativo na indução de lesões nas membranas celulares e o peróxido de hidrogênio possui a capacidade de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA (REIS et al., 2011).

Em situações em que a produção de espécies reativas do oxigênio supera os sistemas de defesa antioxidante, os EROs em excesso podem oxidar lipídios de membranas, desnaturar proteínas e atacar ácido nucléicos, o que constitui a base molecular de diversas doenças com envolvimento inflamatório (ER et al., 2007).

## 8 INFLAMAÇÃO

Em condições normais de funcionamento do organismo, moléculas e células de defesa circulam livremente na corrente sanguínea (CRUVINEL et al., 2010). Quando há uma lesão no organismo, esses agentes de defesa são imediatamente acionados e direcionados para o local do tecido lesionado ou infeccionado, iniciando o processo inflamatório (DE MENDONÇA et al., 2009).

O processo inflamatório é dividido em padrões agudo e crônico. O padrão inflamatório agudo é a primeira ação de defesa do organismo contra o agente agressor e começa de forma abrupta e precoce, sendo caracterizado por três eventos principais, mediados por moléculas solúveis ou por células do sistema imune: (1) sinalização de calor e rubor devido à vaso dilatação e aumento do fluxo sanguíneo local; (2) extravasamento de proteínas e recrutamento de leucócitos para o espaço extravascular com subsequente formação do edema (ou tumor) causado pelo aumento da permeabilidade vascular; (3) liberação de substâncias pró-inflamatórias que provocam dor. Já o padrão inflamatório crônico, é o tipo de inflamação que perdura por longo

tempo, não sendo perceptível os sinais cardinais de dor, tumor, calor, rubor e perda de função (WEBSTER, 2003).

A resposta inflamatória envolve a participação de diferentes tipos celulares, como neutrófilos e macrófagos que atuam como células fagocitárias, removendo o tecido morto e mantendo a assepsia do local da ferida, além da liberação de citocinas e fatores de crescimento que desempenham papel importante na etapa seguinte do processo de cicatrização (OLCZYK et al., 2014).

Na inflamação, os macrófagos liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e quimiocinas. Também produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio, assim como intermediários reativos de nitrogênio, cujo principal representante é o óxido nítrico (NO) (ABBAS e LICHTMAN, 2003).

As respostas celulares inflamatórias envolvem a formação e acúmulo de mediadores bioativos, sendo o óxido nítrico um dos mediadores importantes para várias funções biológicas (KATSUNG, 1998). No decorrer da inflamação, a produção de NO aumenta e exerce efeitos pró-inflamatórios e regulatórios (HAMALAINEM et al., 2007).

O Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF- $\alpha$ ) é o primeiro mediador inflamatório a ser produzido em resposta às infecções e é considerado um mediador primário do sistema imune inato, crucial para induzir proteção local (ULLOA e TRACEY, 2005). Mínimas quantidades de TNF- $\alpha$  colaboram para a defesa do hospedeiro, porém, quando a produção é em excesso e prolongada, o TNF- $\alpha$  torna-se nocivo ao organismo (NETEA et al., 2003), desregulando a resposta imune e induzindo a ativação de outras citocinas e do sistema oxidativo celular, que estimulam inflamação e lesão tecidual potencialmente letais (TRACEY, 2002; ULLOA e TRACEY, 2005).

Já a interleucina 10 (IL-10), tem o papel de inibir as citocinas pró-inflamatórias, principalmente a citocina contrarreguladora da resposta imune inata (OBERHOLZER et al., 2002). Esta interleucina tem ação anti-inflamatória, inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias (CASEY, 2000). Concentrações elevadas de IL-10 acarretam a diminuição da produção de TNF- $\alpha$ , interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1, IL-6 e IL-8) pelos monócitos. Por outro lado, a supressão de IL-10 resulta no aumento dos níveis séricos circulantes de TNF- $\alpha$  e IL-6; isso sugere que a IL-10 possui enorme poder anti-inflamatório (CUNNEEN; CARTWRIGHT, 2004). Oberholzer e colaboradores (2002) sugeriram que a magnitude da resposta da IL-10 pode estar correlacionada com a

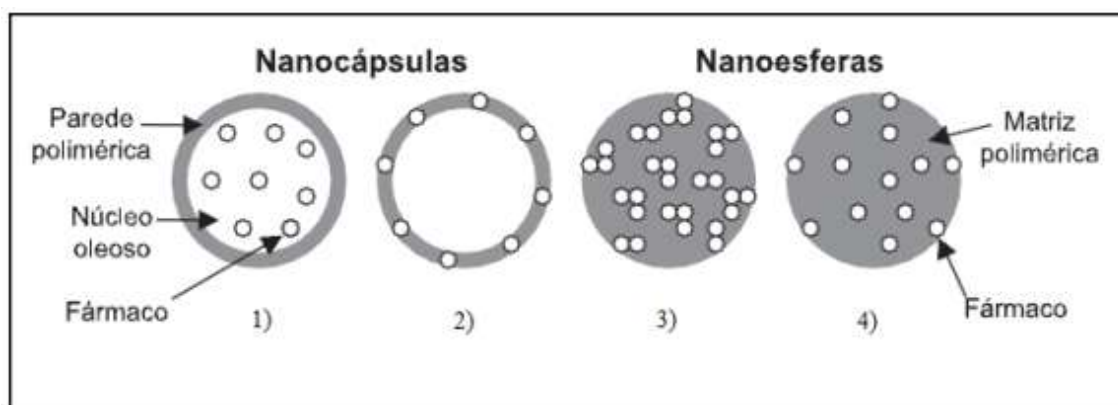
gravidade do processo inflamatório e a concentração de citocinas pró-inflamatórias, com ativação do TNF- $\alpha$ . Há, realmente, um mecanismo homeostático que envolve a IL-10 e as citocinas pró-inflamatórias: enquanto o TNF- $\alpha$  e outras citocinas estimulam a síntese de IL-10, na vigência de estímulo inflamatório, esta irá bloquear a síntese de TNF- $\alpha$  de forma diretamente proporcional à resolução do processo inflamatório, levando à normalização dos níveis séricos das citocinas (BORISH; STEINKE, 2003) e restaurando a homeostase (BONE, GRODZIN e BALK 1997).

## 9 SISTEMAS NANO-ESTRUTURADOS POLIMÉRICOS PARA ENCAPSUAÇÃO E LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Dentre os sistemas de nanocarreadores mais comuns e que são extremamente utilizados para transportar drogas/compostos, tem-se as micelas, dendrímeros, nanofibras, niossomas, lipossomas e nanopartículas (NPs) (TORCHILIN, 2005).

O termo “nanopartícula” engloba dois tipos de estruturas diferentes, denominados nanocápsulas e nanoesferas, que diferem entre si de acordo com a sua composição e organização estrutural, como representado na Figura 12.

**Figura 12:** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: 1) Nanocápsula com fármaco dissolvido no seu núcleo; 2) Nanocápsula com o fármaco adsorvido na membrana polimérica; 3) Nanoesfera com fármaco retido na sua matriz polimérica; 4) Nanoesfera com fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica (Fonte: Schaffazick, et al., 2003b com permissão da Sociedade Brasileira de Química, ©Creative Commons Attribution License).



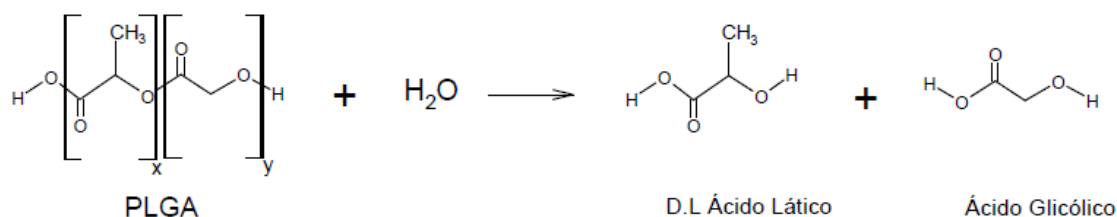
As nanocápsulas são sistemas do tipo reservatório, no qual é possível a identificação de um núcleo líquido diferenciado (óleo ou água) e, ao redor, um material sólido (invólucro polimérico). A substância ativa neste sistema pode estar dissolvida no

núcleo e/ou incluída ou adsorvida na parede polimérica. Já as nanoesferas são sistemas formados por matrizes poliméricas que, ao contrário das nanocápsulas, não apresentam um núcleo diferenciado. As substâncias ativas neste tipo de nanopartículas encontram-se, geralmente, homoganeamente distribuídas/encapsuladas no interior da matriz, sendo liberadas por difusão, mas, podem encontrar-se também adsorvidas à superfície da nanoesfera (COUVREUR et al., 1995; SCHAFFAZICK et al., 2003b; GUTERRES, ALVES e POHLMANN, 2007, STEICHEN et al., 2013).

As nanopartículas poliméricas são bastante empregadas como biomateriais, devido às suas características de elaboração e design simples, boa biocompatibilidade, ampla variedade de estruturas e fácil reprodutibilidade. Em relação à entrega de drogas, elas se destacam por serem capazes de transportar compostos diretamente para o local proposto no corpo humano, com excelente eficiência (EL-SAY e EL-SAWY, 2017). Segundo Jain et al., (1998), os polímeros biodegradáveis mais utilizados atualmente são os poliésteres, como o poli( $\epsilon$ -caprolactona), o PLA (ácido poli-lático) e os diferentes tipos de PLGA (ácido poli-lático-co-glicólico), sendo que os dois últimos têm sido os mais amplamente empregados.

O PLGA pode ser usado em vários formatos e tamanhos, podendo encapsular moléculas de, praticamente, qualquer tamanho. É solúvel em muitos solventes comuns, incluindo clorados, tetrahydrofurano, acetona e acetato de etila (UHRICH et al., 1999; WU e WANG, 2001). O PLGA se degrada por hidrólise de suas ligações éster (Figura 13). A presença de grupos laterais de metila no PLA, torna o polímero mais hidrofóbico que o PGA e, sendo assim, os copolímeros de PLGA ricos em lactídeo são menos hidrofílicos, absorvendo menos água e se degradando de forma mais lenta. Devido à hidrólise do PLGA, os parâmetros como temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), teor de umidade e peso molecular, podem mudar com o tempo (HOUCHIN e TOPP, 2009).

**Figura 13:** Hidrólise do polímero PLGA.



Segundo Zorzi e colaboradores (2015), fatores como polaridade do composto ativo, solubilidade, presença de solvente orgânico e volatilidade devem ser considerados

ao selecionar o nanossistema e sua técnica de preparação. Entre os métodos mais utilizados para obtenção de nanopartículas de PLGA como carreadores de compostos bioativos, está a emulsão-*evaporação* de solvente (NAIR et al., 2010). O método de emulsão-*evaporação* consiste na dispersão de uma fase orgânica volátil, na qual se dissolve o polímero, sobre uma fase aquosa, na presença de um agente emulsionante. A emulsão formada é submetida à agitação para a *evaporação* do solvente da fase orgânica e formação das nanopartículas. As moléculas bioativas podem ser incorporadas, tanto via fase orgânica como via fase aquosa, dependendo de sua solubilidade (WANG et al., 2014; SCHAFFAZICK et al., 2003a).

O método de emulsificação-*evaporação* de solvente é um método bastante utilizado para preparar nanopartículas a partir de copolímeros pré-formados (RAO e GECKELER, 2011). Essa técnica também permite encapsular compostos hidrofílicos. Entretanto, uma emulsão dupla A/O/A (água/óleo/água) deve ser formada com o princípio ativo dissolvido na fase aquosa interna (KAMALY et al., 2016). Uma vantagem desta metodologia é a simplicidade de execução, requerendo, apenas, a seleção adequada dos solventes, emulsificantes e condições de agitação (LI, ROUAUD e PONCELET, 2008).

Para preparar nanopartículas poliméricas, são usados tensoativos na fase aquosa, obtendo-se dispersões estáveis. O tensoativo mais adequado é aquele que promove uma redução maior da energia livre interfacial, diminuindo a tendência à coalescência e à aglomeração das gotículas emulsificadas (ANTON, BENOIT e SAULNIER, 2008). Um dos tensoativos utilizados na fase externa aquosa é o PVA (SCHOLES et al., 1999), que evita a agregação das nanosferas durante a lavagem e a liofilização, embora não possa ser utilizado quando o produto se destina a administração intravenosa (LIU, PAN e FENG, 2010). Na fase orgânica, segundo Liu e colaboradores (2010), geralmente, são usados solventes clorados para solubilizar o polímero, como o cloreto de metileno ou o clorofórmio, devido à sua baixa hidrossolubilidade, ao seu baixo ponto de ebulição e à sua capacidade de solubilização de um grande número de princípios ativos.

De acordo com Souto, Severino e Santana (2012), muitos parâmetros podem afetar as características físico-químicas das nanopartículas poliméricas obtidas pelo método de emulsão-*evaporação*, incluindo a solubilidade do princípio ativo, a natureza do solvente orgânico, a concentração do polímero, a natureza e a concentração do tensoativo e o modo e duração da agitação da emulsão. Algumas características podem determinar as funções das nanopartículas, sendo que as principais são: a) tamanho

médio e distribuição de tamanho das nanopartículas, b) carga superficial, c) estabilidade química e física, d) eficiência da encapsulação, e) perfil de liberação das substâncias encapsuladas (WANG et al., 2014; SCHAFFAZICK et al., 2003a).

SchaffaZick e colaboradores (2003a) e Anton, Benoit e Saulnier (2008) afirmam que o uso de nanopartículas vem aumentando de maneira considerável, devido a características como aumento da solubilidade de compostos ativos, que confere maior estabilidade a este composto na suspensão de nanopartículas e aumenta a absorção intracelular devido ao seu tamanho reduzido. Estes sistemas nanoparticulados são considerados promissores vetores de substâncias ativas devido à sua capacidade de liberação controlada de compostos.

De acordo com Rezaei, Fathi e Jafari (2019), a nanoencapsulação é uma boa alternativa para preservação e proteção dos compostos bioativos contra circunstâncias ambientais inadequadas e para aumentar a biodisponibilidade e estabilidade destes compostos, contribuindo para sua aplicação em alimentos e produtos farmacêuticos. Ademais, a encapsulação protege contra oxigênio, luz, pH, umidade e digestão gástrica, melhora a solubilidade de compostos lipofílicos em meios aquosos e permite a absorção prolongada de nutrientes.

A Tabela 2 apresenta alguns exemplos de nanoencapsulação de compostos bioativos extraídos de frutas, usando o método de emulsão-*evaporação* para obtenção de nanopartícula polimérica usando PLGA<sub>50:50</sub> e PLGA<sub>65:35</sub>, com caracterização das nanopartículas (tamanho; Índice de Polidispersão (PdI), eficiência de encapsulação).

A diferença na hidrofobicidade entre as proporções de PLGA, com a PLGA<sub>65:35</sub> sendo mais hidrofóbica que PLGA<sub>50:50</sub> devido a um maior componente láctico presente, pode afetar a eficiência de encapsulação entre estes extratos (SILVA, et al., 2014; BUDHIAN, SIEGEL e WINEY, 2005). O Índice de Polidispersão (PdI) é uma medida adimensional da extensão da dispersão de tamanhos de partículas, onde valores menores que 0,1 indicam um sistema monodisperso e homogêneo e valores mais altos (> 0,1) indicam um sistema polidisperso e mais heterogêneo (ZIGONEANU, ASTETE e SABLIOV, 2008 ).

**Tabela 2:** Nanoencapsulação de compostos bioativos, usando método de emulsão-evaporação para obtenção de nanopartículas poliméricas.

Polímero	Extrato	Diâmetro Médio das Partículas (nm)	PdI	EE%	Composto Bioativo	Autor
PLGA <sub>50:50</sub>	Guabiroba ( <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg)	153,2	0,28	83,7	Carotenóide	Pereira et al., (2015)
PLGA <sub>65:35</sub>		154,8	0,21	98,5		
PLGA <sub>50:50</sub>	Acerola ( <i>Malpighia emarginata</i> DC)	136,53	0,26	63,27	Quercetina	Silva et al., (2014)
	Maracujá ( <i>Passiflora edulis</i> Sims)	127,34	0,23	10,61	Cumarina	
	Goiaba ( <i>Psidium guajava</i> L.)	153,62	0,17	1,15	Resveratrol	
PLGA <sub>65:35</sub>	Acerola ( <i>Malpighia emarginata</i> DC)	153,37	0,17	10,94	Quercetina	
	Maracujá ( <i>Passiflora edulis</i> Sims)	185,82	0,26	25,47	Cumarina	
	Goiaba ( <i>Psidium guajava</i> L.)	154,33	0,20	8,15	Resveratrol	
PLGA <sub>50:50</sub>	Guabiroba ( <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg)	202,5	0,37	39,2	Compostos fenólicos	Pereira et al., (2018)
PLGA <sub>65:35</sub>		243,8	0,43	32,0		

PdI: Índice de Polidispersão; EE% : Eficiência de Encapsulação.



## **CAPÍTULO 3**

### **PARTE EXPERIMENTAL**

A parte experimental foi realizada em etapas: coleta dos frutos de *Guazuma ulmifolia*, obtenção dos extratos metanólicos e de acetato de etila destes frutos; caracterização química dos extratos; ensaios biológicos: viabilidade celular pelo método de MTT; produção de Espécies Reativas de Oixgênio (EROs); produção de Óxido Nítrico (NO); produção de Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina - 10 (IL-10); obtenção das nanopartículas do extrato de acetato de etila em PLGA (Np-ExAc); caracterização das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET); Teste de estabilidade das nanopartículas, durante 30 dias, com determinação do Diâmetro hidrodinâmico Médio ( $Dh^M$ ) e Índice de Polidispersão (PdI) por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS); Eficiência de Encapsulação do ExAc em PLGA.

## 10 MATERIAIS

Os reagentes e solventes empregados neste trabalho foram usados sem prévia purificação e estão listados na Tabela 3.

Os padrões de compostos fenólicos (Sigma-Aldrich) utilizados nas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLAE-EMAR), foram: ácido gálico, ácido protocatequínico, ácido gentísico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, catequina, epicatequina, rutina, quercetina, naringenina, luteolina e kaempferol. O padrão quercetina 3-O- $\beta$ -glucosideo foi isolado de plantas.

**Tabela 3:** Reagentes, solventes e materiais empregados neste trabalho.

Reagentes	Marca
Acetato de Etila P.A.	Qhemis
Acetona P.A.	Dinâmica
Ácido Clorídrico P.A.	Dinâmica/ Merck
Ácido Ascórbico P.A.	Dinâmica
Ácido Fosfórico P.A.	Dinâmica
Ácido Gálico P.A.	Sigma-Aldrich
BHT (butil-hidroxil-tolueno) P.A.	Synth

Azul tritripano	Sigma-Aldrich
Carbonato de Sódio P.A.	Vetec
Catequina $\geq 98\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich
CellROX® Green da sonda	Invitrogen, Life Technologies
Clorofórmio P.A.	Anidrol
Diclorometano P.A.	Dinâmica
DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco)	Gibco®
Dimetilsulfóxido P.A. (DMSO)	J.T Baker
DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)	Sigma-Aldrich
Estreptomicina	Life Technologies™
Etanol P.A.	Dinâmica
Folin Ciocalteu	Sigma-Aldrich
Hexano P.A.	Nuclear
Hidróxido de Sódio P.A.	Impex
Kit ELISA de IL-10	BD OptEIA™
Kit ELISA de TNF- $\alpha$	BD OptEIA™
LPS	Sigma-Aldrich
Metanol P.A.	Nuclear
Metil-tiazol-tetrazólio (MTT)	Life Technologies™
N-(1-Naphthyl)	Sigma-Aldrich
Naftil-etilenodiamina P.A.	Dinâmica
Nitrito de Sódio (NaNO <sub>2</sub> ) P.A.	Dinâmica
Penicilina	Life Technologies™
PBS pH 7,2	LB - Laborolin
PLGA <sub>50:50</sub> (38-54kDa)	Sigma-Aldrich
PVA 98%	Acros Organics
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	ICN - Biomedicals
Soro Fetal Bovino (SFB)	Life Technologies™

Sulfanilamida P.A.	Dinâmica
Sulfato de cobre P.A.	Vetec
Tartarato de Sódio e Potássio P.A.	J. T. Baker / Sigma-Aldrich
Tripsina-EDTA (0,05%)	Gibco®
Vanilina 99%	Sigma-Aldrich

---

## 11 MÉTODOS

### 11.1 Obtenção dos extratos dos frutos de *Guazuma ulmifolia*

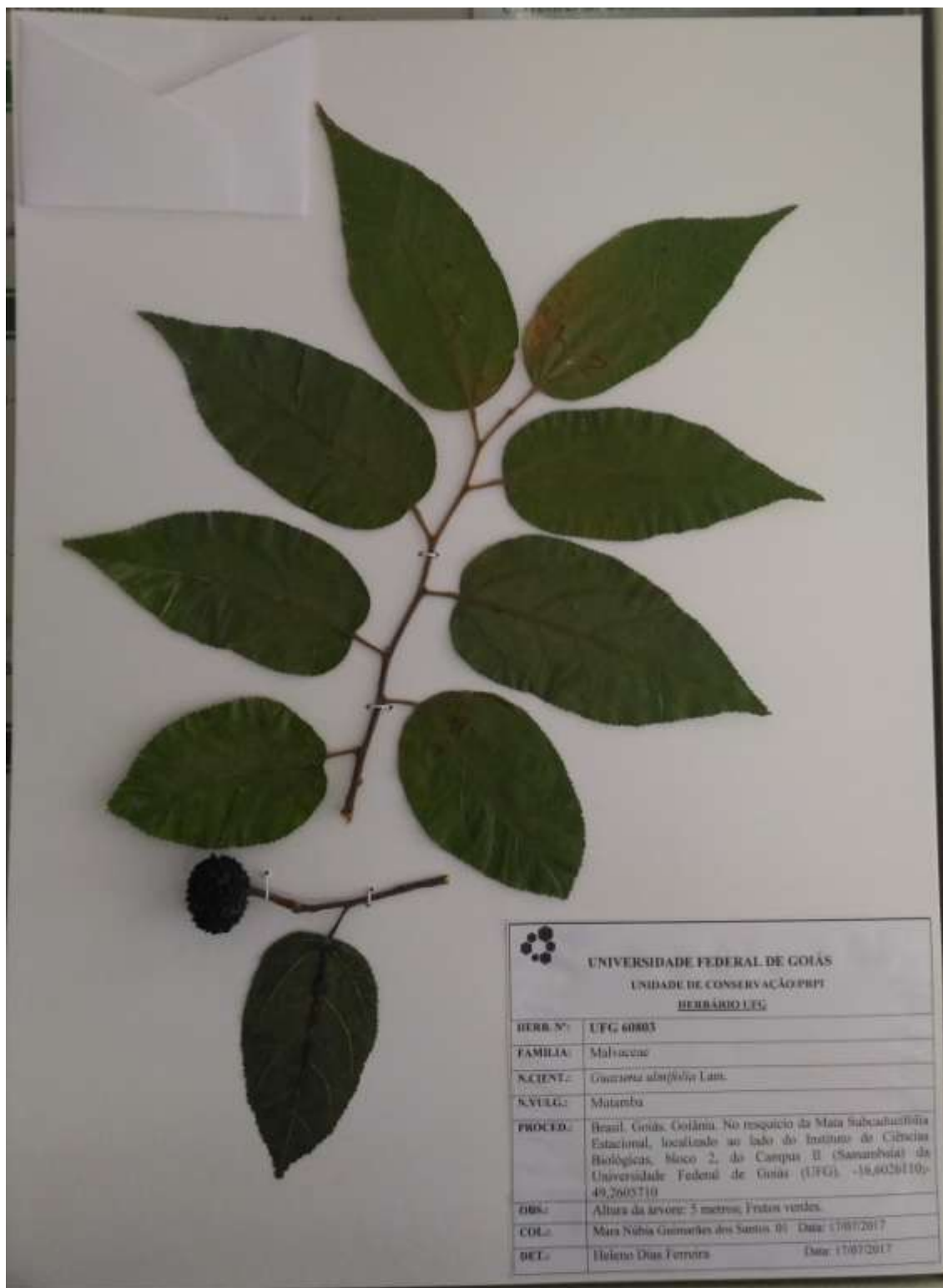
#### 11.1.1 Coleta dos Frutos

Os frutos de mutamba foram coletados no resquício da Mata Subcaducifólia Estacional, localizado ao lado do Instituto de Ciências Biológicas, bloco 2, do Campus II (Samambaia) da Universidade Federal de Goiás (UFG), a 16° 36'12,6 " S; 49° 15'38,7 " O e 16° 36'13,0 " S, 49° 15'53,5 " O, no período de 1 de setembro a 3 de outubro de 2017. A exsicata está depositada no herbário da Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO, sob código de registro: UFG-60803 (Figura 14). A identificação da espécie foi realizada pelo Prof. Dr. Heleno Dias Ferreira, do Instituto de Biologia, na Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO.

#### 11.1.2 Preparação do Extrato Metanólico

Os frutos frescos da espécie *Guazuma ulmifolia* (6000,00 g) (Figura 15) foram selecionados, lavados em água corrente, triturados em nitrogênio líquido e liofilizados (Liofilizador LIOTOP, modelo L101) por 24 h, para obter 4294,23 g de fruto seco, que foi suspenso em 5800 mL de metanol, pelo método de percolação. Após um período de 48 horas em metanol, o resíduo sólido presente na suspensão foi filtrado e sulfato de sódio anidro foi adicionado à solução metanólica como agente secante. Posteriormente, a solução metanólica foi isolada e o solvente foi removido por destilação a pressão reduzida, utilizando-se um evaporador rotativo. O material sólido obtido foi denominado Extrato Metanólico (ExMet).

**Figura 14:** A exsicata depositada no herbário da Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO, sob código de registro: UFG-60803.



**Figura 15:** Os frutos frescos da espécie *Guazuma ulmifolia*.



#### 11.1.3 Preparação dos Extratos metanólicos da Casca, Polpa e Semente de Mutamba

Para os extratos metanólicos da casca (ExCMet), polpa (ExPMet) e semente (ExSMet) da *Guazuma ulmifolia*, foi pesado 250,0 g do fruto e foi separado 22,37 g de semente, 45,56 g de polpa e 166,38 g de casca. Cada parte foi colocada, separadamente, em Erlenmeyer e adicionado 60,0, 135,0 e 340,0 mL de metanol, respectivamente; após 48 h, o solvente foi rotaevaporado e os sólidos liofilizados (Liofilizador LIOTOP, modelo L101) por 24 h.

#### 11.1.4 Preparação dos Extrato de Acetato de Etila

Três alíquotas de 10,00 g do extrato metanólico (ExMet) foram dissolvidas, separadamente, em 100 mL de água deionizada. Cada solução aquosa resultante foi lavada com hexano (3 x 40 mL), empregando-se um funil de separação, com o objetivo de retirar a maior parte dos compostos de baixa polaridade, presentes no ExMet. Em seguida, a fração de média polaridade foi extraída por partição, empregando-se acetato de etila (3 x 40 mL) como solvente. A fase orgânica obtida no tratamento de cada alíquota, foi separada da fase aquosa através do funil de separação e, depois, as frações

foram reunidas e roto-evaporadas à temperatura de 40 °C. Após liofilização, o material sólido obtido (3,1453 g) foi denominado ExAc.

## 11.2 Análises Químicas dos Extratos

As análises químicas (compostos fenólicos totais, flavonóides totais, taninos condensados e potencial antioxidante) foram realizadas em triplicata. As análises foram realizadas no laboratório de Química Inorgânica, bloco IQ-2, Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO.

### 11.2.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

A determinação dos compostos fenólicos totais, presentes nos extratos metanólico (ExMet) e de acetato de etila (ExAc), foi realizada de acordo com o método de Folin Ciocalteu, descrito por Roesler et al. (2007).

Foram preparadas as seguintes soluções: solução de metanol (50%, v/v), solução de acetona (70%, v/v), solução aquosa de carbonato de sódio 20%, solução aquosa de ácido gálico 0,005 g.mL<sup>-1</sup>. A solução do Folin Ciocalteu foi diluída em água deionizada na proporção 1:3 (v/v). Nas análises, utilizou-se, respectivamente, 250,0 mg e 100,0 mg das amostras ExMet e ExAc, às quais foram adicionados 40 mL de solução de metanol 50%. As misturas foram mantidas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 1 h e, depois, foram centrifugadas (3400 rpm, 20 °C, 20 min) para separação da fase sólida. Os sobrenadantes foram recolhidos em balões volumétricos de 100 mL e mantidos ao abrigo da luz. A cada fração sólida, foram adicionados 40 mL de solução de acetona 70% e a mistura resultante foi mantida à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 1 h. As misturas foram centrifugadas e os sobrenadantes foram recolhidos e adicionados aos balões volumétricos, cujos volumes foram completados com água. As amostras foram analisadas utilizando-se alíquotas de 1 mL de cada amostra, misturada a, 1 mL da solução Folin ciocalteu, 2 mL da solução de carbonato de sódio 20% e 2 mL de água deionizada, deixando em repouso durante 30 minutos. Em seguida, as soluções foram analisadas por espectrofotometria de absorção, medindo-se a absorbância em 700 nm (equipamento da marca Biospectro, modelo SP 220). Fez-se uma curva de calibração com ácido gálico nas concentrações de 0 a 50,0 µg.mL<sup>-1</sup>. A

equação da curva padrão de ácido gálico foi  $y = 0,01256 x + 0,05125$ , com  $R^2 = 0,999$ . Os resultados foram expressos em g de ácido gálico equivalente/100 g de amostra.

### 11.2.2 Determinação de Flavonóides Totais

A determinação do teor de flavonóides totais foi realizada, de acordo com Lees e Francis (1972). Utilizou-se 100,0 mg de cada extrato (ExMet e ExAc). A cada amostra, adicionou-se 30 mL de solução de álcool etílico e HCl 1,5 mol.L<sup>-1</sup> (85:15, v/v) e, após homogeneização por 1 minuto, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completado com a solução de etanol/HCl. Os balões contendo as soluções foram armazenados ao abrigo da luz pelo período de 16 horas. Depois, a amostra foi filtrada e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de absorção no comprimento de onda de 374 nm, previamente calibrado com a solução de etanol/HCl. Os resultados foram expressos em mg de flavonóides por 100 gramas de amostra.

$$FD = \frac{100 \times Vol(mL)}{M(g)}$$

Onde:

FD é Fator de Diluição;

Vol é volume da solução (mL);

M é a massa da amostra (g).

$$Flavonóides = \frac{|\times|FD \times Diluição}{76,6}$$

Onde:

Abs é absorvância;

Diluição é a quantidade de diluição da amostra;

76,6 é o Fator para determinação de flavonóides em 374 nm.

### 11.2.3 Determinação de Taninos Condensados

O teor de taninos condensados foi determinado empregando-se o método da vanilina, de acordo com o protocolo de Broadhurst e Jones (1978). Utilizou-se, separadamente, 100 mg de cada extrato (ExMet e ExAc) em 10 mL de acetona 70%. A



mistura foi agitada por 3 minutos e, em seguida, foi deixada em repouso por 60 minutos, repetindo-se este procedimento por mais duas vezes. Finalmente, a mistura foi centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi recolhido em um balão de fundo redondo. Ao resíduo sólido isolado na centrifugação, adicionou-se mais 10 mL de acetona 70%, agitou-se por 3 minutos e centrifugou-se a 4000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi adicionado ao balão de fundo redondo e a acetona foi rotoevaporada, sendo o líquido remanescente transferido para um balão volumétrico de 25 mL, cujo volume foi completado com metanol.

Em seguida, foi adicionado em tubos de ensaio, 5 mL de vanilina reagente (4g de vanilina, 56 mL de HCl concentrado Merck, 83 mL de metanol). Os tubos de ensaio contendo vanilina-reagente foram pré aquecidos a 30 °C por 30 minutos e, em seguida, adicionou-se 1 mL da solução de extrato, homogenizando-se a mistura. Em outros tubos de ensaio, preparou-se o branco da vanilina, adicionando-se 1 mL de metanol 72% ao invés da amostra. Manteve-se todos os tubos a 30 °C por 20 minutos e, depois, fez-se a leitura da absorvância em 510 nm (espectrofotômetro marca Biospectro, modelo SP 220), sendo o aparelho previamente calibrado com metanol 72%. Fez-se uma curva padrão com concentração de 0,02 a 0,16 mg.mL<sup>-1</sup>. A equação da curva padrão de catequina foi  $y = 0,02355 x + 0,00512$ , com  $R^2 = 0,998$ . Os resultados foram expressos em miligramas de catequina equivalente por 100 gramas de amostra.

#### 11.2.4 Determinação do Potencial Antioxidante pelo método de DPPH

O potencial antioxidante dos extratos (ExMet e ExAc) foi avaliado utilizando-se a reação dos mesmos com o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), sendo que o consumo deste radical no meio reacional foi detectado por espectrofotometria de absorção na região do visível, em comprimento de onda de 515 nm, de acordo com a metodologia descrita por Roesler et al. (2007). O padrão de referência utilizado foi o BHT (butil-hidroxil-tolueno).

As análises foram realizadas com o radical estável DPPH na concentração inicial de 36,0 µg.mL<sup>-1</sup> em metanol. Uma curva de calibração de DPPH foi construída nas concentrações de 1,0 a 36,0 µg.mL<sup>-1</sup>. A concentração da solução estoque de cada extrato (ExMet e ExAc) foi de 1520 µg.mL<sup>-1</sup>. As concentrações utilizadas para análise do ExMet foram: 15,2; 38,0; 76,0; 152,0; 380,0; 760,0 e 912,0 µg.mL<sup>-1</sup>. As concentrações utilizadas para análise do ExAc foram: 1,52; 3,80; 15,2; 38,0; 76,0 e 152,0 µg.mL<sup>-1</sup>.

Para análise, cada solução de extrato (300  $\mu\text{L}$ ) foi adicionada à 2,700  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH 36,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As soluções resultantes foram mantidas ao abrigo da luz por 30 min e, em seguida, fez-se a leitura da absorbância em 515 nm em um espectrofotômetro da marca Biospectro, modelo SP 220. A mesma metodologia foi aplicada ao padrão de BHT. Os resultados foram expressos em  $\text{EC}_{50}$  ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). O cálculo do  $\text{EC}_{50}$  (Concentração Equivalente a 50%) representou a concentração de extrato necessária para reduzir em 50% a quantidade de DPPH em solução.

### 11.3 Análises Espectrométricas

#### 11.3.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN $^1\text{H}$ )

As análises por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ , foram realizadas no espectrômetro Bruker Avance III (500,13 MHz), com campo aplicado de 11,74 Tesla. Os solventes utilizados foram  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$  e os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram obtidos em partes por milhão (ppm), utilizando-se como padrão de referência interna o tetrametilsilano, TMS ( $\delta=0,0$ ). As análises foram realizadas no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, bloco IQ-1, Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO.

#### 11.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLAE-EMAR)

Os extratos de mutamba (ExCMet, ExPMet, ExSMet e ExAc) (1  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) foram analisadas por CLAE-EMAR, utilizando-se Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000, Thermo Scientific, equipado com coluna ACE -C18 (4,6x100mm; 3 $\mu\text{m}$ ), acoplado a um espectrômetro de Massas de Alta Resolução Q-Exactive, Thermo Scientific, com fonte H-ESI (Ionização por Eletrospray), operando em modo negativo, com voltagem do spray 4 kV, gás de bainha 30, gás auxiliar 10, temperatura do capilar 350  $^{\circ}\text{C}$ , temperatura de gás auxiliar 300  $^{\circ}\text{C}$ , tube lens-55 e faixa de massas  $m/z$  150-700. A fase móvel utilizada, foi a mistura binária de  $\text{H}_2\text{O}$  com 0,1% de ácido fórmico (Fase móvel A, v/v) e metanol com 0,1% ácido fórmico (Fase móvel B – v/v), com programação de gradiente de 93:07 (A:B) - 70:30 (A:B) de 0-10 minutos; 70:30 (A:B) - 50:50 (A:B) de 10-15 minutos; 50:50 (A:B) - 30:70 (A:B) 15-18 minutos; 30:70 (A:B) -

20:80 (A:B) de 18-20 minutos; 20:80 (A:B) - 100 (B) de 20-23 minutos; 100 (B) de 23-26 minutos. A vazão da fase móvel foi  $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; a temperatura da coluna foi de  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ; o tempo de corrida foi 26 minutos; o volume de injeção foi de  $10 \text{ }\mu\text{L}$ .

A solução estoque de cada padrão foi preparada em metanol na concentração de  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A solução da mistura dos padrões foi preparada em metanol na concentração de  $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de cada padrão. As análises dos padrões e das amostras foram realizadas nas mesmas condições. Os padrões de compostos fenólicos utilizados foram: ácido gálico, ácido protocatequínico, ácido gentísico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, catequina, epicatequina, rutina, quercetina, quercetina 3-O- $\beta$ -glucosideo, naringenina, luteolina e kaempferol. Os dados foram processados no software Xcalibur™.

A análise foi realizada no laboratório do Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI), Alameda Flamboyant - Quadra K Edifício K1, Campus Samambaia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO.

#### **11.4 Ensaios Biológicos**

Ensaios de citotoxicidade foram realizados pelo método de MTT, produção de óxido nítrico (NO) e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) para diferentes linhagens celulares (macrófago de murino - RAW 264.7, fibroblasto de camundongo - NIH-3T3 e endotelial de aorta humana - EAHy 926), obtidas pela American Type Culture Collection (ATCC) e atividade antiinflamatória em célula de macrófago de murino - RAW 264.7, com os kits ELISA.

O detalhamento dos ensaios realizados está descrito nos subitens subsequentes.

##### **11.4.1 Cultura Celular**

As células da linhagens RAW 264.7, EAHy 926 e NIH-3T3 foram cultivadas em meio DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% (v:v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v:v) de solução de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e  $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de estreptomicina); e mantidas em incubadora (Thermo scientific, modelo 3130) úmida a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ .

#### 11.4.2 Viabilidade celular pelo método de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo)

O ensaio de MTT foi utilizado para determinar a viabilidade das células, nas diferentes concentrações dos extratos. A redução do MTT (de coloração amarela) a formazan (coloração roxa) é proporcional à atividade das desidrogenases, principalmente as mitocondriais e, conseqüentemente, à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Os extratos de mutamba secos (ExMet e ExAc - 1,0 mg) foram dissolvidos em DMSO (Dimetilsulfóxido P.A.) na concentração final de  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Para os ensaios de MTT, as amostras de extratos foram diluídas em meio de cultura suplementado nas concentrações: 6,25; 9,38; 18,75; 35,5; 50; 62,5; 125; 250 e  $500 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Os testes foram realizados em células semeadas em placas de cultivo de 96 poços nas concentrações de  $5 \times 10^4$  RAW-264.7;  $2 \times 10^4$  NIH-3T3;  $5 \times 10^4$  EAHy 926;  $2 \times 10^4$  células/mL, sendo adicionado  $200 \text{ } \mu\text{L/poço}$ . As placas contendo as células foram mantidas em estufa a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após esse período, foram adicionados  $200 \text{ } \mu\text{L/poço}$  de cada extrato (ExMet e ExAc) nas concentrações especificadas anteriormente. Depois de 24 horas, o meio teste de cada poço foi descartado e as células incubadas com uma solução de MTT ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  em PBS) a 10% em meio de cultivo suplementado por 3 horas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  em estufa úmida a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, a solução do MTT foi descartada e o formazan foi dissolvido com  $100 \text{ } \mu\text{L}$  de DMSO por poço. As placas foram analisadas em espectrofotômetro (Spectramax M2, Molecular Devices, EUA) e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 595 nm. Os resultados obtidos no ensaio de MTT para as duas amostras (ExMet e ExAc) foram comparados usando, como referência de células 100% viáveis, as células incubadas apenas com meio de cultura. Foram realizadas três repetições do experimento.

#### 11.4.3 Produção de EROs

A preparação das amostras ExMet e ExAc para os ensaios de produção de EROs consistiu em dissolver 3,0 mg do sólido em  $10 \text{ } \mu\text{L}$  de DMSO e  $2990 \text{ } \mu\text{L}$  de meio de cultura, adicionando-se cada extrato na concentração de  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

A determinação dos níveis de EROs intracelular, foi realizada utilizando o reagente CellROX® Green da sonda (Invitrogen, Life Techonoliges, Milão, Itália) de acordo com as instruções do fabricante.

Os ensaios foram realizados em placas de 12 poços utilizando as concentrações de células especificadas no item anterior, incubadas por 24 h, com os extratos (ExMet e ExAc) na concentração de  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em meio de cultura suplementado. No final de cada tratamento, o meio foi removido e recolhido, e adicionado o reagente CellROX® Green na concentração final de  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em meio de cultura com 2% de SFB. Após 40 minutos de incubação ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) no escuro, o meio foi descartado e as células recolhidas em um eppendorf, com o auxílio de tripsina, centrifugadas 2 vezes com PBS e levadas ao citômetro de fluxo (FACS Verse, BD) para análise. Foram realizados dois experimentos independentes e adquiridos 10.000 eventos para determinação das células com fluorescência (verde).

#### 11.4.4 Produção de Óxido Nítrico (NO)

O acúmulo de óxido nítrico (NO) em meio de cultura de células, foi determinado pelo método de Griess descrito por Wu e Yotnda, 2011. Para este estudo as células foram plaqueadas e tratadas de acordo com o item anterior (11.4.3). Após o tempo de incubação, o sobrenadante de cada poço foi coletado e realizado a quantificação do NO: 100  $\mu\text{L}$  de cada poço misturados com um volume igual de reagente de Griess (100  $\mu\text{L}$  de naftil-etilenodiamina e sulfanilamida em 5% ácido fosfórico) na placa de 96 poços, incubando-se no escuro por 10 min à temperatura ambiente. A absorbância da mistura foi medido a 540 nm, em um leitor de microplacas (Spectra Max, modelo M2). A concentração de NO foi determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) (faixa de trabalho: 10 a 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Cada tratamento foi realizado com duas repetições e os resultados finais foram expressos em  $\mu\text{M}$  de NO.

Os macrófagos (RAW 264) são células que participam do processo inflamatório nos organismos vivos (EPELMAN, LAVINE e RANDOLPH, 2014 ), assim, nos estudos realizados com estas células, foi adicionado LPS ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) como estímulo de inflamação (LEE, LEE e KIM, 2019). Após 24 h do plaqueamento das células nos poços, foi adicionado cada extrato na concentração de  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  e incubadas por 2h antes da adição da solução de LPS e incubados por 24 h para posterior determinação da quantidade de NO produzido.

#### 11.4.5 Produção de TNF- $\alpha$ e IL-10

Após 24 h do plaqueamento das células RAW-264 nos poços, foi adicionado os extratos na concentração de 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> e incubadas por 2 h. Após este tempo foi adicionado LPS (1  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) nos poços especificados e incubados por 24 h. O meio de cada poço foi recolhido, centrifugado a 2000 rpm por 5 min a 4 °C e o sobrenadante utilizado para a determinação de TNF- $\alpha$  e IL-10 com o Kit ELISA da BD Cat. 560478 e 555252, respectivamente.

#### 11.4.6 Análise Estatística

Fez-se a análise estatística para os resultados de produção de EROs, NO, TNF- $\alpha$  e IL-10 para verificação de diferenças estatísticas, usando Two way ANOVA (Graph Pad Prisma) e Teste de Tukey.

### **11.5 Determinação de toxicidade *in vivo* por bioensaio com *Artemia salina* e Análise qualitativa de cianeto**

O bioensaio com microcrustáceo *Artemia salina* é um método simples, econômico e rápido que permite a detecção de compostos potencialmente tóxicos ou com atividade biológica. Foram colocados 0,2 g de ovos de *Artemia salina* em 200 mL de solução de sal marinho a 3,5% sob aeração constante e iluminação por 48 horas, até a eclosão. Os nauplia eclodidos foram capturados individualmente com uma pipeta Pasteur e transferidos para um tubo de ensaio, contendo 1 mL de solução salina marinha a 3,5% (dez indivíduos por tubo). Extratos aquosos do fruto *Guazuma ulmifolia* (ExMet, ExAc, ExCMet, ExPMet e ExSMet) foram filtrados em membrana de celulose, 0,45 micrômetro, 25 mm de diâmetro (marca Millipore), em seguida, adicionados em diferentes concentrações aparente (20; 40; 60; 80 e 100  $\mu$ L), para tubos de ensaio contendo culturas de *Artemia*, em quantidades não superiores a 100  $\mu$ L, o que é equivalente a 10% do volume total no tubo de ensaio. Um maior volume do extrato poderia alterar, significativamente, a concentração de sal e nutrientes na cultura, afetando, provavelmente, a sobrevivência de *Artemia*, o que representaria uma fonte adicional de erro nos experimentos (falso positivo). Os experimentos foram realizados

em triplicata. Três tubos de ensaio contendo 1 mL de culturas de *Artemia salina*, foram utilizados como controle, contendo 100 µL de água destilada cada um, uma vez que todos os extratos foram preparados com água destilada em purificação de toxinas. Após 24 horas de incubação, indivíduos vivos e mortos foram contados para o cálculo da porcentagem de sobrevivência. As curvas dose-resposta foram construídas e a resposta dose-letal 50 (DL<sub>50</sub>) foi calculada a partir da equação do ajuste logarítmico (MEYER et al., 1982 adaptado por FONSECA et al., 2013).

A presença de ácido cianídrico nas sementes foi avaliada, usando o teste de Guignard específico, com base na formação de vermelho isopurpurato alcalino da reação de cianeto com picrato de sódio (COSTA, 2001). Um total de 0,1 g de cada extrato (ExMet, ExAc, ExSMet, ExPMet e ExCMet) foi colocado, separadamente, em um frasco de Erlenmeyer contendo 10 mL de água. Uma tira de papel de filtro com aproximadamente 1 cm de largura umedecido, inicialmente, com solução de ácido pícrico a 1% e, depois, com solução de carbonato de sódio 10%, foi colocada na borda do Erlenmeyer e suspenso sobre a amostra por, aproximadamente, duas horas. O desenvolvimento de uma cor vermelha na superfície do papel indica a presença de cianeto na amostra. O teste de Guignard é uma técnica qualitativa que permite confirmar a presença ou não de cianetos em extratos. Caso os cianetos sejam identificados em algum extrato, sua concentração pode ser facilmente calculada, usando um padrão de cianeto de potássio.

## **11.6 Nanoencapsulação do extrato de *Guazuma ulmifolia* (mutamba) em PLGA**

A nanoencapsulação do extrato de *Guazuma ulmifolia* foi caracterizada mediante morfologia por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET); foi verificado o tamanho das nanopartículas, avaliando-se o Diâmetro hidrodinâmico de Intensidade (Dh<sup>I</sup>), de Número (Dh<sup>N</sup>) e Médio (Dh<sup>M</sup>), e avaliando-se o Índice de polidispersão das mesmas (PdI), por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Fez-se também a análise da eficiência de encapsulação do extrato ExAc.

### **11.6.1 Obtenção de nanopartículas de PLGA/ExAc**

O extrato de acetato de etila (ExAc) foi encapsulado em PLGA, empregando-se o método da emulsão-evaporação do solvente descrito por Gomes, Moreira e Castell-

Perez (2011), com algumas modificações. O procedimento consistiu, inicialmente, da preparação da fase orgânica, a partir da dissolução de 50,0 mg de PLGA<sub>50:50</sub> (38-54 kDa) e 5,0 mg de ExAc em 2,0 mL de diclorometano. A fase aquosa foi constituída de 0,100 g de PVA dissolvido em 20,0 mL de água deionizada. A fase orgânica foi adicionada à fase aquosa, gota a gota, sob agitação magnética de 1000 rpm ((Ika®, modelo RCT basic). Após adição da fase orgânica, a mistura foi emulsificada por 4 min, utilizando um dispersor Ultra-Turrax (Ika®, modelo T10 basic). A emulsão foi sonicada (Sonicador de ponteira ultrassônico, marca Eco-Sonics, modelo Q350 W) por 5 minutos. Todo o procedimento foi conduzido em banho de gelo (5 °C, aproximadamente). O diclorometano foi rotoevaporado e, em seguida, uma alíquota de 200 µL da suspensão aquosa foi coletada para caracterização por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). A suspensão de nanopartículas foi centrifugada a 10.000 rpm (centrífuga Sigma, modelo 3-30KS) durante 15 minutos para remoção do excesso de surfactante (PVA). O sólido resultante foi lavado três vezes com água deionizada e, a cada lavagem, a suspensão foi centrifugada. Ao final, o sólido foi congelado e liofilizado (Liofilizador LIOTOP, modelo L101) por 24 h. Após a liofilização, as amostras foram armazenadas no congelador a -20 °C para serem utilizadas, posteriormente, nos experimentos de determinação de eficiência de encapsulação e perfil de liberação. Este procedimento foi realizado em triplicata. Nanopartículas de PLGA, sem adição de ExAc, também foram obtidas e caracterizadas para fins de comparação.

#### 11.6.2 Caracterização das nanopartículas de PLGA/ExAc

As medidas de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão de diâmetro das nanopartículas suspensas em água deionizada foram realizadas na temperatura de 25 °C, utilizando o equipamento ZetasizerNano-ZS, modelo ZEN3600 da marca Malvern. As medidas foram realizadas em amostras contendo 200 µL da suspensão de nanopartículas diluídas em 2 mL de água deionizada. A estabilidade das suspensões de nanopartículas foi avaliada durante 30 dias.

O diâmetro hidrodinâmico, foi calculado através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), também conhecida como Espectroscopia de Correlação de Fótons. Partículas dispersas em um meio líquido, ao serem irradiadas com a luz de um laser ( $\lambda = 532$  nm), espalham luz e, devido ao movimento browniano das partículas no



meio, ocorrem flutuações na intensidade da luz espalhada. Essas flutuações estão relacionadas à velocidade com que as partículas se movem, o que pode ser expresso pelo coeficiente de difusão translacional, que é inversamente proporcional ao tamanho das partículas, de acordo com a equação de Stokes-Einstein, apresentada abaixo (SHAW, 1975):

$$D_h = \frac{K_B T}{3\pi\eta D_t}$$

Na qual,

$D_h$  é o diâmetro hidrodinâmico;

$D_t$  é o coeficiente de difusão translacional;

$K_B$  é a constante de Boltzmann;

$T$  é a temperatura;

$\eta$  é a viscosidade dinâmica.

A amostra de nanopartículas de PLGA/ExAc foi examinada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizando o microscópio eletrônico JEOL, JEM-2100 equipado com EDS (Energy Dispersive Spectrometry), Thermo Scientific, operando a 200 kV. Esta técnica permitiu a determinação do diâmetro médio das nanopartículas e o índice de polidispersão de tamanhos, assim como a morfologia. As medidas foram realizadas em amostras contendo 200  $\mu$ L da suspensão de nanopartículas diluídas em 2 mL de água deionizada. A suspensão foi depositada sobre uma placa de cobre com filme de carbono de marca Electron Microscopy Science. O acetato de uranila foi utilizado como agente de contraste.

O diâmetro das nanopartículas (Np-ExAc) foi medido pela análise das micrografias obtidas, com o emprego do software ImageJ®. O histograma de tamanho foi construído, medindo-se o diâmetro de 300 nanopartículas, sendo que os dados foram ajustados por uma curva LogNormal, a partir da qual foram obtidos os valores de diâmetro médio e índice de polidispersão.

### 11.6.3 Eficiência de Encapsulação do ExAc em PLGA

Para determinação da eficiência de encapsulação (EE), as nanopartículas liofilizadas Np-ExAc, foram suspensas em 5 mL de clorofórmio e mantidas em agitação

magnética por 72 h, na ausência de luz. As amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada (RC) (marca KASVI, modelo K18-230, poro tamanho 0,2  $\mu\text{m}$ ) para remoção dos polímeros. As amostras foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, sendo o volume completado com clorofórmio. Uma solução estoque de Ex-Ac em clorofórmio (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi preparada, e a partir desta, foram feitas diluições em balões de 10 mL, obtendo-se soluções nas concentrações de 0,010; 0,025; 0,0375; 0,050; 0,075; 0,100; 0,125; 0,150; 0,175; 0,200 e 0,250  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , as quais foram utilizadas para construção de uma curva de calibração. A absorbância dessas soluções e da amostra extraída das nanopartículas de PLGA foi medida em 279 nm, em um espectrofotômetro (Perkin Elmer, modelo Lambda 45), em cubetas de quartzo com 10 mm de caminho ótico. A quantidade de extrato encapsulado nas nanopartículas foi calculada a partir desta curva de calibração. A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada conforme a equação abaixo (GOMES, MOREIRA e CASTELL-PEREZ, 2011):

$$EE = \frac{\textit{Quantidade de Composto Ativo Aprisionado}}{\textit{Quantidade Inicial de Composto Ativo}} \times 100$$

## **CAPÍTULO 4**

### **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

## 12 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos para os extratos do fruto de *Guazuma ulmifolia*, dentre eles: caracterização química (compostos fenólicos totais, flavonóides totais, taninos condensados, potencial antioxidante); espectros de Ressonância Magnética Nuclear de prótons (RMN  $^1\text{H}$ ) dos extratos; identificação dos compostos fenólicos por CLAE-EMAR; ensaios biológicos (viabilidade celular, produção de EROs, produção de NO, produção de TNF- $\alpha$  e IL-10), ensaio toxicológico com *Artemia salina*, análise qualitativa de cianeto; além da caracterização das nanopartículas de extrato de acetato de etila (Np-ExAc): morfologia por MET; teste de estabilidade durante 30 dias por DLS (diâmetro hidrodinâmico médio ( $D_h^M$ ) e índice de polidispersão (PdI); eficiência de encapsulação (EE%).

### 12.1 Rendimento dos Extratos dos Frutos de Mutamba

A partir de 6000,00 g de fruto de mutamba *in natura*, obteve-se 4294,23 g de fruto liofilizado, o que corresponde a 71,57% do fruto *in natura*. O total da massa obtida após a liofilização dos frutos, foi utilizado para preparar o extrato metanólico (ExMet), obtendo-se 421,40 g (não liofilizado), ou seja, 9,81% do fruto liofilizado. O extrato de acetato de etila (ExAc) (liofilizado) foi obtido a partir do ExMet, e representou 0,073% do fruto liofilizado. A Tabela 4 resume esses resultados.

O rendimento da extração dos compostos de plantas, sofre influência das condições em que o processo de extração é realizado (WONGKITTIPONG et al., 2004). Aspectos como: tipo do solvente, temperatura de extração, ação mecânica (agitação e pressão), matriz vegetal formada por estrutura complexa, estrutura molecular do soluto, tamanho, localização e ligação com outros componentes, tudo isso influencia no rendimento do extrato. As características químicas do solvente, a estrutura e composição diversas do produto natural, atestam que cada sistema material-solvente mostra comportamento próprio, o que não pode ser previsto com facilidade (PINELO et al., 2004).

**Tabela 4:** Rendimento percentual dos frutos liofilizados, do extrato metanólico (ExMet) e do extrato de acetato de etila (ExAc) dos frutos de *Guazuma ulmifolia*.

<b>Produtos</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	
Fruto Fresco	6000,00	100,00	
Fruto Liofilizado	4294,23	71,57	
ExMet	421,40	9,81	
	<b>Massa ExMet (g)</b>	<b>Massa ExAc (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
ExAc	90,00	3,15	0,073

## 12.2 Caracterização Química dos Extratos do Fruto de Mutamba

Os teores de compostos fenólicos totais (CFT), flavonóides totais (FT), taninos condensados (TC) e o potencial antioxidantes dos extratos metanólico (ExMet) e de acetato de etila (ExAc) dos frutos de mutamba foram avaliados e estão apresentados na Tabela 5. Os resultados apresentados indicam que o extrato de acetato de etila (ExAc) mostrou-se enriquecido em compostos fenólicos totais e flavonóides totais, comparado com o extrato metanólico (ExMet), o que pode estar relacionado com o tipo de solvente utilizado. Neste caso o acetato de etila, resultou em uma mistura mais concentrada de compostos de média polaridade do que o metanol, fato que é comprovado nos espectros Ressonância Magnética Nuclear (RMN  $^1\text{H}$ ), os quais mostram uma maior intensidade de sinal na região dos hidrogênios aromáticos (6,5-8,0 ppm) para o espectro do extrato ExAc, o qual será apresentado mais adiante (Figura 17). Já o teor de taninos condensados foi maior para o extrato ExMet, indicando que esses compostos tiveram maior afinidade com o metanol.

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos dos frutos de mutamba estudados neste trabalho (ExMet e ExAc foram de 2145,0 e 5292,6 mg/100g de extrato, respectivamente), mostrou-se maior que o do extrato (metanol/acetona/água deionizada) dos frutos (polpa e semente) estudados por Pereira e colaboradores (2020), o qual apresentou 166,43 mg/100g de peso seco, dado obtido por CLAE-EMAR-ESI-MS/MS. A diferença pode estar relacionada com a presença da casca dos frutos, uma vez que os extratos ExMet e ExAc foram feitos a partir dos frutos inteiros.

Os teores de compostos fenólicos totais, flavonóides totais e taninos condensados da casca de caule, folhas e frutos de *G. ulmifolia* foram determinados espectrofotometricamente, por outros autores. O fruto mutamba mostrou um teor de CFT (2300 mg/100g peso seco) e TC (1200 mg/100g peso seco) (ROJAS-HERNANDEZ et al., 2015). Extratos das folhas apresentaram altos teores de CFT e FT,

com valores variando de 7800 a 24000 mg/100 g de extrato e 81 a 3250 mg/100 g de extrato, respectivamente (DOS SANTOS et al., 2018; MORAIS et al., 2017). A parte da planta que apresentou teor de CFT mais alto foi a casca do caule (variando de 16000 a 46930 mg/100 g extrato) (DOS SANTOS et al., 2018; FELTRIN et al., 2012; SEREIA et al., 2019), enquanto o FT (variou de 1290 a 2940 mg/100 g de extrato) foi semelhante ao extrato de folhas (DOS SANTOS et al., 2018; FELTRIN et al., 2012). A triagem fitoquímica preliminar por análise espectrofotométrica, indicou que as partes das árvores de *G. ulmifolia* contêm metabolitos secundários, principalmente, compostos fenólicos, o que foi também comprovado neste trabalho. Os dados apresentados para os extratos ExMet e ExAc estão dentro do relatado na literatura, para as partes da planta *G. ulmifolia*.

O ExAc apresentou maior potencial antioxidante ( $EC_{50} = 67,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do que o ExMet ( $EC_{50} = 147,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), indicando uma relação positiva com o teor de compostos fenólicos. De um modo geral, os extratos alcoólicos das folhas de *Guazuma ulmifolia* apresentaram maior potencial antioxidante do que o extrato metanólico dos frutos (ExMet) obtido no presente trabalho, enquanto que o extrato de acetato de etila (ExAc) não diferiu, muito, do extrato das folhas a esse respeito. Por exemplo, Moraes e colaboradores (2017) encontraram  $EC_{50}$  para o extrato etanólico das folhas ( $119,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), cerca de 12 vezes maior do que o controle (quercetina,  $10,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Já Navarro e colaboradores (2003) encontraram, para o extrato metanólico das folhas, valor de  $EC_{50}$  ( $50,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) 21 vezes maior do que o do controle (ácido ascórbico,  $2,34 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Porém, observa-se que os valores de  $EC_{50}$  variam, consideravelmente, em diferentes trabalhos, por exemplo, um estudo realizado por Kaneria e colaboradores (2009) apresenta valores de  $EC_{50}$  maiores; respectivamente,  $655 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $> 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (controle de ácido ascórbico,  $11,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para os extratos metanólico e de acetato de etila das folhas de *G. ulmifolia*.

**Tabela 5:** Teores de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoide totais (FT), taninos condensados (TC) e o potencial antioxidante dos extratos metanólico (ExMet) e de acetato de etila (ExAc) dos frutos de *Guazuma ulmifolia*. Os dados são apresentados como valor médio  $\pm$  DP.

Amostras	Parâmetro	Quantificação
ExMet		2145,0 $\pm$ 33,15
ExAc	CFT (mg de AGE/100 g de extrato)	5292,6 $\pm$ 174,6
ExMet		264,87 $\pm$ 53,56
ExAc	FT (mg de flavonóides/100 g de extrato)	546,02 $\pm$ 72,97
ExMet		729,05 $\pm$ 31,09
ExAc	TC (mg de CE/100 g de extrato)	557,67 $\pm$ 25,54
ExMet		147,6 $\pm$ 3,6
ExAc		67,63 $\pm$ 4,81
BHT	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> )	6,28 $\pm$ 0,00

CFT: Compostos Fenólicos Totais; AGE: Ácido Gálico Equivalente; FT: Flavonóides Totais; TC: Tanino Condensado; DP: desvio padrão; EC<sub>50</sub>: Concentração necessária para obter um efeito antioxidante de 50%.

Os teores de compostos fenólicos totais, flavonóides totais e o potencial antioxidante dos extratos de metanólicos de acetato de etila do fruto de mutamba, são comparados com extratos metanólicos de morango e acerola, por serem frutas muito conhecidas e consumidas por toda a população no Brasil. E, também, são comparados com a gabirola, um fruto do Cerrado bem mais conhecido e estudado que a mutamba. O intuito de tais comparações, é que os resultados sirvam de subsídio para comprovação do alto potencial do fruto da mutamba, em relação ao teor de compostos fenólicos totais.

Comparando-se o teor de compostos fenólicos do ExMet (2145,0 mg AGE/100g amostra) determinado neste trabalho, com os dados dos extratos metanólicos de morango (178,56 mg AGE/100g amostra) e da acerola (675,73 mg AGE/100g amostra) estudados por Batiston e colaboradores (2013), nota-se que o extrato da mutamba apresenta maior teor de compostos de fenólicos. O teor de compostos fenólicos nos extratos dos frutos da mutamba (ExMet e ExAc) também foi maior em relação ao dos extratos hidroalcoólicos (70%) da polpa da gabirola (324,8 mg AGE/100 g para polpa) (FERNANDES et al., 2015) (Tabela 6). O alto teor de fenólicos da mutamba pode estar

relacionado com o fato dos extratos terem sido obtidos a partir da totalidade dos frutos, inclusive a casca.

Ao se comparar o potencial antioxidante dos extratos dos frutos (ExMet e ExAc) com os resultados dos extratos metanólicos de acerola e morango (Tabela 6), relatados nos estudos de Batiston et al. (2013), observa-se que o extrato de acerola ( $EC_{50} = 24,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresenta maior capacidade antioxidante do que os extratos ExMet e ExAc, podendo este resultado estar relacionado com a presença de outros compostos que apresentam essa característica como, por exemplo, a vitamina C (PELUZIO, ROSA e OLIVEIRA, 2010). Já o extrato de morango ( $EC_{50} = 181,38 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresenta potencial antioxidante similar ao encontrado para o ExMet.

O extrato dos frutos de *Guazuma ulmifolia* (ExMet) apresentou potencial antioxidante semelhante ao encontrado para o extrato hidroalcolico da polpa de gabirola, *Campomanesia adamantium* ( $EC_{50} = 130,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; controle quercitina,  $EC_{50} = 3,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (FERNANDES, 2015), como pode ser visto na Tabela 6.

De modo geral, em extratos de produtos naturais, há uma relação positiva entre o potencial antioxidante e o teor de compostos fenólicos (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996; DORMAN et al., 2003).

**Tabela 6:** Teor de compostos fenólicos totais (CFT) e o potencial antioxidante de extratos de algumas espécies de plantas frutíferas, para comparação.

<b>Extrato</b>	<b>CFT (mg AGE/100 g de amostra)</b>	<b>Autores (Ano)</b>
Acerola ( <i>Malpighiae marginata</i> ) (F)	675,73±3,40	Batiston et al. (2013)
Morango ( <i>Fragaria vesca</i> ) (F)	178,56±3,40	Batiston et al. (2013)
Gabirola ( <i>Campomanesia adamantium</i> ) (P)	324,8±8,5	Fernandes et al. (2015)
ExMet ( <i>Guazuma ulmifolia</i> )	2145,0±33,15	-
ExAc ( <i>Guazuma ulmifolia</i> )	5292,6±174,6	-
<b>Extrato</b>	<b>EC<sub>50</sub> (μg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Autores (Ano)</b>
Acerola ( <i>Malpighiae marginata</i> ) (F)	24,48±0,27*	Batiston et al. (2013)
Morango ( <i>Fragaria vesca</i> ) (F)	181,38±3,66*	Batiston et al. (2013)
Gabirola ( <i>Campomanesia adamantium</i> ) (P)	130,4±3,5	Fernandes et al. (2015)
ExMet ( <i>Guazuma ulmifolia</i> )	147,6±3,6	-
ExAc ( <i>Guazuma ulmifolia</i> )	67,63±4,81	-

\*Sem controle positivo. P = Polpa; F = Fruta.



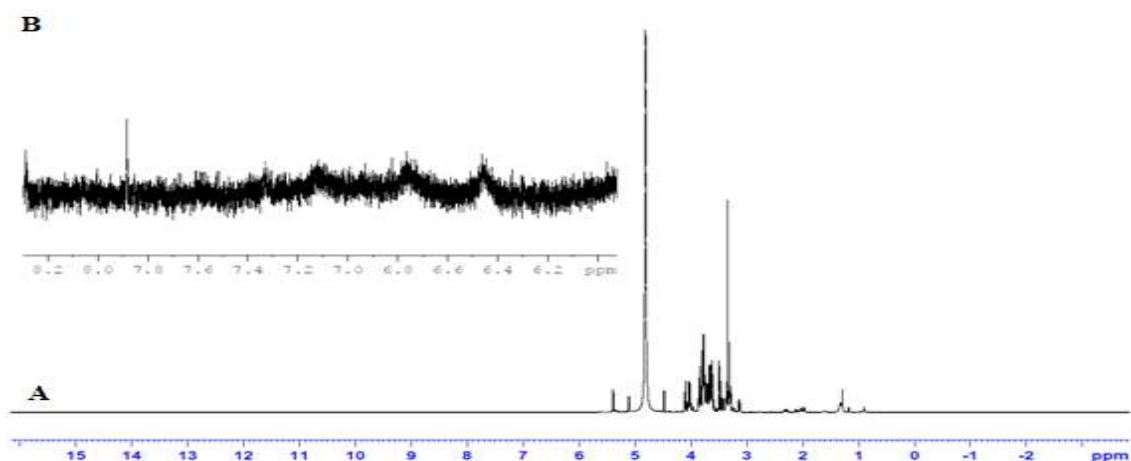
### 12.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLAE-EMAR)

Os dados fitoquímicos apresentados acima, foram confirmados através de técnicas analíticas modernas, como RMN e CLAE-EMAR, constatando-se a presença de compostos fenólicos nos extratos (ExMet e ExAc) dos frutos de *G. ulmifolia*.

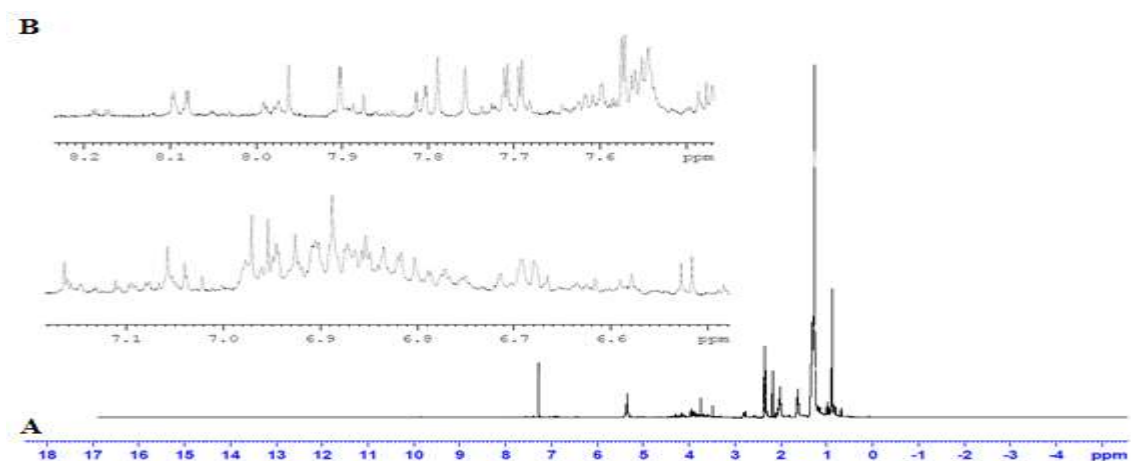
Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  do extrato metanólico (ExMet) e do extrato de acetato de etila (ExAc) foram analisados e estão apresentados nas Figuras 16 e 17. O espectro do ExMet é complexo, com sinais em toda região espectral, podendo-se destacar as regiões de 6,5 a 8,0 ppm (intensidade relativa muito baixa), de 3,0 a 5,0 ppm (intensidade relativa alta) e de 0,5 a 2,5 ppm (intensidade baixa). A região de 3,0 a 5,0 ppm é típica dos açúcares, nos quais aparecem os hidrogênios anoméricos (~5,0 ppm) e os hidrogênios ligados a carbonos metoxime-tínicos. Na região de 0,8 a 2,5 ppm ocorrem os hidrogênios metílicos e metilênicos ( $\text{CH}_3, \text{CH}_2$ ), que podem estar presentes, tanto em cadeias carbônicas alifáticas, como em compostos terpênicos. A partir da análise das intensidades relativas dos sinais, nas diferentes regiões de deslocamento químico, conclui-se que o extrato metanólico do fruto da mutamba contém compostos fenólicos, corroborando o resultado da análise química de CFT (Tabela 5), porém há predomínio de açúcares (açúcares livres e/ou em compostos glicosilados).

O perfil do espectro do extrato de acetato de etila (ExAc) (Figura 17), em comparação com o extrato metanólico (ExMet), indica que o primeiro se apresenta enriquecido em compostos fenólicos em relação aos açúcares (3,0 a 5,0 ppm), apresentando maior intensidade de sinais na região dos hidrogênicos aromáticos (6,5 a 8,0 ppm). Também se observa uma maior intensidade relativa dos sinais dos hidrogênios metílicos e metilênicos, comparado aos sinais dos açúcares, assim como sinais mais intensos na região de 5,3 ppm, o que pode estar relacionado à presença de ácidos graxos de cadeia longa.

**Figura 16:** A) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) do extrato metanólico (ExMet) e B) A expansão na região dos hidrogênios aromáticos.

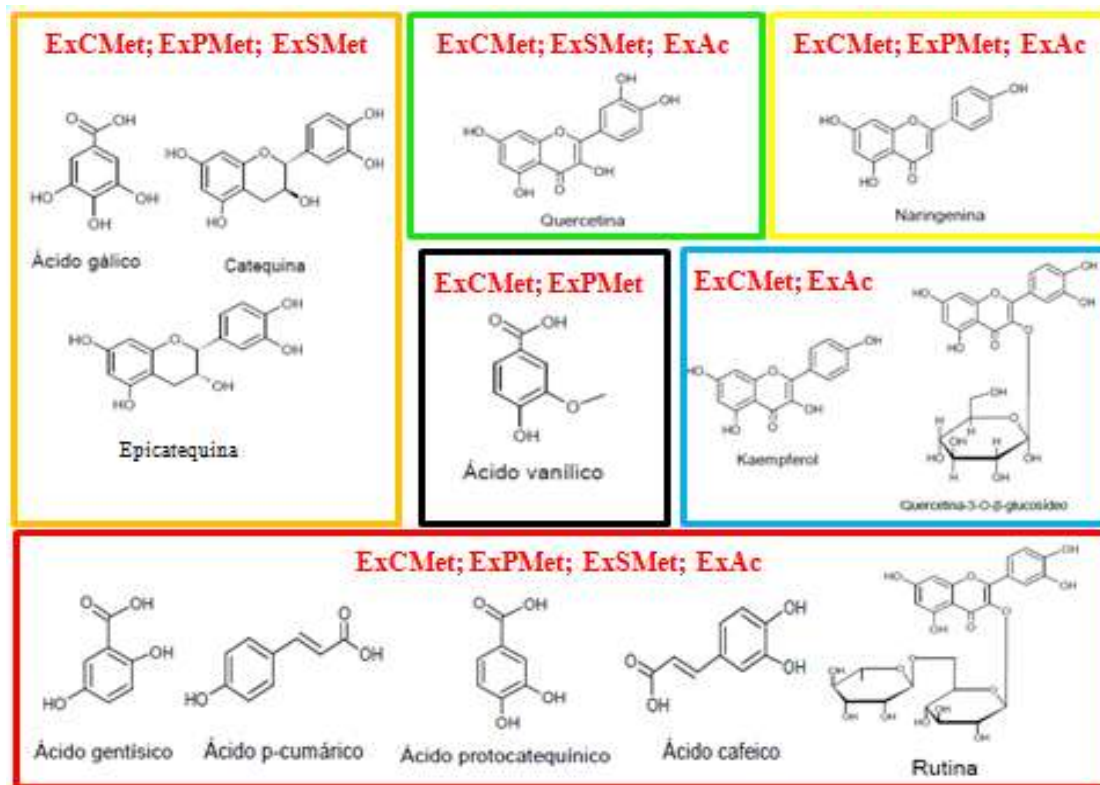


**Figura 17:** A) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do extrato de acetato de etila (ExAc) e B) A expansão da região dos hidrogênios aromáticos.



Os extratos metanólicos da casca (ExCMet), polpa (ExPMet), semente (ExSMet) e o extrato de acetato de etila do fruto inteiro (ExAc), foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa de Alta Resolução (CLAE-EMAR), H-ESI modo negativo, com o objetivo de analisar compostos fenólicos, nos quais são capazes de desprotonar. Foram identificados 13 compostos fenólicos, conforme apresentado na Figura 18. A identificação foi feita por comparação com o íon molecular e tempo de retenção dos padrões, como descrito na parte experimental. As tabelas (Tabela 8 a 11) dos compostos identificados e os cromatogramas (Figura 29 a 62) de cada composto estão em anexo.

**Figura 18:** Estruturas químicas dos composto fenólicos encontrados nos extratos ExCMet, ExPMet, ExSMet e ExAc.



Dos compostos fenólicos comuns a todos os extratos, a maioria foi de ácidos fenólicos: ácido gentísico, ácido p-cumárico, ácido protocatequínico, ácido cafeico, além de um flavonóide, a rutina. Esse último composto é reconhecido por seu potencial antioxidante e por apresentar atividade anti-inflamatória (FRUTOS, RINCÓN-FRUTOS e VALERO-CASES, 2019); de modo geral, os ácidos fenólicos apresentam alto potencial antioxidante (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

A quercetina está presente nos extratos ExCMet, ExSMet e ExAc, não sendo identificada no extrato da polpa do fruto de mutamba. Enquanto que a naringenina, foi identificada nos extratos ExCMet, ExPMet e ExAc e não foi identificada no extrato de semente.

O ácido gálico, catequina e epicatequina foram encontrados nos extratos metanólicos da casca, polpa e semente dos frutos de mutamba e não no ExAc. Podendo-se supor que esses compostos são mais solúveis no metanol do que no acetato de etila.

O kaempferol e a Quercetina 3-O-β-glucosídeo estão presentes no extrato metanólico da casca e no ExAc. Já o ácido vanílico está presente no extrato metanólico da casca e da polpa da mutamba. Estudos recentes, reportaram a presença de 26

compostos fenólicos nos frutos (polpa e semente) de *Guazuma ulmifolia*, como relatado anteriormente. Dentre eles, os compostos apresentados acima neste trabalho, com exceção do ácido vanílico (PEREIRA et al., 2020).

#### 12.4 Teste de Viabilidade Celular

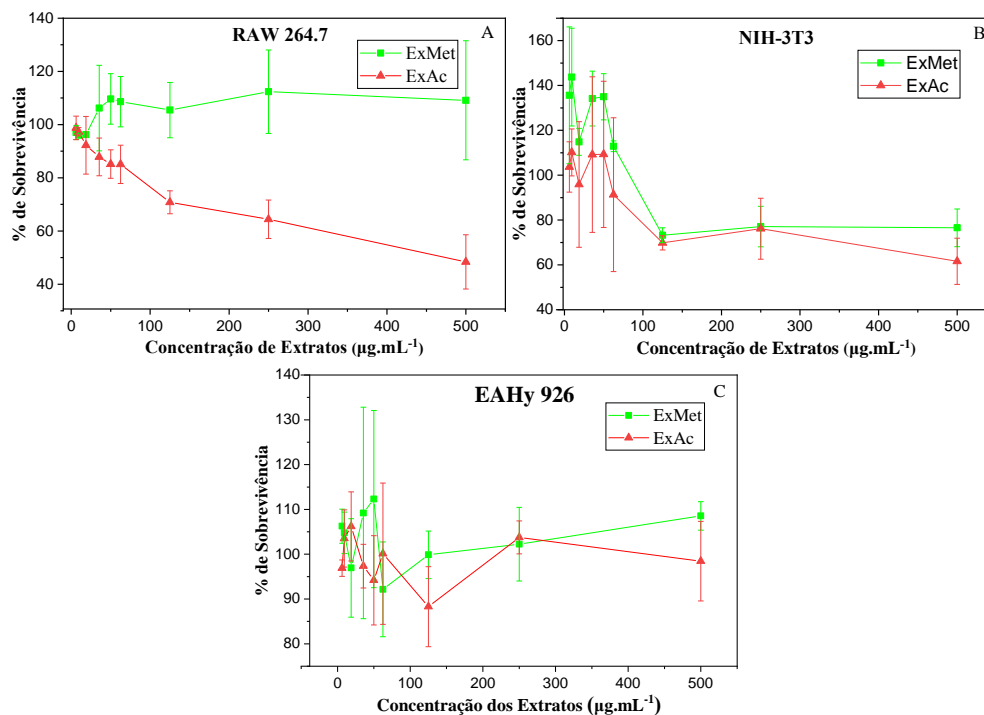
Fazendo coro a muitos outros autores, Morais-Braga, et al., (2013), enfatiza que a pesquisa com produtos naturais é uma interessante alternativa na busca por novos fármacos. É essencial a realização do teste de toxicidade, para avaliar prováveis efeitos tóxicos aos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES e FORBES, 1994). Os resultados deste teste podem gerar informações importantes para triagem das condições de aproveitamento de produtos naturais, considerados prováveis candidatos a fármacos (MORAIS-BRAGA et al., 2013).

As três células empregadas (macrófagos de murino, RAW 264.7, fibroblastos de camundongo, NIH-3T3 e endotelial de aorta humana, EAHy 926) nesta pesquisa, são componentes do sistema imune inato, e todas apresentam respostas inflamatórias, por isso foram escolhidas para verificação, tanto o efeito tóxico, quanto do efeito inibitório de mediadores do processo inflamatório.

Os resultados obtidos nos testes de viabilidade celular para os três tipos de células empregados (macrófagos de murino, RAW 264.7, fibroblastos de camundongo, NIH-3T3 e endotelial de aorta humana, EAHy 926), para diferentes concentrações dos extratos ExMet e ExAc, estão apresentados na Figura 19.

Os resultados mostram que o extrato ExMet não exerceu efeito citotóxico sobre os macrófagos (Figura 19A), em nenhuma das concentrações testadas. Já o extrato ExAc apresentou baixa citotoxicidade, na maior concentração testada ( $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com 48,37% de células viáveis. Sabe-se que a morte celular por apoptose é modulada pelo estresse oxidativo e que as substâncias antioxidantes atuam na sua prevenção (CHANDRA et al., 2000). Os antioxidantes podem desempenhar um papel modulador da ocorrência de apoptose em macrófagos (MOORE e TABAS, 2011; TABAS e RON, 2011). Desta forma, é possível que a toxicidade dos extratos frente aos macrófagos, esteja relacionada à presença de antioxidantes nos extratos testados.

**Figura 19:** Resultados de viabilidade celular do extrato metanólico de mutamba (ExMet) e do extrato de acetato de etila (ExAc). A)- Células RAW 264.7; B)- Células NIH-3T3 e C)- Células EAHy 926.



O teste MTT com fibroblasto de camundongo (Figura 19B), mostrou uma diminuição expressiva da viabilidade celular, a partir da concentração de  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , tanto para ExMet, quanto para ExAc. Na concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , obteve-se 76,02% de células viáveis para a amostra ExMet e 51,71% para ExAc, porém não há diferença estatística entre os extratos nessa concentração, ao nível de significância de 5%. Segundo Ratner e colaboradores (2004), os fibroblastos são células encontradas no tecido conjuntivo de mamíferos e são, geralmente, escolhidos para testes de citotoxicidade, porque são fáceis de manter e produzir resultados, mostrando alta correlação com os resultados biológicos "in vivo". Os fibroblastos estão presentes em feridas e constituem o principal tipo de célula implicado no processo de regeneração celular. Estudos realizados por Calixto-Júnior e colaboradores (2016) com fibroblastos de murinos, mostraram resultados da atividade citotóxica para os produtos naturais de três espécies estudadas, dentre elas, a *Guazuma ulmifolia*. O extrato etanólico das folhas de *G. ulmifolia* exibiu alta citotoxicidade na concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  com apenas 30% de células viáveis, ou seja, apresentou maior efeito tóxico do que os extratos estudados neste trabalho.

As amostras ExMet e ExAc não apresentaram efeito citotóxico para as células endoteliais da aorta humana (Figura 19C) nas concentrações testadas. Segundo Hirase e

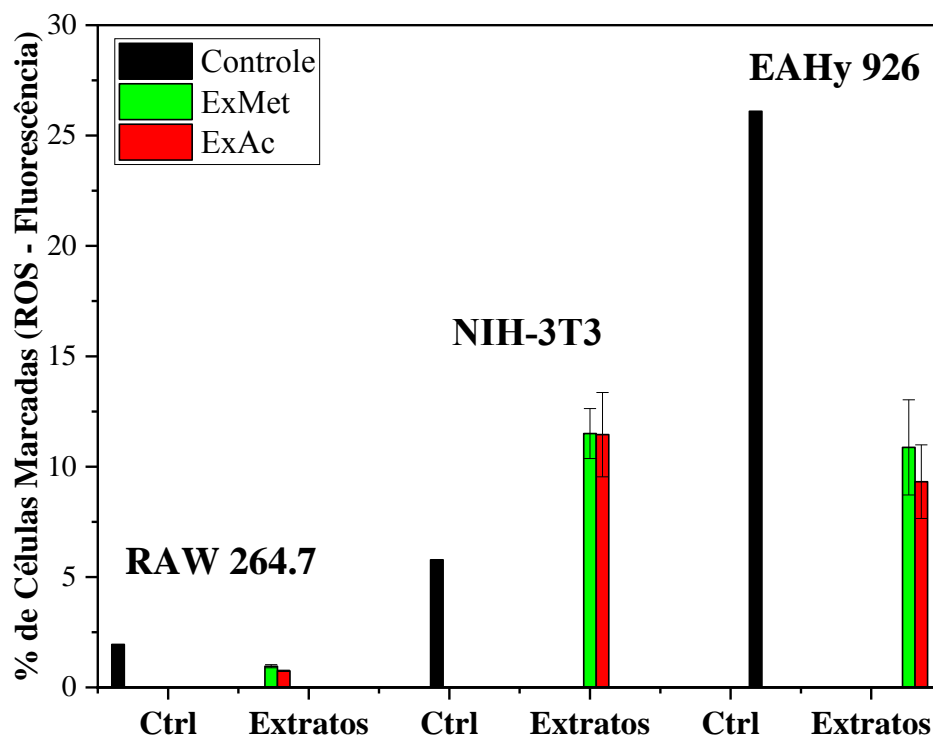
Node (2012), o endotélio vascular reveste a superfície interna dos vasos sanguíneos, formando uma barreira entre o sangue e os tecidos. As células endoteliais que o constituem, não apresentam apenas função estrutural, mas, são capazes de responder a um estresse fisiológico e desempenham papel importante na manutenção da integridade da parede, por meio da regulação do tônus, da permeabilidade, do remodelamento, da inflamação e da trombo-resistência vasculares.

### **12.5 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Óxido Nítrico (NO)**

Durante o processo de inflamação, ocorre a produção de EROs e NO, por células do sistema imune, os quais podem gerar danos irreversíveis ao organismo, caso não sejam controlados. Torna-se importante, assim, analisar a ocorrência desses mediadores químicos em células, bem como criar formas de controlar sua produção. Em função desta importância, foi analisado o provável efeito provocado pelos extratos dos frutos de mutamba nos três tipos de células. O resultado foi apresentado abaixo.

A produção de EROs pelas células, após incubação com extratos de mutamba, pode ser observada na Figura 20 para as células RAW 264-7, NIH-3T3 e EAHy 926. É possível observar que ambos os extratos de mutamba (ExMet e ExAc) não alteraram a produção de espécies reativas de oxigênio, no ensaio realizado com as células RAW 264.7 em comparação ao controle, não havendo diferença ao nível de significância de 5%. Para a célula EAHy 926, ambos os extratos reduziram a produção de EROs e diferiram do controle ( $p < 0,05$ ), apresentando uma relação do potencial antioxidante com a inibição da produção de EROs. Não houve efeito para células NIH-3T3.

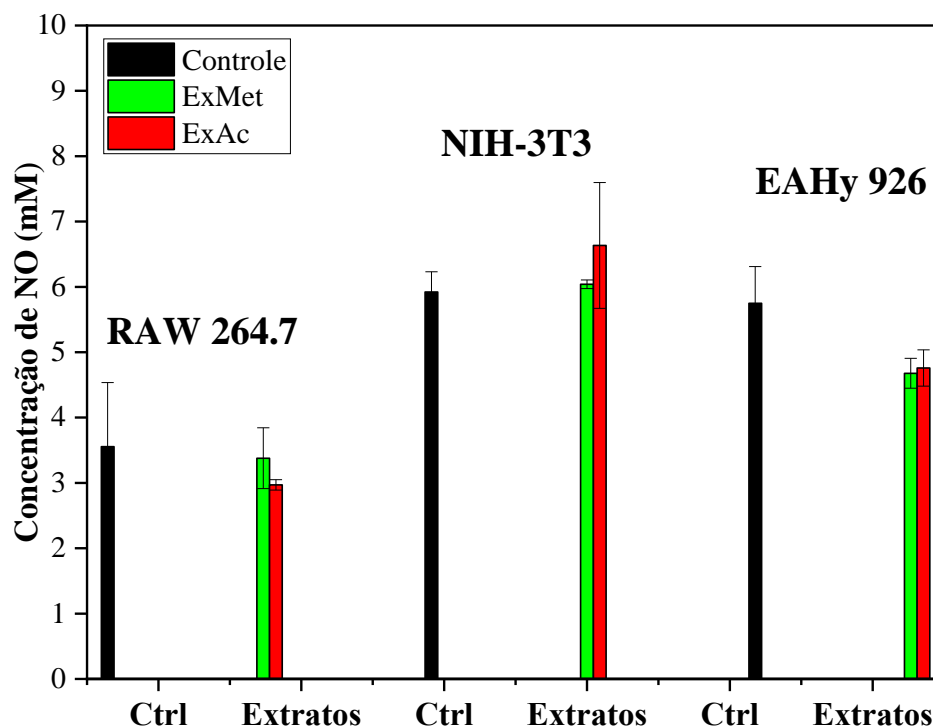
**Figura 20:** Produção de EROs em células de macrófagos de murino (RAW 264.7), fibroblastos de camundongo (NIH-3T3) e endotelial de aorta humana (EAHy 926), marcadas com CellRox, após 24 h de exposição em extratos (ExMet e ExAc) na concentração de 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>.



Ctrl: Controle.

Conforme apresentado na Figura 21, o efeito da presença dos extratos de mutamba (ExMet e ExAc) sobre as células, não reduziu a produção de óxido nítrico (NO) nas condições empregadas e não houve diferença ao nível de significância de 5% para nenhum extrato, comparado ao controle. Tem sido relatada a capacidade dos flavonóides de inibir a expressão de isoformas de óxido nítrico sintase induzida, ciclooxigenase e lipooxigenase, que são responsáveis pela produção de óxido nítrico e outros mediadores do processo inflamatório (TUÑÓN et al., 2009). Portanto, extratos com alto teor de flavonóides, em geral, reduzem tanto EROs como NOs (GASPARRINI et al., 2017; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2017), fato que não foi observado para os extratos de mutamba estudados neste trabalho. O alto teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos, não contribuiu para redução da produção de óxido nítrico nas três células.

**Figura 21:** Produção de NO em macrófagos de murino (RAW 264.7), fibroblastos de camundongo (NIH-3T3) e endotelial de aorta humana (EAHy 926), após 24 h de incubação com extratos (ExMet e ExAc) na concentração de 0,25 mg .mL<sup>-1</sup>.

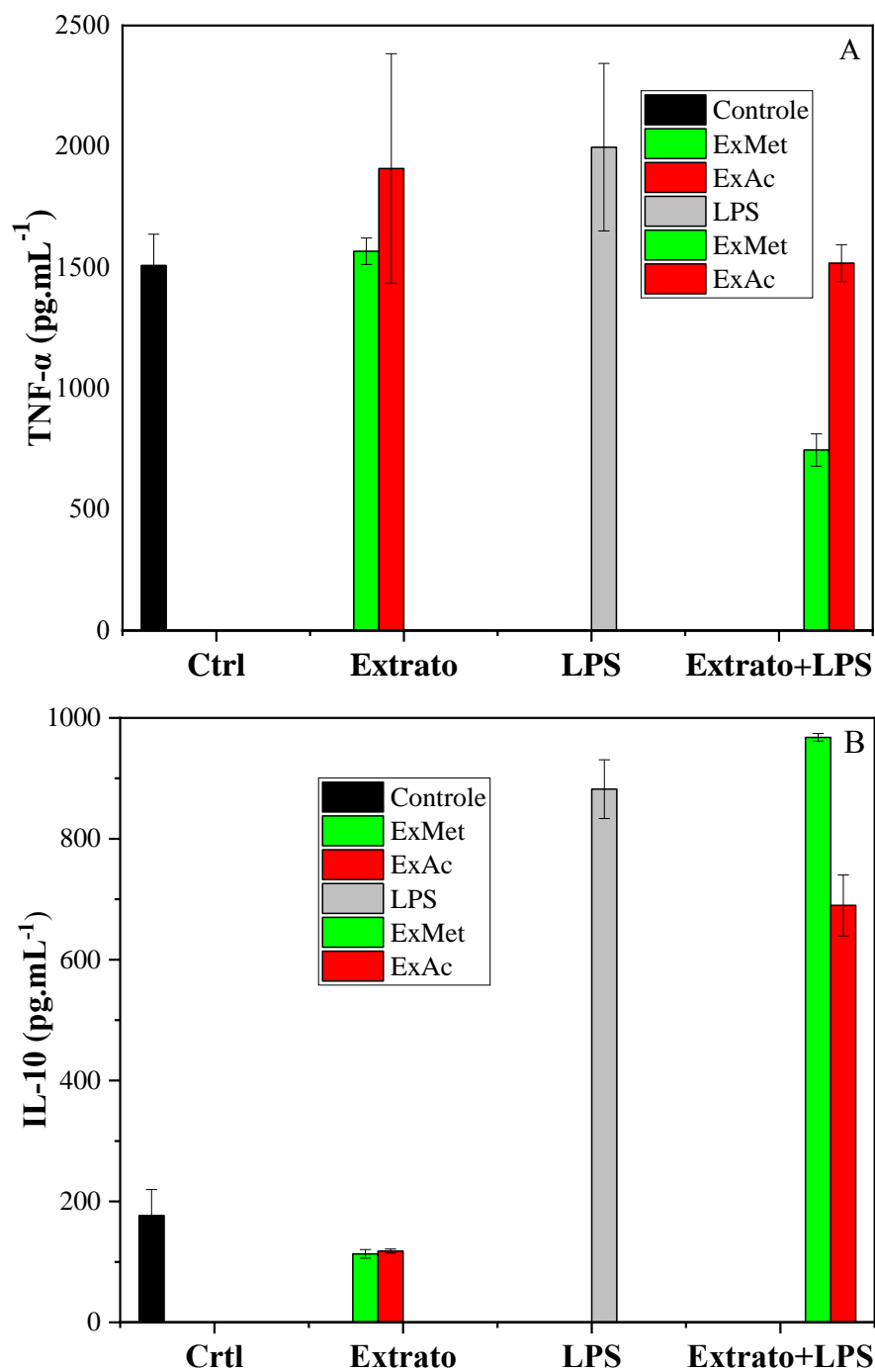


Ctrl: Controle.

Nos experimentos (sem estímulo com LPS), os extratos não acarretaram variações, ao nível de significância de 5%, tanto na produção de TNF- $\alpha$ , quanto na de IL-10, conforme pode ser verificado na Figura 22. Já nos experimentos com estímulo de LPS, houve redução considerável na produção de TNF- $\alpha$  (Figura 22A) somente para extrato metanólico (ExMet), enquanto a produção de IL-10 (Figura 22B) não se alterou para nenhum dos extratos estudados. Porém, pode-se observar que a produção de IL-10 é maior ( $p < 0,05$ ) na presença dos extratos de mutamba com indução de LPS, em comparação ao controle (sem LPS) e aos extratos (sem LPS). Esses resultados apontam que o extrato metanólico possui significativa resposta à inflamação, já que reduz TNF- $\alpha$ , embora não altere a produção de IL-10. Este fator, pode estar relacionado com a presença de alguns flavonóides, como: quercetina, luteolina e rutina, em abundância no extrato metanólico e que são capazes de inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, TNF- $\alpha$  (LÓPEZ-POSADAS et al., 2008; KIM et al., 2004; CAZAROLLI et al., 2008).



**Figura 22:** Produção de A) TNF- $\alpha$  e B) IL-10 após adição de extratos (ExMet e ExAc) na concentração de 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> em macrófagos (RAW 264.7).



Ctrl: Controle.

## 12.6 Determinação de Toxicidade *in vivo* por bioensaio com *Artemia salina* e Análise qualitativa de cianeto

*Artemia salina* L. (Artemiidae) é um ser invertebrado da fauna de ecossistemas aquáticos e marinhos, e tem sido utilizado em bioensaios para determinar a toxicidade

através da estimativa da dose letal média (valores de  $DL_{50}$ ) (LEWAN, ANDERSSON e MORALES-GOMEZ, 1992), conforme relatado por Meyer e colaboradores (1982) para várias toxinas em extratos de plantas.

O método de bioensaio com crustáceo *Artemia salina*, tem sido usado em testes toxicológico para plantas medicinais, existindo uma correlação entre esse bioensaio e o teste *in vivo* em camundongos (PARRA et al., 2001). Este ensaio também tem sido usado para detectar o ácido cianídrico em sementes de cereja, ameixa, pêssigo, manga e abacate (GARCIA-RODRIGUEZ et al., 2009). O ensaio com *Artemia* foi realizado para detectar toxicidade em sementes de frutos do Cerrado. Na análise realizada foi detectado efeito tóxico, mas, não foi comprovada a presença de cianeto, o que sugere a presença de outras substâncias tóxicas (FONSECA et al., 2013).

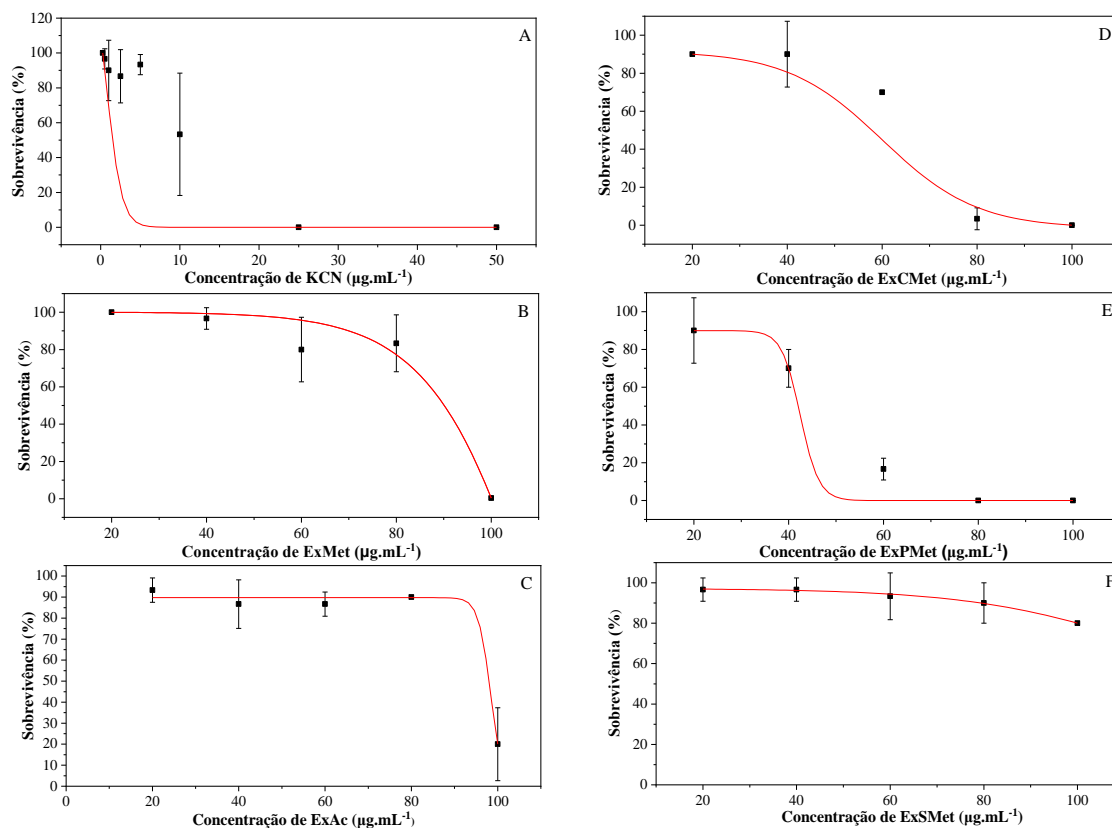
As Figuras 23 mostramos curva padrão de cianeto de potássio (KCN) e os resultados dos testes de toxicidade dos extratos ExMet, ExAc, ExCMet, ExPMet e ExSMet para *Artemia salina*. É importante frisar que a concentração aparente obtida na análise de toxicidade, deveu-se à não solubilidade total dos extratos testados, no solvente utilizado (água destilada).

Os extratos ExMet e ExAc apresentaram-se pouco tóxicos para *Artemia salina*, pois o valor de  $DL_{50}$ , calculado a partir da equação obtida pelo ajuste dos dados, foi de  $98 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para ambos os casos, ou seja, próximo ao da máxima concentração empregada. Já os extratos metanólicos da casca (ExCMet) e da polpa (ExPMet) apresentaram maior toxicidade, com  $DL_{50}$  de  $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para ExCMet e  $42 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para ExPMet, sugerindo a presença de substância tóxica nesses extratos, capaz de causar a morte das *Artemias*. O extrato da semente (ExSMet) não foi tóxico em nenhuma das concentrações testadas.

Foi realizado o teste de Guignard, específico para cianeto (COSTA, 2001), para verificar se há cianeto nos extratos, com resultados negativos para todas as amostras. Além disso, as curvas dose-resposta dos extratos foram diferentes da curva padrão de KCN (Figura 23A), confirmando a ausência de toxicidade devido a cianeto. Desta forma, conclui-se que os extratos metanólico e de acetato de etila, do fruto de mutamba, são pouco tóxicos e que a polpa e a casca dos frutos contêm uma ou mais substâncias tóxicas para *Artemia salina*. Fonseca e colaboradores (2013) estudaram a toxicidade em sementes de araticum (*Annona crassiflora Mart*), mangaba (*Hancornia speciosa*), cagaita (*Eugenia dysenterica DC*), jatobá (*Hymenaea courbaril L. var. courbaril*) e tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), as quais foram consideradas tóxicas para *Artemia*

*salina*. Porém, quando avaliadas pelo teste de Guignard, não foi constatada a presença de cianeto, assim como observado neste trabalho.

**Figura 23:** A) Curva padrão de cianeto de potássio (KCN) para o teste de citotoxicidade com *Artemia salina*. Teste de toxicidade *in vivo* com *Artemia salina*, para extratos: B) ExMet, C) ExAc, D) ExCMet, E) ExPMet e F) ExSMet em diferentes concentrações.



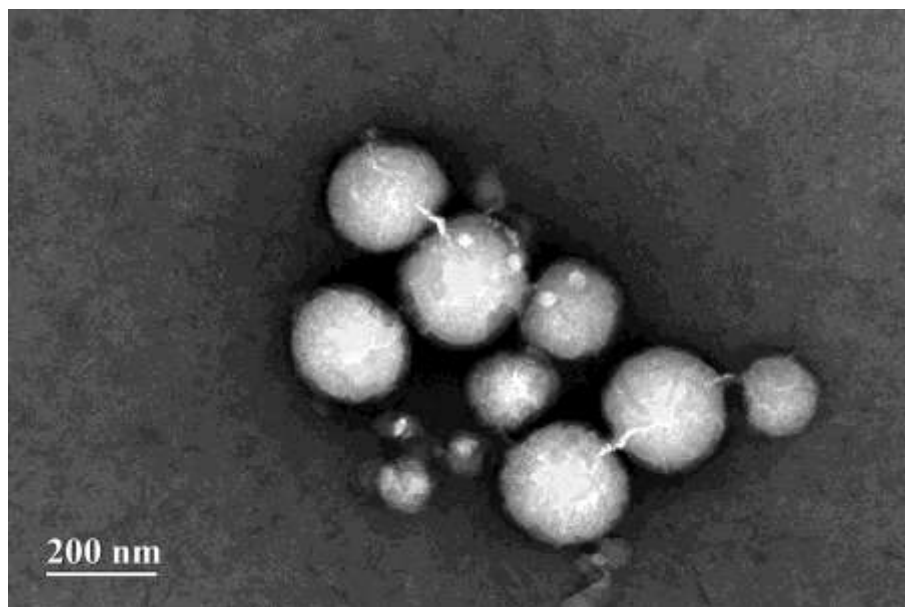
## 12.7 Encapsulação do extrato de acetato de etila em PLGA

Neste trabalho, foram obtidas nanopartículas poliméricas, utilizando-se PLGA, um polímero biodegradável, para encapsulação do extrato de acetato de etila do fruto da *Guazuma ulmifolia*, que apresentou maior teor de compostos fenólicos totais. A caracterização das nanopartículas de PLGA (Np-PLGA) e de extrato de acetato de etila (Np-ExAc) consistiu na avaliação morfológica e distribuição de tamanho de partícula, avaliação da estabilidade e determinação da eficiência de encapsulação nas nanoestruturas.

### 12.7.1 Caracterização das Nanopartículas de PLGA e de PLGA/ExAc

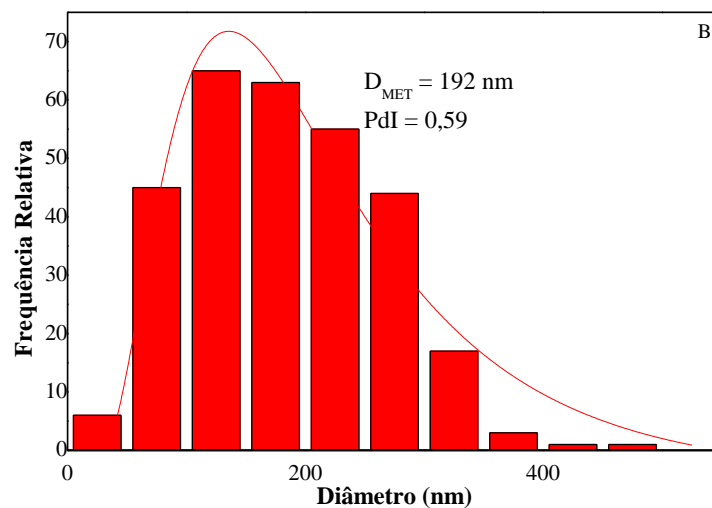
As nanopartículas poliméricas de PLGA com extrato de acetato de etila (Np-ExAc) foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Nota-se nas micrografias (Figura 24), partículas de formatos esféricos e de diferentes tamanhos.

**Figura 24:** Micrografia da nanopartícula polimérica do extrato de acetato de etila de mutamba (Np-ExAc) obtidas por MET.



A Figura 25 apresenta o histograma obtido a partir das imagens de MET das nanopartículas Np-ExAc.

**Figura 25:** Histograma de tamanho das nanopartículas poliméricas de acetato de etila de mutamba (Np-ExAc).

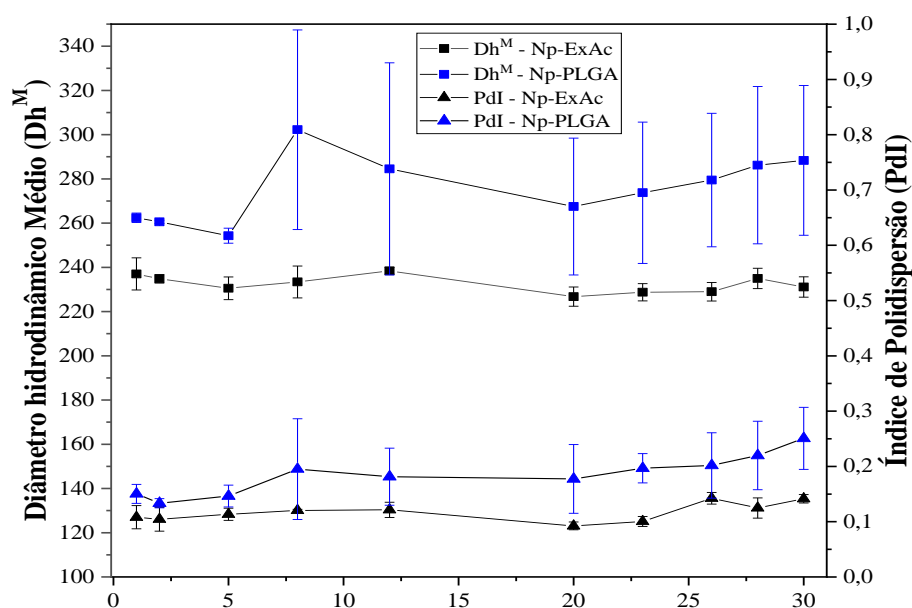


As nanopartículas mostraram diâmetro médio de 192 nm e PdI igual a 0,59, na presença do extrato de acetato de etila (ExAc).

As medidas de uma amostra de partículas por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), fornecem três tipos de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos: distribuição em função da intensidade do espalhamento das partículas (I), do número de partículas (N) e do volume das partículas (V). Para cada distribuição, obtém-se o respectivo valor médio de diâmetro hidrodinâmico: ( $Dh^I$ ), ( $Dh^N$ ) e ( $Dh^V$ ). A análise dos diferentes tipos de distribuição de diâmetros e dos respectivos diâmetros médios é, particularmente, importante para o caso de amostras polidispersas ou que contenham agregados de partículas.

As suspensões aquosas de nanopartículas de PLGA e de PLGA com extrato de acetato de etila, Np-PLGA e Np-ExAc, respectivamente, foram avaliadas quanto aos diâmetros hidrodinâmicos (Dh) e índice de polidispersão (PdI) por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), durante 30 dias. A Figura 26 mostra os valores de  $Dh^M$  (diâmetro hidrodinâmico médio) e PdI, obtidos durante o período de 30 dias após a preparação das amostras e armazenamento a 18 °C. Pode-se observar os valores iniciais de  $Dh^M$  foram de 262 nm (PdI = 0,150) e 237 nm (PdI = 0,108) para as amostras Np-PLGA e Np-ExAc, respectivamente. Não ocorreu variação significativa desses parâmetros durante os 30 dias de avaliação, indicando que não houve formação de agregados ou aglomerados de partículas durante o armazenamento.

**Figura 26:** Diâmetro hidrodinâmico médio ( $Dh^M$ ) e Índice de Polidispersão (PdI) de nanopartículas Np-PLGA e Np-ExAc armazenadas a 18 °C durante 30 dias.



Pode-se concluir, também, que a amostra Np-ExAc foi polidispersa, sem ocorrência de agregados, o que pode ser constatado ao se comparar os valores de diâmetro médio numérico ( $Dh^N$ ) e diâmetro médio de intensidade ( $Dh^I$ ) (Tabela 7).

A distribuição de tamanhos das nanopartículas, geralmente não se altera, de forma significativa, na presença de substâncias encapsuladas (GOMES, MOREIRA e CASTELL-PEREZ, 2011; HILL, TAYLOR e GOMES, 2013; PEREIRA et al., 2015).

**Tabela 7:** Valores de diâmetro hidrodinâmico médio de intensidade ( $Dh^I$ ), diâmetro hidrodinâmico médio numérico ( $Dh^N$ ) e diâmetro hidrodinâmico médio ( $Dh^M$ ) e índice de polidispersão (PdI) das amostras Np-PLGA e Np-ExAc.

Dias	Np-PLGA				Np-ExAc			
	$Dh^I$	$Dh^N$	$Dh^M$	PdI	$Dh^I$	$Dh^N$	$Dh^M$	PdI
1	297±12	218±1	262±2	0,150	257±1	200±7	237±7	0,108
2	303±4	216±8	261±1	0,133	264±7	198±14	235±2	0,104
5	301±7	212±14	254±3	0,146	262±5	185±8	231±5	0,113
8	287±26	236±22	302±45	0,195	267±8	187±11	233±7	0,120
12	313±37	231±39	285±48	0,181	274±7	194±7	238±1	0,121
20	295±4	208±28	268±31	0,177	252±6	191±7	227±4	0,092
23	302±15	215±38	274±32	0,197	256±4	190±7	229±4	0,100
26	314±3	207±34	280±30	0,202	263±10	180±16	229±4	0,142
28	322±36	213±13	286±36	0,220	265±9	192±7	235±5	0,125
30	273±66	240±33	288±34	0,251	265±5	182±3	231±5	0,141

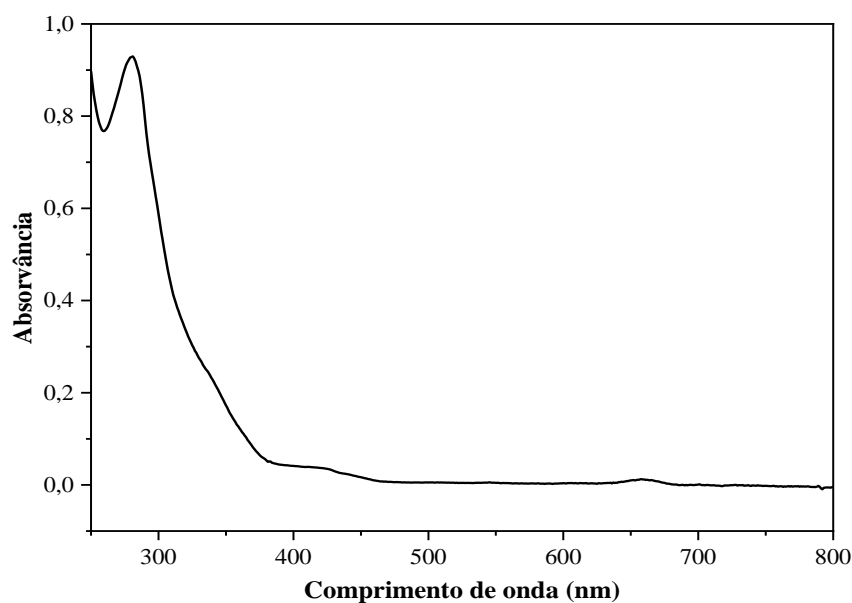
Segundo Malvern (2007) e Bohren e Huffman (1933), o  $Dh^I$ , geralmente, é a distribuição de tamanho mais elevado, pois, de acordo com a Aproximação de Rayleigh, a intensidade de luz espalhada pela partícula é proporcional ao diâmetro da mesma, elevada a sexta potência ( $I \sim D^6$ ).

#### 12.7.2 Eficiência de Encapsulação do ExAc em PLGA

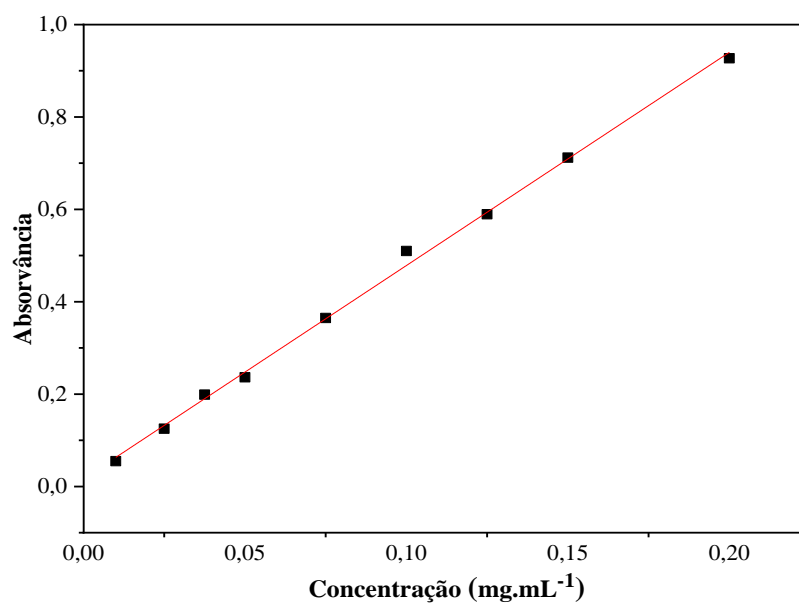
A eficiência de encapsulação é usada para indicar a quantidade de composto aprisionado na matriz polimérica e foi determinada por espectrofotometria no UV-Vis,

no comprimento de onda de 279 nm, devido à alta absorvância do extrato nessa região conforme apresentado na Figura 27. Essa banda de absorção, está associada à transições do tipo  $n \rightarrow \pi^*$ , do grupo carbonila, e  $\pi \rightarrow \pi^*$ , do anel aromático, que estão presentes nos compostos fenólicos (PAVIA et al., 2010; ALEIXANDRE-TUDO e TOIT, 2018). Na região espectral do visível (380 a 780 nm), a amostra absorve pouco. A curva padrão da solução do extrato ExAc está apresentada na Figura 28.

**Figura 27:** Espectro de absorção na região UV-Vis da solução padrão do extrato ExAc de *Guazuma ulmifolia* (solução  $0,20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em clorofórmio).



**Figura 28:** Curva de calibração do extrato ExAc em clorofórmio.



A eficiência de encapsulação do extrato ExAc foi calculada a partir da diferença da quantidade de extrato encapsulado e quantidade de extrato inicial, calculados através do ajuste dos valores de absorvância à curva de calibração ( $y = 4,61489 x + 0,01696$ , com  $R^2 = 0,997$ ). A média da eficiência de encapsulação foi igual a  $12,7 \pm 2,6\%$ , o valor se encontra na faixa de encapsulação reportada na literatura para encapsulação de extratos vegetais em PLGA.

### 13 CONCLUSÃO

Os extratos metanólico (ExMet) e de acetato de etila (ExAc) apresentaram compostos bioativos, sendo que o ExAc apresentou maior teor de compostos fenólicos e potencial antioxidante. Os extratos (ExMet e ExAc) foram capazes de reduzir a produção de EROs, para a célula endotelial de aorta humana e não alterou a produção de EROs para macrófagos e fibroblastos. O extrato metanólico (ExMet) reduziu, consideravelmente, a produção de TNF- $\alpha$ , indicando que este extrato possui significativa resposta à inflamação, embora não altere a produção de IL-10. Os extratos ExMet, ExAc foram pouco tóxicos para *Artemia salina*, já os extratos da casca (ExCMet) e polpa (ExPMet) apresentaram maior toxicidade, sugerindo a presença de substâncias tóxicas para *Artemia*. Já o extrato da semente (ExSMet) não foi tóxico em nenhuma das concentrações testadas. O teste de estabilidade das nanopartículas (Np-PLGA e Np-ExAc) indicou que não houve formação de agregados ou aglomerados durante os 30 dias avaliados. A eficiência de encapsulação do extrato de *G. ulmifolia* está dentro do reportado na literatura, que é variável, quando se trata de encapsulação de extratos vegetais.

No presente estudo, foi comprovada a atividade biológica da *G. ulmifolia*, na inibição da produção de TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória, o que indica um potencial efeito anti-inflamatório, mormente do extrato metanólico do fruto dessa planta. O efeito desta atividade biológica vem se somar aos indícios obtidos em outras pesquisas e análises, ampliando as possibilidades em prol da utilização de produtos naturais nas indústrias alimentícia e farmacêutica. O baixo índice de toxicidade do fruto e o seu elevado teor de compostos fenólicos, comprovado neste estudo, aliados às já conhecidas propriedades nutricionais, indicam um significativo potencial de uso dos mesmos na indústria alimentícia. Em relação, especificamente, à indústria farmacêutica, a



capacidade de inibição da produção de TNF- $\alpha$  aqui observada, ampliaas expectativas existentes, devendo motivar e corroborar com novas pesquisas, buscando-se comprovar o que aqui está indicado como uma importante possibilidade.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. 6th ed. Saunders 2003.
- ABBAS, S.; KARANGWA, E.; BASHARI, M.; HAYAT, K.; HONG, X.; SHARIF, H. R.; ZHANG, X. Fabrication of polymeric nanocapsules from curcumin-loaded nanoemulsion templates by self-assembly. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 81-92, 2015.
- ADÁMOLI, J.; MACEDO, J.; AZEVEDO, L. G.; NETTO, J. M. Caracterização da região dos Cerrados. In: W. J. GOEDERT (Ed). **Solos dos Cerrados: tecnologias e estratégias de manejo**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, São Paulo: NOBEL, p. 33-98, 1987.
- ADEGOKE, G. O.; VIJAY KUMAR, M.; GOPALA KRISHNA, A. G.; VARADARAJ, M. C.; SAMBAIAH, K.; LORESH, B. R. Antioxidants and lipid oxidation in food: a critical appraisal. **Journal of Foods Science and Tachnology**, v. 35, n. 4, p. 282-298, 1998.
- ADNYANA, I. K.; YULINAH, E.; YULIET; KURNIATI, N. F. Antidiabetic Activity of Aqueous Leaf Extracts of *Guazuma ulmifolia* Lamk., Ethanolic Extracts of *Curcuma xanthorrhiza* and their Combinations in Alloxan-induced Diabetic Mice. **Researchv Journal of Medicinal Plant** , v. 7, n. 3, p. 158-164, 2013.
- ALARCON-AGUILAR, F. J.; ROMAN-RAMOS, R.; PEREZ-GUTIERREZ, S.; AGUILAR-CONTRERAS, A.; CONTRERAS-WEBER, C. C.; FLORES-SAENZ, J. L. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 101-110, 1998.
- ALEIXANDRE-TUDO, J. L.; TOIT, W. **The Role of UV-Visible Spectroscopy for Phenolic Compounds Quantification in Winemaking**, 2018.
- ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M.; ARRIAGA, A. M. C.; PRADO, G. M.; MAGALHÃES, C. E. C.; MAIA, G. A. M.; LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 2155-2159, 2011.
- ALONSO-CASTRO, A. J.; SALAZAR-OLIVO, L. A. The anti-diabetic properties of *Guazuma ulmifolia* Lam are mediated by the stimulation of glucose uptake in normal and diabetic adipocytes without inducing adipogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 252-256, 2008.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; CARRILLO-PERDOMO, E.; ALLER, A; GIAMPIERI, F.; GASPARRINI, M.; GONZÁLEZ-PÉREZ, L.; BELTRÁN-AYALA, P.; BATTINO, M. Anti-inflammatory effect of Capuli cherry against LPS-induced cytotoxic damage in RAW 264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 102, p. 46-52, 2017.

ALVES, A. M.; DIAS, T.; HASSIMOTTO, N. M. A.; NAVES, M. M. V. Ascorbic acid and phenolic contents, antioxidant capacity and flavonoids composition of Brazilian Savannah native fruits. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 564-569, 2017.

AMAROWICZ, R. Tannins: the new natural antioxidants? **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 549-551, 2007.

ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. J. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates A review. **Control. Release.**, v. 128, n. 3, p. 185-199, 2008.

ARTS, I. C. W.; HOLLMAN, P. C. H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, suppl.1, p. 317-325, 2005.

ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant action of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, v. 523, p. 9-20, 2003.

ASSIS, R. Q.; ANDRADE, K. L.; GOMES BATISTA, L. E.; DE OLIVEIRA RIOS, A.; DIAS, D. R.; NDIAYE, E. A.; DE SOUZA, É. C. Characterization of mutamba (*Guazuma ulmifolia* LAM.) fruit flour and development of bread. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 101-120, 2019.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BATISTON, W. P.; MARUYAMA, S. A.; GOMES, S. T. M.; VISENTAINER, J. V.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M. Total phenolic and antioxidant capacity of methanolic extracts of ten fruits. **Acta Scientiarum Technology**, v. 35, n. 3, p. 581-585, 2013.

BERENGUER, B.; TRABADELA, C.; SÁNCHEZ-FIDALGO, S.; QUÍLEZ, A.; MIÑO, P.; DE LAPUERTA, R.; MARTÍN-CALERO, M. J. 2007. The aerial parts of *Guazuma ulmifolia* Lam. protect against NSAID-induced gastric lesions. **J. Ethnopharmacol**, v. 114, p. 153-160, 2007.

BOHREN, C. F.; HUFFMAN, D. R. **Absorption and Scattering of Light by Small Particles**, Wiley-Interscience, New York, 1983.

BOLIGON, A. A.; FELTRIN, A. C.; ATHAYDE, M. L. Determination of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Guazuma ulmifolia* essential oil. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2013.

- BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, v. 112, n. 1, p. 235-243, 1997.
- BONIFÁCIO, B. V.; SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; NEGRI, K. M. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014.
- BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. 2. Cytokines and chemokines. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. 460-475, 2003.
- BOUISSOU, C.; ROUSE, J. J.; PRICE, R.; VAN DER WALLE, C. F. The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: Remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. **Pharm Res.** v. 23, p. 1295-1305, 2006.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p.317-333, 1998.
- BROADHURST, R. B.; JONES, W. T. Analysis of condensed tannins using acidified vanilin. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 29, p. 788-794, 1978.
- BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Production of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles for extended controlled drug release of haloperidol. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, p. 773-785, 2005.
- BYUN, E.-B.; SUNG, N.-Y.; BYUN, E.-H.; SONG, D.-S.; KIM, J.-K.; PARK, J.-H.; KIM, J.-H. The procyanidin trimer C1 inhibits LPS-induced MAPK and NF- $\kappa$ B signaling through TLR4 in macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 450-456, 213.
- BYUN, E.-B.; SUNG, N.-Y.; YANG, M.-S.; SONG, D.-S.; BYUN, E.-H.; KIM, J.-K.; KIM, J.-H. Procyanidin C1 causes vasorelaxation through activation of the endothelial NO/cGMP pathway in thoracic aortic rings. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 7, 742-748, 2014.
- CABALLERO-GEORGE, C.; VANDERHEYDEN, P. A. M.; DE BRUYNE, T.; SHAHAT, A. A.; VAN DEN HEUVEL, H.; SOLIS, P. N.; GUPTA, M. P.; CLAEYS, M.; PIETERS, L.; VAUQUELI, G.; VLIETINCK, A. J. *In vitro* inhibition of [3H]-angiotensin II binding on the human AT1 Receptor by proanthocyanidins from *Guazuma ulmifolia* bark. **Planta Medica**, v. 8, n. 12, p. 1066-1071, 2002.
- CÁCERES, A.; CANO, O.; SAMAYOA, B.; AGUILAR, L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders.1. Screening of 84 plants against Enterobacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p. 55-73, 1990.
- CAI, Y.-Z.; SUN, M.; XING, J.; LUO Q, CORKE, H. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 2872-2888, 2006.

CALIXTO JÚNIOR, J. T. C.; MORAIS, S. M. DE; GOMEZ, C. V.; MOLAS, C. C.; ROLON, M.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; OLIVEIRA, C. D. DE M.; TINTINO, S. R.; COUTINHO, H. D. M. Phenolic composition and antiparasitic activity of plants from the Brazilian Northeast “Cerrado”. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 434-440, 2016.

CARVALHO, P. E. R. **Mutamba: Guazuma ulmifolia**, p. 1-13, 2007.  
Disponível em: from <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/42548/1/Circular141.pdf>.

CASEY, L. C. Immunologic Response to Infection and its Role in Septic Shock. **Critical Care Clinics**, v. 16, n. 2, p. 193-213, 2000.

CATES, R. G.; PRESTWICH, B.; INNES, A.; ROWE, M.; STANLEY, M.; WILLIAMS, S.; THOMPSON, A.; MCDONALD, S.; CATES, S.; SHRESTHA, G.; SORIA, J. A. F.; ESPINOZA, L. V.; ARDÓN, C.; GALVEZ, B.; DÍAZ, M. R.; CORONADO, F. S.; GARCÍA, J. R.; ARBIZÚ, D. A.; MARTINEZ, J. V. Evaluation of the activity of Guatemalan medicinal plants against cancer cell lines and microbes. **Journal Medicinal of Plants Research**, v. 7, n. 35, p. 2616-2627, 2013.

CAVALCANTI, R. B.; CARDINOT, G.; CEOTTO, P.; PINHEIRO, R. S. Cerrado. In: SCARANO F. R. et al. (eds.). **Biomás brasileiros**. Rio de Janeiro: Conservação Internacional-Casa da Palavra. 2012.

CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E. H.; FIGUEIREDO, M. S. R. B. Flavonoids: prospective drug candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 13, p. 1429-1440, 2008.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biol. Med.**, v. 29, p. 323-333, 2000.

CHONG, J.; POUTARAUD, A.; HUGUENEY, P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. **Plant Science**, v. 177, p. 143-155, 2009.

COSTA, A. F. **Fármacos com Heterósidos**. In: FARMACOGNOSIA. 3. ed. Lisboa: Ed. Gulbekian, v. 3, cap. 13, p. 700-701, 2001.

COSTA, N. M. B. Alimentos: Componentes Nutricionais e Funcionais. In: COSTA, N. M. B. BORÉM, A. **Biotecnologia e nutrição**. 1 ed. Brasil: Nobel, p. 31-69, 2003.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, p. 99-134, 2002.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 854, p. 435-442, 1998.

CRUVINEL, W. M.; JUNIOR, D. M.; ARAUJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRAD, L. E. C. Immune system – Part I

Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Bras J Rheumatol**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CRUZ, G. L. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**. 5ª Ed., Editora Bertrand, Rio de Janeiro, Brasil. 1995.

CUNNEEN, J.; CARTWRIGHT, M. The puzzle of sepsis: fitting the pieces of the inflammatory response with treatment. **AACN Clinical Issues**, v. 15, n. 1, p. 18-44, 2004.

CUNNINGHAM, F. G.; LEVENO, K. J.; BLOOM, S. L., et al. Tireóide e outros distúrbios endócrinos. In: CUNNINGHAM, F. G. et al. **Obstetrícia de Williams**. 23 ed. Porto Alegre: Artmed-McGraw-Hill, p.1126-1144, 2012.

CYBORAN, S.; BONARSKA-KUJAWA, D.; PRUCHNIK, H.; ŻYŁKA, R.; OSZMIĄŃSKI, J.; KLESZCZYŃSKA, H. Phenolic content and biological activity of extracts of black currant fruit and leaves. **Food Research International**, v. 65, p. 47-58, 2014.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules, Basel**, v. 15, n. 10, p.7313-7352, 2010.

DA'I, M.; WIKANTYASNING, E. R.; WAHYUNI, A. S.; KUSUMAWATI, I. T. D.; SAIFUDIN, A.; SUHENDI, A. Antiproliferative properties of tiliroside from *Guazuma ulmifolia* Lamk on T47D and MCF7 cancer cell lines. **National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 6, p. 627-633, 2016.

DECKER, E. A. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of food to maximize oxidative stability. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, n. 6, p. 241-248, 1998.

DEGÁSPARI, C. H.; WASCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidante de compostos fenólicos. **Visão Acad.**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DELAUNOIS, B.; CORDELIER, S.; CONREUX, A.; CLÉMENT, C.; JEANDET, P. Molecular engineering of resveratrol in plants, **Plant Biotechnol. J.** v. 7, p. 2-12, 2009.

DEMBITSKY, V. M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1671-1701, 2011.

DE MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

DE SOUZA, J. A. L.; DA SILVA, W. A. V.; BEZERRA, I. C. F.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. (2018). Chemical profiles by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography of plant species from Northeast Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, v. 14, n. 56, p. 437-443, 2018.

DEVALARAJA, S.; JAIN, S.; YADAV, H. Exotic fruits as therapeutic complements for diabetes, obesity and metabolic syndrome. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1856-1865, 2011.

DOS SANTOS, J. M.; ALFREDO, T. M., ANTUNES, K.Á., DA CUNHA, J.; COSTA, E. M. A.; COSTA, E. S.; SILVA, D. B.; CAROLLO, C. A.; SCHMITZ, W. O.; BOLETI, A. P. A.; DOS SANTOS, E. L. *Guazuma ulmifolia* Lam. Decreases oxidative stress in blood cells and prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1-16, 2018.

DORMAN, H. J. D.; KOSAR, M.; KAHLOS, K.; HOLM, Y.; HILTUNEN, R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, 2003.

DUARTE, L. M. G. Globalização, agricultura e meio ambiente: o paradoxo do desenvolvimento dos Cerrados. In: DUARTE, L. M. BRAGA, M. L. S. (Org.). **Tristes cerrados**. Brasília: Paralelo, v. 15, p. 11-26, 1998.

EL-SAY, K. M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, n. 1-2, p. 675-691, 2017.

EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. **Immunity**, v. 41, p. 21-35, 2014.

ER, T-K; TSAI, S-M; WU, S-H; CHIANG, W.; LIN, H-C.; LIN, S-F.; WU, S-H.; TSAI, L-Y.; LIU, T-Z. Antioxidant status and superoxide anion radical generation in acute myeloid leukemia. **Clin Biochem**, v. 40, n. 13-14, p. 1015-1019, 2007.

FELTRIN, A. C.; BOLIGON, A. A.; JANOVIK, V.; ATHAYDE, M. L. Antioxidant potential, total phenolic and flavonoid contents from the stem bark of *Guazuma ulmifolia* Lam. **Asian J. Biol. Sci**, v. 5, p. 268-272, 2012.

FERNANDES, T. O.; ÁVILA, R. I.; MOURA, S. S.; RIBEIRO, G. A.; NAVESA, M. M. V.; VALADARES, M. C. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 184-193, 2015.

FONSECA, R. C.; SOUZA, N. A.; CORREA, T. C. L.; GARCIA, L. F.; REIS, L. G. V.; RODRIGUEZ, A. G. Assessment of toxic potential of Cerrado fruit seeds using *Artemia salina* bioassay. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 251-256, 2013.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice**. Londres: Chapman and Hall, 1994, 247 p.

FRANCO, D. M. M. Avaliação do potencial antioxidante de frutas do Cerrado por Ressonância Paramagnética de Elétrons. **Dissertação** (Mestrado em Química), Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, Goiânia-Go, 2010. 134 p.

FRUTOS, M. J.; RINCÓN-FRUTOS, L.; VALERO-CASES, E. Chapter 2.14 - Rutin. **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**, p. 111-117, 2019.

GALINA, K. L. *Guazuma ulmifolia* Lam., Sterculiaceae: Estudo botânico, químico e microbiológico. **Dissertação** de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2003. 105 p.

GALINA, K. J. SAKURAGUI, C. M.; BORGUEZAM ROCHA, J. C.; LORENZETTI, E. R.; PALAZZO DE MELLO, J. C. Contribuição ao estudo farmacognóstico da mutamba (*Guazuma ulmifolia* - Sterculiaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 2, p. 225-233, 2005.

GARCIA-RODRIGUEZ, A.; TEIXEIRA, O. M.; SALLES, F. G.; VITAL, J. P.; PEIXOTO, D. S. Bioensaio com *Artemia salina* para detecção de toxinas em alimentos vegetais. **Estudos**, v. 36, n. 4, p. 795-808, 2009.

GASPARRINI, M.; FORBES-HERNANDEZ, T. Y.; FRANCESCA GIAMPIERI, F.; AFRIN, S.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; MAZZONI, L.; BRUNO MEZZETTI, B.; QUILES, J. L.; BATTINO, M. Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 102, p. 1-10, 2017.

GOMES, C.; MOREIRA, R. G.; CASTELL-PEREZ, E. Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles with entrapped trans-cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications. **Journal of Food Science**, v. 6, n. 2, p. 16-24, 2011.

GONÇALVES, A. E. D. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666-4674, 2010.

GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In: HUDSON, B. J. F. (ed.). **Food Antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, p. 1-18, 1990.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HAMALAINEN, M.; NIEMINEN, R.; VUORELA, P.; HEINONEN, M.; MOILANEN, E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzen inhibit STAT-1 and NF-kB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. **Mediators of Inflammation**, v.1, p. 1-10, 2007.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, I. S.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2928-2935, 2005.



HAWORTH, R. D. The Chemistry of the Lignan Group of Natural Products. **The Tilden Lecture Delivered Before The Chemical Society at Bristol and London**, p. 448-456, 1942.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HIDAYAT, M.; SOENG, S.; PRAHASTUTI, S.; ERAWIJANTARI, P. P.; WIDOWATI, W. Inhibitory potential of ethanol extract of Detam1 Soybean (*Glycine max*) seed and Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia*) leaves on adipogenesis and obesity models in 3T3-L1 Cell Line. **Journal of Scientific Research & Reports**, v. 6, n. 4, p. 304-312, 2015.

HILL, L. E.; TAYLOR, M. T.; GOMES, C. Antimicrobial efficacy of poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles with entrapped cinnamon bark extract against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 4, p. 626-632, 2013.

HIRASE, T.; NODE, K. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. **Am J Physiol Heart CircPhysiol**, v. 302, n. 3. p. 499-505, 2012.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chem Biol Interact**, v. 139, p. 1-21, 2002.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. **Arch Toxicol**, v. 20, p. 237-248, 1998.

HOR, M.; HEINRICH, M.; RIMPLER, H. Proanthocyanidin polymers with antisecretory activity and proanthocyanidin oligomers from *Guazuma ulmifolia* bark. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 109-119, 1996.

HOUCHIN, M. L.; TOPP, E. M. Physical properties of PLGA films during polymer degradation. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 114, p. 2848-2854, 2009.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

ISODA, H.; MOTOJIMA, H.; ONAGA, S.; SAMET, I.; VILLAREAL, M. O.; HAN, J. Analysis of the erythroid differentiation effect of flavonoid apigenin on K562 human chronic leukemia cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 220, p. 269-277, 2014.

ISWANTINI, D.; SILITONGA, R. F.; MARTATILOFA, E.; DARUSMAN, L. K. *Zingiber cassumunar*, *Guazuma ulmifolia*, and *Murraya paniculata* extracts as antiobesity: *In Vitro* inhibitory effect on pancreatic lipase activity. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 18, n. 1, p. 6-10, 2011.

JAIN, R.; SHAH, N. H.; MALICK, A. W.; RHODES, C. T. Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 8, p. 703-727, 1998.

JAYATILAKE, G. S.; JAYASURIYA, H.; LEE, E.-S.; KOONCHANOK, N.M; GEAHLEN, R. L.; ASHENDEL, C.L.; MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C.-J. Kinase Inhibitors from *Polygonum Cuspidatum*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 10, p. 1805-1810, 1993.

JBRJ, 2017. **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 19/01/2019.

JÚNIOR, E. F.; SOUZA, P.; NASCIMENTO, J.; SANTOS, S.; ESPÍNDOLA, L.; FERREIRA, V. Antinociceptive and antiinflammatory properties of the ethanolic extract of *Pouteria ramiflora* roots. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 812-818, 2009.

JUNG, M.; PARK, M.; LEE, H. C.; KANG, Y. H.; KANG, E. S.; KIM, S. K. Antidiabetic agents from medicinal plants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1203-1218, 2006.

KAMALY, N.; YAMEEN, B.; WU, J.; FAROKHZAD, O. C. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2602-2663, 2016.

KANERIA, M.; BARAVALIA, Y.; VAGHASIYA, Y.; CHANDA, S. Determination of Antibacterial and Antioxidant Potential of Some Medicinal Plants from Saurashtra Region, India. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 406-412, 2009.

KATSUNG, B. G. **Farmacologia básica & clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, n. 3, p. 229-2245, 2004.

KIN, R.; KATO, S.; KANETO, N.; SAKURAI, H.; HAYAKAWA, Y.; LI, F.; YOKOYAMA, S. Procyanidin C1 from *Cinnamomi* cortex inhibits TGF- $\beta$ -induced epithelial-to-mesenchymal transition in the A549 lung cancer cell line. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 6, p. 1901-1906, 2013.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005.

LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **Horticultural Science**, v. 7, n. 1, p. 83-84, 1972.

LEE, S. H.; LEE, H.; KIM, J. C. Anti-inflammatory effect of water extracts obtained from doenjang in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 4, p. 947-954, 2019.

LEWAN, L.; ANDERSSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives To Laboratory Animals**, v. 20, p. 297-301, 1992.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 26-39, 2008.

LIMA, J. P.; AZEVEDO, L.; DE SOUZA, N. J.; NUNES, E. E.; VILAS BOAS, E. V. B. First evaluation of the antimutagenic effect of mangaba fruit *in vivo* and its phenolic profile identification. **Food Research International**, v. 75, p. 216-224, 2015a.

LIMA, J. P.; AZEVEDO, L.; LIMA, J. P.; FANTE, C. A.; PIRES, C. R.; NUNES, E. E.; ALVES, R. R.; ELIAS, H. H.; NUNES, C. A.; VILAS BOAS, E. V. de B. The antioxidative potential and volatile constituents of mangaba fruit over the storage period. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 1-6, 2015b.

LIU, J.; QIU, Z.; WANG, S.; ZHOU, L.; ZHANG, S. A modified double-emulsion method for the preparation of daunorubicin-loaded polymeric nanoparticle with enhanced *in vitro* anti-tumor activity. **Biomedical Materials**, v. 5, n. 6, p. 1-10, 2010.

LIU, Y.; PAN, J.; FENG, S. S. Nanoparticles of lipid monolayer shell and biodegradable polymer core for controlled release of paclitaxel: Effects of surfactants on particles size, characteristics and *in vitro* performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1-2, p. 243-250, 2010.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochem. Pharmacol.**, v. 76, n. 4, p. 495-506, 2008.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas**

LUNA-CAZÁRES, L. M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana de *Guazuma ulmifolia* Lam. (Caulote) endos etapas fenológicas. **Lancandonia**, v. 1, n. 1, p. 37-43, 2017.

MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1207-1220, 1984.

MAGOS, G. A.; MATEOS, J. C.; PÀEZ, E.; FERNÁNDEZ, G.; LOBATO, C.; MÀRQUEZ, C.; ENRÍQUEZ, R. G. Hypotensive and vasorelaxant effects of the procyanidin fraction from *Guazuma ulmifolia* bark in normotensive and hypertensive rats. **J. Ethnopharmacol**, v. 117, p. 58-68, 2008.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1409-1418, 2007.

MALDINI, M. T.; DI MICCO, S.; MONTORO, P.; DARRA, E.; MARIOTTO, S.; BIFULCO, G.; PIZZA, G.; PIACENTE, S. Flavanocoumarins from *Guazuma ulmifolia* bark and evaluation of their affinity for STAT1. **Phytochemistry**, v. 86, p. 64-71, 2013.

MALTA, L. G.; GHIRALDINI, F. G.; REIS, R.; OLIVEIRA, M. V.; SILVA, L. B.; PASTORE, G. M. In vivo analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 604-611, 2012.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365-373, 2011.

MALVERN Instruments **Zetasizer Nano User Manual**, Worcestershire, 2007.

MENNEN, L. I.; WALKER, R.; BENNETAU-PELISSERO, C.; SCALBERT, A. Risks and safety of polyphenol consumption. *Am J Clin Nutr*, v. 81, p. 326S-329S, 2005.

MEYER, B. N.; FERRINGI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MESQUITA, M. L.; DE PAULA, J. E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 439-445, 2009.

MESTMAN, J. H. Thyroid and parathyroid diseases in pregnancy. IN: GABBE, S. G.; NIEBYL, J. R.; SIMPSON, J. L.; LANDON, M. B.; GALAN, H. L.; JAUNIAUX, E. R. M., et al. **Obstetrics normal and problem pregnancies**. 6th ed. Saunders Elsevier: Philadelphia, p. 922-953, 2012.

METCHE, M. Tanins, nature et propriétés, Groupe Polyphénols. **Nancy**, v.10, p. 11-32, 1980.

MORAIS, S. M.; CALIXTO-JÚNIOR, J. T.; RIBEIRO, L. M.; SOUSA, H. A.; SILVA, A. A. S.; FIGUEIREDO, F. G.; MATIAS, E. F. F.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; COUTINHO, H. D. M. Phenolic composition and antioxidant, anticholinesterase and antibiotic-modulating antifungal activities of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) ethanol extract. **South African Journal of Botany**, v.110, p. 251-257, 2017.

MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SOUZA, T. M.; SANTOS, K. K. A.; ANDRADE, J. C.; GUEDES, G. M. M.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E. S.; COSTA, J. G. M.; SARAIVA, A. A. F.; COUTINHO, H. D. M. Citotoxicidade e atividade antiparasitária de *Lygodium venustum* SW. **Acta Toxicol.**, v. 21, p. 50-56, 2013.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004.

MOORE, K. J.; TABAS, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. **Cell**, v. 145, p. 341-355, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MYERS, N.; MITTERMEIER, C.G.; MITTERMEIER, G. A. B.; KENTS, J.

NAKANO, N.; NISHIYAMA, C.; TOKURA, T.; NAGASAKO-AKAZOME, Y.; OHTAKE, Y.; OKUMURA, K.; OGAWA, H. Procyanidin C1 from apple extracts inhibits FcεRI-mediated mast cell activation. *International Archives of Allergy and Immunology*, v. 147, n. 3, p. 213-221, 2008.

NAIR, H. B.; SUNG, B.; YADAV, V. R.; KANNAPPAN, R.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Delivery of anti-inflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer. **Biochem Pharmacol**, v. 80, n. 12, p. 1833-1843, 2010.

NAVARRO, M. C.; MONTILLA, M. P.; CABO, M. M.; GALISTEO, M.; CÁCERES, A.; MORALES, C.; BERGER, I. Antibacterial, Antiprotozoal and Antioxidant Activity of Five Plants Used in Izabal for Infectious Diseases. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 325-329, 2003.

NEVES, M. A.; HASHEMI, J.; PRENTICE, C. Development of novel bioactives delivery systems by micro/nanotechnology. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 7-12, 2015.

NETEA, M. G. VAN DER MEER, J. W.; VAN DEUREN, M.; KULLBERG, B. J. . Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? **Trends in Immunology**, v. 24, n. 5, p. 254-258, 2003.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010.

NILE, S. H.; PARK, S. W. Edible berries: Review on bioactive components and their effect on human health. **Nutrition**, v. 30, n. 2, p. 134-144, 2014.

NUNES, Y. R. F.; FAGUNDES, M.; SANTOS, R. M.; DOMINGUES, E. B. S.; ALMEIDA, H. S.; GONZAGA, A. P. D. Atividades fenológicas de *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) em uma floresta estacional decidual no norte de Minas Gerais, **Instituto de Ciências Biológicas-UFMG**, v. 6, n. 2, p. 99-105, 2005.

NURI, N.; SUKARDIMAN, S.; PRA YOGO, B. Inhibitory effect of non-polar and semipolar fractions of ethanolic extract of *Guazuma ulmifolia* Lamk. leaves on rat preadipocytes proliferation and differentiation. **Proceeding ICMHS**, p. 66-69, 2016.

- OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L. L. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 1, p. 58-63, 2002.
- OLCZYK, P.; MENCNER, Ł.; KOMOSINSKA-VASSEV, K. Therole of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. **BioMed Research**
- OLIVEIRA, D. A.; ANGONESE, M.; FERREIRA, S. R. S.; GOMES, C. L. Nanoencapsulation of passion fruit by-productsextracts for enhanced antimicrobial activity. **Food and Bioproducts Processing**, v. 104, p. 137-146, 2017.
- OLIVEIRA, M. C. DE; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.
- OLIVEIRA, S. G.; BERCHIELLI, T. T. Potencialidades da utilização de taninos na conservação de forragens e nutrição de ruminantes – revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2007.
- OLIVEIRA, T. T.; ROSA, C. O. B.; STRINGHETA, P. C.; VILELA, M. A. P. Ação Antioxidante dos Flavonóides. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos funcionais - componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, cap. 4, p. 59-77, 2010.
- PARRA, A. L.; YHEBRAA, R. S.; SARDIÑASA, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.
- PATIL, J. U.; BIRADAR, S. D. Pharmacognostic study of *Guazuma ulmifolia*. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 4, p. 130-131, 2013.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. Trad. 4a. ed. São Paulo: Cengage Learnig, 2010.
- PELÚZIO, M. C. G.; ROSA, D. D.; OLIVEIRA, V. P. Vitaminas Antioxidantes. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos funcionais - componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, cap. 3, p. 37-57, 2010.
- PEREIRA, D. A.; ARAÚJO, M. N. P.; ARRUDA, H. S.; MOLINA, G.; PASTORE, G. M. Phytochemicals and biological activities of mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam.): A review. **Food Research International**, v. 126, p. 1-19, 2019.
- PEREIRA, D. A.; ARRUDA, H. S.; MORAIS, D. R.; ARAUJO, N. M. P.; PASTORE, G. M. Mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam.) fruit as a novel source of dietary fibre and phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 310, p. 1-9, 2020.
- PEREIRA, M. C.; HILL, L. E.; ZAMBIAZI, R. C.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S.; GOMES, C. L. Nanoencapsulation of hydrophobicphy to chemical susing poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) for antioxidant and antimicrobial

delivery applications: Guabiroba fruit (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) study. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 100-107, 2015.

PEREIRA, M. C.; OLIVEIRA, D. A.; HILL, L. E.; ZAMBLAZI, R. C.; BORGES, C. D.; VIZZOTTO, M.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S.; GOMES, C. L. Effect of nanoencapsulation using PLGA on antioxidant and antimicrobial activities of guabiroba fruit phenolic extract. **Food Chemistry**, v. 240, p. 396-404, 2018.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, J. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). **Food Chemistry**, v. 85, p. 267-273, 2004.

PIZZI, A. Tanin-Based adhesives. In: PIZZI, A. (ed) **Wood adhesives: Chemistry and technology**, New York, Marcel Dekker, 1993, p. 177-246.

QUINTANAR-ISAIAS, A.; VELAZQUEZ-NÚÑEZ, M.; SOLARES-ARENAS, F.; PÉREZ-OLVERA, C.; TORRE-BLANCO, A. Secondary stem anatomy and uses of four drought-deciduous species of a tropical dry forest in Mexico. **Revista de Biología Tropical**, v. 53, p. 29-48, 2005.

RAMIREZ, V. R.; MOSTACERO, L. J.; GARCIA, A. E.; MEJIA, C. F.; PELAEZ, P. F.; Medina, C. D.; MIRANDA, C. H. **Vegetales empleados en Medicina Tradicional Norperuana**. Banco Agrario del Peru e Nacional Universidade de Trujillo, Peru, 1988, 54 p.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887-913, 2011.

RATNER, B.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**, 2<sup>a</sup> ed. Elsevier Academic Press, New York. 2004, 484 p.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 60, p. 57-109, 2003.

REIS, C. N.; FREITAS, W. R.; VENTURA, T. L. B.; KANASHIRO, M. M.; MUZITANO, M. F.; OLIVEIRA, D. B. Inibição da Produção de Óxido Nítrico e Efeito Citotóxico de Extrato Aquoso de *Annona muricata* L. **Perspectivas Online - Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 1, n. 2, p. 1- 8, 2011.

REZAEI, A.; FATHI, M.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers. **Food Hydrocoll**, v. 88, p. 146-162, 2019.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do bioma cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Ed.). **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 151-212, 2008.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

ROCHA, J. C. B. Avaliação da qualidade das cascas, estudo químico, capacidade antioxidante, atividade sobre o crescimento de pêlos em ratos e ensaio de permeação cutânea *in vitro* de extratos de *Guazuma ulmifolia* Lam. VAR. *tomentella*, Sterculiaceae. **Dissertação** de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005. 157 p.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. A. S.; Pastore, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 53-60, 2007.

ROJAS-HERNANDEZ, S.; OLIVARES-PEREZ, J.; AVILES-NOVA, F.; VILLAMANCERA, A.; REYNOSO-PALOMAR, A.; CAMACHO-DÍAZ, L. M. Productive response of lambs fed *Crescentia alata* and *Guazuma ulmifolia* fruits in a tropical region of Mexico. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 7, p. 1431-1436, 2015.

ROUPE, K. A.; REMSBERG, C. M.; YÁÑEZ, J. A.; DAVIES, N. M. Pharmacometrics of Stilbenes: Seguing Towards the Clinic. **Current Clinical Pharmacology**, v. 1, p. 81-101, 2006.

ROW, L. R.; SRINIYASULU, C.; SMITH, M.; SUBBA RAO, G. S. R. New lignans from *Phyllanthus niruri*. **Tetrahedron letters**, v. 23-24, p. 1557-1567, 1964.

RUFINO, M. S. M.; FERNANDES, F. A. N.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. Free radicals scavenging behavior of some Northeast Brazilian fruits in DPPH system. **Food Chemistry**, v. 114, p. 693-695, 2009.

RUHE, P. Q.; HEDBERG, E. L.; PADRON, N. T.; SPAUWEN, P. H.; JANSEN, J. A.; MIKOS, A. G. rhBMP-2 release from injectable poly (DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium-phosphate cement composites. **J Bone Joint Surg Am**, v. 85, p.75-81, 2003.

SALCEDO, H. E. R.; VIRGEN-CALLEROS, G.; VARGAS-RADILLO, J. J.; SALCEDOPEREZ, E.; BARRRIENTOS-RAMIREZ, L. Actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de hoja de *Guazuma ulmifolia* Lam. contra fitopatógenos. **Revista Mexicana de Ciencias Forestales**, v. 6, n. 27, p. 114-124, 2014.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos: actividad antioxidante. *Alimentaria*, v. 1, p. 29-40, 2002.

SANO, E. E.; RODRIGUES, A. A.; MARTINS, E. S.; BETTIOL, G. M.; BUSTAMANTE, M. M. C.; BEZERRA, A. S.; COUTO JR., A. F.; VASCONCELOS, V.; SCHÜLER, J.; BOLSE, E. L. Cerrado ecoregions: A spatial framework to assess and prioritize Brazilian savanna environmental diversity for conservation. **Journal of Environmental Management**, v. 232, p. 818-828, 2019.



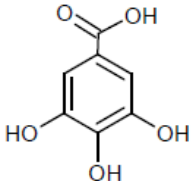
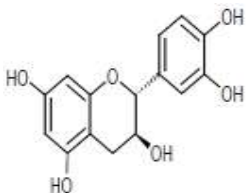
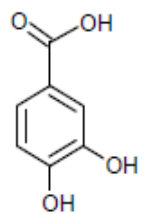
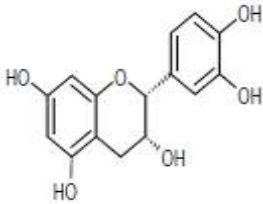
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003b.
- SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 501-505, 2003a.
- SCHOLES, P. D.; COOMBESA, A. G. A.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S.; WATTS, J. F.; USTARIZ, C.; VERT, M.; DAVIES, M. C. - J. Detection and determination of surface levels of poloxamer and PVA surfactant on biodegradable nanospheres using SSIMS and XPS. **Journal of Controlled Release**, v. 59, n. 3, p. 261-278, 1999.
- SENTHIL, A. P.; KUMAR, A.; MANASA, M.; KUMAR, K. A.; SRAVANTHI, K.; DEEPA, D., 2011. Wound healing activity of alcoholic extract of “*Guazuma ulmifolia*” 33 leaves on albino wistar rats. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 4, p. 34-38, 2011.
- SEREIA, A. L.; DE OLIVEIRA, M. T.; BARANOSKI, A.; MARQUES, L. L. M.; RIBEIRO, F. M.; ISOLANI, R. G.; DE MELLO, J. C. P. *In vitro* evaluation of the protective effects of plant extracts against amyloid-beta peptide-induced toxicity in human neuroblastoma SHSY5Y cells. **PLOS ONE**, v. 14, n. 2, p. 1-24, 2019.
- SHAW, D. J. **Introdução à Química dos colóides e de superfícies**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975.
- SILVA, L. M.; HILL, L. E.; FIGUEIREDO, E.; GOMES, C. L. Delivery of phytochemicals of tropical fruit by-products using poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles: Synthesis, characterization, and antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 165, p. 362-370, 2014.
- SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.
- SOBRINHO, S. P.; SIQUEIRA, A. G. Morphological characterization of fruits, seeds, seedlings and saplings of mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam. - Sterculiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 114-120, 2008.
- SONG, J. H.; LEE, H.-J.; KANG, K. S. Procyanidin C1 activates the Nrf2/HO-1 signaling pathway to prevent glutamate-induced apoptotic HT22 cell death. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, p. 142, 2019.
- SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados - Parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.
- SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M. Total phenolic and antioxidant capacity of methanolic extracts of ten fruits. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 35, n. 3, p. 581-585, 2013.

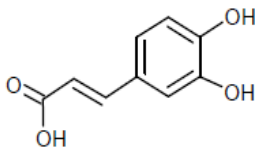
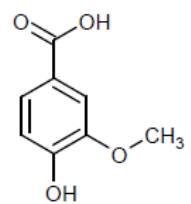
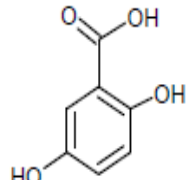
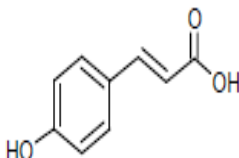
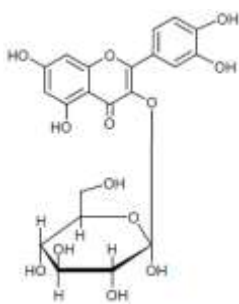
- STEICHEN, S. D.; CALDORERA-MOORE, M.; PEPPAS, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 416-427, 2013.
- SUNG, N.-Y.; YANG, M.-S.; SONG, D.-S.; BYUN, E.-B.; KIM, J.-K.; PARK, J.-H.; KIM, J.-H. The procyanidin trimer C1 induces macrophage activation via NF- $\kappa$ B and MAPK pathways, leading to Th1 polarization in murine splenocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 714, n. 1-3, p. 218-228, 2013.
- TABAS, I.; RON, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. **Nat. Cell Biol.**, v. 13, p. 184-190, 2011.
- TIAN, Y.; ZOU, B.; LI, C.; YANG, J.; XU, S.; HAGERMAN, A. E. High molecular weight persimmon tannin is a potent antioxidant both ex vivo and in vivo. **Food Research International**, v. 45, p. 26-30, 2012.
- TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 145-160, 2005.
- TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853-859, 2002.
- TUÑÓN, M. J.; GARCÍA-MEDIAVILLA, M. V.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Potencial de flavonóides como agentes antiinflamatórios: modulação da expressão gênica pró-inflamatória e vias de transdução de sinal. **Current Drug Metabolism**, v. 10, n. 3, p. 256-271, 2009.
- UHRICH, K. E.; CANNIZZARO, S. M.; LANGER, R. S.; SHAKESHEFF K. M. Polymeric systems for controlled drug delivery. **Chem. Rev.**, v. 99, n. 11, p. 3181-3198, 1999.
- ULLOA, L.; TRACEY, K. J. The "cytokine profile": a code for sepsis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 2, p. 56-63, 2005.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.
- WAFFO-TÉGUO, P.; HAWTHORNE, M. E.; CUENDET, M.; MÉRILLON, J. M.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M.; MEHTA, R. G. Potential Cancer-Chemopreventive Activities of Wine Stilbenoids and Flavans Extracted From Grape (*Vitis vinifera*) Cell Cultures. **Nutrition and Cancer**, v. 40, n. 2, p. 173-179, 2001.
- WANG, S.; SU, R.; NIE, S.; SUN, M.; ZHANG, J.; WU, D.; MOUSTAID-MOUSSA, N. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, p. 363-376, 2014.
- WEBSTER, N.R.; GALLEY, H.F. Inflammation and immunity. **British journal of anaesthesia**, v. 3, n. 2, p. 54-58, 2003.

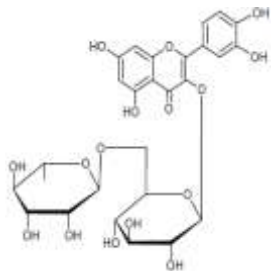
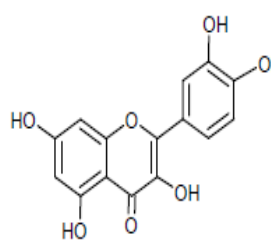
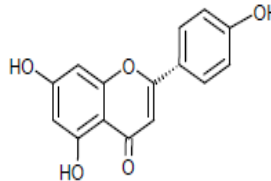
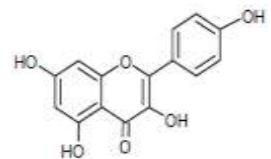
- WONGKITTIPONG, R.; PRAT, L.; DAMRONGLERD, S.; GOURDON, C. Solid-liquid extraction of andrographolide from plants-experimental study, kinetic reaction and model. **Separation and Purification Technology**, v. 40, p. 147-154, 2004.
- WOOTTON-BEARD, P. C.; RYAN, L. Improving public health?: the role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. **Food Research International**, v. 44, n. 10, p. 3135-3148, 2011.
- WU, D.; YOTNDA, P. Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers. **Journal of Visualized Experiments**, v. 57, p. 33-57, 2011.
- WU, X. S.; WANG, N. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation. Parte II: Biodegradação. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 12, p. 21-34, 2001.
- ZHANG, S-H.; LIN, Y-M.; ZHOU, H-C.; WEI, S-D.; LIN, G-H.; YE, G-F. Antioxidant tannins from stem bark and fine root of *Casuarina equisetifolia*. **Molecules**, v. 15, p. 5658- 5670, 2010.
- ZIGONEANU, I. G.; ASTETE, C. E.; SABLIOV, C. M. Nanoparticles with entrapped alfa-tocopherol: synthesis, characterization, and controlled release. **Nanotechnology**, v.19, p. 1-8, 2008.
- ZORZI, A, G. K.; CARVALHO, E. L. S.; POSER, G. L. V.; TEIXEIRA, H. F. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 426-436, 2015.

## **ANEXOS**

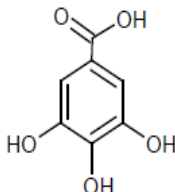
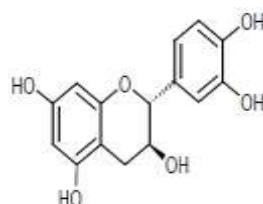
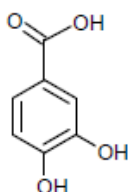
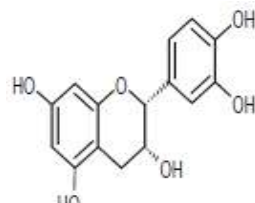
**Tabela 8:** Compostos encontrados no extrato da casca da mutamba (ExCMet) através da análise por CLAE-EMAR.

TR (min)	TR do padrão	Massa Detectada	Massa Calculada	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	Composto Identificado
		[M - H] <sup>-</sup> m/z				
11,48	11,58	169,01344	169,01365	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	1,243	 <p>Ácido gálico</p>
17,77	17,89	289,07199	289,07119	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	2,767	 <p>Catequina</p>
19,74	19,86	153,01836	153,01875	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	2,549	 <p>Ácido protocatequínico</p>
20,04	20,16	289,07196	289,07119	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	2,664	 <p>Epicatequina</p>

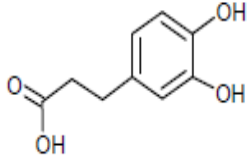
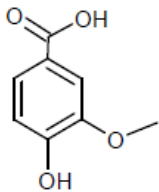
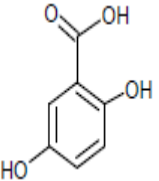
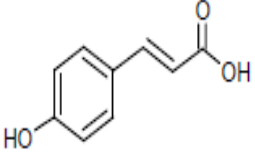
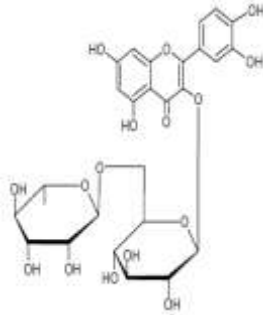
20,63	20,74	179,03423	179,03441	$C_9H_8O_4$	1,005	 <p>Ácido cafeico</p>
20,65	20,76	167,03416	167,03441	$C_8H_8O_4$	1,497	 <p>Ácido vanílico</p>
22,86	22,96	153,01839	153,01875	$C_7H_6O_4$	2,353	 <p>Ácido genticico</p>
22,94	22,75	163,03917	163,03951	$C_9H_8O_3$	2,085	 <p>Ácido p-cumárico</p>
23,58	23,67	463,08868	463,08757	$C_{21}H_{20}O_{12}$	2,397	 <p>Quercetina 3 O-<math>\beta</math> glucosideo</p>

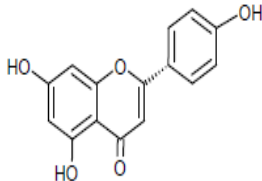
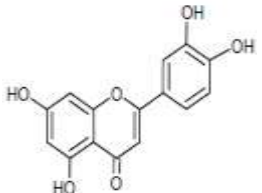
23,83	23,63	609,14655	609,14547	$C_{27}H_{30}O_{16}$	1,773	 <p>Rutina</p>
25,87	25,94	301,03561	301,03477	$C_{15}H_{10}O_7$	2,790	 <p>Quercetina</p>
25,91	25,98	271,06140	271,06065	$C_{15}H_{12}O_5$	2,767	 <p>Naringenina</p>
26,78	26,83	285,04059	285,03987	$C_{15}H_{10}O_6$	2,526	 <p>Kaempferol</p>

**Tabela 9:** Compostos encontrados no extrato da polpa da mutamba (ExpMet) através da análise por CLAE-EMAR.

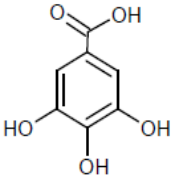
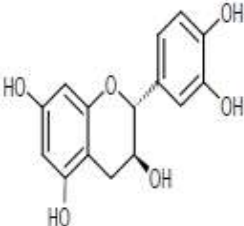
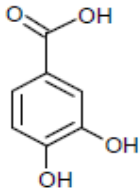
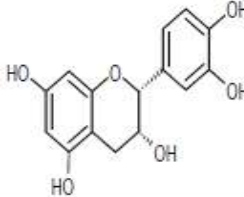
TR (min)	TR do padrão	Massa Detectada	Massa Calculada	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	Composto Identificado
		[M - H] <sup>-</sup> m/z				
11,48	11,58	169,01340	169,01365	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	1,479	 <p>Ácido gálico</p>
17,77	17,89	289,07196	289,07119	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	2,664	 <p>Catequina</p>
19,74	19,86	153,01843	153,01875	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	2,091	 <p>Ácido protocatequínico</p>
20,04	20,16	289,07196	289,07119	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	2,664	 <p>Epicatequina</p>

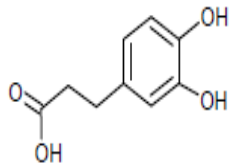
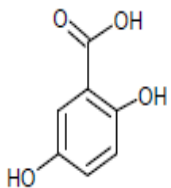
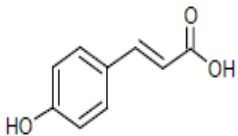
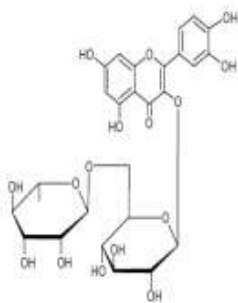
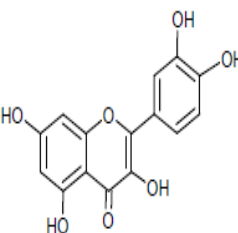


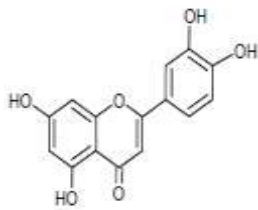
20,63	20,74	179,03424	179,03441	$C_9H_8O_4$	0,950	 <p>Ácido cafeico</p>
20,65	20,76	167,03418	167,03441	$C_8H_8O_4$	1,377	 <p>Ácido vanílico</p>
22,85	22,96	153,01840	153,01875	$C_7H_6O_4$	2,287	 <p>Ácido gentsico</p>
22,93	22,75	163,03923	163,03951	$C_9H_8O_3$	1,717	 <p>Ácido p-cumárico</p>
23,82	23,63	609,14661	609,14547	$C_{27}H_{30}O_{16}$	1,871	 <p>Rutina</p>

25,91	25,98	271,06140	271,06065	$C_{15}H_{12}O_5$	2,767	 <p>Naringenina</p>
26,21	26,27	285,04062	285,03987	$C_{15}H_{10}O_6$	2,631	 <p>Luteolina</p>

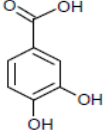
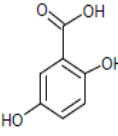
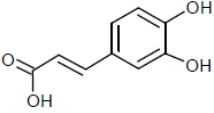
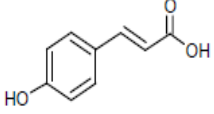
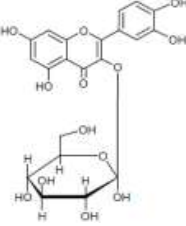
**Tabela 10:** Compostos encontrados no extrato da semente da mutamba (ExSMet) através da análise por CLAE-EMAR.

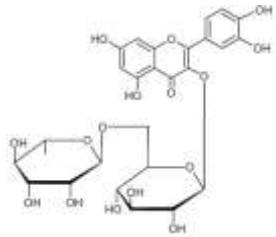
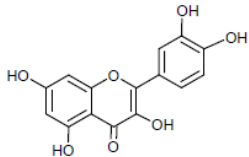
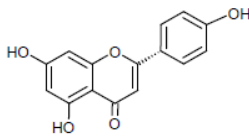
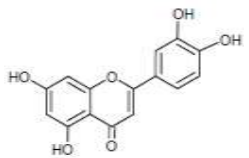
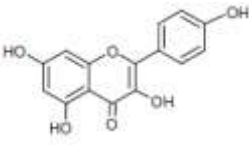
TR (min)	TR do padrão	Massa Detectada	Massa Calculada	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	Composto Identificado
		[M - H] <sup>-</sup> m/z				
11,49	11,58	169,01344	169,01365	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	1,243	 <p>Ácido gálico</p>
17,78	17,89	289,07199	289,07119	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	2,767	 <p>Catequina</p>
19,74	19,86	153,01842	153,01875	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	2,157	 <p>Ácido protocatequínico</p>
20,04	20,16	289,07196	289,07119	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	2,664	

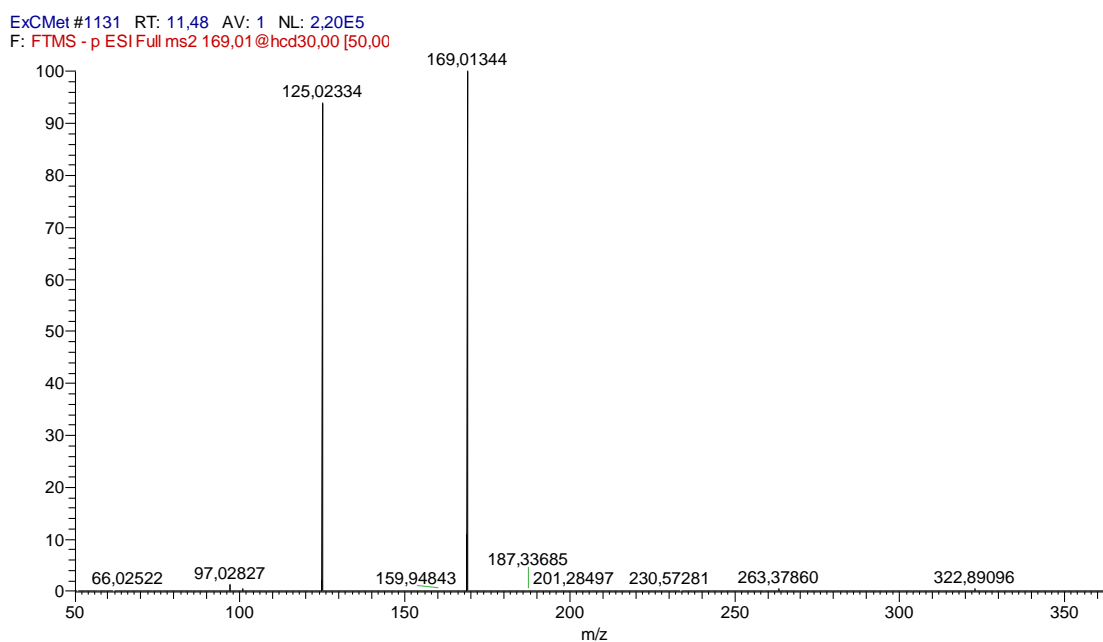
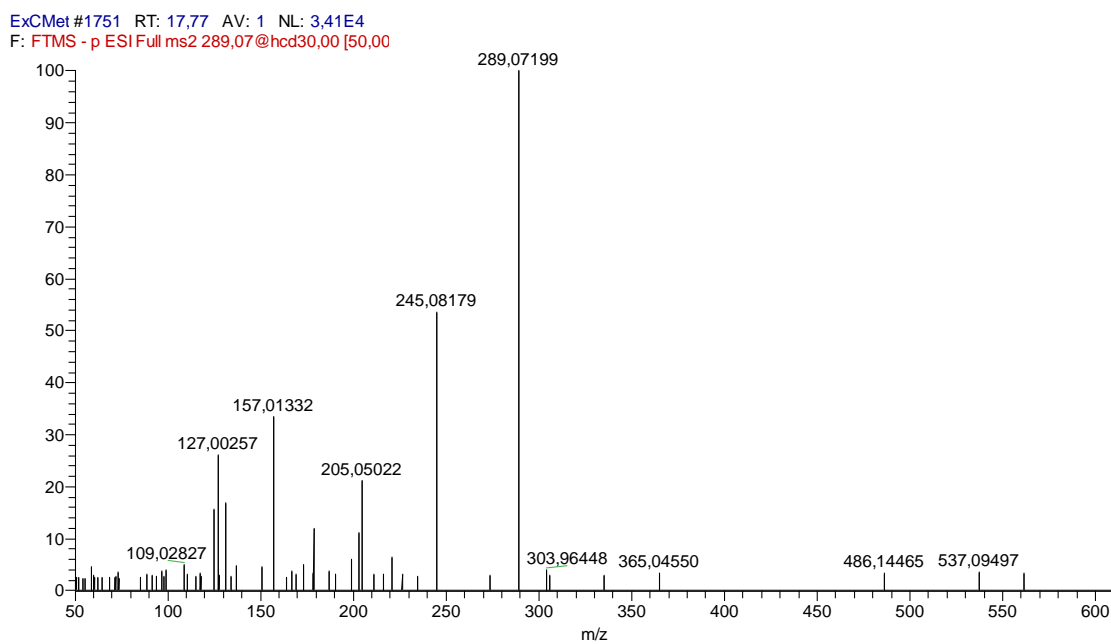
20,63	20,74	179,03424	179,03441	$C_9H_8O_4$	1,396	 <p>Ácido cafeico</p>
22,29	22,96	153,01842	153,01875	$C_7H_6O_4$	2,157	 <p>Ácido gentsico</p>
22,93	22,75	163,03918	163,03951	$C_9H_8O_3$	2,024	 <p>Ácido p-cumárico</p>
23,82	23,63	609,14642	609,14547	$C_{27}H_{30}O_{16}$	1,560	 <p>Rutina</p>
25,86	25,94	301,03552	301,03477	$C_{15}H_{10}O_7$	2,392	 <p>Quercetina</p>

26,20	26,27	285,04056	285,03987	$C_{15}H_{10}O_6$	2,421	 <p>Luteolina</p>
-------	-------	-----------	-----------	-------------------	-------	------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Tabela 11:** Compostos encontrados no extrato ExAc através da análise por CLAE-EMAR.

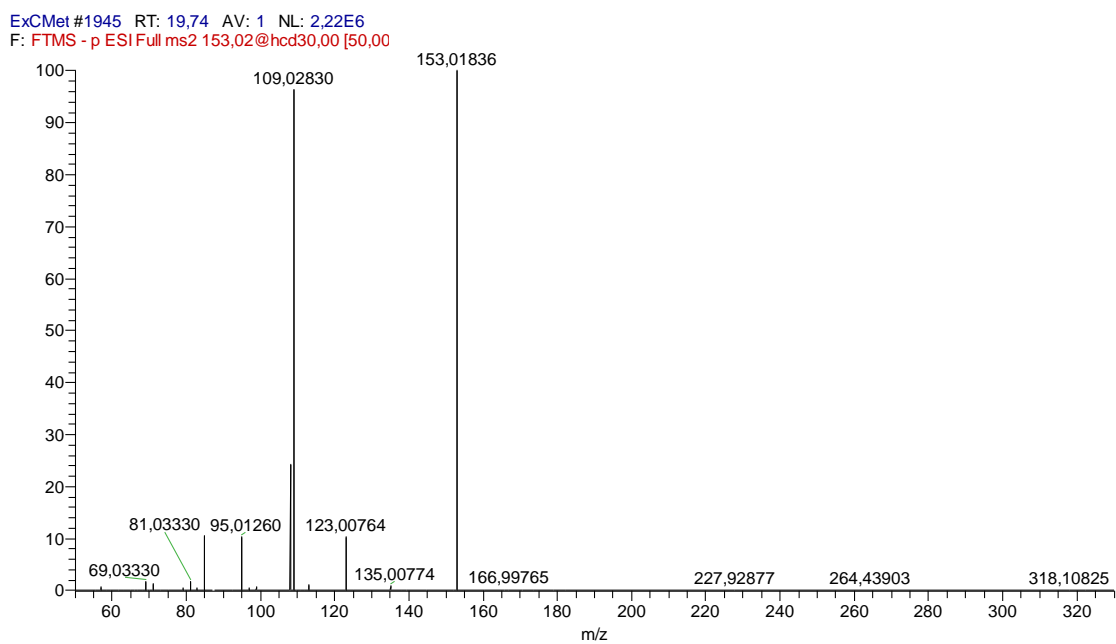
TR (min)	TR do padrão	Massa Detectada	Massa Calculada	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	Composto Identificado
		[M – H] <sup>-</sup> (m/z)				
19,27	19,35	153,01869	153,01879	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	0,455	 <p>Ácido protocatequínico</p>
22,66	22,75	153,01855	153,01879	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	0,315	 <p>Ácido gentísico</p>
23,18	23,27	179,03419	179,03444	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	0,305	 <p>Ácido cafeico</p>
25,10	25,20	163,03935	163,03952	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0,379	 <p>Ácido p-cumárico</p>
25,60	25,59	463,08908	463,08766	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	1,978	 <p>Quercetina-3-O-β-glucosídeo</p>

25,60	25,59	609,14642	609,14557	$C_{27}H_{30}O_{16}$	1,409	 <p>Rutina</p>
27,77	27,83	301,03592	301,03483	$C_{15}H_{10}O_7$	1,641	 <p>Quercetina</p>
28,07	28,14	271,06174	271,06065	$C_{15}H_{12}O_5$	1,640	 <p>Naringenina</p>
28,28	28,31	285,04105	285,03992	$C_{15}H_{10}O_6$	1,686	 <p>Luteolina</p>
28,92	28,98	285,04108	285,03992	$C_{15}H_{10}O_6$	1,716	 <p>Kaempferol</p>

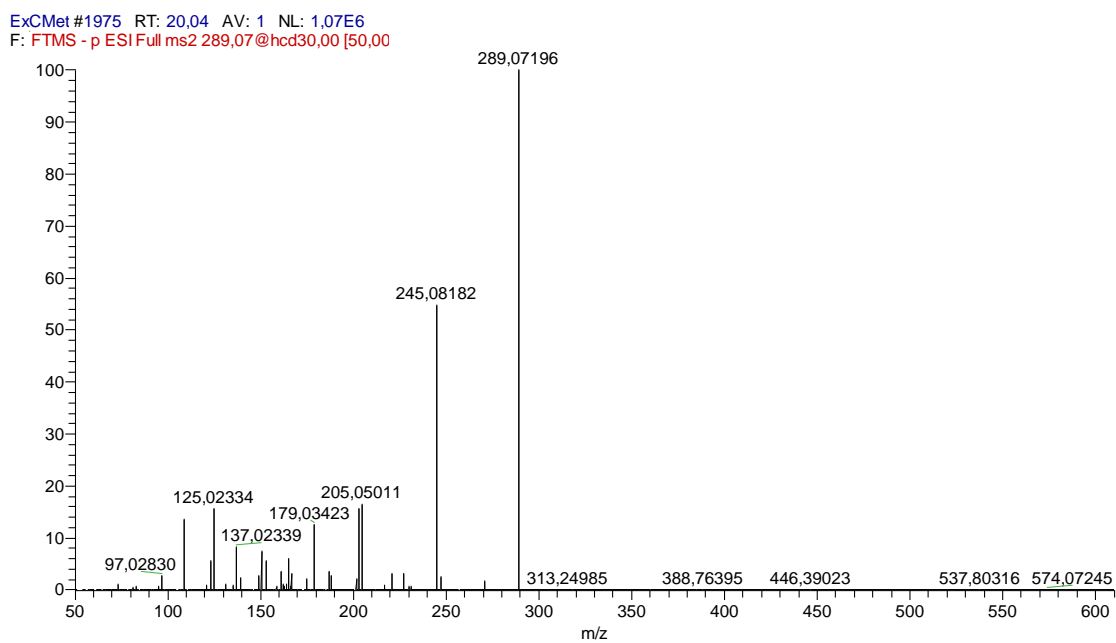
**Figura 29:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido gálico no ExCMet.**Figura 30:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da catequina no ExCMet.

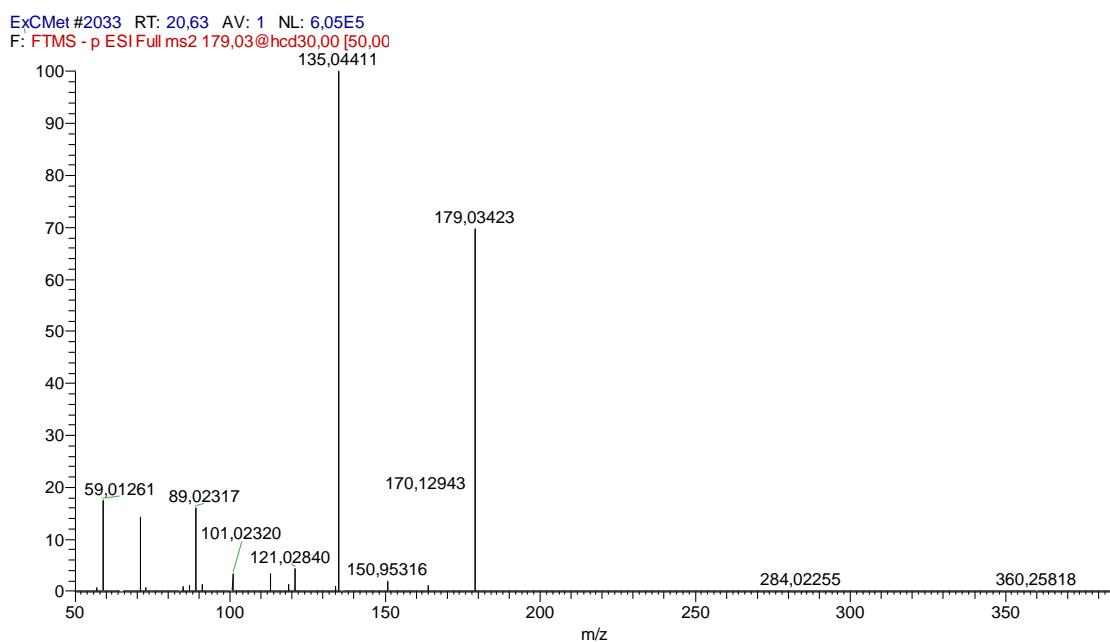
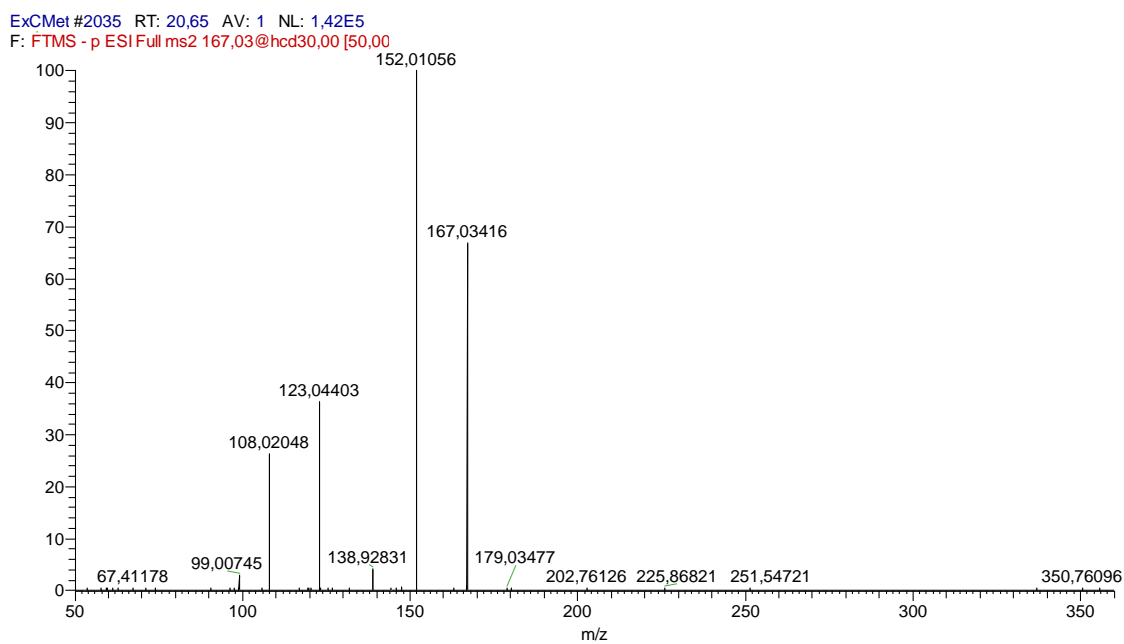


**Figura 31:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da ácido protocatequínico no ExCMet.



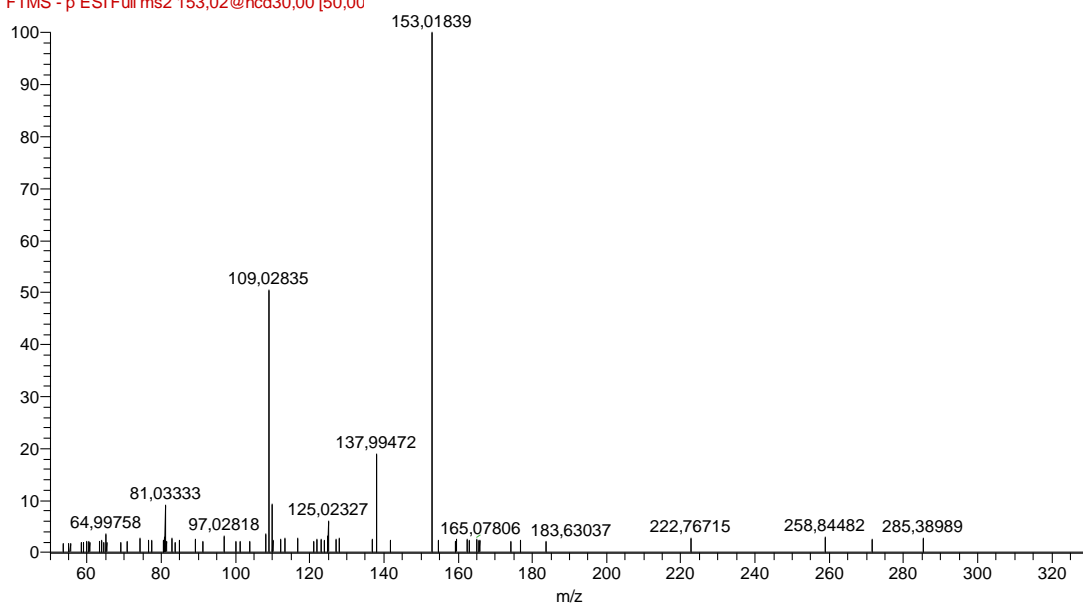
**Figura 32:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da epicatequina no ExCMet.



**Figura 33:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido cafeico no ExCMet.**Figura 34:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido vanílico no ExCMet.

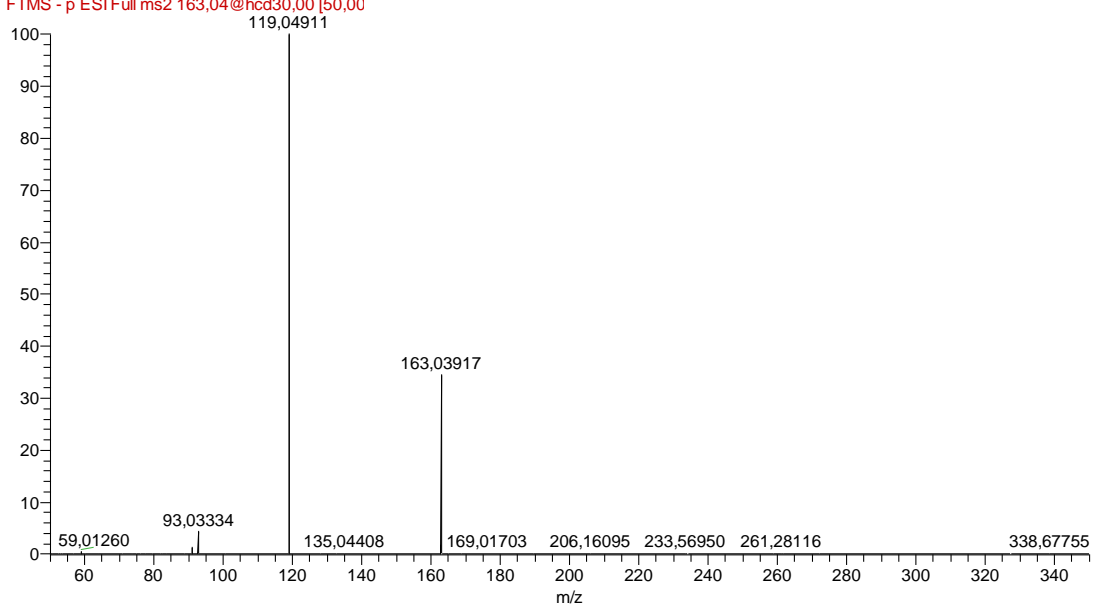
**Figura 35:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido gentísico no ExCMet.

ExCMet #2253 RT: 22.86 AV: 1 NL: 2,82E4  
F: FTMS - p ESI Full ms2 153,02@hcd30,00 [50,00

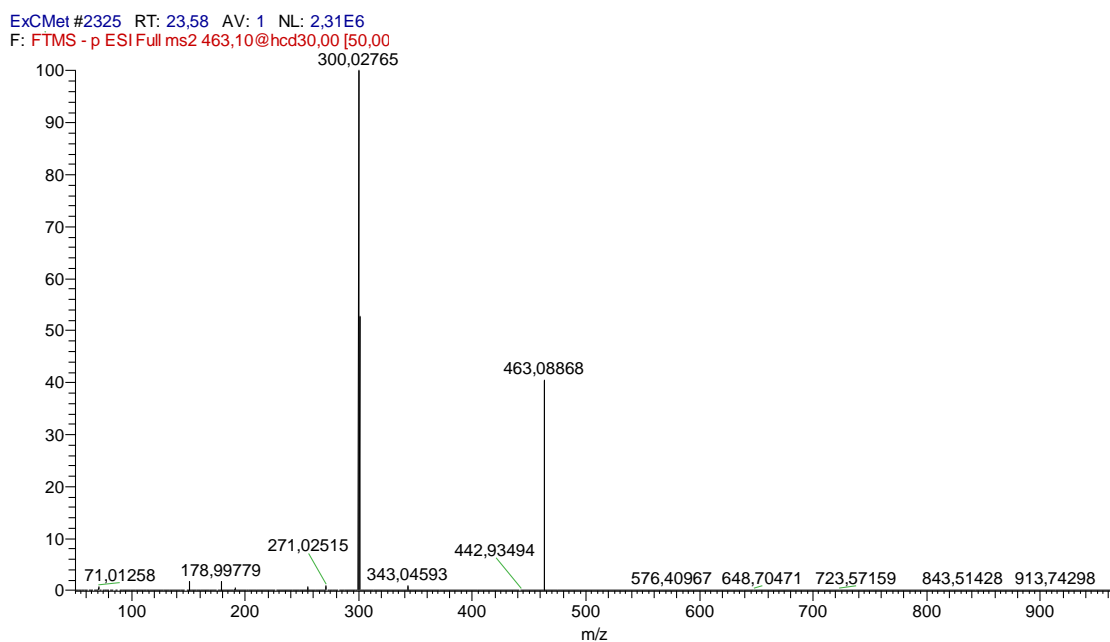


**Figura 36:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido p-cumárico no ExCMet.

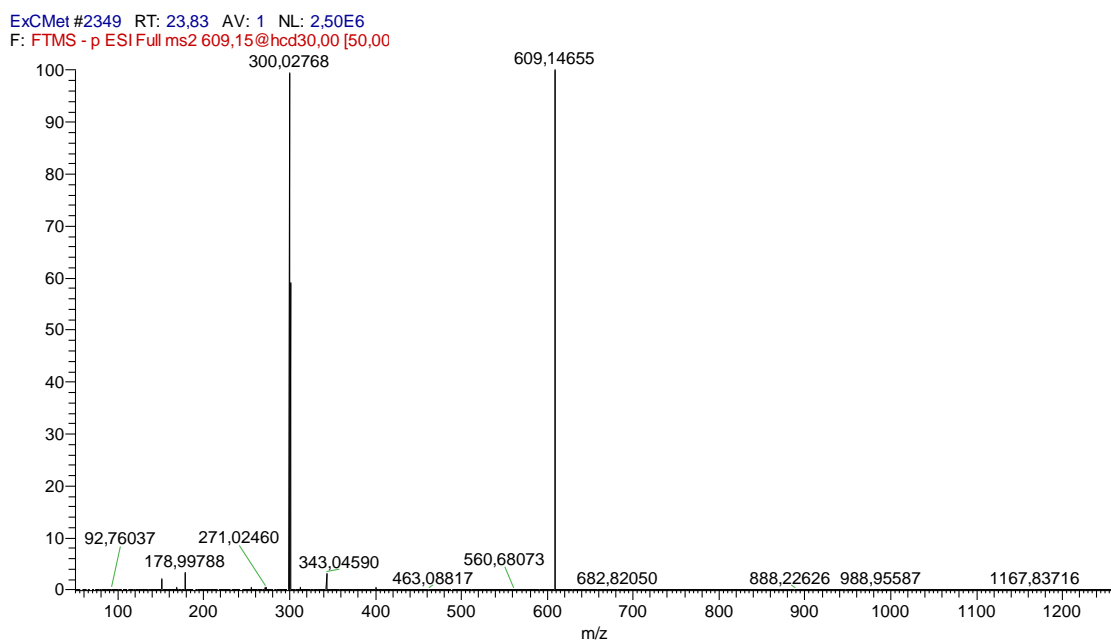
ExCMet #2261 RT: 22.94 AV: 1 NL: 3,36E5  
F: FTMS - p ESI Full ms2 163,04@hcd30,00 [50,00

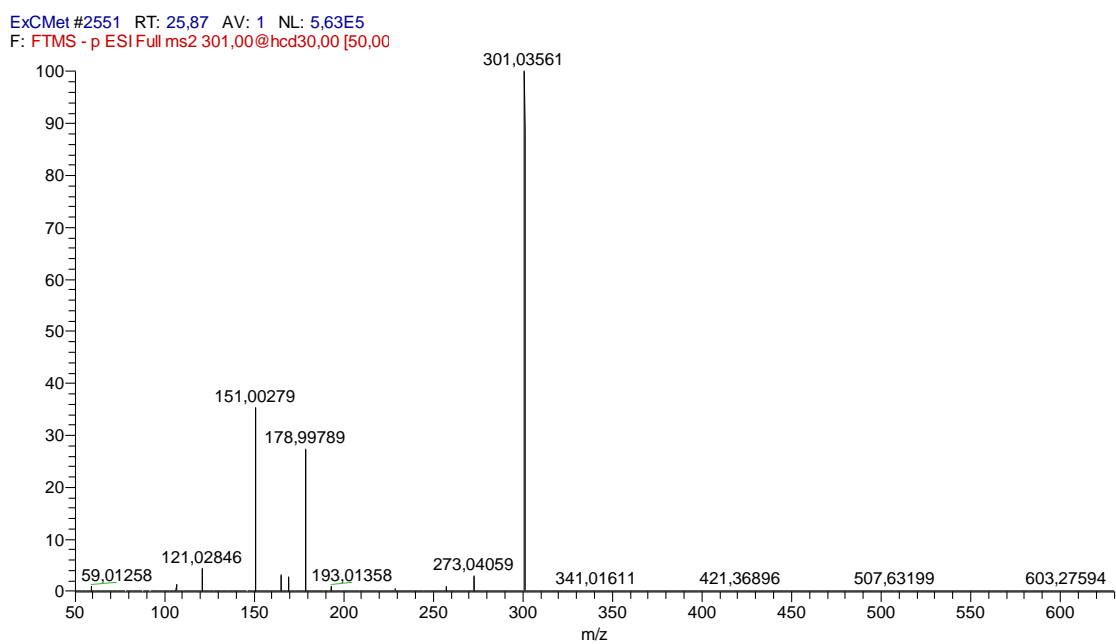
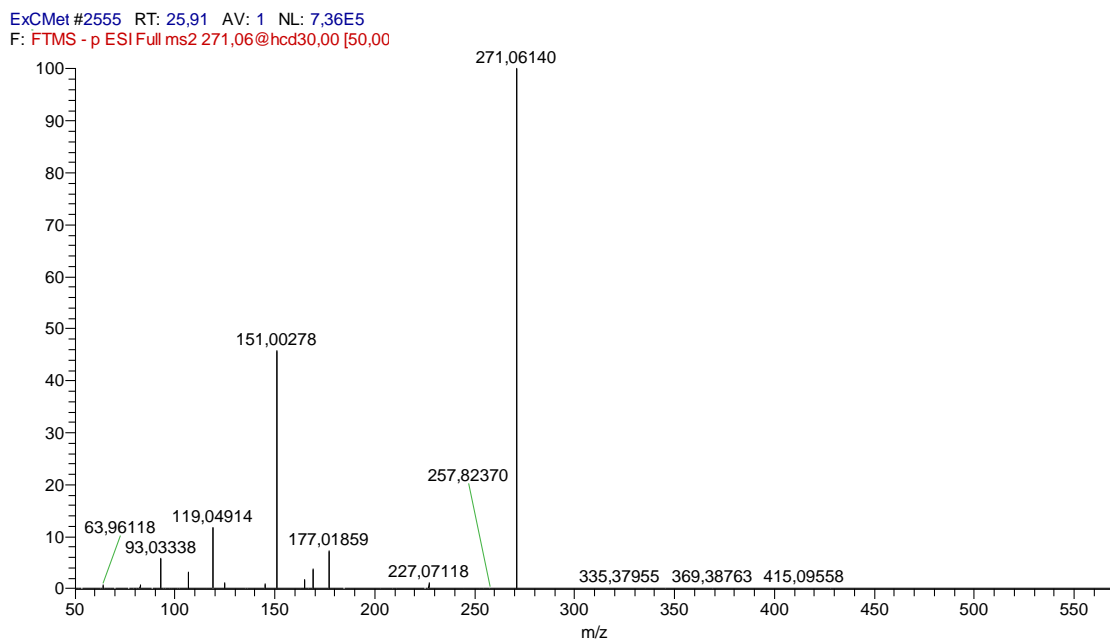


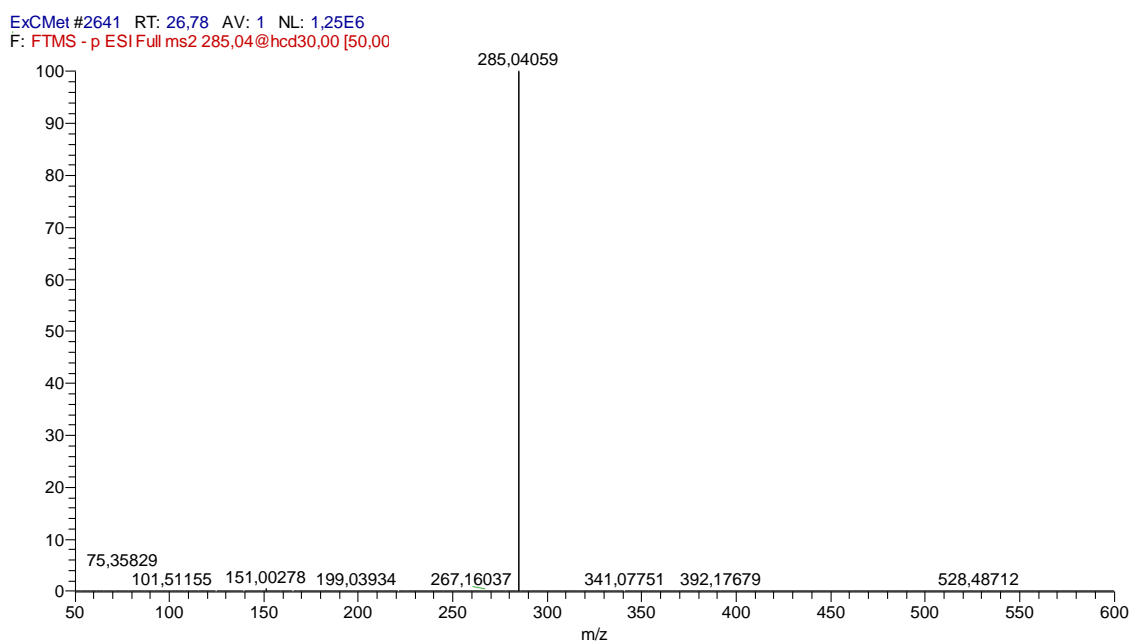
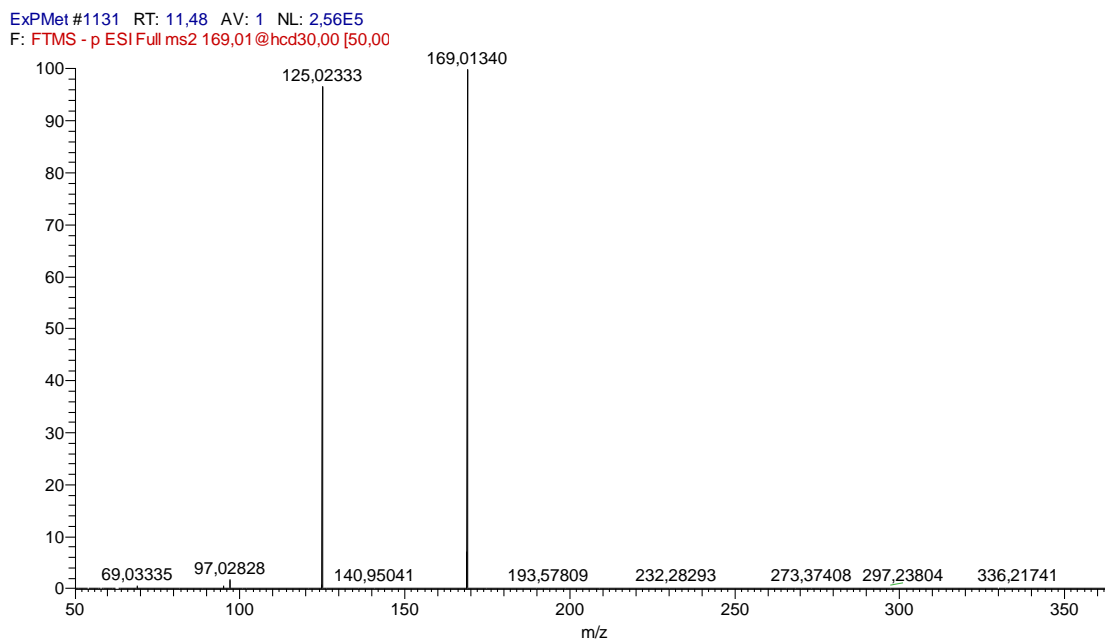
**Figura 37:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da quercetina 3 O -  $\beta$  glucosideo no ExCMet.



**Figura 38:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da rutina no ExCMet.

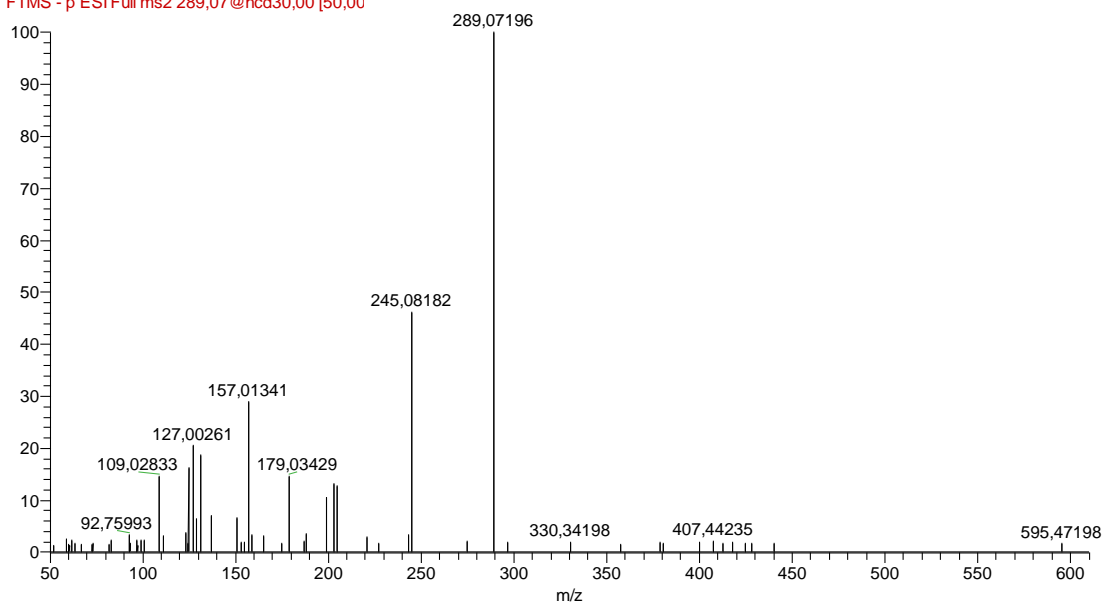


**Figura 39:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da quercetina no ExCMet.**Figura 40:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da naringenina no ExCMet.

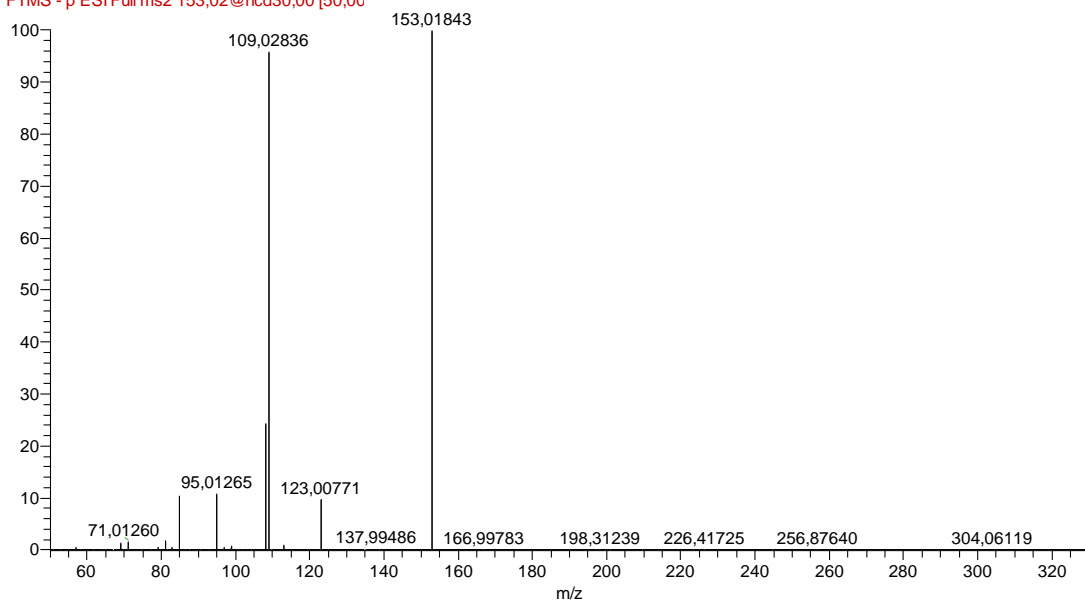
**Figura 41:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do kaempferol no ExCMet.**Figura 42:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido gálico no ExpMet.

**Figura 43:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da catequina no ExPMet.

ExPMet #1751 RT: 17,77 AV: 1 NL: 5,87E4  
F: FTMS - p ESI Full ms2 289,07@hcd30,00 [50,00]

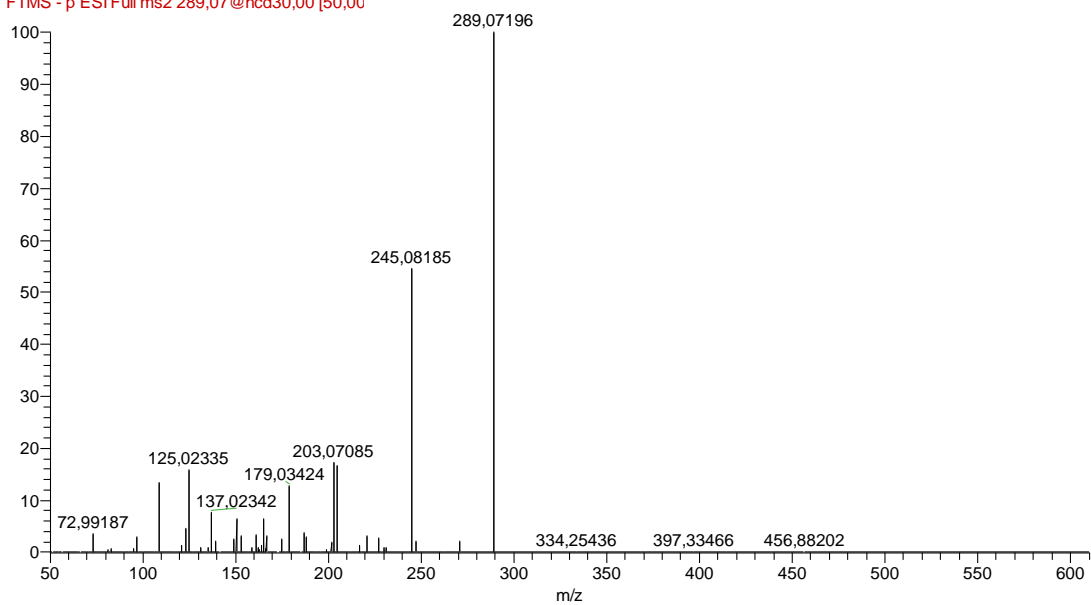
**Figura 44:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido protocatequínico no ExPMet.

ExPMet #1945 RT: 19,74 AV: 1 NL: 1,52E6  
F: FTMS - p ESI Full ms2 153,02@hcd30,00 [50,00]

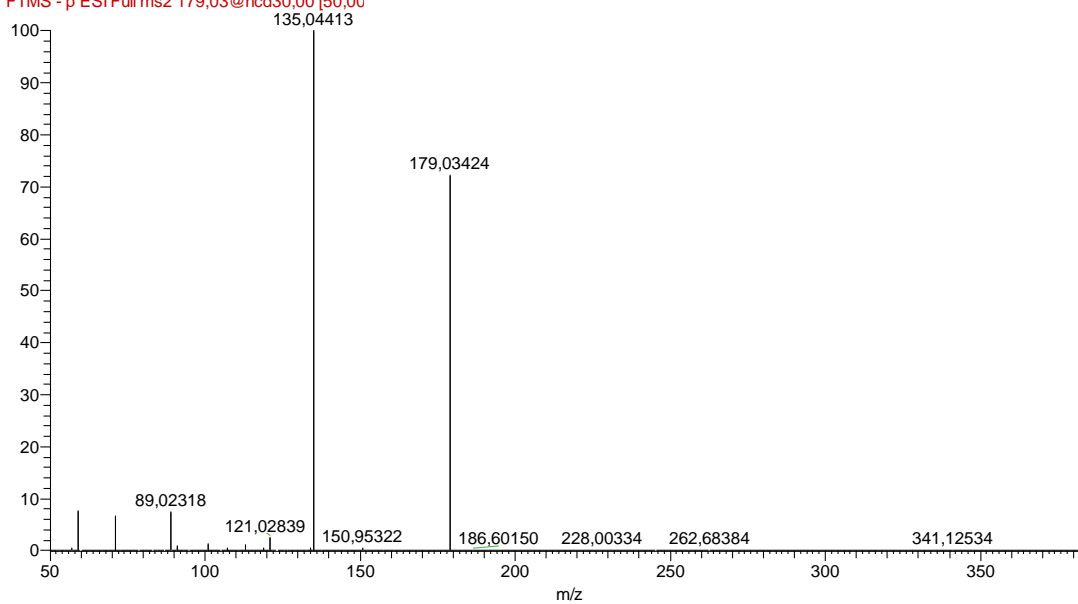


**Figura 45:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da epicatequina no ExPMet.

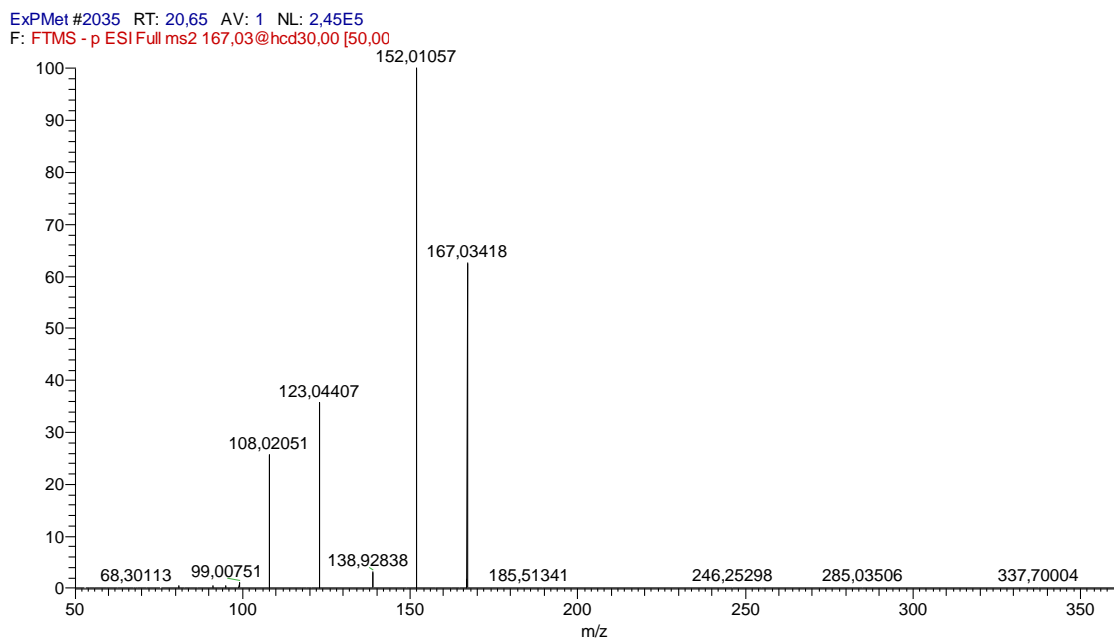
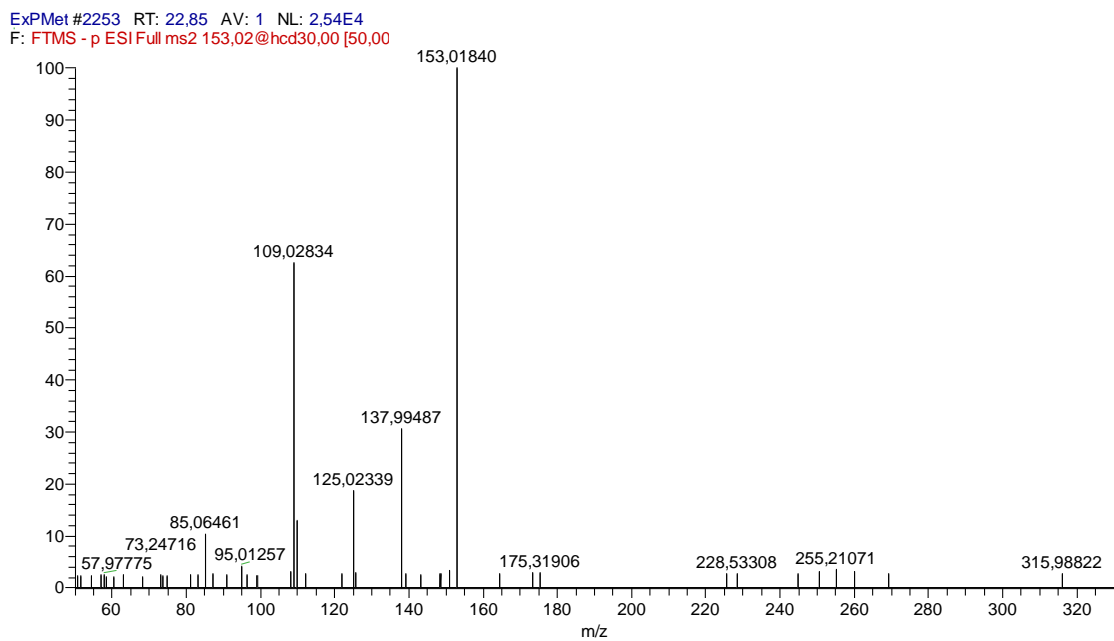
ExPMet #1975 RT: 20,04 AV: 1 NL: 1,17E6  
F: FTMS - p ESI Full ms2 289,07@hcd30,00 [50,00

**Figura 46:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido cafeico no ExPMet.

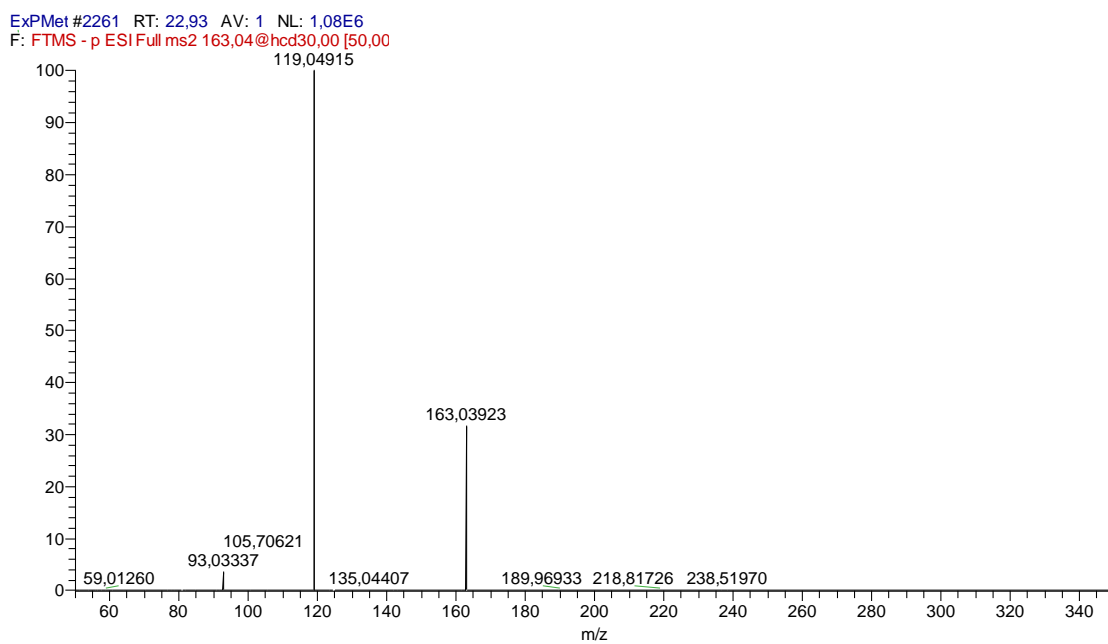
ExPMet #2033 RT: 20,63 AV: 1 NL: 1,14E6  
F: FTMS - p ESI Full ms2 179,03@hcd30,00 [50,00



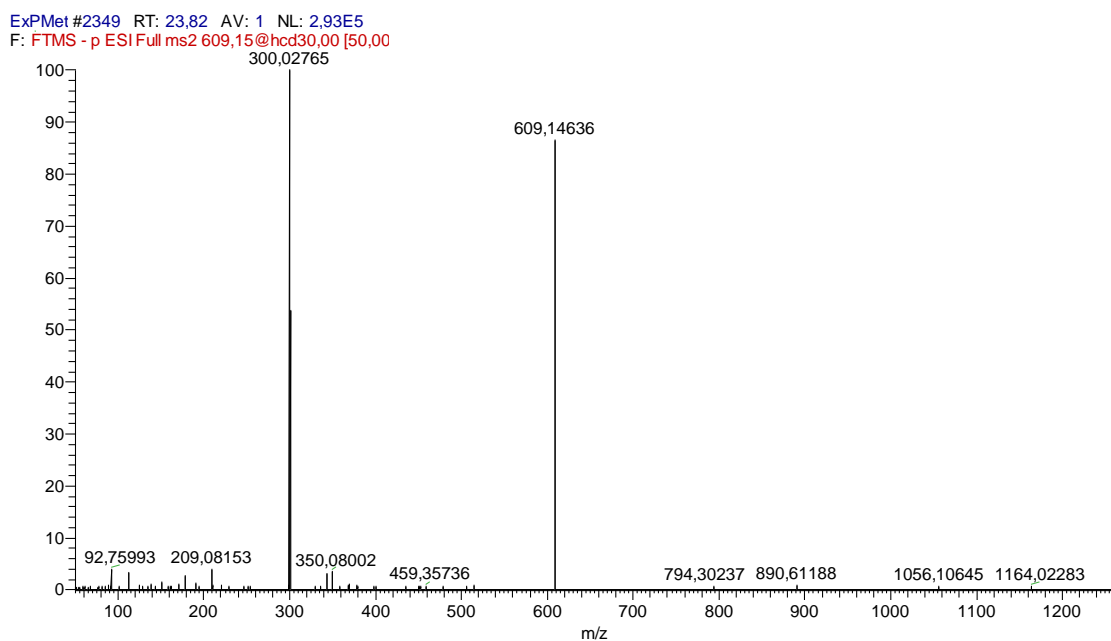


**Figura 47:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido vanílico no ExPMet.**Figura 48:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido gentísico no ExPMet.

**Figura 49:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido p-cumárico no ExpMet.

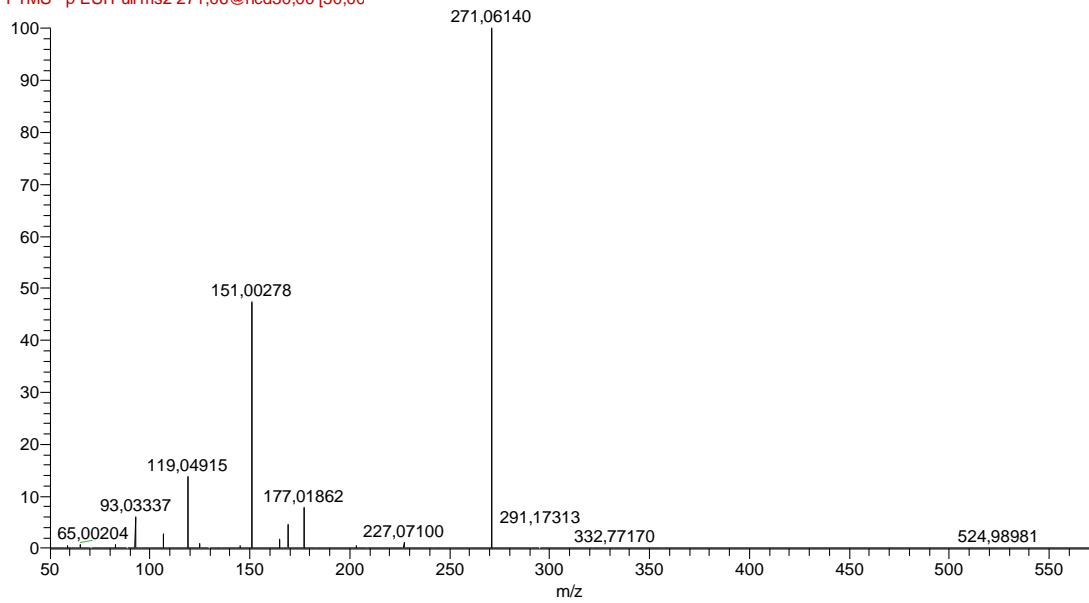


**Figura 50:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da rutina no ExpMet.

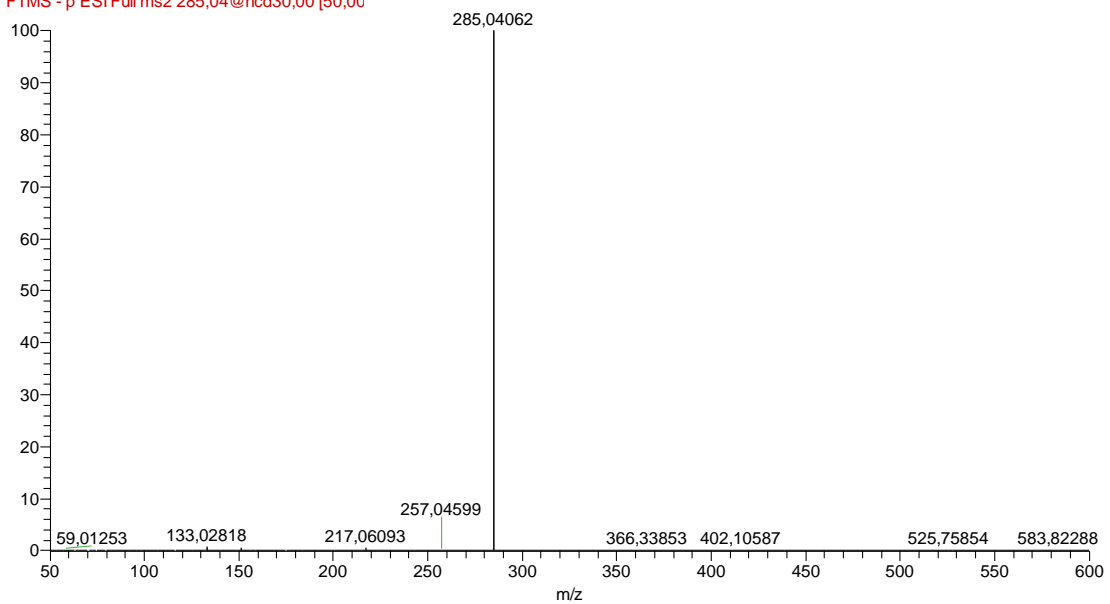


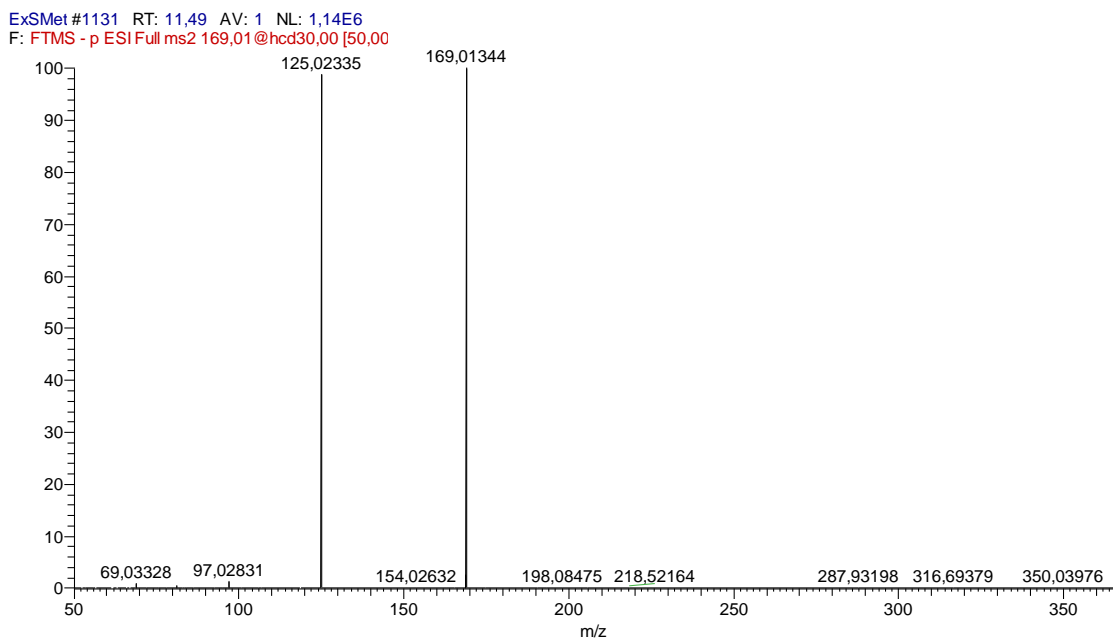
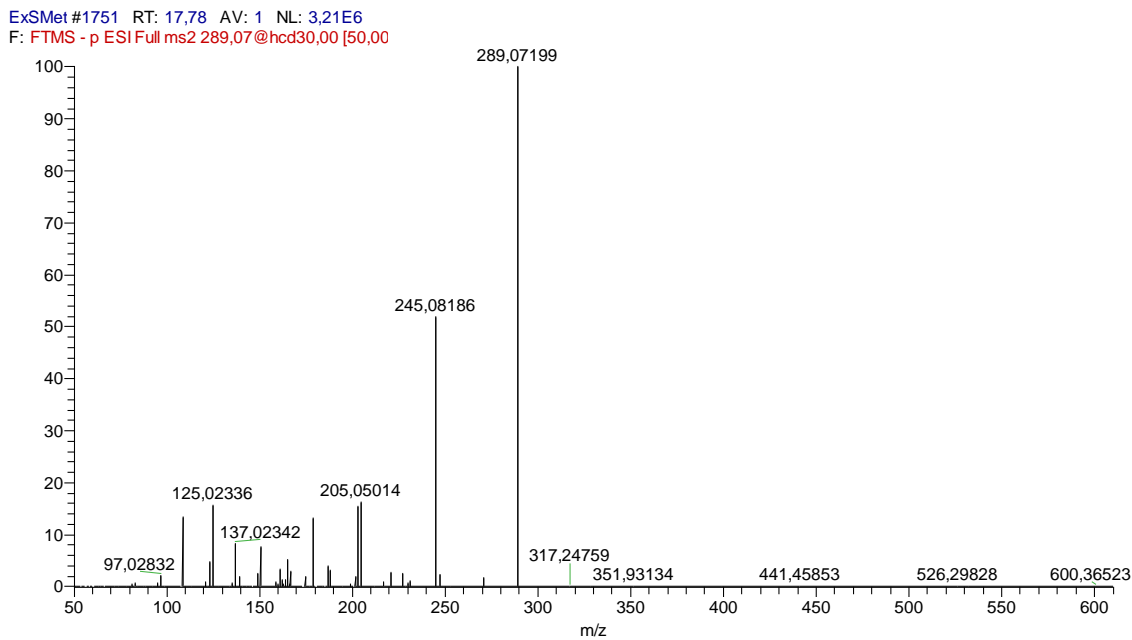
**Figura 51:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da naringenina no ExPMet.

ExPMet #2555 RT: 25,91 AV: 1 NL: 1,41E6  
F: FTMS - p ESI Full ms2 271,06@hcd30,00 [50,00]

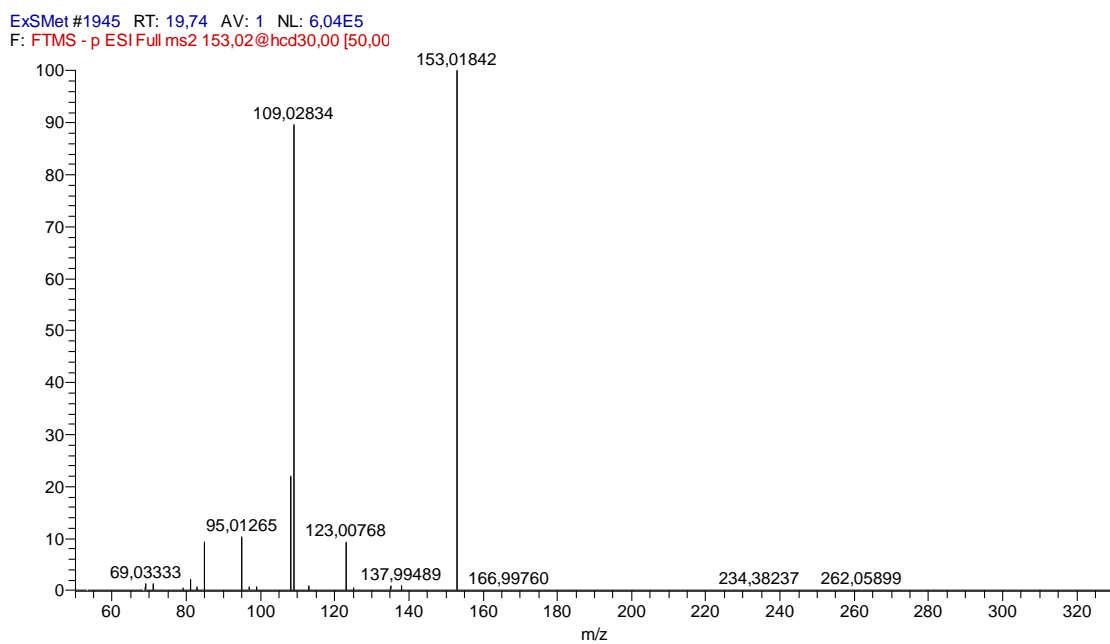
**Figura 52:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da luteolina no ExPMet.

ExPMet #2585 RT: 26,21 AV: 1 NL: 4,86E6  
F: FTMS - p ESI Full ms2 285,04@hcd30,00 [50,00]

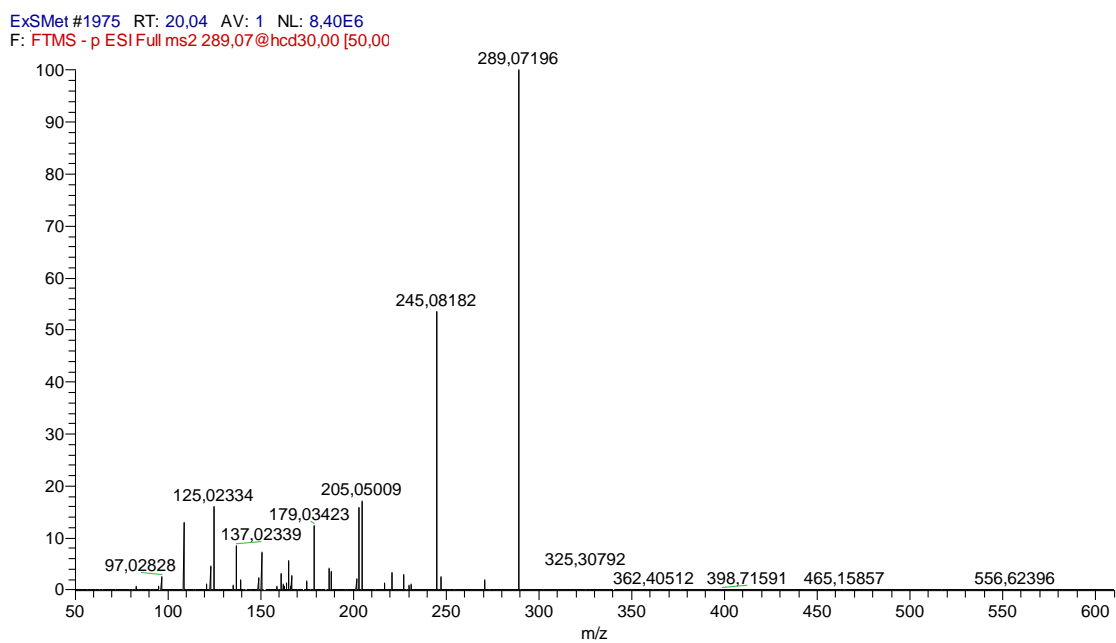


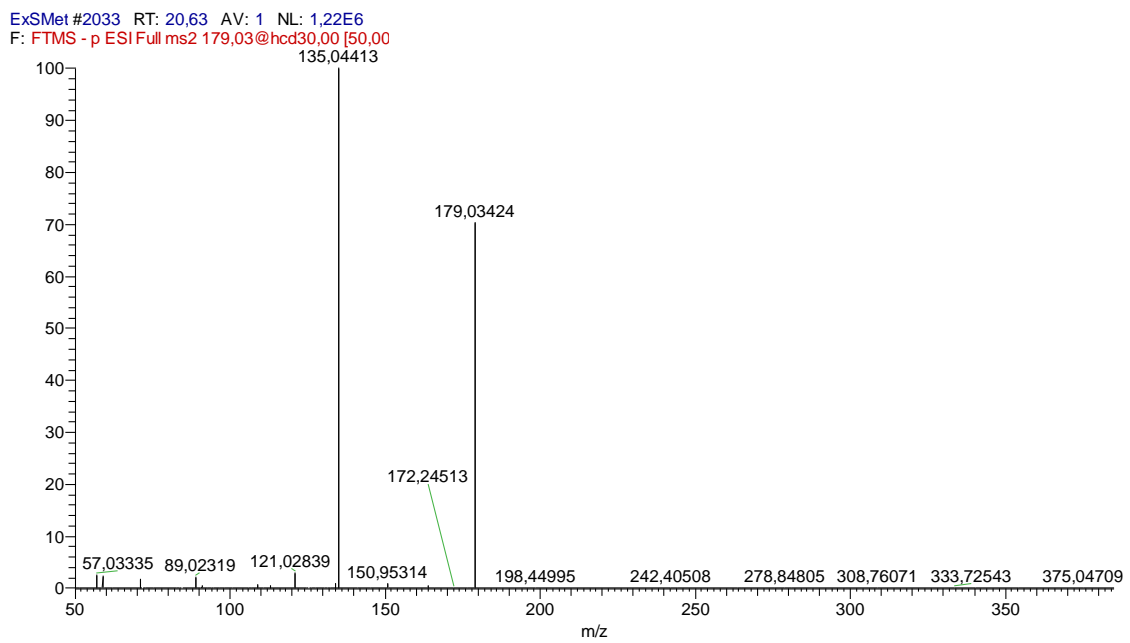
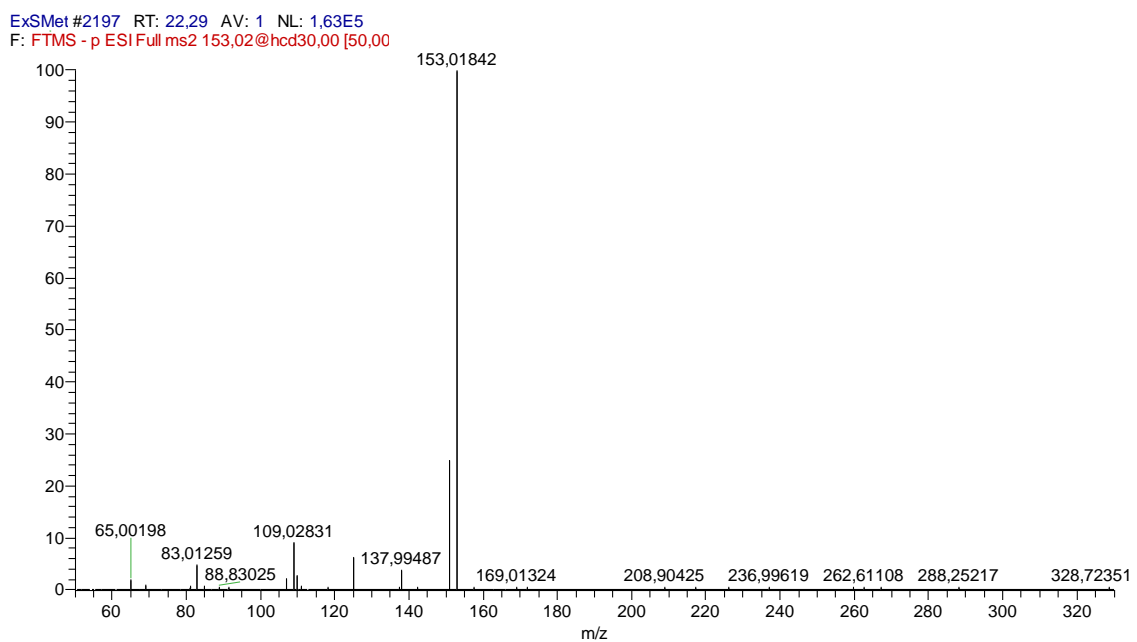
**Figura 53:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido gálico no ExSMet.**Figura 54:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da catequina no ExSMet.

**Figura 55:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido protocatequínico no ExSMet.

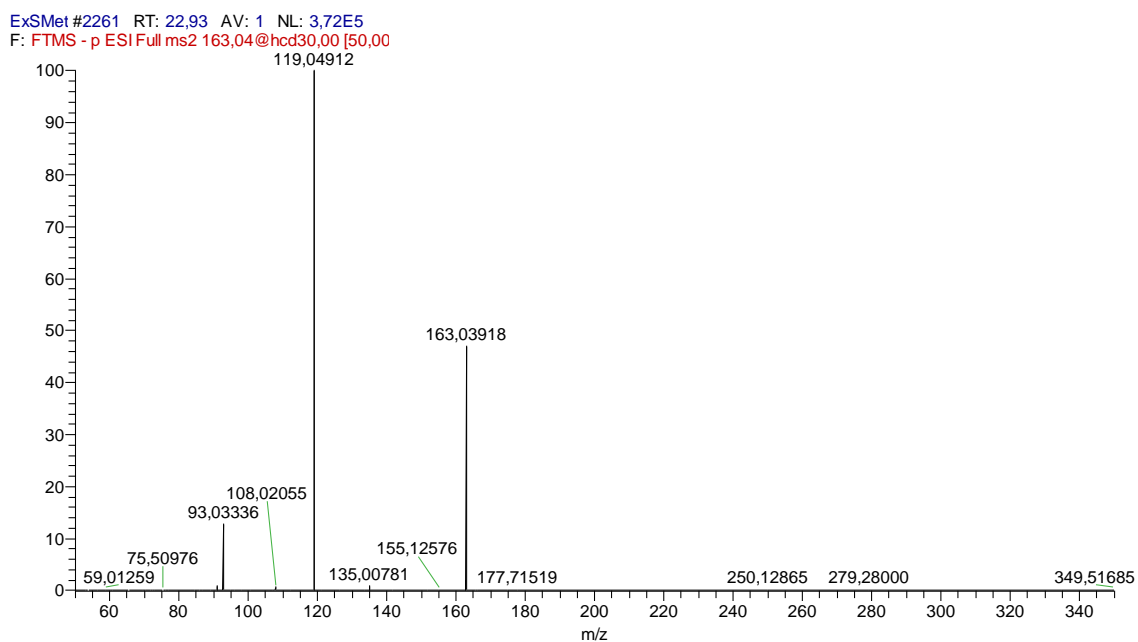


**Figura 56:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da epicatequina no ExSMet.

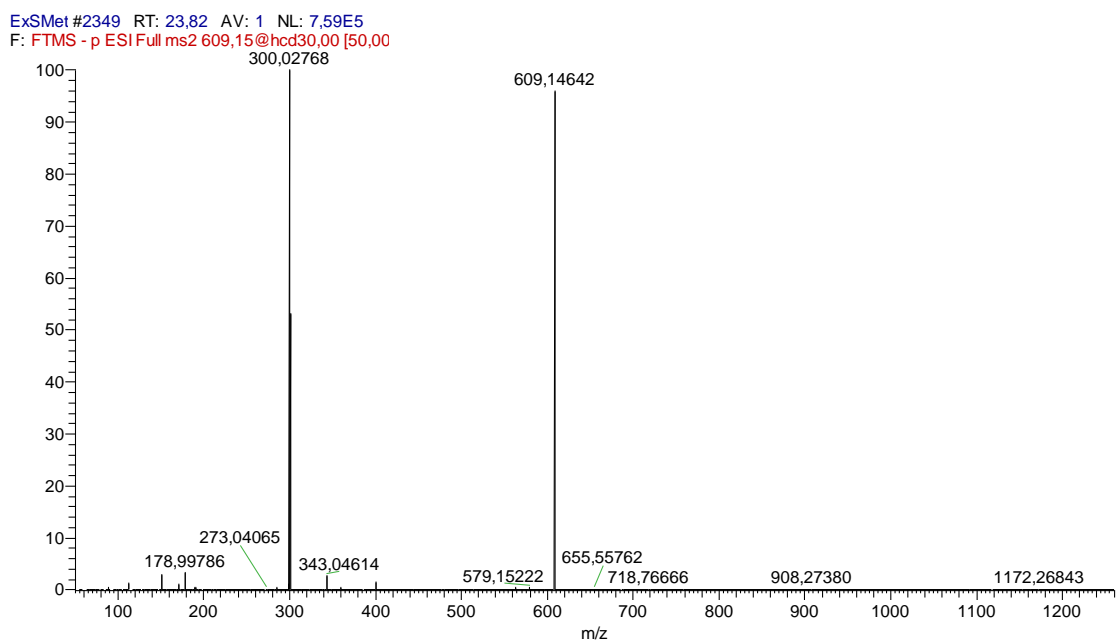


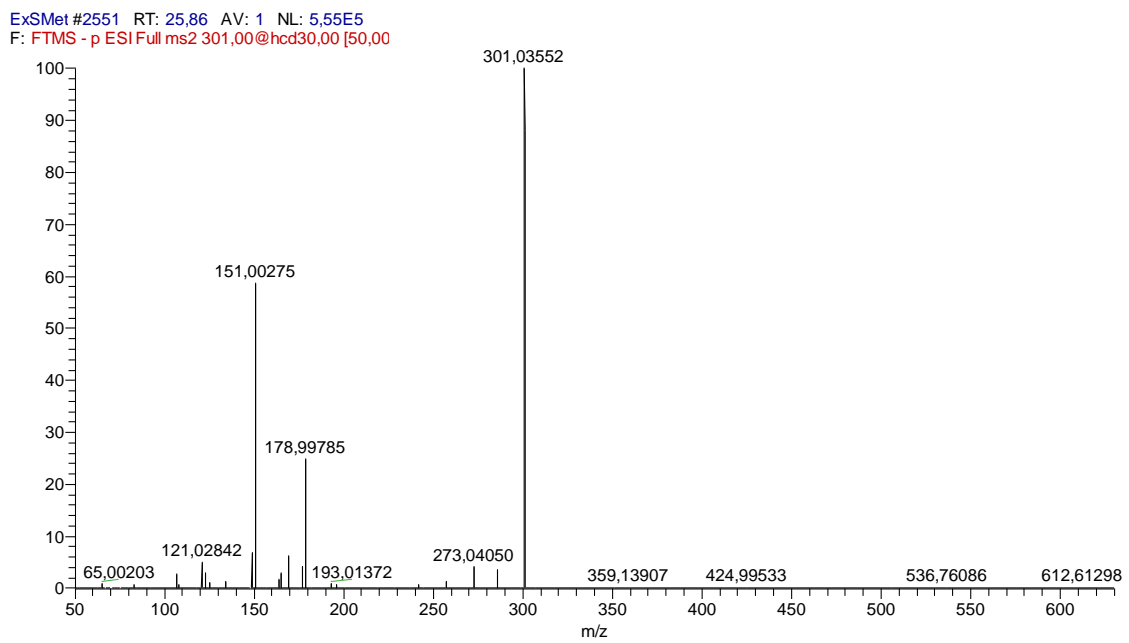
**Figura 57:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido cafeico no ExSMet.**Figura 58:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido gentísico no ExSMet.

**Figura 59:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença do ácido p-cumárico no ExSMet.



**Figura 60:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da rutina no ExSMet.



**Figura 61:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da quercetina no ExSMet.**Figura 62:** Cromatograma obtido por CLAE-EMAE mostrando a presença da luteolina no ExSMet.